



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



[Yüksek Lisans Tezi]

[BİYOLOJİK ATIK SU ARITMA SİSTEMLERİNDE  
BAKTERİYOFAJLARIN BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI]

[Şuheda REİSOĞLU]

[Biyoloji Anabilim Dalı]

[Biyoteknoloji Programı]

DANIŞMAN  
[Prof. Dr.] [Sevcan AYDIN]

[Aralık, 2023]

İSTANBUL

Bu çalışma, [22.12.2023] tarihinde aşağıdaki jüri tarafından [Biyoloji Anabilim Dalı],  
[Biyoteknoloji Programı]nda [Yüksek Lisans tezi] olarak kabul edilmiştir.

### Tez Jürisi

[Prof. Dr.] [Sevcan AYDIN] (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
[Fen Fakültesi]

[Doç. Dr.] [Muharrem BALCI]  
[İstanbul Üniversitesi]  
[Fen Fakültesi]

[Dr. Öğr. Üyesi] [Özlem ATEŞ DURU]  
[Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi]  
[Mühendislik Fakültesi]

## İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

## Proje Destekleri

[Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2023-39728 numaralı projesi ile desteklenmiştir. ]

## Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

1. Reisoglu, Ş., & Aydın, S. (2023a). Bacteriophages as a promising approach for the biocontrol of antibiotic resistance pathogens and the reconstruction of microbial interaction networks in wastewater treatment systems: A review. *Science of The Total Environment*, 164291.
2. Reisoglu, Ş., & Aydın, S. (2023b). Bacteriophage and Their Potential Use in Bioaugmentation of Biological Wastewater Treatment Processes. *Sustainability*, 15(16), 12216.

## ÖNSÖZ

[Bu tez çalışmasının gerçekleşmesinde bana her türlü yardım ve desteği sunan, kıymetli yönlendirmelerini, değerli eleştirilerini ve sabrını hiç esirgemeyen, beni bakteriyofajlar ile tanıştıran yeni bir bakış açısı sağlayan ve bu konuda çalışma imkânı sunan, birlikte uluslararası alanda büyük başarılar getirecek çalışmalar yapacağımıza inandığım Değerli Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Sevcan AYDIN'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüksek lisans dönem arkadaşlarım Ceren ÇATI ve Betül ORUÇOĞLU'na desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Son olarak, maddi ve manevi destekleriyle her an yanımda olan ve şu an bulunduğum noktada olmamdaki en büyük payın sahipleri aileme ve Yunus Emre USDA'ya en kalbi duygularıyla teşekkür ederim. ]

Aralık 2023

[Şuheda REİSOĞLU]

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

|  |           |
|--|-----------|
| [ÖNSÖZ .....   | iv        |
| İÇİNDEKİLER.....   | v         |
| ŞEKİL LİSTESİ .....  | vii       |
| SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....   | viii      |
| ÖZET .....   | ix        |
| SUMMARY .....  | xi        |
| <b>1. GİRİŞ .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2. GENEL KISIMLAR .....</b>   | <b>5</b>  |
| 2.1 BİYOLOJİK ATIK SU ARITMA SİSTEMLERİNDE BAKTERİYOFAJLAR.....  | 5         |
| 2.1.1 Litik fajlar .....   | 7         |
| 2.1.2 Lizojenik fajlar.....  | 8         |
| 2.2 ATIK SU ARITMA SİSTEMLERİNDE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİ PATOJENLERİN UZAKLAŞTIRILMASINDA BAKTERİYOFAJLARIN ROLÜ .....                  | 9         |
| 2.3 ATIK SU ARITMA SİSTEMLERİNDE MEMBRAN KİRLENMESİNİN BİYOKONTROLÜNDE BAKTERİYOFAJLARIN ROLÜ .....                                  | 10        |
| 2.4 BİYOLOJİK ATIK SU ARITMA SİSTEMLERİNDE MİKROBİYAL TOPLULUK YAPISININ YENİDEN DÜZENLENMESİNDE BAKTERİYOFAJLARIN POTANSİYELİ ..... | 12        |
| <b>3. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>  | <b>17</b> |
| 3.1. PİYOFAJ KOKTEYLİNİN İZOLASYONU VE ZENGİNLEŞTİRİLMESİ.....   | 17        |
| 3.2. AEROBİK MEMBRAN BİYOREAKTÖRÜNÜN ÇALIŞTIRILMASI.....   | 17        |
| 3.3. SHOTGUN METAGENOMİK DİZİLEME İLE MİKROBİYAL TOPLULUK ANALİZİ .....  | 18        |
| <b>4. BULGULAR .....</b>   | <b>21</b> |
| 4.1. AEROBİK MEMBRAN BİYOREAKTÖRÜNDE BAKTERİYOFAJLAR İLE PROKARYOTİK VE ÖKARYOTİK MİKROBİYAL ÇEŞİTLİLİK ARASINDAKİ ETKİLEŞİMLER..... | 21        |
| 4.2. BAKTERİYOFAJLARIN METABOLİK YOL ÜZERİNDEKİ ETKİSİ .....   | 22        |
| 4.3. AEROBİK MEMBRAN BİYOREAKTÖRÜNDE BAKTERİYOFAJ İLE ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİ ARASINDAKİ ETKİLEŞİMLER.....                        | 24        |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>   | <b>26</b> |

|                       |           |
|-----------------------|-----------|
| <b>KAYNAKLAR.....</b> | <b>32</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>  | <b>48</b> |



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

|   |    |
|---|----|
| Şekil 2.4.1: a) The Red Queen hipotezi, b) Kill the Winner hipotezi, c) Polivalenci (Reisoglu ve Aydın, 2023). .....                          | 13 |
| Şekil 2.4.2: Bakteriyofajların aerobik arıtma sistemlerinin biyougmentasyonunda potansiyel kullanımı (Reisoglu ve Aydın, 2023).....           | 14 |
| Şekil 3.2.1: Metagenom analiz akışı.....  | 19 |
| Şekil 4.1.1: BP reaktörünün çamurundaki baskın on taksonun bolluğu. (a) Filum düzeyinde, (b) Cins düzeyinde .....                             | 21 |
| Şekil 4.1.2: BP reaktöründeki toplam ökaryotik mikroorganizmaların (%0,02) ve Ascomycota'nın göreceli bolluğu.....                            | 22 |
| Şekil 4.2.1: BP reaktöründe KEGG yolak dağılımı.....  | 23 |
| Şekil 4.3.1: İçteki daire, ADG'leri içeren çeşitli filumların dağılımının temsili, dıştaki daire filumlardaki ADG'lerin oranını temsili ..... | 24 |
| Şekil 4.3.2: (a) Direnç genlerinin dağılımı, (b) direnç mekanizmaları ile filumlar arasındaki ilişki.....                                     | 25 |

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

### **Simgeler**                      **Açıklama**

|    |             |
|----|-------------|
| %  | : Yüzde     |
| °C | : Santigrat |

### **Kısaltmalar**                      **Açıklama**

|              |   |
|--------------|---|
| <b>AAT</b>   | : Atık su arıtma tesisleri                                    |
| <b>AOB</b>   | : Azot oksitleyici bakteriler                                 |
| <b>BAS</b>   | : Biyolojik atık su arıtma sistemleri                         |
| <b>EPS</b>   | : Hücre dışı polisakkarit madde                               |
| <b>FBO</b>   | : Fosfat biriktiren organizmalar                              |
| <b>LC/MS</b> | : Sıvı kromatografisi/kütle spektrometrisi                    |
| <b>MOİ</b>   | : Multiplicity of infection                                   |
| <b>MBR</b>   | : Membran biyoreaktörü  |
| <b>NOB</b>   | : Nitrit oksitleyen bakteriler                                |
| <b>PFU</b>   | : Plaque-forming unit   |
| <b>SEM</b>   | : Taramalı elektron mikroskobu (Scanning electron microscope) |
| <b>TAK</b>   | : Toplam askıda katı madde                                    |
| <b>TK</b>    | : Toplam katı madde   |
| <b>TGD</b>   | : Tüm genom dizileme  |
| <b>QS</b>    | : Quorum sensing  |
| <b>UFP</b>   | : Ultrafine particles   |
| <b>YGT</b>   | : Yatay gen transferi ]                                       |

## ÖZET

### [YÜKSEK LİSANS TEZİ]

#### [BİYOLOJİK ATIK SU ARITMA SİSTEMLERİNDE BAKTERİYOFAJLARIN BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI]

[Şuheda REİSOĞLU]

**İstanbul Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

[Biyoloji Anabilim Dalı]

**Danışman : [Prof. Dr.] [Sevcan AYDIN]**

[Bakteriyofajlar, spesifik bakterileri enfekte eden ve mikrobiyal ekosistemlerin evriminde önemli rol oynayan virüslerdir. Fajların spesifik konak hücreleri ile etkileşimi, mikrobiyomun içeriğini, fonksiyonunu ve evrimsel sürecini etkileyebilmektedir. Bu etkileşimin anlaşılması, çevre ve gıda mühendisliği gibi farklı mühendislik alanlarında mikrobiyal büyümeyi kontrol etmek için önem taşımaktadır. Biyolojik atık su arıtma tesislerinde yer alan mikrobiyal çeşitlilik ve aralarındaki genetik etkileşimler arıtma tesisinin verimli olarak işletilmesini sağlamaktadır. Dolayısıyla, tesisteki mevcut mikrobiyotanın stabilitesi, biyolojik atık su arıtma sistemlerinin kimyasal ve biyolojik kirleticileri gidermesi için önem taşımaktadır.]

Biyolojik atık su arıtma sistemlerinde yüksek bolluk ve çeşitlilikte yer alan fajlar, mikrobiyal çeşitliliğin değişimi için itici güçler olup konak hücreyi etkileyerek mikrobiyal çeşitliliği değiştirme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle faj-konakçı dinamiklerinin anlaşılması, biyolojik arıtma sürecinin kalitesini iyileştirmede büyük önem taşımaktadır. Önerilen tezde, beş farklı patojen bakteriye özgü litik faj içeren piyofaj kokteyli kullanılarak biyolojik atık su arıtımının önceliği olan fonksiyonel mikrobiyotanın iyileştirilmesi amaçlanmıştır. Fajlar tarafından modifiye edilebilen ökaryotik mikroorganizmalar da dahil olmak üzere tüm mikrobiyom için kapsamlı veri elde etmek amacıyla aerobik membran biyoreaktörüne faj kokteyli ve antibiyotik uygulaması yapılarak süreç sonunda reaktörden alınan numunede shotgun metagenomik dizileme analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz ile fajların spesifik olduğu patojenleri etkili bir şekilde giderme potansiyeline ek olarak, fajların genel olarak mikrobiyal komünite yapısına,

faj-mikrobiyal komünite etkileşimi sonucu metabolik süreçlerde aktif rol oynayan metabolik yollara ve reaktördeki antibiyotik direnç genleri dağılımına etkisi izlenmiştir. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: FYL-2023-39728. ]

Aralık 2023, [60] sayfa.

**Anahtar kelimeler:** [ Bakteriyofaj, Biyoaugmentasyon, Mikrobiyota, Metagenomik Dizileme ]



## **SUMMARY**

**[M.Sc. THESIS]**

### **[BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF BACTERIOPHAGES IN BIOLOGICAL WASTEWATER TREATMENT PROCESSES]**

**[Şuheda REİSOĞLU]**

**Istanbul University**

**Institute of Graduate Studies in Sciences**

**[Department of Biology]**

**Supervisor : [Prof. Dr.] [Sevcan AYDIN]**

[Bacteriophages are viruses that infect specific bacteria and play an important role in the evolution of microbial ecosystems. The interaction of phages with specific host cells can affect the content, function and evolutionary process of the microbiome. Understanding this interaction is important to control microbial growth in different engineering fields such as environmental and food engineering. Microbial diversity in biological wastewater treatment plants and microbial dynamics between them ensure the efficient operation of the treatment plant. Therefore, the stability of the existing microbiota in the process is important for biological wastewater treatment systems to remove chemical and biological pollutants.

Phages, which are present in high abundance and diversity in biological wastewater treatment systems, are driving forces for the change of microbial diversity and have the ability to change microbial community diversity by affecting the host cell. Therefore, understanding phage-host dynamics is of great importance in improving the quality of the biological treatment process. In the proposed thesis, it is aimed to improve the functional microbiota, which is the priority of biological wastewater treatment, by using a pyophage cocktail containing lytic phages specific to five different pathogenic bacteria. In order to obtain comprehensive data for the entire microbiome, including eukaryotic microorganisms that can be modified by phages, phage cocktail and antibiotics were applied to the aerobic membrane bioreactor and shotgun metagenomic sequencing analysis was performed on the sample taken from the reactor at the

end of the process. With this analysis, in addition to the potential of phages to effectively eliminate pathogens for which they are specific, the effects of phages on the microbial community structure, metabolic pathways that play an active role in metabolic processes as a result of phage-microbial community interaction, and the distribution of antibiotic resistance genes in the reactor were monitored. This thesis study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Coordination Unit. Project number: FYL-2023-39728. ]

December, 2023 [60] pages.

**Keywords:** [Bacteriophage, Bioaugmentation, Microbiota, Metagenomic Sequencing]



## 1. GİRİŞ

[Sucul ekosistemlerin fizikokimyasal özelliklerinde ve biyolojik sağlığında belirgin bir düşüşle kendini gösteren, su kalitesinde gözle görülür bozulma uzun yıllardır endişe kaynağı olup bu bozulma, esas olarak, artan insan nüfusu ve endüstriyel faaliyetlerin birleşiminden kaynaklanmaktadır. Atık su arıtma tesisleri (AAT), tıbbi kurumlar, tarımsal araziler, mezbahalar, hayvancılık, ilaç üretimi ve evsel atık suları da dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan gelen çok miktarda atık suyun iyileştirilmesinde önemli bir rol üstlenmektedir. Atık su iyileştirme süreçlerinin yetersiz kaldığı durumlarda, atık sudan zararlı kirleticilerin uzaklaştırılması mümkün olmayabilir ve atık suyun bu şekilde deşarj edilmesi durumunda hem insan ve çevre sağlığı hem de sucul ekosistemler için zararlı sonuçlar doğurabilir (Chowdhary ve diğ., 2020). Sonuç olarak, atık suyun etkili ve akılcı bir şekilde arıtılması, bilimsel inceleme ve pratik zorunluluk açısından oldukça önemli bir konuma yükselmiştir. Atık su arıtımında arazi uygulaması, kimyasal arıtma ve kanalizasyona deşarj dahil olmak üzere halihazırda çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemler doğal sınırlamalarla ilişkilidir. Arazi uygulaması ve kanalizasyon deşarj yöntemleri sıklıkla olumsuz kokulara ve su ortamlarının kirlenmesine neden olmaktadır. Ek olarak, kimyasal arıtma proseslerinin kullanımı, yüksek arıtma maliyetleri ve kimyasal içeren atık çamur yönetiminin lojistik sorunlara ve harcamaların artmasına neden olması sebebiyle tercih edilmemektedir (Aziz ve diğ., 2019).

Biyolojik atık su arıtma sistemleri (BAS), kirleticilerin atık sudan uzaklaştırılması için çevre dostu ve uygun maliyetli özellikleriyle karakterize olmuş önemli bir çözüm alternatifi teşkil etmektedir. BAS, atık sudan organik madde, azot ve fosforun uzaklaştırılmasından sorumlu olan çeşitli fonksiyonel bakteri popülasyonlarının fonksiyonuna dayanır. Heterotrofik bakteriler organik maddelerin uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynarken amonyak oksitleyici bakteriler (AOB) nitrifikasyona katkıda bulunur, denitrifikasyon bakterileri azotun uzaklaştırılmasına yardımcı olurken fosfat biriktiren organizmalar (FBO) fosfor gideriminde çok önemli bir rol oynar (Cyzdik-Kwiatkowska ve diğ., 2012). Etkili kirletici giderimi, bu fonksiyonel gruplar arasındaki işbirlikçi etkileşimler yoluyla gerçekleştirilir (Liu ve diğ., 2021).

Biyolojik atık su arıtma sürecinde bakteriyel gruplar, popülasyon yoğunluğunu ve davranışlarını Quorum sensing (QS) olarak bilinen hücreden hücreye iletişim yolu aracılığıyla modüle eder. Bu mekanizma yalnızca bakteriyel biyofilmlerin oluşumundan değil aynı zamanda kirleticilerin uzaklaştırılmasının düzenlenmesinden, patogenezin kontrol edilmesinden ve biyofilm topluluğunun bileşiminin ve davranışının belirlenmesinden de sorumludur (Paluch ve diğ., 2020) BAS'deki bakteri topluluğunun hedefe yönelik manipülasyonu, etkili bir arıtma ve kirleticilerin en uygun şekilde uzaklaştırılmasında kritik bir rol oynadığı için büyük ilgi görmektedir (Maddela ve diğ., 2019) .

Son yıllarda, sınırlı alan mevcudiyeti ve geleneksel arıtma sistemlerine özgü sıkı deşarj standartları gibi kısıtlamalar nedeniyle yüksek kaliteli atık su arıtmaya yönelik zorunlu ihtiyaca bir yanıt olarak alternatif arıtma sistemlerine yönelik ilgi artmıştır. Dikkate değer ve umut verici yaklaşımlardan biri hem evsel hem de endüstriyel atık suyun arıtımında yaygın olarak benimsenen membran biyoreaktör (MBR) teknolojisinin kullanımınıdır. MBR, aktif çamur prosesinin membran filtrasyon teknikleriyle yenilikçi bir birleşimini temsil eder ve atık suyun arıtılarak geri dönüştürülmesi için etkili bir araç sunar (G. Wen ve diğ., 2010). Bu sistem içerisinde, tanımlanmış molekül ağırlığı kesim değerlerine sahip membranlar, kesme eşiklerini aşan kirleticileri yakalamada bir moleküler elek görevi görür. Bu, kirleticiler ile MBR'de bulunan bozundurucu mikroorganizmalar arasında doğrudan temasa olanak tanır ve böylece kirleticilerin kapsamlı bir şekilde bozunmasını sağlar (Goswami ve diğ., 2018). MBR teknolojisi, özellikle çeşitli kaynaklardan gelen atık sularla ilgilenirken güçlendirilmiş arıtma potansiyeli sayesinde, aktif çamur sistemi ya da fiziksel ve kimyasal arıtma gibi geleneksel arıtma yöntemlerinden daha iyi performans göstermesinden dolayı atık su arıtımı için cazip bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Ek olarak MBR, biyoreaktör içindeki çamur koşullarından bağımsız olarak tutarlı arıtma kalitesi sağlayarak nispeten az bakım gereksinimi ile avantajlı bir kullanım sunmaktadır. Hem çamur üretimini azaltmada hem de besinlerin, organik bileşiklerin ve kirleticilerin yüksek uzaklaştırma oranlarına ulaşmada etkili sonuçlar sağlamaktadır. Sistemin kompakt fiziksel ayak izi, yerden tasarruf sağlayan çözümler sunarak çekiciliğini daha da vurgulamaktadır. Özellikle, BAS'ın membran filtrasyonu ile birleştirilmesi, AATlerde giderek artan bir endişe olan mikroorganizmaları tutma kapasitesini önemli ölçüde artırmaktadır (Lebleu ve diğ., 2010).

Biyolojik atık su arıtım sürecinin etkinliği, mikroorganizmalar arasındaki etkileşime önemli ölçüde bağlıdır ve hem biyo-çamurun hem de atık suyun özellikleri bu sistemin verimliliği üzerinde çok önemli bir etkiye sahiptir. Mikrobiyal türler arasındaki etkileşimlerin optimize edilmesi ve mikrobiyal topluluk kompozisyonunun modüle edilmesi, sürdürülebilir bir sürecin sağlanmasında önemli bir etki yaratabilir. Bu bağlamda, kısaca faj olarak adlandırılan bakteriyofajlar, belirli bakteri türleri üzerinde hedeflenen litik etkileri aracılığıyla aerobik BAS süreçlerini geliştirmek için umut verici ajanlar olarak ortaya çıkmaktadır. Mikrobiyal topluluk dinamiklerini seçici olarak manipüle etmek için fajların kullanılması, aerobik BAS'da karşılaşılan zorluklara potansiyel çözümler sunmakta ve sonuç olarak AATlerde arıtma verimliliğinin artmasına katkıda bulunmaktadır (Reisoglu ve Aydin, 2023). Tek faj türüne karşı bakteriyel direncin gelişme ihtimali göz önüne alındığında, genellikle faj kokteylleri olarak adlandırılan spesifik faj karışımlarının kullanılmasının çeşitli tedavi süreçlerinde daha etkili olduğu kanıtlanmıştır (Abedon ve diğ., 2021). Çeşitli faj türlerini içeren faj kokteylleri, konakçı aralığını genişleterek bakteriyel patojenler arasındaki faj direncini azaltır. Faj tedavisinin uyarlanabilirliği hem aerobik hem de anaerobik BAS süreçlerinde etkili bir şekilde uygulanabildiğinden, mevcut operasyonel dinamiklerde önemli değişiklikler ve uyarlamalar gerektirmeden çeşitli sistemlerde kullanılabilirliği özellikle dikkate değerdir (Zhang ve diğ., 2020).

BAS sistemlerinde mikrobiyal toplulukların iç dinamiklerini anlamak ve yönetmek çok önemlidir. 16S rRNA dizilimi, mikrobiyal topluluğun tanımlanması ve karakterizasyonu için yaygın olarak kullanılan bir teknik olmaya devam etse de özellikle genetik çeşitlilik ve topluluk dinamikleri ile ilgili yüksek çözünürlüklü verilerin sağlanmasında çeşitli sınırlamalar taşımaktadır. Sonuç olarak, 16S rRNA dizilemesinin kısıtlamalarının üstesinden gelmeyi amaçlayan, nispeten pahalı olsa da daha kapsamlı bir yaklaşım olan tüm genom dizilemeye (TGD) doğru belirgin bir değişim olmuştur. TGD, mikrobiyal toplulukları daha derinlemesine incelenmesine olanak tanıyarak salt taksonomik tanımlamanın ötesine geçen bilgiler sağlamaktadır. Bu dizileme yöntemi, tüm genetik repertuarın, metabolik yolların ve topluluk içindeki karmaşık mikrobiyal etkileşimlerin araştırılmasını kolaylaştırmaktadır (Hasan ve diğ., 2014; Lazarevic ve diğ., 2012).

Planlanan tez çalışmasında, BASlarda önemli bir unsur olan fonksiyonel mikrobiyota üzerinde, sucül ekosistemlerde antropojenik baskı uyguladığı bilinen üç yaygın antibiyotiğin (eritromisin,

tetrasiklin ve sülfametoksazol) kullanımına ek olarak faj kokteyli ile biyo-augmentasyonun etkisini değerlendirmek amaçlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan faj kokteyli, Gürcistan'ın Tiflis kentinde bulunan Eliava Enstitüsü'nden temin edilmiştir ve kokteyli oluşturan fajlar, özellikle *Staphylococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sp.*, *Proteus sp.* ve *Pseudomonas sp.* olmak üzere beş bakteri türüne karşı etkinliğe sahiptir. Çalışma bulguları fajların, mikrokaryotları kapsayan tüm mikrobiyom üzerindeki önemli etkisini ve bunların karbonhidrat ve amino asit metabolizmalarıyla ilişkili metabolik yollar üzerindeki belirgin etkilerini aydınlatmıştır. Bu alışma, AATlerdeki mikrobiyal toplulukların işlevsel kapasitelerini geliştirmek için fajların umut verici araçlar olarak taşıdığı potansiyelin altını çizmektedir.



]

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1 BİYOLOJİK ATIK SU ARITMA SİSTEMLERİNDE BAKTERİYOFAJLAR

Fajlar tipik bakteri hücresinden yaklaşık 1 ila 2 kat daha küçük virüsler olup boyutları 20 nm ila 200 nm arasında değişirken, bazı fajların boyutları 600 nm'ye kadar ulaşabilmektedir (Iyer ve diğ., 2021). Yapısal bileşimleri nispeten basit olup tek ya da çift sarmallı DNA ya da RNA olabilen faj genomunu içeren bir protein kapsid içerirler. Bazı durumlarda, bir lipit membran, genetik materyali kapsid içerisinde kaplayabilir (Hatfull ve Hendrix, 2011). Fajlar genellikle fajın bakteri hücre duvarına yapışmasıyla başlayan ve ardından genetik materyalini konakçıya enjekte eden litik bir enfeksiyon döngüsüne girer. Litik bir enfeksiyon, efektif viral parçacıklar olan yeni nesil virionların senteziyle sonuçlanır ve bu virionlar, konakçı hücre lizise uğradığında serbest kalmak üzere salınır. Bununla birlikte faj genomu, lizojenik enfeksiyon türü olan konakçı hücre lizisini indüklemeyen bakteri genomuna da entegre olabilir. Lizojenik enfeksiyonlarda virionların ekspresyonu ve salınımı yalnızca konakçının dış strese maruz kalması durumunda meydana gelir. Diğer bir deyişle, konağın büyümesine ve çevre koşullarına bağlı olarak yaşam döngülerinde farklılıklar gözlemlenebilmektedir (Howard-Varona ve diğ., 2017; Ogilvie ve Jones, 2017).

Tasarlanmış biyolojik sistemler, atık su arıtımını ve biyoenerji taşıyıcılarının üretimini kapsayan çok sayıda çevresel uygulamada önemli bir rol oynamaktadır. Atık su arıtımı, biyolojik karbon ve besin giderimini kolaylaştırmak için tasarlanmış mikrobiyolojik işlemlere dayanır. Bu prosesler, aktif çamur gibi askıda büyüme teknikleri, bağlı büyüme ve biyofilm proseslerinin (örneğin; damlatmalı filtreler, hareketli yataklı biyofilm reaktörleri ve aerobik granüler çamur) yanı sıra BAS olarak tanımlanan anaerobik çürütücüleri kapsar (Runa ve diğ., 2021). Fajların BAS'daki rolü, bakteriyel komünite üzerindeki potansiyel etkilerinden dolayı giderek daha fazla dikkat çekmiş, dolayısıyla süreç verimliliğini ve atık su kalitesini etkilemiştir (Wu ve diğ., 2017). Bununla birlikte, fajların BAS'da incelenmesi, deniz ve tatlı su ortamlarının yanı sıra toprak da dahil olmak üzere diğer ekosistemlerde, özellikle de klinik düzeydeki ilgisi kadar ilgi görmemiştir (Lawrence ve diğ., 2019; Principi ve diğ., 2019). BASlardaki faj kimliğinin, bolluğunun ve işlevlerinin daha derinlemesine anlaşılması sistemin daha sağlam ve

verimli çalışmasına imkan vererek hedeflenen atık su arıtım seviyelerine ulaşma ve suyun yeniden kullanımını teşvik etme konusundaki önemli zorluklara çözüm getirebilir.

Metagenomik dizileme, mikrobiyal toplulukların tamamını keşfetmek için değerli bir araç olarak büyük ilgi görürken BAS bünyesindeki viral çeşitliliği araştırmak için de etkili bir şekilde fayda sunmaktadır. Kültürden bağımsız bu yöntem, tek başına ya da kültüre dayalı teknikleri tamamlamak için kullanılmaktadır (Brum ve Sullivan, 2015). Fajların BAS ortamlarındaki baskın virüs türü olduğu düşünülse de enterik ya da arkeal virüsler de dahil olmak üzere viral popülasyondaki fajları seçici olarak saymak ya da ayırt etmek her zaman mümkün olmamaktadır (Runa ve diğ., 2021). Uygulanan yöntemlerin bu ayırmaya imkân vermediği genel olarak "virüs" terimi kullanılmaktadır (Weitz ve diğ., 2019). AATlerde yer alan fajların genel çeşitliliği, toprakta bulunan çeşitliliğe benzer şekilde deniz ortamlarında gözlemlenenen daha düşüktür, ancak insan dışkıdaki viral çeşitlilikten daha yüksektir (Tamaki ve diğ., 2012). Fajların bolluğu ve çeşitliliği, süreç boyunca farklı şekillerde değişme eğilimindedir. Ham kanalizasyondaki viral yükün mililitre başına yaklaşık  $10^8$  viral parçacık ( $ml^{-1}$ ) olduğu tahmin edilmektedir (Tamaki ve diğ., 2012). İkincil arıtma ünitelerinde virüs konsantrasyonu, aktif çamur proseslerinde yaklaşık  $10^9$  viral partikül  $ml^{-1}$ 'e ve anaerobik çürütücülerde  $10^{10}$  viral partikül  $ml^{-1}$ 'e yükselirken çıkış atık suyundaki konsantrasyon daha düşük seyredir (Runa ve diğ., 2021). Bununla birlikte, arıtılan atık sudaki virüslerin bolluğu, yaklaşık  $10^8$  viral partikül  $ml^{-1}$  konsantrasyonuyla azalır (Wu ve Liu, 2009). Gözlenen bu azalmaya ilişkin kesin bir açıklama mevcut olmamakla birlikte, arıtma aşamasında bakterilerle birlikte virüslerin de ortadan kalkıyor olması ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca, atık suyun önceki arıtma aşamalarıyla karşılaştırıldığında ihmal edilebilir düzeyde potansiyel konakçı konsantrasyonu içerebildiği görüşüyle birlikte üçüncül arıtma uygulandığında virüs konsantrasyonlarının daha da azalacağı görüşü mevcuttur. Farklı AATler, giriş atık suyu ve çalışma koşullarına bağlı olarak faj konsantrasyonlarında farklılıklar gösterebilir (Petrovich ve diğ., 2019).

Bazı çalışmalarda BASlarda viriomu karakterize etmek için dizileme yöntemleri kullanılmıştır. Aktif çamurdaki virüslerin karşılaştırmalı metagenom analizi, Myoviridae, Siphoviridae ve Podoviridae dahil olmak üzere hepsi Caudovirales takımı içinde, sırasıyla %40,3, %31,9 ve %25,6 göreceli bolluklarda baskın viral grupları tanımlamıştır (Parsley ve diğ., 2010). Aktif çamur, ham kanalizasyon ve anaerobik sindirim üzerine yapılan diğer metagenomik çalışmalar

da bu viral aileleri baskın olarak bildirmiştir (Aw ve diğ., 2014; Heyer ve diğ., 2019; Petrovich ve diğ., 2019). Bununla birlikte, bu çalışmalarda elde edilen genomik dizilerin yalnızca yaklaşık %5'inin, veri tabanlarındaki bilinen viral genomlarla örtüşmesi dikkat çekicidir; bu, BASlardaki benzersiz bir viromu gösterir. Baskın viral ailelerinin tanımlanmasına rağmen virom, hacimli ve hacimsiz aktif çamur ya da bağlı büyüme ile askıya alınmış büyüme gibi farklı koşullar karşılaştırıldığında cins ve tür seviyelerinde önemli farklılıklar sergiler (Yang ve diğ., 2017). Arıtma sistemleri, 14 atık su arıtma tesisinde viral genom üzerine yapılan bir çalışmada gözlemlendiği gibi, bir arıtma prosesi ya da belirli bir coğrafi alan için ortak olan karakteristik bir genomik parmak izi de dahil olmak üzere faj popülasyonunun önemli bir bölümünü paylaşabilir (Ottawa ve diğ., 2007). Benzer bir durum, süreçlere ve operasyonel moda bağlı olarak belirli bakteri gruplarındaki farklılıklara rağmen, ortak bir organizma çekirdeğini paylaşan BASların prokaryotik topluluklarında küresel olarak gözlemlenmektedir. Ayrıca metagenomik çalışmalar bakteri genomunun analizini kapsarken, bu parmak izleri yalnızca "serbest" fajları değil aynı zamanda profajları da kapsar (Parsley ve diğ., 2010; Petrovich ve diğ., 2019). Genomik parmak izinin oluşturulması, faj-konak sistemlerindeki dinamikler, belirli temel fonksiyonel bakterilerdeki düşüşler ve fajların sistem içindeki göçü ile ilgili soruların yanıtlanmasında da etkili olabilir.

### 2.1.1 Litik fajlar

Organizmaların büyümesinin ve bolluğunun öncelikli olarak besin varlığından ziyade yırtıcılıkla şekillendiği ekolojik prensip ile ilgili olan 'top-down' olarak bilinen olgu, BAS içindeki mikrobiyota bağlamında iyi bir şekilde ortaya konmuştur (Tang ve diğ., 2022). Tipik olarak, öldürücü fajlar ya da diğer ismiyle litik fajlar ve bunların konakçı mikroorganizmaları arasındaki ilişkinin 'Kill-the-Winner' hipoteziyle örtüştüğü düşünülmektedir (Bu hipotezden 2.4 kısmında daha detaylı bahsedilecektir). Lotka-Volterra türler arası rekabet modeline dayanan bu hipotez, mikrobiyal popülasyonlar üzerinde etkili olan negatif frekansa bağlı seçilimin, fajlar ve konakçılar arasındaki etkileşimi yönlendiren temel mekanizma olduğunu öne sürmektedir (Winter ve diğ., 2010).

Litik fajlar, yeni virionların salınması sırasında mikrobiyal konakçıları parçaladıkları bir strateji sergilerler. Litik fajların bu yırtıcılığı, AAT'lerde fonksiyonel mikrobiyotanın stabilitesine yönelik bir tehdit oluşturmaktadır. Öte yandan, faj aracılı negatif frekansa bağlı seçim çerçevesinde, nadir mikrobiyal taksonlar kendilerini enfekte edebilecek faj ortaya

çıkana kadar çoğalma fırsatına sahiptir (Alkhalil, 2023). Bu dinamik etkileşim, belirli mikrobiyal popülasyonlarda periyodik dalgalanmalara yol açabilir ve sonuçta bakteri çeşitliliğinin korunmasına katkıda bulunabilir. Negatif frekansa bağlı seçilim kavramı, farklı mikrobiyal türlerin bir arada bulunmasını kolaylaştırırken, daha rekabetçi olan konakçı genotiplerinin baskınlığını düzenlemeye yardımcı olur (Bouvier ve Del Giorgio, 2007). Sonuçta litik fajlar, tek bir baskın türün kontrolsüz genişlemesini dengelediklerinden dolayı bakteri çeşitliliğini teşvik ve kontrol etme eğilimi gösterirler. Biyolojik atık su arıtımı bağlamında litik fajlar, yoğun rekabet ortamında topluluk çeşitliliğini korumada önemli bir rol oynayabilir. Bu topluluk çeşitliliği, BASlarda işlevsel yedekliliği sağlamak için temeldir (Shapiro ve diğ., 2010).

### 2.1.2 Lizojenik fajlar

Çeşitli ekolojik habitatlarda öldürücü (litik döngü) ve ılıman (lizojenik döngü) fajların dağılımı eşit olmamakla birlikte faj dağılımının kısmen konakçı yoğunluğundan etkilendiği bilinmektedir (Erez ve diğ., 2017). Tipik olarak litik döngü, konakçı çoğalıp yüksek yoğunluklara ulaştığında tercih edilirken, konakçı bolluğunun düşük olduğu durumlarda lizojenik döngü daha yaygın olarak görülür. Bu klasik kavram teorik ve deneysel çalışmalarla iyi bir şekilde desteklenmektedir, ancak çevresel araştırmalardan elde edilen veriler değişen sonuçlar sunmaktadır. Bazı çalışmalar litik ya da lizojenik fajların sıklığı ile konakçı yoğunluğu arasında pozitif ya da negatif korelasyonlar bildirirken (Liang ve diğ., 2020), bazı çalışmalar ise zayıf ya da hiçbir korelasyon göstermemiştir (Knowles ve diğ., 2017). Knowles ve diğ. (2016) lizojenik enfeksiyon ile konakçı yoğunluğu arasındaki ilişkiyi tanımlamak için “Piggyback-the-Winner” modelini önermiştir. Bu modele göre, mikrobiyal yoğunluğun yüksek olduğu ekosistemlerde lizojeni giderek yaygınlaşmaktadır. Yüksek konakçı yoğunluklarında, ılıman fajlar, konakçıları lizojen yoluyla sömürmek için tercih edilebilir. Ek olarak konakçı yoğunluğu arttıkça konakçıların ilgili virüslerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı direnci daha kritik hale gelebilir (Thingstad ve diğ., 2014).

AAT’lerde öldürücü ve ılıman fajların dağılımı, biyolojik atık su arıtımındaki karmaşık beslenme durumundan dolayı belirsizlik taşımaktadır (Tang ve diğ., 2022). Belediye atık suyu tipik olarak bol miktarda besin maddesi (örneğin azot ve fosfor) içererek besin açısından zengin bir ortam teşkil etmektedir. Bununla birlikte, çamurdaki mikropların yüksek yoğunluğu, kaynaklar için şiddetli bir rekabete yol açmakta ve bu da bireysel hücreler için sınırlı besin

varlığına yol açmaktadır. AAT'lerde, lizojenik enfeksiyonlar ekolojik avantajlar sağlayabileceğinden lizojenik strateji tercih edilebilir. Serbest faj parçacıkları atık sularla birlikte sürekli olarak uzaklaştırılırken profajlar ve bunların konakçı bakterileri sistem içinde tutulur (Breitbart ve diğ., 2018). Genel olarak, toplam bakteri popülasyonu içindeki lizojenlerin (uyarılabilir bir profaj içeren bakteri hücreleri) oranı, farklı çevresel faktörlere ve indüksiyon yöntemlerine bağlı olarak, tespit edilemeyecek düzeyden %80'in üzerine kadar değişiklik gösterir (Weinbauer, 2004). Ilıman fajların çeşitli bir grup olduğunu belirtmek önemlidir, çünkü bu tarz fajların hepsi enfeksiyon üzerine lizojenik döngüye girmez (Feiner ve diğ., 2015). AAT'lerdeki lizogeni yüzdesine ilişkin spesifik tahminler bulunmamasına rağmen, ılıman fajların benzersiz yaşam döngüleri nedeniyle önemi hafife alınmamalıdır. Özellikle kayda değer olan, ılıman fajların "top-down" etkiyi karmaşık hale getirebilmesidir, çünkü profajlar, dış uyaranlara yanıt olarak veya kendiliğinden hareketsiz bir durumdan litik döngüye geçebilirler.

## **2.2 ATIK SU ARITMA SİSTEMLERİNDE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİ PATOJENLERİN UZAKLAŞTIRILMASINDA BAKTERİYOFAJLARIN ROLÜ**

Farklı biyolojik ya da kimyasal arıtma metotları kullanılmasına rağmen AAT'lerin patojenlerin uzaklaştırılmasında tam olarak etkili olamayıp yetersiz kaldığı birçok çalışmada rapor edilmiştir. Higgins ve diğ. (2018) fırsatçı patojen *Acinetobacter baumannii*'nin AAT'lerin tüm aşamalarında yayıldığını ve daha sonra atık su yoluyla proseten çevreye salındığını belirtmiştir. Oliveira ve diğ. (2021) deşarj edilen atık su numunelerinde karbapeneme dirençli bakterileri göstererek, konvansiyonel atık su arıtma proseslerinin patojenlerin uzaklaştırılmasındaki verimsizliğini belirtmiştir. Raza ve diğ. (2022) ayrıca 12 farklı AAT'nin çekirdek direnç profillerini incelemişler, klinik açıdan önemli olan antibiyotik direnç genlerinin mevcut arıtma yöntemleriyle tam olarak giderilemediğini ve arıtma sonunda dirençli patojenlerin doğaya salındığını bildirmişler ve ayrıca antibiyotik oluşumunu tetikleyebilecek bazı antibiyotiklerin de bulunduğunu belirtmişlerdir. Patojen bakterilerin yok edilmesi amacıyla alternatif biyolojik tedavi yaklaşımları geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu girişimlerden biri de mikroalgal-bakteriyel sistemin kullanıldığı bir çalışmadır. Bu araştırmada Ruas ve diğ. (2022), atık sudaki patojenik bakterilerin daha iyi uzaklaştırılmasının, yalnızca aktif çamur kullanmak yerine mikroalgal-bakteriyel karışık kültür kullanılarak başarıldığını göstermiştir. Ancak her patojen bakterinin, giderim sonuçlarını etkileyebilecek kendine özgü

inaktivasyon mekanizmaları sergilemesi nedeniyle, kültür ve çalışma koşulları açısından mikroalg ve aktif çamurdan oluşan karışık kültürün kullanılması gerekebilir. Diğer biyolojik mücadele yöntemlerinde olduğu gibi fajlarla yapılan biyokontrol, patojenlerin uzaklaştırılmasında kimyasal kullanımını hafifletmektedir. Bu noktada fajlara yönelik birkaç özellik dikkate değer bir rol oynuyor. Fajlar, patojen yoğunluğuna bağlı olarak çoğalabilen, kendi bakterisinin bulunduğu yerde kolaylıkla bulunabilen, bakteriye özgü ajanlardır. Hedeflerine karşı duyarlı oldukları için normal floraya neredeyse hiç zarar vermezler ve düşük toksisiteye sahiptirler. Antimikrobiyal dirençli bakterilere karşı da aynı derecede başarılıdır ve çeşitli bakterilerin oluşturduğu biyofilm oluşumlarını kırmada etkilidirler. Bu değerli özellikler onları antibiyotiğe dirençli bakterilerle mücadelede umut verici araçlar haline getiriyor. Örneğin Siang Tan (2020) ham kanalizasyon atık suyundan izole ettikleri fajlar ile metisiline dirençli *S. aureus*'u etkili bir şekilde tedavi ettiklerini belirtmişlerdir. Benzer şekilde Grami ve diğ. (2022) faj PA25'in atık sudaki *Pseudomonas aeruginosa* patojenine karşı etkinliğini ortaya koymuştur. Bu yeni izole edilmiş faj, atık sudaki bakteri yoğunluğunu ve hedef bakterideki antibiyotik direncini uygun şekilde azaltmıştır. Başka bir çalışmada Ben Saad ve diğ. (2022), farklı koşullar altında bakteriyel inaktivasyonu izlemek için belirli *Salmonella typhi* bakterisine yönelik faj biyoinokülasyonunu uygulamıştır. Araştırmacılar, 103 UFP/mL'ye eşit konsantrasyonda faj enjekte ettiklerinde bakteriyel azalmada %90 oranında iyileşme elde etmişler ve enjekte edilen faj titresi 105 UFP/mL olduğunda bu bozunma oranı neredeyse %99'a çıkmıştır. Ayrıca Dhevagi ve Anusuya (2013) *Salmonella* sp. ve *E. coli* fajlarının kanalizasyon çamurundaki hedef patojenlere karşı etkili olduğunu göstermiştir.

### **2.3 ATIK SU ARITMA SİSTEMLERİNDE MEMBRAN KİRLENMESİNİN BİYOKONTROLÜNDE BAKTERİYOFAJLARIN ROLÜ**

Membran biyoreaktör sistemleri gelişmiş atık su arıtma stratejileri olsa da ve geleneksel yaklaşımlara göre daha yüksek eliminasyon kapasitelerine sahip olsalar da biyofilm yapılarındaki artan antibiyotik direncinden kaynaklanan çevresel ve tıbbi bir sorun olan biyolojik kirlilik, membran biyoreaktör sistemlerinde kaçınılmaz bir sorun olup sistemin verimli bir şekilde çalışmasına engel olabilmektedir (Zhen ve diğ., 2019). Bakteriler geliştirdikleri hayatta kalma mekanizması ile dezenfektanlar ve antibiyotikler gibi çevresel streslere karşı korunmak amacıyla biyofilmler üretebilmekte ve bu biyofilmler istenmeyen koşullar altında popülasyonun güvenliğini sağlamaktadır. Artan tolerans nedeniyle

antimikrobiyal konsantrasyon öldürücü olmayan bir seviyeye ulaşmakta ve bu durum biyofilm yapısındaki direncin artmasının yanı sıra dirençli popülasyonların seçilimine de yol açmaktadır. Fajlar, biyoreaktördeki arıtma sürecini bozan istenmeyen mikroorganizmaları barındıran AATlerdeki biyolojik kirlenmenin kontrol edilmesinde potansiyel olarak görülmektedir. Bu bağlamda Bhattacharjee ve diğ. (2015) AATden izole ettikleri litik faj ARB1'in, antibiyotiğe dirençli *Delftia tsuruhatensis* türü tarafından oluşturulan membran filtreleri üzerindeki bakteriyel biyofilmi etkili bir şekilde giderebildiğini göstermiştir. Liu ve diğ. (2015), *Gordonia* G11 ve G7 suşları ile köpüren aktif çamurda uyguladıkları faj kokteylinin kontrol reaktörü ile karşılaştırıldığında bakteriyel azalmada on kat etkili olduğunu bulmuşlardır. Membran biyolojik kirliliği problemlerinin çözümünde faj uygulamasının bir başka örneği Ayyaru ve diğ. (2018)'lerinin çalışmasında ortaya konmuştur. Belediye atık suyundan bir bakteriyi ve ilgili fajı izole ederek litik fajların membran biyolojik kirlenmesi üzerindeki etkisini izlemiştir. Geçirgenlik akısı ve SEM kullanarak bakteri ve faj süspansiyonunun etkisini araştırdıklarında, litik fajın bakteriyel inhibisyon ve biyofilm oluşumunun ortadan kaldırılması üzerindeki başarısına gözlemlemiştir. Ayrıca Aydın ve Can (2020) piyofaj kokteylinin bir MBR biyofilm yapısındaki aerobik mikrobiyal topluluk üzerindeki etkisi ile membran kirliliğinin giderilmesindeki etkisini incelemiştir. Piyofajın farklı dozlarda uygulanmasına bağlı olarak, biyolojik olarak güçlendirilmiş piyofaj kokteylinin, biyofilm üreten bakterilerin baskılanması ve aerobik membran biyoreaktör sisteminin performansının artırılması ile biyofilm membranının mikrobiyal topluluğu üzerindeki olumlu etkisini göstermişlerdir. Ferreira ve diğ. (2021), filamentli ve hacim artışına neden olan bir bakteri olan *Sphaerotilus natans*'a karşı etkili olan SnaR1 adlı fajı, bu istenmeyen patojeni önlemek için AAT'den izole ederek fajın farklı enfeksiyon çoklukları (MOI'ler) üzerindeki etkinliğini araştırmıştır ve sonuçlar, *S. natans* gelişiminde %83'e varan başarılı bir azalma göstermiştir. Yukarıdaki sonuçlar ve daha fazlası, AATlerdeki membran biyolojik kirliliğinin kontrolünde faj aktivitesinin umut verici uygulamalarından birkaçıdır. Atık su arıtımında fajların bir başka örneğinde Aydın ve diğ. (2022) bir faj kokteylinin anaerobik membran biyoreaktör üzerindeki etkisini araştırmıştır. Faj kokteyl uygulaması sonucu membran biyolojik kirliliğine de katılan, toplulukta en baskın bulunan Firmicutes türlerinin azalmasıyla birlikte mikrobiyal topluluk yapısında önemli değişiklikler gözlemlenmiştir. Firmicutes filumundaki bu azalmayla birlikte membran kirliliği %25 oranında azalmıştır ve bu azalış, faj kokteylinin biyoaugmentasyon ajanı olarak potansiyelini göstermektedir. Bu çalışmalar, fajların yalnızca antibiyotiğe dirençli patojenleri

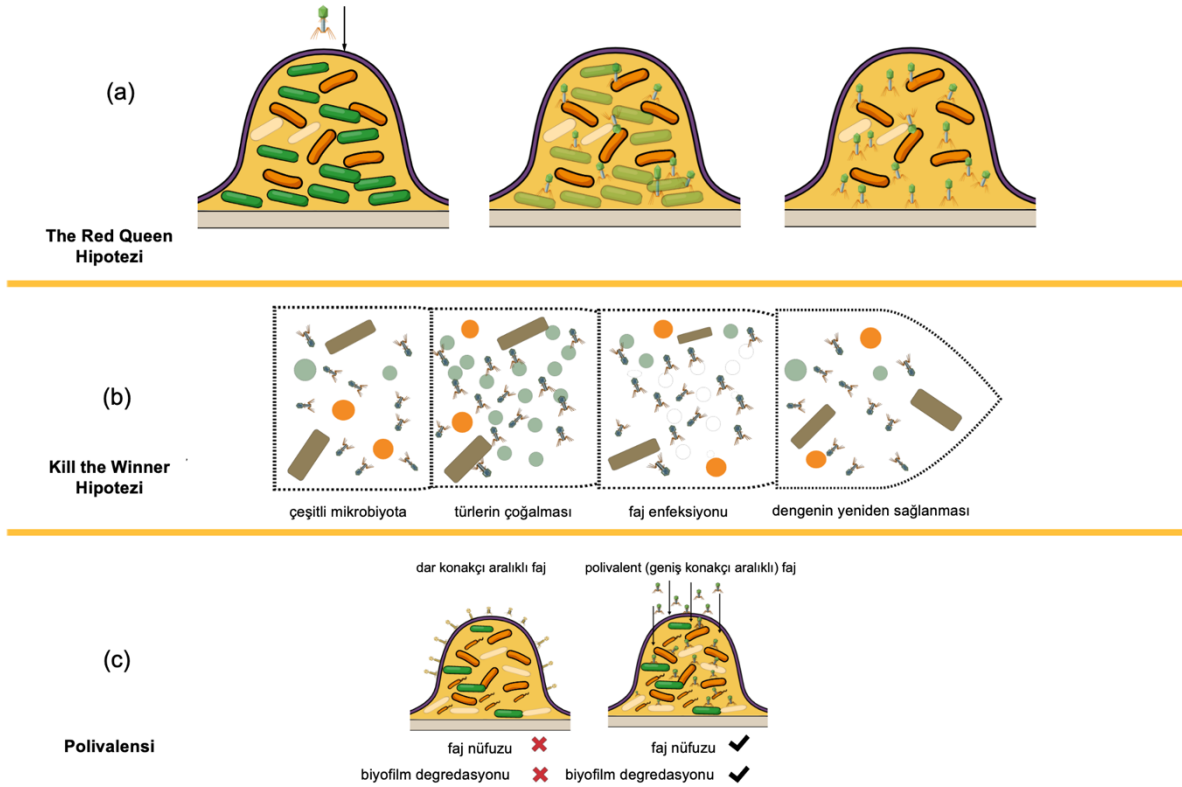
önlemede ve kalıntılarını ortadan kaldırmada başarılı bir araç olmadığını, aynı zamanda mikrobiyal toplulukların şekillenmesinde de rol oynayan önemli faktörler olduğunu açıkça ifade etmektedir.

Biyofilm yapıları genellikle çok türlü bakteri popülasyonlarından oluşur; bu, yalnızca tek bir türe özgü fajın kullanılmasının, biyofilmde yalnızca bir cinsi hedef alabileceği, ancak katmanda kalan türlerin endişe yaratmaya devam edebileceği anlamına gelir. Faj kokteylleri bakteri topluluklarını daha ustaca rahatsız ederek bu açığı giderebilir (Chan ve diğ., 2013). Ancak bu durum, bakteriyel konağın parçalanmasından kısa bir süre sonra endotoksinlerin salınması nedeniyle mikrobiyal topluluğun şekli ve içeriğinde değişiklik gibi bazı çevresel risklere yol açabilir. Çok değerlikli fajlardan (birden fazla bakteriyel konakçıyı hedef alan tek bir faj) yararlanan yeni bir yöntem, bu sorunu ortadan kaldırmaya yönelik bir çözüm olarak ortaya çıkmıştır (Ye ve diğ., 2018). Turki ve diğ. (2012), üç farklı fajdan oluşan bir faj kokteylinin atık sudaki *Salmonella* spp. suşlarını başarıyla enfekte ettiğini göstermiştir. Faj kokteyl uygulaması, *Salmonella* spp.'yi gidermek için tek bir faj ve iki faj karışımının kullanılmasına karşılaştırıldığında en etkili olan antimikrobiyal uygulama olarak bulunmuştur. Ayrıca Yu ve diğ. (2017), aktif çamurda *E. coli* NDM-1'in azaltılmasında çok polivalent fajlar içeren bir kokteylin, sınırlı konakçı aralığına sahip faj kokteyli ile karşılaştırıldığında daha başarılı olduğunu belirtmişlerdir.

#### **2.4 BİYOLOJİK ATIK SU ARITMA SİSTEMLERİNDE MİKROBİYAL TOPLULUK YAPISININ YENİDEN DÜZENLENMESİNDE BAKTERİYOFAJLARIN POTANSİYELİ**

Fajlar genellikle konakçıları iki şekilde etkiler: Konakçıların metabolik repertuarını, kondisyonunu ve hayatta kalma potansiyelini değiştirerek veya hedef bakterileri doğrudan yok ederek. Fajların bakteriyel rekabetle de temas ettiği hem teorik hem de ampirik olarak gösterilmiştir. Örnekleme gerekirse, fajlar, faj-konakçı etkileşimlerinin doğası ve dış koşullarla bağlantılı olarak rekabetçi dışlamayı kolaylaştırabilir veya bakteriyel konakçıların bir arada varlığını güçlendirebilir. Her bir faj enfeksiyonu, konak bakterisi için yeni genetik bilgi içerebildiğinden (Suttle, 2007), faj ve konakçısı, mikrobiyal toplulukların evrimi ve ekolojisinde anahtar unsur olarak öne çıkmaktadır (Koskella ve Brockhurst, 2014). Aralarındaki bu işbirliği, bakteri topluluğunun rekabetini değiştirerek (Joo ve diğ., 2006), bakteri çeşitliliğini teşvik ederek (Liu ve diğ., 2015) ya da bir türden diğerine yatay gen

transferini (YGT) katalize ederek mikrobiyal topluluk yapılarını yeniden yapılandırabilir (Touchon ve diğ., 2016). Bu birlikte evrim birkaç yaklaşımla açıklanmaya çalışılmıştır. “Red Queen” hipotezi, eğer bir organizma başarılı bir şekilde uyum sağlarsa, bunun aynı çevreyi paylaşan ve onunla etkileşime giren diğer türlerin uyum sağlama yeteneğinde bir düşüşe neden olacağını belirtir (Şekil 2.4.1a) (Van Valen, 1974).

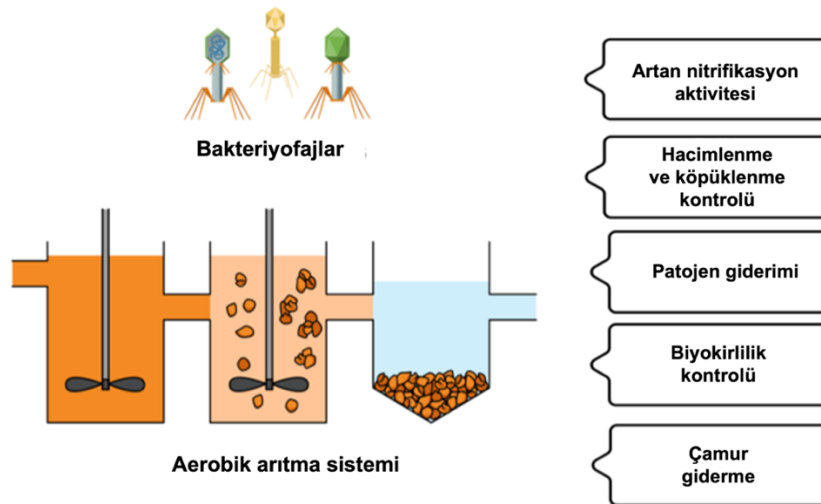


Şekil 2.4.1: a) The Red Queen hipotezi, b) Kill the Winner hipotezi, c) Polivalensi (Reisoglu ve Aydın, 2023).

Red Queen hipotezinin faj ve onunla etkileşime giren bakterilerin kendilerini birbirlerine karşı korudukları, "arms-race" adı verilen bir birbirine karşı mücadele ile birlikte uyum sağlama süreci olduğu düşünülmektedir (Buckling ve Rainey, 2002). Fajlar ve konakçı dağları arasındaki direnç ortaya çıktığında, silahlanma yarışı bozulmayla karşı karşıya kalabilir ve en sonunda sık genotipleri enfekte etmek amacıyla faj evrimini kullanarak nadir bakteriyel direnç alellerine izin verebilecek dalgalı seçilim dinamikleri tarafından yerinden edilebilir (Gandon ve diğ., 2008). “Kill the Winner” hipotezine göre, mikrobiyal popülasyonun negatif frekansa bağlı seçimi, fajlar ve bakteriyel konakçılar arasındaki etkileşimin ana itici gücüdür (Şekil 2.4.1b)

(Winter ve diğ., 2010). Bol konakçı genotipi faj yırtıcılığı tarafından düzenlenirken, nadir olanı faj onu enfekte edene kadar çoğalacaktır. Bu, belirli mikrobiyaların tekrarlayan yükseliş ve düşüşlerine yol açabilir ve sonuçta organizmaların bir arada yaşamasıyla daha rekabetçi türlerin düzenlenmesi yoluyla bakteri çeşitliliğine katkıda bulunabilir (Bouvier ve Del Giorgio, 2007). Üçüncü bir açıklama ise polivalenci durumudur (Şekil 2.4.1c). Fajların genellikle dar bir konakçı aralığına sahip olduğu düşünülürken, çok değerlikli fajlar geniş bir konakçı aralığına sahiptir, bu da farklı türleri enfekte edebildikleri ve biyolojik atık su arıtmalarından izole edilebildikleri anlamına gelir (Hantula ve diğ., 1991). Bu, Khan ve diğ. (2002)'nin çalışmasında açıkça görülmektedir. Aktif çamurdan geniş konakçı aralığına sahip sekiz faj keşfettiler ve sekiz fajdan dördü hem gram pozitif hem de gram negatif bakterileri enfekte edebildi. Hatta son dönemde geliştirilen sıralı yaklaşımlar sayesinde aktif çamurdan izole edilen bazı fajların türler arası enfeksiyon yeteneğine sahip olduğu bile keşfedilmiştir (Yu ve diğ., 2016).

Biyolojik atık su arıtma prosesinde mikroorganizmalar önemli bir rol oynar ancak atık su ve biyo-çamur özellikleri, mikroorganizmaların atık su arıtmasındaki etkinliğinde birincil unsurdur. AAT'lerdeki türlerin optimizasyonu ve mikrobiyal topluluk değişiklikleri, büyük ölçekte sürdürülebilir teknolojilerin kapılarını açabilir. Bu bakımdan fajlar, mikroorganizmaların önemli bir rol oynadığı aerobik biyolojik atık su arıtımındaki sorunlara önemli bir çözüm olabilir ve sürecin verimliliğini artırabilir (Şekil 2.4.2).



**Şekil 2.4.2:** Bakteriyofajların aerobik arıtma sistemlerinin biyougmentasyonunda potansiyel kullanımı (Reisoglu ve Aydin, 2023).

*Gordonia* sp., *Corynebacteria* sp. ve *Nocardia* sp. gibi filamentli bakteri türlerinin aşırı oluşumundan dolayı aktif çamur prosesinde kabarma ve köpüklenme yaygın bir sorundur (Collivignarelli ve diğ., 2020). Bu bağlamda bu soruna yönelik kimyasal yaklaşımlar denenmiştir ancak kimyasalların uygulanması süreçten sorumlu olan bakterilerin gelişimini engellediği için olumsuz sonuçlar doğurabilmektedir (Mamais ve diğ., 2011). Bu sorunun üstesinden gelmek için, aktif çamur prosesinde kabarmayı ve köpürmeyi kontrol etmek amacıyla faj kullanılmıştır. Örneğin, Liu ve diğ. (2015), aktif çamurdan izole ettikleri dört fajdan oluşan kokteyli sistemden *Gordonia* cinsinin gideriminde kullanmış ve kontrol reaktörüne kıyasla faj kullanılan reaktörde on kat daha etkili bir sonuç elde etmiştir. Petrovski ve diğ. (2011), üç *Gordonia* sp. türüne ve iki *Nocardia* sp. türüne karşı atık su arıtma tesisinden izole ettikleri bir çok değerlikli fajın başarılı bir antimikrobiyal etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Aktif çamur sisteminde karşılaşılan başka bir sorun, filamentli bakterilerin deşarj edilmesinin büyük miktarda çamur hacmi ve *Zoogloea* sp. ve *Thauerea* sp. cinsleri tarafından salınan yüksek viskoziteye sahip ekstrasellüler polisakkarit maddelerin birikmesine neden olmasıdır (Luo ve diğ., 2019; Yang ve diğ., 2017). Aşırı miktardaki EPS, daha fazla ara suyun tutulmasına neden olarak çamurun dehidrasyonunu etkiler ve düşük sedimantasyon kapasitesine yol açar (Sheng ve diğ., 2010). Spesifik fajlar, yüksek EPS seviyelerinin neden olduğu biyofilm oluşumunu bozabilecek dikkate değer bir özelliğe sahiptir (Tait ve diğ., 2002). Ayrıca, kısmi nitrifikasyon-anammox (PN/AMX) süreci, atık su arıtmasında fazla azotun uzaklaştırılması ve düşük çamur oluşturma gibi yararlar sergileyen bir avantajlı yaklaşımdır. Bununla birlikte, NOB (*Nitrobacter* sp. ve *Nitrospiraceae* sp.) ile anammox bakteriler arasındaki substrat üzerindeki rekabet, başa çıkılması zor bir sorun yaratır ve Nitrospirae genellikle NOB grubunda öne çıkanlardır. *Nitrospiraceae multiformis* kullanılarak yapılan bir çalışmada, belirli çevresel stresler altında iki profajın üretilmesi uyarılmıştır. Özellikle asidik pH'da virüs partiküllerinin artması *N. multiformis* miktarını azaltarak nitrifikasyon aktivitesinin daha düşük olmasını sağlamıştır (Choi ve diğ., 2010). Liu ve diğ., (2017) yüksek miktarda viral kontig varlığında *Nitrospiraceae* sp. ve *Nitrosomonadaceae* sp. familyalarının önemli bir azalma gösterdiğini, bunun da faj aracılı bozulmanın nitrifikasyon sürecini azaltabileceğini gösterdiğini belirtmiştir. Aydın ve Can (2020), atık sudaki nitrojen denitrifikasyon prosesinin iyileştirilmesine yönelik bir çalışmada, atık su arıtımında nitratı giderebilen özel suşları içeren piyofaj kokteyli ile yapılan biyoaugmentasyon yoluyla Beta-Proteobacteria sayısının arttığını bildirmiştir. Ayrıca

Liao ve diğ. (2023) aerobik denitrifikasyon sırasında nitratın uzaklaştırılmasında faj etkinliğini göstermiştir.

Anaerobik biyolojik atık su arıtımı, önemli bir biyoenerji kaynağı olan metanın üretildiği, bakteri-arkeaların sinerji içinde olduğu dinamik bir süreçtir. Fajlar ve fajların MBR sisteminin biyolojik olarak güçlendirilmesi için potansiyel kullanımı, Şekil 2.4.2'te görüldüğü gibi performans, membran biyolojik kirlenmesi ve mikrobiyal topluluk yapısı açısından umut verici bir yaklaşımdır. Bu sistemdeki mikrobiyal topluluktaki bakterilerin fajlarla değiştirilmesi arkea oranını etkileyerek metan üretimini arttırabilir. Bu durum Aydın ve diğ. (2022) tarafından bir faj kokteylinin anaerobik bir biyoreaktördeki farmasötik atık su arıtımı üzerindeki etkisini araştırmıştır. Faj kokteylinin reaktöre eklenmesiyle biyofilm tabakası ve çamurdaki bakteri-arkea topluluk yapısı dikkate değer bir değişiklik sergilemiştir. Aynı çalışmada baskın arkea topluluğu *Methanothermobacter* sp.'den *Methanoculleus* sp.'ya yönelirken, bakteri cinsi *Macellibacteroides* - *Desulfovibrio* ile arkea türü *Methanoculleus* sp. arasında sentrofik bir etkileşim izlenmiştir. Fajların kullanımı, anaerobik mikrobiyal topluluktaki bakterileri kontrol etmek ve bakteriyel arkeal dengeyi hızla yeniden sağlamak için umut verici bir çözüm olabilir. Ancak anaerobik biyoreaktördeki mikrobiyal topluluk yapısının ve aktivitesinin geliştirilmesine yönelik farklı fajların kullanıldığı çok az sayıda deneysel çalışma yapılmıştır. Farklı faj türlerinin ve kombinasyonlarının anaerobik reaktör performansı ve mikrobiyal topluluk dinamikleri üzerindeki etkisini değerlendirmek için uzun çalışma süreli çalışmaların yapılması önerilmektedir. ]

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. PİYOFAJ KOKTEYLİNİN İZOLASYONU VE ZENGİNLEŞTİRİLMESİ

Reaktörde patojen gideriminde kullanılmak üzere Gürcistan Tiflis'teki Eliava Enstitüsü'nden elde edilen piyofaj kokteyli, beş patojen bakteri türünü (*Staphylococcus* sp., *E. coli*, *Streptococcus* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp.) hedefleyen bir faj kombinasyonudur. *E. coli* ve *Pseudomonas spp.* hücreleri başlangıçta Luria Bertani agar ortamında kültürlenerek 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Agardan elde edilen tekli koloniler daha sonra 10 mL sıvı besin ortamında kültürlenerek çalkalayıcı bir inkübatörde 37 °C'de 24 saat daha inkübe edilmiştir. Bakteriyel konsantrasyonlar McFarland standartlarına uygun olarak  $10^6$ - $10^7$  hücre/ml'ye ayarlanmıştır. *In vitro* faj duyarlılık testinde, 10 ml faj süspansiyonunun farklı titrasyonlarıyla spot test yöntemi yapılmıştır. %0,5 Luria Bertani yarı katı agarın kullanıldığı çift agar katmanı yöntemi, faj zenginleştirme işlemi için kullanılmıştır. 3 mL yarı katı agarın 15 mL steril falkon tüpüne dökülmesini takiben 100 µl bakteri hücresi ile 300 µl faj dilüsyonu tüpe eklenmiştir ve bakteri-faj-yarı katı agar karışımı agar plakalarına dökülerek kurutulmuştur. 24 saatlik inkübasyonun ardından, petriden kazınan %0,5 agarın 10.000 rpm'de 25 dakika boyunca santrifüj edilmesiyle süpernatant elde edilmiştir. Elde edilen süpernatant 0,22 µm'lik bir filtreden süzülüş, gerekli faj miktarını elde etmek için bu süzme işlemi tekrarlanmıştır. İşlem sonunda, faj konsantrasyonu  $3 \times 10^8$  PFU/ml olarak belirlenmiştir.

#### 3.2. AEROBİK MEMBRAN BİYOREAKTÖRÜNÜN ÇALIŞTIRILMASI

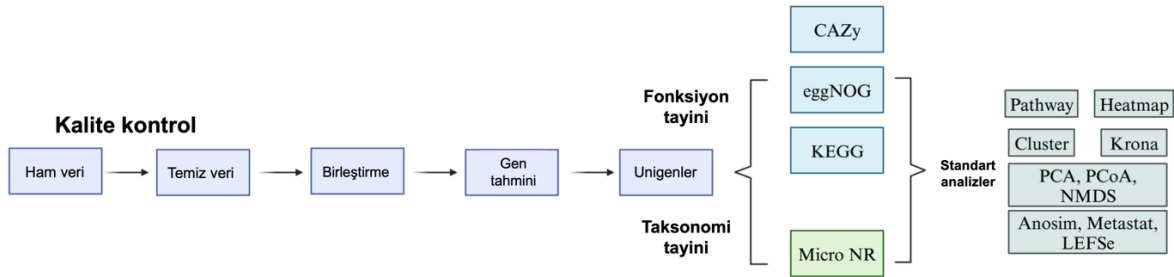
Tez çalışmasında atık su arıtım potansiyelinin faj kokteyli yoluyla biyolojik olarak arttırılmasını incelemek için deney düzeneğinde sürekli besleme modunda çalıştırılan bir aerobik membran biyoreaktörü kullanılmıştır (Aydın ve Can, 2020). Biyoreaktör için 0,125 m<sup>2</sup> yüzey alanına sahip batık, içi boş fiber membran modülü sağlanmıştır. Biyoreaktörün tabanında membran yüzey temizliği ve havalandırmayı sağlamak amacıyla hava difüzörü kullanılmış olup, R×H=7,25 cm×34 cm boyutlarında olan havalandırma tankının hacmi 5 L'dir. Ultrafiltrasyon gerçekleştirmek için ortalama 0,04 µm gözenek boyutu kullanılmıştır. Basıncı ölçmek için transmembran basınç sensörü bir vakum hattına bağlanmış ve değerler otomatik olarak bir bilgisayara kaydedilmiştir.

İSKİ Ambarlı İleri Biyolojik Atık Su Arıtma Tesisi'nden temin edilen çamurun konvansiyonel özellikleri, toplam katı madde (TK:10435 mg/L) ve toplam askıda katı madde (TAK: 4630 mg/L) analizleri ile belirlenmiştir. Çamur yaşı ile hidrolik bekletme süreleri sırasıyla 30 gün ve 12 saat olarak belirlenmiştir. Sentetik farmasötik atık su bileşimi 500 mg/L glikoz, 100 mg/L üre, 50 mg/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mg/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 50 mg/L NaCl, 10 mg/L CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O ve 100 mg/L NaCO<sub>3</sub>'ten oluşturulmuştur (Aydın ve Can, 2020). Farmasötik atık su koşullarını yansıtmak için mikroorganizmaların hayatta kalabileceği ve hızla direnç geliştirebileceği konsantrasyonlar olan 100 mg/L eritromisin, 100 mg/L sülfametoksazol ve 37,3 mg/L tetrasiklin antibiyotikleri reaktörleri ilave edilmiştir (Aydın ve diğ., 2015). Deney için hazırlanan BP biyoreaktörüne aerobik çamur ve antibiyotiklere ek olarak piyofaj (faj kokteyli) eklenmiştir ve reaktör 40 gün çalıştırılmıştır. Reaktör çamurundan günde iki kez numuneler toplanmış ve elde edilen numuneler, numuneleri LC/MS (sıvı kromatografisi/kütle spektrometrisi) analizine hazırlamak için OASIS HLB kartuşları (6 mL, 200 mg, Waters, Milford, MA, ABD) aracılığıyla ekstrakte edilmiş ve temizlenmiştir.

### **3.3. SHOTGUN METAGENOMİK DİZİLEME İLE MİKROBİYAL TOPLULUK ANALİZİ**

Shotgun metagenomik dizileme, mikrobiyal toplulukların biyolojik çeşitliliğini ve işlevsel özelliklerini incelemek için etkili bir yaklaşımdır. Aerobik mikrobiyal topluluk yapısının ve antibiyotik direnç genlerinin (ADG'leri) antibiyotik ve faj kokteyli varlığında değişimini tespit etmek için Illumina dizileme kullanılmıştır ve dizileme hazırlığı Gentera Bioteknoloji Co., Ltd.'de (İstanbul, Türkiye) gerçekleştirilmiştir. DNA ekstraksiyonu için numune olarak BP reaktöründen çamur alınarak üreticinin talimatlarına göre Genomic DNA Isolation Kit (Norgen Biotek. Corp., Kanada) aracılığıyla tüm genom DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Kütüphane oluşturulmasının her aşamasında kalite kontrolü yapılmıştır. DNA saflaştırma ve entegrasyonunda %1 agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır ve DNA konsantrasyonunun ölçümü, Qubit dsDNA Assay Kit (Life Technologies, CA, ABD) kullanılarak Qubit 2.0 florometre kantitasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Kütüphane oluşturulmasında her örnek 1 µg DNA ile hazırlanmıştır ve kütüphanelerin oluşturulmasında NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, ABD) kullanılmıştır. Numuneler spesifik indeks kodlarıyla etiketlendikten sonra, her numunenin 350 bp'ye kadar fiziksel parçalanmasında Covaris™ S220 Sonicator (Covaris, Inc., Woburn, MA) kullanılmıştır. Fragmanların A kuyruklu ve uçları

cilalı olarak elde edilmesinin ardından fragmanlar, Illumina dizileme için PCR amplifikasyonu ile bağlanmıştır. Numunelerin saflaştırılması AMPure XP sistemi üzerinden yapılmıştır ve yeterli zenginleşmeyi sağlamak için Agilent 2100 Bioanalyzer ve Q-PCR uygulanmıştır. Daha sonra üreticinin talimatları doğrultusunda dizileme için cBot Küme Oluşturma Sistemi kullanılmıştır ve takiben Illumina NextSeq 500/HiSeq platformları kullanılarak kütüphane hazırlıklarından eşleştirilmiş uç okumalar oluşturulmuştur. Daha sonra metagenom derlemesinde kullanılacak temiz veriler elde etmek için elde edilen ham verilere kalite kontrol ve konak filtreleme uygulanmıştır. 38'in altında bir değere sahip olan ve 40 baz çifti eşliğini aşan okumalar, veri ön işleme sırasında düzeltmeye tabi tutulmuştur. Ayrıca aşırı belirsiz nükleotidlere (N) sahip okumalar atılırken adaptörlerle önemli ölçüde örtüşen okumalar kesilmiştir. Soap 2.21 yazılımı, konakçı DNA'sından kaynaklanan potansiyel kontaminasyonu azaltmak için kullanılmıştır. Kalite kontrolünün ardından, metagenom derlemesinde erken adım olarak MEGAHIT kullanılmıştır (Li ve diğ., 2015). Scaffoldlar içindeki kesintisiz diziler anlamına gelen scaftigler, "N" sembolünün olduğu anda kesilerek elde edilmiştir. Karışık okumalardan ve bireysel numunelerden elde edilen, uzunluğu 500 baz çiftinin altında olan scaftigler kesilmiştir. Her numunenin kombinasyonu ile oluşturulan kullanılmayan okumalar, düşük bolluğa sahip türleri tanımlamak için analiz edilmiştir. MetaGeneMark, karışık ve bireysel örneklerden bir araya getirilen scaftigleri kullanarak gen tahmini yapmak için kullanılmıştır. Daha sonra tahmin edilen genler, çoğaltılmak üzere bir araya getirilmiştir ve bunu daha sonra kapsamlı bir gen kataloğunun oluşturulması izlemiştir. Önceki adımlarda elde edilen temiz veriler, MetaGeneMark aracılığıyla ORF tahminine tabi tutulmuştur (Zhu ve diğ., 2010). Temiz verileri kataloğa eşleyen SoapAligner aracı, haritalanan okumaların toplam miktarı ve gen uzunluğu kullanılarak gen bolluğunun hesaplanmasını gerçekleştirmek üzere kullanılmıştır (Gu ve diğ., 2013) (Şekil 3.2.1).



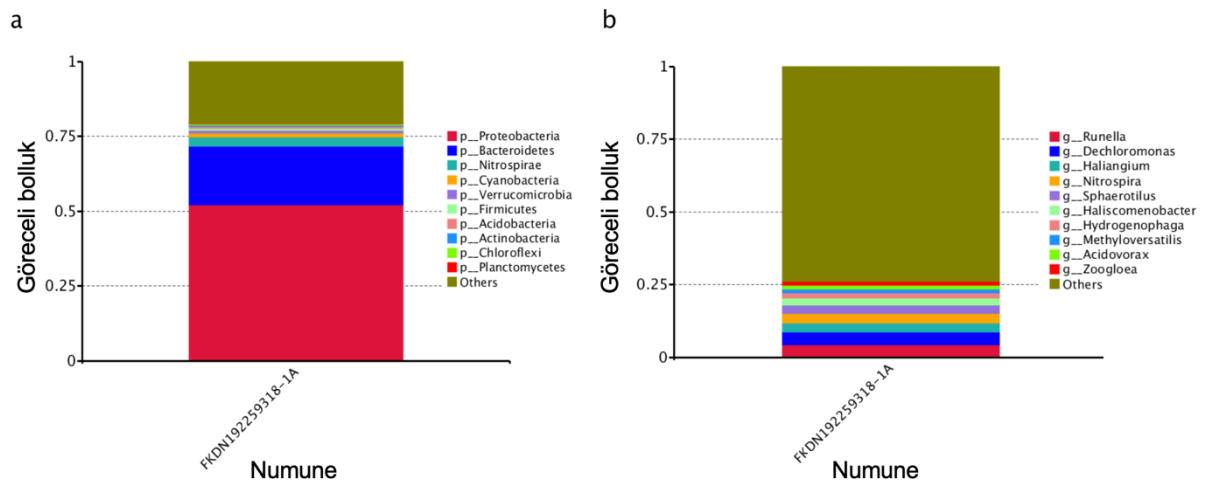
Şekil 3.2.1: Metagenom analiz akışı

Metagenomik homologların taksonomik açıklamasında MEGAN yazılımı kullanılmıştır ve NCBI'nin (NCBI: sürüm 2016-11-05) NR veri tabanı ile karşılaştırma yapılmıştır (Huson ve diğ., 2016). Metagenomdaki farklı fonksiyon türlerinin kodlama dizilerinin ve göreceli bolluklarının fonksiyon tespiti için KEGG, Eggnog, CAZy gibi veri tabanlarında benzerlik araştırması yapılmıştır. NMDS, Anosim ve PCA kümelemesini içeren analiz, taksonomik ve fonksiyonel bolluk tablolarına dayanılarak yapılmıştır. Ayrıca, farklı grupların fonksiyonel içerikleri karşılaştırıldığında istatistiksel analiz için LEfSe ve Metastat'lar kullanılmıştır. ADG'lerin türlerdeki bolluğu ve dağılımının belirlenmesi için veri seti Kapsamlı Antibiyotik Direnç Veri Tabanı (İngilizce: CARD) ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada protein dizilerini karşılaştıran bir biyoinformatik araç olan BLASTp kullanılmıştır ve karşılaştırmadaki e-değer eşiği  $\leq 1 \times 10^{-5}$  olup veri seti ile CARD veri tabanı arasındaki eşleşmelerin istatistiksel anlamlılığının belirlenmesini sağlamıştır (Alcock ve diğ., 2019). ]

## 4. BULGULAR

### 4.1. AEROBİK MEMBRAN BİYOREAKTÖRÜNDE BAKTERİYOFAJLAR İLE PROKARYOTİK VE ÖKARYOTİK MİKROBİYAL ÇEŞİTLİLİK ARASINDAKİ ETKİLEŞİMLER

Illumina dizileme, mikrobiyal topluluk yapısı hakkında kapsamlı veriler sağlamış ve piyofaj kokteyli ile antibiyotik kombinasyonuna maruz kalmanın, reaktör çamurunun mikrobiyal topluluk yapısında önemli değişikliklere yol açtığını göstermiştir (Şekil 4.1.1).

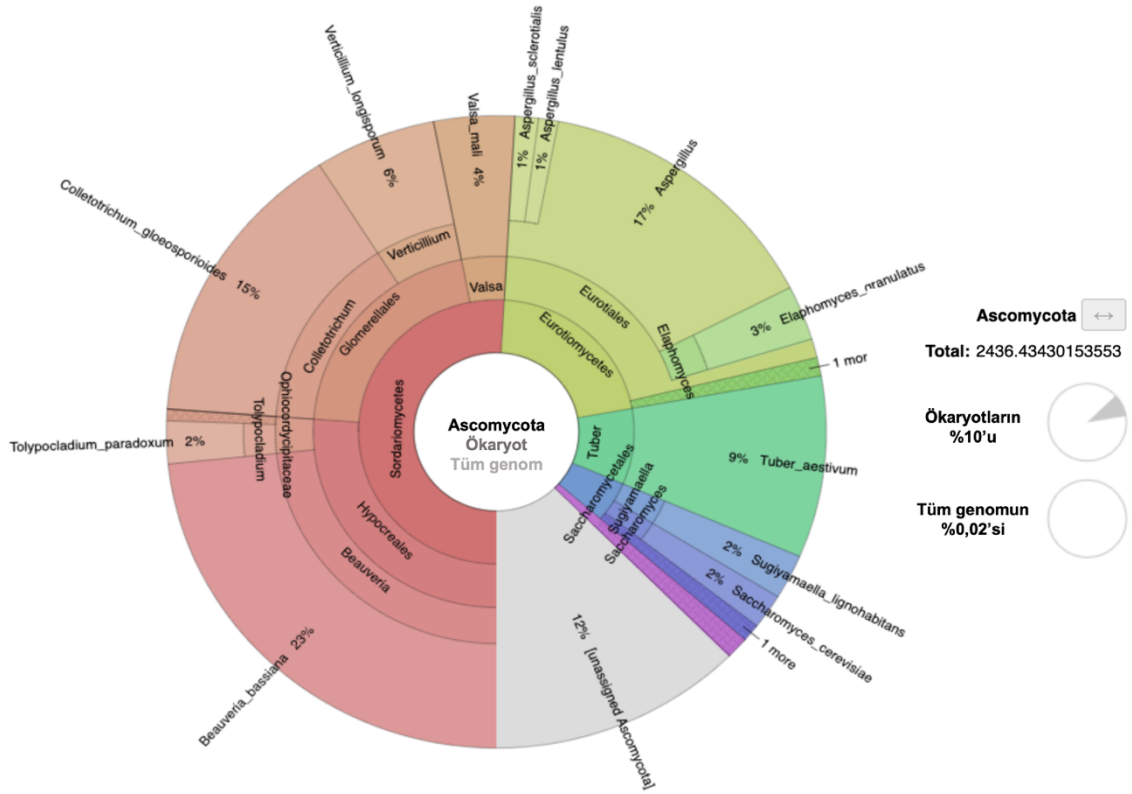


**Şekil 4.1.1: BP reaktörünün çamurundaki baskın on taksonun bolluğu. (a) Filum düzeyinde, (b) Cins düzeyinde**

Filum düzeyinde, Proteobacteria bakteri popülasyonunun %62'sini oluştururken, tolerans nedeniyle bir artış göstermiştir, ikinci en bol bulunan filum Bacteroidetes %23'lük bir orana sahip olmuştur. Öte yandan Firmicutes, AATlerde üçüncü baskın filum olarak bilinirken (Aydın ve diğ., 2022), piyofaj kokteylinin antibiyotiklerle birlikte uygulanmasıyla *Firmicutes* bolluğu düşük bir oranda kalarak BP reaktöründeki toplam bakteri popülasyonunun yalnızca %5'ini oluşturmuştur. Nitrospirae, BP reaktör çamurunun bakteri popülasyonunda üçüncü baskın filum olarak tüm popülasyonunun %4'ünü oluşturmuştur. Gerçekleştirilen tez çalışmasında, piyofaj kokteyli ve antibiyotiklerin varlığında BP reaktör çamuru mikrobiyotasındaki bakteri topluluğunun gelişimi cins düzeyinde de incelenmiştir. Mevcut çalışmada *Runella* (%5), *Dekloromonas* (%5), *Nitrospira* (%4), *Haliangium* (%4) ve *Haliscomenobacter* (%3) bakteri topluluğu içinde en baskın cinsler olarak tanımlanmıştır. BP

reaktöründe bulunan ve dikkat çeken diğer bir cins ise Zoogloea (%2) olmuştur. Öte yandan, *Haliangium ochraceum* (%1) türü, BP reaktöründe kayda değer bir bollukta yer almıştır.

Mevcut çalışmada biyoreaktörlerdeki ökaryotik mikroorganizmalar da araştırılarak bu mikroorganizmaların tüm topluluğun yalnızca oldukça küçük bir yüzdesini oluşturduğu tespit edilmiştir. Ascomycota filumu (%10), Chytridiomycota (%2) ve Basidiomycota (%1) baskın mantar grupları olarak gözlenirken, mikroalgal filum Chlorophyta (%2) ve diatom grubu Thalassiosira (%1) diğer önemli ökaryotik mikroorganizmaları oluşturmuştur (Şekil 4.1.2).

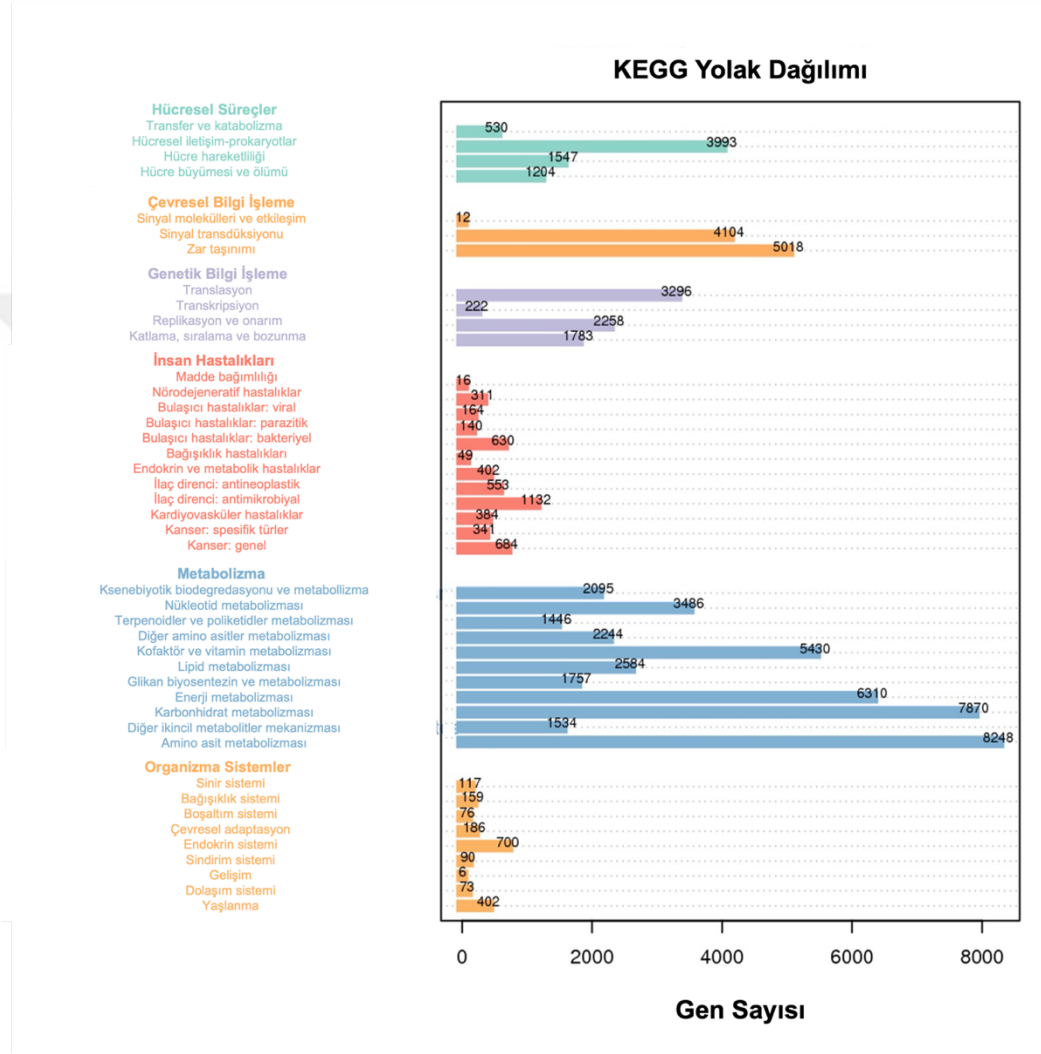


Şekil 4.1.2: BP reaktöründeki toplam ökaryotik mikroorganizmaların (%0,02) ve Ascomycota'nın göreceli bolluğu.

## 4.2. BAKTERİYOFAJLARIN METABOLİK YOL ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Faj uygulamasının mikrobiyal topluluğun metabolik yol üzerindeki proteomik seviyeden etkisine ilişkin daha fazla bilgi edinmek için, BP reaktöründe Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG) yol sınıflandırması gerçekleştirilmiştir. Baskın olarak görülen

metabolik yollar amino asit metabolizması, karbonhidrat metabolizması, enerji metabolizması, kofaktör ve vitamin metabolizması, nükleotid metabolizması, lipid metabolizması, ksenobiyotiklerin biyolojik parçalanması ve diğer ikincil metabolitlerin metabolizması ve biyosentezi olmuştur (Şekil 4.2.1).



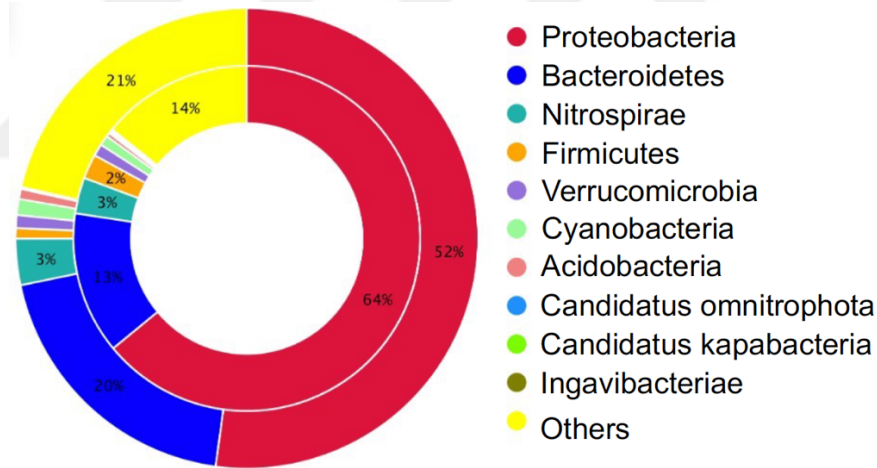
Şekil 4.2.1: BP reaktöründe KEGG yolak dağılımı

Azot metabolizmasındaki çekirdek gruplar, potansiyel nitrifikasyon bakteri grupları olarak bilinen Nitrosomonas (%0,2) ve Nitrospira (%4) olarak gözlenmiştir. Piyofaj kokteyli ve antibiyotik kombinasyon uygulanmasının bu cinslerin varlığına bir etkisi tespit edilmemiştir. BP reaktörü ayrıca iyi denitrifikasyon potansiyelleri ile bilinen ve bakteri popülasyonunun toplam %9'unu oluşturan Dechloromonas (%5), Zoogloea (%2) ve Accumulibacter (%2)

cinslerini de içermiştir. Ayrıca, BP reaktör çamurunda %2 oranında *Accumulibacter*, %3 oranında *Rhodobacterales* ve %0,9 oranında *Sorangium* cinsleri tespit edilmiştir.

#### 4.3. AEROBİK MEMBRAN BİYOREAKTÖRÜNDE BAKTERİYOFAJ İLE ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİ ARASINDAKİ ETKİLEŞİMLER

Bu tez çalışmasında, biyoreaktördeki mikrobiyal topluluk yapılarının yanı sıra ADG'lerin analiziyle, ADG'ler arasındaki korelasyonlar hakkında bilgi edinilmiştir. Antibiyotiklerin varlığı, BP reaktöründe yüksek düzeyde antibiyotik direnç profili sergileyen gram negatif *Proteobacteria* sp. zenginleşmesine yol açmıştır. BP reaktöründeki *Proteobacteria* grubunun kayda değer varlığı ve geniş yelpazesi, potansiyel olarak *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Acinetobacter* spp. dahil çok sayıda önemli insan patojenini kapsayan antibiyotiğe dirençli *Proteobacteria* türlerine atfedilebilir. Şekil 4.3.1, BP reaktöründeki ADG'leri içeren farklı filumları göstermektedir.



Şekil 4.3.1: İçteki daire, ADG'leri içeren çeşitli filumların dağılımının temsili, dıştaki daire filumlardaki ADG'lerin oranını temsili

*Proteobacteria* baskın filum olduğundan, bakterilerin direnç genlerini elde etmek için kullandığı en baskın direnç mekanizması RND tipi İlaç Akış Pompası iken *mtrA* ise ortak direnç geni olarak tanımlanmıştır. Bu tez çalışmasında *Staphylococcus aureus*'un varlığı tüm bakteri genomunda düşük bollukta (%0,003) yer teşkil etmiş olsa da bu türe ait direnç geninin (*arlR*), BP reaktöründe en belirgin direnç genlerinden biri olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.3.2).



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

[AAT'lerde fajlar ve bakteriler, mikrobiyal dinamikler, malzeme dolaşım süreci ve enerji metabolizması açısından kritik mikrobiyal grupları oluşturur. Fajlar, belirli bakteri türlerini hedef alarak enfekte eden virüsler olup bakterilerle karşılaştırıldığında yaklaşık 10:1 oranında yüksek bir bolluğa sahiptirler (Jameson ve diğ., 2020). Fajlar, mikrobiyal topluluklardaki bakterilerle sinerjistik etkileşimler sergileyerek bu etkileşimlerin bakteriyel topluluklar üzerindeki etkilerini açığa çıkarır. Saniyede yaklaşık  $10^{23}$  enfeksiyon oranında bakteri suşlarını enfekte edebilirler ve bu yetenek, özellikle antibiyotiğe dirençli olanlar olmak üzere hedef bakteriyel popülasyonları azaltmada önemli bir potansiyele sahiptir (Worley-Morse ve Gunsch, 2015). Bu tez çalışmasında beş farklı patojenik türe özgü fajları içeren kokteylin reaktöre eklenmesi sonucunda, hedeflenen türler reaktörde tespit edilmemiştir. Önceki çalışmalar, kentsel ve endüstriyel atık sularında yaygın olarak bulunan patojenik bakteriler arasında reaktöre eklenen fajların özgü olduğu *Staphylococcus* spp., *E. coli*, *Streptococcus* spp., *Proteus* spp. ve *Pseudomonas* spp. türlerinin bulunduğunu göstermiştir (Kumaraswamy ve diğ., 2014; Yasir, 2020). Bu tez çalışmasındaki en baskın iki filum olan Proteobacteria ve Bacteroidetes'in önceki çalışmalarda farklı AAT'lerde en baskın bakteri filumları olarak yer alırken yaygın cinslerin ise *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*'u olduğu belirtilmiştir (Zhao ve diğ., 2019).

Yapılan çalışmalarda Firmicutes filumuna ait üyelerin antibiyotiğe dirençli genleri barındırabildiği belirtilmiştir (Schwarz ve diğ., 2014; G. Wang ve diğ., 2020). Bu bilgi göz önüne alındığında tez çalışmasındaki düşük Firmicutes bolluğunun piyofaj kokteylinin varlığından kaynaklandığını öne sürmek mümkündür. BP reaktöründeki üçüncü baskın filum olan Nitrospirae, özellikle düşük seviyede çözünmüş oksijen ve substrat mevcudiyeti ile atık su arıtım sistemlerinde biyolojik besin gideriminde önemli bir role sahip olan nitrit oksitleyen bakterilerin (NOB) baskın bir şubesidir (Geng ve diğ., 2022). Önceki çalışmalardaki normal çalışan atık su arıtma sistemlerinde Nitrospirae'nin göreceli bolluğu ile karşılaştırıldığında, mevcut çalışmadaki BP reaktöründe tespit edilen Nitrospirae oranı daha yüksek olup bu artışın piyofaj kokteyli nedeniyle olduğu sonucuna varmak uygundur (Xiao ve diğ., 2023; Y. Yang ve diğ., 2020). Nitrifikasyon prosesindeki başarısızlığın genel olarak aktif çamur sistemlerindeki nitrifikasyon bakterilerinin düşük konsantrasyonu ile bağlantılı olduğu göz önüne alındığında, Nitrospirae'deki bu artış, piyofaj kokteylinin MBR performansını iyileştirme potansiyeli

taşıdığını göstermektedir (Wanner ve diğ., 2000). Önceki çalışmalar, cins düzeyinde Dekloromonas ve Nitrospira'nın çoğu AAT'deki temel mikrobiyal gruplardan olduğunu ve antibakteriyel ajanlarla karşılaştıklarında dirençli özellikler gösterebileceğini belirtmiştir (L. Wu ve diğ., 2019). Antimikrobiyal ajanların varlığına rağmen bu tez çalışmasında tespit edilen beş baskın cinsin (Runella, Dekloromonas, Nitrospira, Haliangium ve Haliscomenobacter) bulunması, antibiyotiğe duyarlı olanların azalmış olabileceği bir toplulukta olası dirence ve gelişme yeteneklerine işaret etmektedir ve bu, konuya ilişkin daha önce yapılan çalışmalarla benzer bulgular sergileyerek uyum göstermektedir (Aydın ve Can, 2020; Du ve diğ., 2021). Reaktörde %2 bulunma oranı ile tespit edilen *Zoogloea*, tipik olarak aktif çamurda bulunur ve atık sudaki organik ve inorganik bileşiklerin parçalanmasında rol oynar (X. Wang ve diğ., 2012).

Reaktördeki ökaryotik mikroorganizmalar incelendiğinde, önemli miktarda mikroorganizma topluluğu sınıflandırılmamıştır; bu durum referans sekans verilerinin eksikliğinden kaynaklanmış olabilir. Baskın gruplar olarak tespit edilen fungal filumlar Ascomycota ve Chytridiomycota selüloz salgılayabilmektedir, dolayısıyla bu mantar grupları selülozu parçalama yetenekleri nedeniyle selüloz içeren atık suların arıtımında kullanım potansiyeli taşıyabilir. BP reaktöründe Ascomycota'nın mikroökaryotlardaki %10 oranındaki bolluğu dikkat çekicidir. Aerobik çamur üzerinde yapılan bir çalışmada, çamurda tespit edilen Ascomycota'nın yüksek bolluğu, membran reaktörüne zengin selüloz eklenmesiyle ilişkilendirilmiştir (C. Chen ve diğ., 2021). Mevcut tez çalışmasında da %10 oranındaki yüksek Ascomycota bolluğu, reaktördeki ökaryotik organizmaların %32'sini oluşturan selüloz içeren bitkilerden kaynaklanmış olabilir. Öte yandan, BP reaktöründeki Ascomycota'nın %17'sini oluşturan *Aspergillus* cinsi filamentli bir mantardır ve ağır metal, petrol ve diğer kirleticilerle kirlenmiş atık sular için biyolojik iyileştirme ajanı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (El-Bondkly ve El-Gendy, 2022). BP reaktörünün ökaryotik mikroorganizmaları arasında Chlorophyta (%2) varlığı dikkat çekmektedir. Mikroalg Chlorophyta, besin maddesinin uzaklaştırılması amacıyla endüstriyel ve belediye atık su arıtmaları da dahil olmak üzere çeşitli akışlarda kullanılmaktadır. Bu kullanım, mikroalglerin spesifik koşullara önemli adaptasyon kapasitesine bağlanabilir (Abinandan ve Shanthakumar, 2015). Arıtılmamış atık sularda mikroalglerin yetiştirilmesinde karşılaşılan önemli bir zorluk, biyokütle verimliliğini kısıtlayan diğer mikroorganizmaların varlığı olsa da BP reaktöründe tespit edilen Chlorophyta, piyofaj kokteyli ve antibiyotik kombinasyonunun varlığında gelişme yeteneğini sürdürmüştür. Bu

nedenle, BP reaktörü bu antimikrobiyallere uzun süreli maruz kalacak şekilde çalışması halinde, mikroalg grubu Chlorophyta'nın büyüme fırsatı artabilir. Dolayısıyla, antibiyotiklerle birlikte bir piyofaj kokteylinin uygulanması, patojenlerin gelişimini önemli bir şekilde engelleyecek ve bu, besin giderimi için atık su arıtma sistemlerinin kapasitesinin ve potansiyelinin artmasına destek olacaktır. Bu bulgular, piyofaj kokteylinin, biyoremediasyonda yararlı olan mikroorganizmaların gelişimini artırarak atık su arıtım sürecini olumlu yönde etkileme potansiyeli taşıdığını göstermektedir. Piyofaj kokteyli, belirli patojenleri ya da fırsatçı mikroorganizmaları hedef alarak faydalı türlerin gelişmesi için daha uygun bir ortam yaratılmasına yardımcı olabilir ve sonuçta sistemin arıtım verimliliğini ve genel performansını artırabilir. Mevcut çalışmada antibiyotikler ile piyofaj kokteyli arasındaki potansiyel sinerjistik ilişkinin dikkate alınması da hayati önem taşımaktadır.

Faj kokteylinin mikrobiyal topluluğun metabolik yolları üzerindeki etkisine ilişkin yapılan analizde, azot metabolizmasındaki baskın cinsler olarak tespit edilen ve potansiyel nitrifikasyon grupları olarak bilinen Nitrosomonas (%0,2) ve Nitrospira (%4)'nın faj kokteyli ve antibiyotik uygulanmasından etkilenmediği görülmüştür. Bu iki cins, nitrifikasyonu artırarak reaktör performansına katkılarıyla bilinmektedir (Whang ve diğ., 2009). Özellikle comammox Nitrospira cinsi, azot döngüsünün en önemli adımı olan nitrifikasyon sürecinde önemli bir role sahiptir. Nitrifikasyon süreci kısaca amonyakın ( $\text{NH}_3$ ) ardışık iki oksidasyon reaksiyonu yoluyla nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) dönüştürülmesiyle gerçekleşir. İlk başta nitrifikasyonun amonyak oksitleyen bakteriler (AOB) ve nitrit oksitleyen bakterilerden (NOB) oluşan iki farklı bakteri grubu tarafından gerçekleştirildiği düşünülmekte idi. Comammox Nitrospira'nın keşfiyle bu anlayış tamamen değişmiştir. Bu cinsin benzersiz özelliği, ikinci adımı gerçekleştirmek için ek bakterilere ihtiyaç duymadan hem amonyak oksidasyonunu hem de nitrit oksidasyonunu gerçekleştirebilme yeteneğidir (G. Zhu ve diğ., 2022). Başka bir deyişle, Nitrospira üyeleri nitrifikasyonun tamamını bağımsız olarak gerçekleştirebilmekte ve bu da sürecin verimliliğini arttırmaktadır. Toprak, tatlı su ve atık su sistemleri gibi çeşitli ortamlardaki bollukları, Nitrospira üyelerini azot metabolizmasında önemli bir oyuncu haline getirmektedir (Latocheski ve diğ., 2022). Aslında, Nitrospira cinsinin metabolik yetenekleri, aerobik koşullar altında format ve hidrojen üzerinde büyüme ve anoksik durumdayken nitratın nitrite indirgenmesi dahil olmak üzere çeşitli yetenekleri kapsayarak nitrit oksidasyonunun ötesine uzanır (Koch ve diğ., 2019). BP reaktörü, Dechloromonas (%5), Zoogloea (%2) ve Accumulibacter (%2) gibi, bakteri popülasyonunun toplam %9'unu oluşturan ve iyi denitrifikasyon potansiyelleri ile bilinen

cinsleri içermektedir (H. Li ve diğ., 2020). Özellikle Zoogloea grubundaki türlerin, geleneksel çalışan aktif çamur sistemlerinde, yüksek oksijen seviyelerinde bile nitrat indirgemelerini sağlayarak denitrifikasyon yapan aerobik heterotrofik bakteri suşları olduğu bildirilmiştir (Straub ve diğ., 2004). Reaktörde %1'lik bolluk ile yer alan *Haliangium ochraceum* türü hem karbonhidrat hem de amino asit metabolizmasıyla ilişkili olup poliketid sentazları ve ribozomal olmayan peptid sentazları dahil olmak üzere poliketid ve peptid metabolitlerinin üretiminde rol alan anahtar enzimleri kodlayan genleri içerir. Ayrıca nişasta, DNA, kazein, jelatin ve kitin gibi makro molekülleri parçalama yeteneğine de sahiptirler (Sun ve diğ., 2020). Tez çalışmasının reaktör çamurundaki bakteri genomunun %3'ünü oluşturan fotosentetik Rhodobacterales daha önce enerji ve vitamin metabolizmalarında tanımlanmıştır (Sasaki ve diğ., 2005). Ayrıca Sorangium cinsi (%0,9) sekonder metabolitlerin yaklaşık yarısının sentezinde önemli bir role sahiptir (H. Chen ve diğ., 2020). Bu metabolik yollara AATlerde yaygın olarak rastlanmaktadır ve bahsedilen bakteriyel gruplar, bu yollardaki anahtar oyuncularındandır. Bir faj kokteylinin varlığına rağmen, bu metabolik yolların sürdürülmesi, fajların, patojenlerin uzaklaştırılmasında ve AAT'nin zenginleştirilmesi için kullanılmasının reaktör sistemlerinde çok önemli olan bakteriyel metabolik yollar üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir. Ayrıca faj kokteyli, BP reaktöründeki fırsatçı patojenleri ortadan kaldırarak bu yollardan sorumlu olan bakteriyel gruplar için uygun ortamlar sağlamış olabilir, bu da metabolik yolların kalıcı olmasına katkıda bulunabilir.

AAT'ler, direnç genlerinin yayılması ve dirençli bakterilerin çoğalması için önemli sıcak noktalar olarak hizmet etmektedir. Bu tür kirlenmiş ortamlar, çok çeşitli ADG'leri ve büyük miktarda bakteriyel yükü barındırarak mikrobiyal etkileşimleri teşvik eder. Ayrıca AAT'ler, türler arası seçimi ve YGT'yi daha da artıran mikropplastik ve ağır metal gibi çeşitli streslere maruz kalmaktadır (Kalli ve diğ., 2023). Faj kokteyli ile antibiyotik direnç genlerinin oluşumu arasındaki etkileşimlere bakıldığında, BP reaktöründeki Proteobacteria grubunun kayda değer varlığı ve geniş yelpazesi, potansiyel olarak *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., ve *Acinetobacter* spp. dahil çok sayıda önemli insan patojenini kapsayan antibiyotiğe dirençli Proteobacteria spp. türlerine atfedilebilir. Antibiyotik direnç profili sergileyen gram negatif Proteobacteria zenginleşmesine BP reaktöründe faj kokteyline ilaveten kullanılan antibiyotikler neden olmuş olabilir. Yüksek Proteobacteria spp. bolluğu, giriş atık suyuna antibiyotik eklenmesinin mikrobiyal topluluk bileşiminde kayda değer bir değişikliğe ve MBR'deki ADG bolluğunda bir artışa neden olduğunu belirten önceki bir çalışmada da gözlemlenmiştir (Wen ve diğ., 2018).

RND antibiyotik akış pompaları, Proteobacteria gibi Gram-negatif bakteri filumunda bulunan bir tür akış pompasıdır ve bu bakteri grubunun çok çeşitli antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesine önemli ölçüde katkıda bulunur. MtrA ya da mtrR olarak da bilinen direnç geni, çeşitli Gram-negatif bakterilerde önemli bir dirençli genidir ve bu gen, MtrCDE akış pompası sisteminden sorumlu olan bir transkripsiyonel baskılayıcı proteini kodlar. Bu pompa sistemi, bakterilerin farklı antimikrobiallere karşı direncinde önemli bir rol oynar. MtrA geni, MtrCDE akış pompası ekspresyonunu düzenleyerek bakteri hücrelerinin aktif olarak antibiyotik salmasını sağlar, bu da antibiyotiklerin hücre içi konsantrasyonlarında bir azalmaya ve bunların daha az verimli hale gelmesine neden olur (Rouquette ve diğ., 1999). BP reaktöründeki toplam bakteri genomunun çok küçük bir bölümünü oluşturan *Staphylococcus aureus*'a ait ArlR direnç geni, arlRS adı verilen iki bileşenli bir düzenleyici sistemin parçasıdır ve bu sistem, antimikrobiyal direnç mekanizmalarında rol oynayan çeşitli gen düzenlemeleriyle güçlü bir şekilde ilişkilidir (Otarigho ve Falade, 2018). BP reaktöründe litik faj uygulamasının ADG bolluğunu önemli ölçüde arttırmadığı görülse de ADGler BP reaktöründe yine de tespit edilir düzeyde yer almıştır. Faj biyoaugmentasyonu yoluyla daha ileri araştırmalarda, aerobik MBR'de özellikle Proteobacteria grubu bakteriler hedef alınarak ADG oluşumunu azaltabilen biyoaugmentasyon için ek ajanların dahil edilmesi faydalı olacaktır.

Özetle, bu tez çalışması, bir piyofaj kokteylinin atık sularda sıklıkla bulunan üç antibiyotikle birleştirilmesinin, shotgun metagenomik analizi kullanılarak bir aerobik MBR'de mikrobiyal topluluk üzerindeki etkisini araştırmıştır. Bu çalışmada kullanılan faj kokteyli atık sularda normalde ve sıklıkla bulunan patojenler olan *Staphylococcus* sp., *E. coli*, *Streptococcus* sp., *Proteus* sp. ve *Pseudomonas* sp.'ye özeldir. Sonuçlar, BP reaktöründe bu türlerin tespit edilmemesiyle faj tedavisinin başarılı olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar patojen giderimi açısından önemlidir çünkü atık sular uygun şekilde tedavi edilmezse bu patojenler potansiyel tehdit olarak su ortamlarına yayılabilir. Piyofaj kokteyline ek olarak kullanılan antibiyotikler faj tedavisiyle sinerji sağlayarak faj kokteylinin konakçı aralığı dışında kalan ve genellikle atık sularda bulunan ancak tez çalışmasında BP reaktöründe minimumda tespit edilen fırsatçı bakteri türlerinin uzaklaştırılmasında etkili olmuştur. Bu kombinasyon, etkili reaktör performansından ve atık su arıtımından sorumlu olan NOB gibi bakterilerin çoğalmasını desteklemiştir. Faj kokteylinin metabolik yollara etkisi de incelenerek faj uygulamasının bu metabolik yollara herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bu çalışmada, faj kokteyli, fırsatçı türleri reaktörden uzaklaştırarak metabolik yollarda yer alan bakteri

gruplarının gelişimini desteklemiş olabilir. Ancak fajların mikrobiyal topluluk dinamikleri üzerindeki etkilerine ilişkin daha kapsamlı bilgi edinebilmek için uzun süreli maruz kalma durumunda daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. ]



## KAYNAKLAR

- [
- Abedon, S. T., Danis-Wlodarczyk, K. M., & Wozniak, D. J. (2021). *pharmaceuticals Phage Cocktail Development for Bacteriophage Therapy: Toward Improving Spectrum of Activity Breadth and Depth*. <https://doi.org/10.3390/ph14101019>
- Abinandan, S., & Shanthakumar, S. (2015). Challenges and opportunities in application of microalgae ( Chlorophyta ) for wastewater treatment: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.086>
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T. Y., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A.-L. V, Cheng, A. A., Liu, S., Min, S. Y., Miroshnichenko, A., Tran, H.-K., Werfalli, R. E., Nasir, J. A., Oloni, M., Speicher, D. J., Florescu, A., Singh, B., ... McArthur, A. G. (2019). CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
- Alkhalil, S. S. (2023). *The role of bacteriophages in shaping bacterial composition and diversity in the human gut*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1232413>
- Aw, T. G., Howe, A., & Rose, J. B. (2014). Metagenomic approaches for direct and cell culture evaluation of the virological quality of wastewater. *Journal of Virological Methods*, 210, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.09.017>
- Aydin, S., & Can, K. (2020). Pyophage cocktail for the biocontrol of membrane fouling and its effect in aerobic microbial biofilm community during the treatment of antibiotics. *Bioresource Technology*, 318, 123965. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123965>
- Aydin, S., Can, K., Çalışkan, M., & Balcazar, J. L. (2022). Bacteriophage cocktail as a promising bio-enhancer for methanogenic activities in anaerobic membrane bioreactors. *Science of The Total Environment*, 832, 154716. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.154716>

- Aydin, S., Ince, B., & Ince, O. (2015). Development of antibiotic resistance genes in microbial communities during long-term operation of anaerobic reactors in the treatment of pharmaceutical wastewater. *Water Research*, 83, 337–344. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2015.07.007>
- Ayyaru, S., Choi, J., & Ahn, Y.-H. (2018). Biofouling reduction in a MBR by the application of a lytic phage on a modified nanocomposite membrane. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 4(10), 1624–1638. <https://doi.org/10.1039/C8EW00316E>
- Aziz, A., Basheer, F., Sengar, A., Irfanullah, Khan, S. U., & Farooqi, I. H. (2019). Biological wastewater treatment (anaerobic-aerobic) technologies for safe discharge of treated slaughterhouse and meat processing wastewater. *Science of The Total Environment*, 686, 681–708. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.05.295>
- Ben Saad, M., Ben Said, M., Bousselmi, L., & Ghrabi, A. (2022). Use of bacteriophage to inactivate pathogenic bacteria from wastewater. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 57(2), 111–116. <https://doi.org/10.1080/10934529.2022.2036551>
- Bhattacharjee, A. S., Choi, J., Motlagh, A. M., Mukherji, S. T., & Goel, R. (2015). Bacteriophage Therapy for Membrane Biofouling in Membrane Bioreactors and Antibiotic-Resistant Bacterial Biofilms. *Biotechnol. Bioeng*, 112, 1644–1654. <https://doi.org/10.1002/bit.25574/abstract>
- Bouvier, T., & Del Giorgio, P. A. (2007). Key role of selective viral-induced mortality in determining marine bacterial community composition. *Environmental Microbiology*, 9(2), 287–297. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01137.x>
- Breitbart, M., Bonnain, C., Malki, K., & Sawaya, N. A. (2018). *Phage puppet masters of the marine microbial realm*. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0166-y>
- Brum, J. R., & Sullivan, M. B. (2015). Rising to the challenge: accelerated pace of discovery transforms marine virology. *Nature Reviews Microbiology*, 13(3), 147–159. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3404>

- Buckling, A., & Rainey, P. B. . (2002). Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1494), 931–936. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1945>
- Chan, B. K., Abedon, S. T., & Loc-Carrillo, C. (2013). Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiology*, 8(6), 769–783. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.47>
- Chen, C., Gan, Z., Xu, R., & Meng, F. (2021). Cellulose-induced shifts in microbial communities and microbial interactions in an anoxic/aerobic membrane bioreactor. *Journal of Water Process Engineering*, 42, 102106. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102106>
- Chen, H., Wang, M., & Chang, S. (2020). Disentangling Community Structure of Ecological System in Activated Sludge: Core Communities, Functionality, and Functional Redundancy. *Microbial Ecology*, 80(2), 296–308. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01492-y>
- Choi, J., Kotay, S. M., & Goel, R. (2010). Various physico-chemical stress factors cause prophage induction in *Nitrosospira multiformis* 25196- an ammonia oxidizing bacteria. *Water Research*, 44(15), 4550–4558. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.04.040>
- Chowdhary, P., Bharagava, R. N., Mishra, S., & Khan, N. (2020). Role of Industries in Water Scarcity and Its Adverse Effects on Environment and Human Health. In *Environmental Concerns and Sustainable Development* (pp. 235–256). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-5889-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-13-5889-0_12)
- Collivignarelli, M. C., Baldi, M., Abbà, A., Caccamo, F. M., Carnevale Miino, M., Rada, E. C., & Torretta, V. (2020). Foams in Wastewater Treatment Plants: From Causes to Control Methods. *Applied Sciences*, 10(8), 2716. <https://doi.org/10.3390/app10082716>
- Cydzik-Kwiatkowska, A., Zielin'ska, M., & Zielin'ska, Z. (2012). Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2012-9>
- Dhevagi, P., & Anusuya, S. (2013). Bacteriophage Based Pathogen Reduction in Sewage Sludge Nature Environment and Pollution Technology An International Quarterly

Scientific Journal. *Nature Environment and Pollution Technology*, 12, 7–16.  
www.neptjournal.com

- El-Bondkly, A. M. A., & El-Gendy, M. M. A. A. (2022). Bioremoval of some heavy metals from aqueous solutions by two different indigenous fungi *Aspergillus* sp. AHM69 and *Penicillium* sp. AHM96 isolated from petroleum refining wastewater. *Heliyon*, 8(7), e09854. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09854>
- Erez, Z., Steinberger-Levy, ida, Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., Peleg, yoav, Melamed, S., Leavitt, A., Savidor, A., Albeck, S., Amitai, G., & Sorek, R. (2017). Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. *Nature Publishing Group*, 541. <https://doi.org/10.1038/nature21049>
- Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., & Herskovits, A. A. (2015). *A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3527>
- Ferreira, R., Amado, R., Padrão, J., Ferreira, V., Dias, N. M., Melo, L. D. R., Santos, S. B., & Nicolau, A. (2021). The first sequenced *Sphaerotilus natans* bacteriophage–characterization and potential to control its filamentous bacterium host. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(4). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab029>
- Gandon, S., Buckling, A., Decaesteckerà, E., & Day, T. (2008). *Host-parasite coevolution and patterns of adaptation across time and space*. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01598.x>
- Geng, M., You, S., Guo, H., Ma, F., Xiao, X., Zhang, J., & Ma, X. (2022). Response of aerobic granular sludge to loading shock: Performance and proteomic study. *Chemical Engineering Journal*, 444, 136458. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.136458>
- Goswami, L., Vinoth Kumar, R., Borah, S. N., Arul Manikandan, N., Pakshirajan, K., & Pugazhenth, G. (2018). Membrane bioreactor and integrated membrane bioreactor systems for micropollutant removal from wastewater: A review. *Journal of Water Process Engineering*, 26, 314–328. <https://doi.org/10.1016/J.JWPE.2018.10.024>

- Grami, E., Salhi, N., Sealey, K. S., Hafiane, A., Ouzari, H.-I., & Saidi, N. (2022). Siphoviridae bacteriophage treatment to reduce abundance and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in wastewater. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *19*(4), 3145–3154. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03366-3>
- Gu, S., Fang, L., & Xu, X. (2013). Using SOAPaligner for Short Reads Alignment. *Current Protocols in Bioinformatics*, *44*(1). <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1111s44>
- Hantula, J., Kurki, A., Vuoriranta, P., & Bamford, D. H. (1991). Ecology of bacteriophages infecting activated sludge bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *57*(8), 2147–2151. <https://doi.org/10.1128/aem.57.8.2147-2151.1991>
- Hasan, N. A., Young, B. A., Minard-Smith, A. T., Saeed, K., & Li, H. (2014). Microbial Community Profiling of Human Saliva Using Shotgun Metagenomic Sequencing. *PLoS ONE*, *9*(5), 97699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097699>
- Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2011). Bacteriophages and their genomes. *Current Opinion in Virology*, *1*(4), 298–303. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.06.009>
- Heyer, R., Schallert, K., Siewert, C., Kohrs, F., Greve, J., Maus, I., Klang, J., Klocke, M., Heiermann, M., Hoffmann, M., Püttker, S., Calusinska, M., Zoun, R., Saake, G., Benndorf, D., & Reichl, U. (2019). Metaproteome analysis reveals that syntrophy, competition, and phage-host interaction shape microbial communities in biogas plants. *Microbiome*, *7*(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0673-y>
- Higgins, P. G., Hrenovic, J., Seifert, H., & Dekic, S. (2018). Characterization of *Acinetobacter baumannii* from water and sludge line of secondary wastewater treatment plant. *Water Research*, *140*, 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.057>
- Howard-Varona, C., Hargreaves, K. R., Abedon, S. T., & Sullivan, M. B. (2017). Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *The ISME Journal*, *11*(7), 1511–1520. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.16>
- Huson, D. H., Beier, S., Flade, I., Górska, A., El-Hadidi, M., Mitra, S., Ruscheweyh, H.-J., & Tappu, R. (2016). MEGAN Community Edition - Interactive Exploration and Analysis of

- Large-Scale Microbiome Sequencing Data. *PLOS Computational Biology*, 12(6), e1004957. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004957>
- Jameson, E., Green, S. I., Styles, K. M., Hill, C., & Guerin, E. (2020). Shining Light on Human Gut Bacteriophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* | *Www.Frontiersin.Org*, 1, 481. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00481>
- Joo, J., Gunny, M., Cases, M., Hudson, P., Albert, R., & Harvill, E. (2006). Bacteriophage-mediated competition in *Bordetella* bacteria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1595), 1843–1848. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3512>
- Kalli, M., Noutsopoulos, C., & Mamais, D. (2023). *The Fate and Occurrence of Antibiotic-Resistant Bacteria and Antibiotic Resistance Genes during Advanced Wastewater Treatment and Disinfection: A Review*. <https://doi.org/10.3390/w15112084>
- Khan, M. A., Satoh, H., Katayama, H., Kurisu, F., & Mino, T. (2002). Bacteriophages isolated from activated sludge processes and their polyvalency. *Water Research*, 36(13), 3364–3370. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00029-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00029-5)
- Knowles, B., Bailey, B., Boling, L., Breitbart, M., Cobián-Güemes, A., Del Campo, J., Edwards, R., Felts, B., Grasis, J., Haas, A. F., Katira, P., Kelly, L. W., Luque, A., Nulton, J., Paul, L., Peters, G., Robinett, N., Sandin, S., Segall, A., ... Rohwer, F. (2017). *Variability and host density independence in inductions-based estimates of environmental lysogeny*. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.64>
- Knowles, B., Silveira, C. B., Bailey, B. A., Barott, K., Cantu, V. A., Cobián-Güemes, A. G., Coutinho, F. H., Dinsdale, E. A., Felts, B., Furby, K. A., George, E. E., Green, K. T., Gregoracci, G. B., Haas, A. F., Haggerty, J. M., Hester, E. R., Hisakawa, N., Kelly, L. W., Lim, Y. W., ... Rohwer, F. (2016). *Lytic to temperate switching of viral communities*. <https://doi.org/10.1038/nature17193>
- Koch, H., van Kessel, M. A. H. J., & Lücker, S. (2019). Complete nitrification: insights into the ecophysiology of comammox *Nitrospira*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(1), 177–189. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9486-3>

- Koskella, B., & Brockhurst, M. A. (2014). Bacteria–phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 916–931. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12072>
- Kumaraswamy, R., Amha, Y. M., Anwar, M. Z., Henschel, A., Rodríguez, J., & Ahmad, F. (2014). Molecular Analysis for Screening Human Bacterial Pathogens in Municipal Wastewater Treatment and Reuse. *Environmental Science & Technology*, 48(19), 11610–11619. <https://doi.org/10.1021/es502546t>
- Latocheski, E. C., da Rocha, M. C. V., & Braga, M. C. B. (2022). Nitrospira in wastewater treatment: applications, opportunities and research gaps. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 21(4), 905–930. <https://doi.org/10.1007/s11157-022-09634-z>
- Lawrence, Baldrige, & Handley. (2019). Phages and Human Health: More Than Idle Hitchhikers. *Viruses*, 11(7), 587. <https://doi.org/10.3390/v11070587>
- Lazarevic, V., Whiteson, K., Gaïa, N., Gizard, Y., Hernandez, D., Farinelli, L., Østerås, M., François, P., & Schrenzel, J. (2012). Analysis of the salivary microbiome using culture-independent techniques. *Journal of Clinical Bioinformatics*, 2(1), 4. <https://doi.org/10.1186/2043-9113-2-4>
- Lebleu, N., Roques, C., Aimar, P., & Causserand, C. (2010). Effects of membrane alterations on bacterial retention. *Journal of Membrane Science*, 348(1–2), 56–65. <https://doi.org/10.1016/J.MEMSCI.2009.10.045>
- Li, D., Liu, C.-M., Luo, R., Sadakane, K., & Lam, T.-W. (2015). MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics*, 1674–1676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>
- Li, H., Zhong, Y., Huang, H., Tan, Z., Sun, Y., & Liu, H. (2020). Simultaneous nitrogen and phosphorus removal by interactions between phosphate accumulating organisms (PAOs) and denitrifying phosphate accumulating organisms (DPAOs) in a sequencing batch reactor. *Science of The Total Environment*, 744, 140852. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.140852>

- Liang, X., Zhang, Y., Wommack, K. E., Wilhelm, S. W., DeBruyn, J. M., Sherfy, A. C., Zhuang, J., & Radosevich, M. (2020). Lysogenic reproductive strategies of viral communities vary with soil depth and are correlated with bacterial diversity. *Soil Biology and Biochemistry*, *144*, 107767. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2020.107767>
- Liao, Y., Zhang, J., Wang, M., Wu, Y., Zhang, J., Wang, S., Pan, Y., & Cao, G. (2023). Nitrogen removal from wastewater for heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium with the combination of bacteriophage DEY7 and Fe nanoparticles. *Biochemical Engineering Journal*, *191*, 108805. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108805>
- Liu, M., Gill, J. J., Young, R., & Summer, E. J. (2015). Bacteriophages of wastewater foaming-associated filamentous *Gordonia* reduce host levels in raw activated sludge. *Scientific Reports*, *5*(1), 13754. <https://doi.org/10.1038/srep13754>
- Liu, R., Li, Z., Han, G., Cun, S., Yang, M., & Liu, X. (2021). Bacteriophage ecology in biological wastewater treatment systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 5299–5307. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11414-8/Published>
- Liu, R., Qi, R., Wang, J., Zhang, Y., Liu, X., Rossetti, S., Tandoi, V., & Yang, M. (2017). Phage-host associations in a full-scale activated sludge plant during sludge bulking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(16), 6495–6504. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8429-8>
- Luo, L., Ge, Y., Yuan, S., Yu, Y., Shi, Z., Zhou, S., & Deng, J. (2019). Enhanced dewaterability of waste activated sludge by a combined use of permanganate and peroxymonosulfate. *RSC Advances*, *9*(47), 27593–27601. <https://doi.org/10.1039/C9RA03781K>
- M. Iyer, L., Anantharaman, V., Krishnan, A., Burroughs, A. M., & Aravind, L. (2021). Jumbo Phages: A Comparative Genomic Overview of Core Functions and Adaptions for Biological Conflicts. *Viruses*, *13*(1), 63. <https://doi.org/10.3390/v13010063>
- Maddela, N. R., Sheng, B., Yuan, S., Zhou, Z., Villamar-Torres, R., & Meng, F. (2019). Roles of quorum sensing in biological wastewater treatment: A critical review. *Chemosphere*, *221*, 616–629. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.01.064>

- Mamais, D., Kalaitzi, E., & Andreadakis, A. (2011). FOAMING CONTROL IN ACTIVATED SLUDGE TREATMENT PLANTS BY COAGULANTS ADDITION. In *Global NEST Journal* (Vol. 13, Issue 3).
- Ogilvie, L. A., & Jones, B. V. (2017). The human gut virome: form and function. *Emerging Topics in Life Sciences*, *1*(4), 351–362. <https://doi.org/10.1042/ETLS20170039>
- Oliveira, M., Leonardo, I., Nunes, M., Silva, A., & Barreto Crespo, M. (2021). Environmental and Pathogenic Carbapenem Resistant Bacteria Isolated from a Wastewater Treatment Plant Harbour Distinct Antibiotic Resistance Mechanisms. *Antibiotics*, *10*(9), 1118. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091118>
- Otarigho, B., & Falade, M. O. (2018). Analysis of antibiotics resistant genes in different strains of *Staphylococcus aureus*. *Bioinformation*, *14*(03), 113–122. <https://doi.org/10.6026/97320630014113>
- Otawa, K., Lee, S. H., Yamazoe, A., Onuki, M., Satoh, H., & Mino, T. (2007). Abundance, Diversity, and Dynamics of Viruses on Microorganisms in Activated Sludge Processes. *Microbial Ecology*, *53*(1), 143–152. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9150-9>
- Paluch, E., Rewak-Soroczyńska, J., Jędrusik, & I., Mazurkiewicz, E., & Jermakow, & K. (2020). Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1871–1881. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10349-w>
- Parsley, L. C., Consuegra, E. J., Thomas, S. J., Bhavsar, J., Land, A. M., Bhuiyan, N. N., Mazher, M. A., Waters, R. J., Wommack, K. E., Harper, W. F., & Liles, M. R. (2010). Census of the Viral Metagenome within an Activated Sludge Microbial Assemblage. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(8), 2673–2677. <https://doi.org/10.1128/AEM.02520-09>
- Petrovich, M. L., Ben Maamar, S., Hartmann, E. M., Murphy, B. T., Poretsky, R. S., & Wells, G. F. (2019). Viral composition and context in metagenomes from biofilm and suspended growth municipal wastewater treatment plants. *Microbial Biotechnology*, *12*(6), 1324–1336. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13464>

- Petrovski, S., Seviour, R. J., & Tillett, D. (2011). Prevention of *Gordonia* and *Nocardia* Stabilized Foam Formation by Using Bacteriophage GTE7. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7864–7867. <https://doi.org/10.1128/AEM.05692-11>
- Principi, N., Silvestri, E., & Esposito, S. (2019). Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00513>
- Raza, S., Shin, H., Hur, H. G., & Unno, T. (2022). Higher abundance of core antimicrobial resistant genes in effluent from wastewater treatment plants. *Water Research*, 208. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117882>
- Reisoglu, Ş., & Aydin, S. (2023). Bacteriophages as a promising approach for the biocontrol of antibiotic resistant pathogens and the reconstruction of microbial interaction networks in wastewater treatment systems: A review. *Science of The Total Environment*, 890, 164291. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.164291>
- Rouquette, C., Harmon, J. B., & Shafer, W. M. (1999). Induction of the *mtrCDE* -encoded efflux pump system of *Neisseria gonorrhoeae* requires MtrA, an AraC-like protein. *Molecular Microbiology*, 33(3), 651–658. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01517.x>
- Ruas, G., Serejo, M. L., Farias, S. L., Scarcelli, P., & Boncz, M. Á. (2022). Removal of pathogens from domestic wastewater by microalgal-bacterial systems under different cultivation conditions. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19(10), 10177–10188. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03820-2>
- Runa, V., Wenk, J., Bengtsson, S., Bv, J., & Lanham, A. B. (2021). Article 730071 Hany Anany, Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), Canada Citation. *Front. Microbiol*, 12, 730071. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.730071>
- Sasaki, K., Watanabe, M., Suda, Y., Ishizuka, A., & Noparatnaraporn, N. (2005). Applications of photosynthetic bacteria for medical fields. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(5), 481–488. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.481>

- Schwarz, S., Shen, J., Wendlandt, S., Feßler, A. T., Wang, Y., Kadlec, K., & Wu, C.-M. (2014). Plasmid-Mediated Antimicrobial Resistance in Staphylococci and Other *Firmicutes*. *Microbiology Spectrum*, 2(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0020-2014>
- Shapiro, O. H., Kushmaro, A., & Brenner, A. (2010). Bacteriophage predation regulates microbial abundance and diversity in a full-scale bioreactor treating industrial wastewater. *The ISME Journal*, 4, 327–336. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.118>
- Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., & Li, X.-Y. (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnology Advances*, 28(6), 882–894. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.001>
- Siang Tan, C. (2020). Could bacteriophages isolated from the sewage be the solution to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? In *Med J Malaysia* (Vol. 75, Issue 2). <https://www.researchgate.net/publication/340629980>
- Straub, K. L., Schönhuber, W. A., Buchholz-Cleven, B. E. E., & Schink, B. (2004). Diversity of Ferrous Iron-Oxidizing, Nitrate-Reducing Bacteria and their Involvement in Oxygen-Independent Iron Cycling. *Geomicrobiology Journal*, 21(6), 371–378. <https://doi.org/10.1080/01490450490485854>
- Sun, Y., Guan, Y., He, K., Echigo, S., & Wu, G. (2020). Revealing Function of Amino Acids in Nitrifying and Anammox Systems Through Chromatography and Metagenomic Analyses. In *Engineering of Microbial Biosynthetic Pathways* (pp. 303–318). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-2604-6\\_17](https://doi.org/10.1007/978-981-15-2604-6_17)
- Suttle, C. A. (2007). Marine viruses — major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), 801–812. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1750>
- Tait, K., Skillman, L. C., & Sutherland, I. W. (2002). The efficacy of bacteriophage as a method of biofilm eradication. *Biofouling*, 18(4), 305–311. <https://doi.org/10.1080/0892701021000034418>
- Tamaki, H., Zhang, R., Angly, F. E., Nakamura, S., Hong, P., Yasunaga, T., Kamagata, Y., & Liu, W. (2012). Metagenomic analysis of DNA viruses in a wastewater treatment plant in

- tropical climate. *Environmental Microbiology*, 14(2), 441–452. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02630.x>
- Tang, X., Fan, C., Zeng, G., Zhong, L., Li, C., Ren, X., Song, B., & Liu, X. (2022). Phage-host interactions: The neglected part of biological wastewater treatment. *Water Research*, 226, 119183. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.119183>
- Thingstad, T. F., Våge, S., Storesund, J. E., Sandaa, R.-A., & Giske, J. (2014). A theoretical analysis of how strain-specific viruses can control microbial species diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(21), 7813–7818. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400909111>
- Touchon, M., Bernheim, A., & Rocha, E. P. (2016). Genetic and life-history traits associated with the distribution of prophages in bacteria. *The ISME Journal*, 10(11), 2744–2754. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.47>
- Turki, Y., Ouzari, H., Mehri, I., Ammar, A. Ben, & Hassen, A. (2012). Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for the biocontrol of Salmonella of wastewater. *Food Research International*, 45(2), 1099–1105. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.041>
- Van Valen, L. (1974). Molecular Evolution as Predicted by Natural Selection. In *J. Mol. Evol* (Vol. 3).
- Wang, G., Deng, D., Hu, C., Lou, L., Luo, L., He, J., Tian, D., Xiao, Y., He, Y., Zhang, S., Deng, S., Deng, O., Lan, T., & Huang, H. (2020). More effective removal of antibiotic resistance genes from excess sludge by microwave integrated fenton treatment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 149, 104920. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.104920>
- Wang, X., Hu, M., Xia, Y., Wen, X., & Ding, K. (2012). Pyrosequencing Analysis of Bacterial Diversity in 14 Wastewater Treatment Systems in China. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(19), 7042–7047. <https://doi.org/10.1128/AEM.01617-12>
- Wanner, J., Ruzickova, I., Krhutkova, O., & Pribyl, M. (2000). Activated sludge population dynamics and wastewater treatment plant design and operation. *Water Science and Technology*, 41(9), 217–225. <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0210>

- Weinbauer, M. G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(2), 127–181. <https://doi.org/10.1016/J.FEMSRE.2003.08.001>
- Weitz, J. S., Li, G., Gulbudak, H., Cortez, M. H., & Whitaker, R. J. (2019). Viral invasion fitness across a continuum from lysis to latency †. *Virus Evolution*. <https://doi.org/10.1093/ve/vez006>
- Wen, G., Ma, J., Zhang, L., & Yu, G. (2010). Membrane Bioreactor in Water Treatment. *Comprehensive Membrane Science and Engineering*, 4, 195–209. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-093250-7.00032-3>
- Wen, Q., Yang, L., Zhao, Y., Huang, L., & Chen, Z. (2018). Insight into effects of antibiotics on reactor performance and evolutions of antibiotic resistance genes and microbial community in a membrane reactor. *Chemosphere*, 197, 420–429. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.067>
- Whang, L. M., Chien, I. C., Yuan, S. L., & Wu, Y. J. (2009). Nitrifying community structures and nitrification performance of full-scale municipal and swine wastewater treatment plants. *Chemosphere*, 75(2), 234–242. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2008.11.059>
- Winter, C., Bouvier, T., Weinbauer, M. G., & Thingstad, T. F. (2010). Trade-Offs between Competition and Defense Specialists among Unicellular Planktonic Organisms: the “Killing the Winner” Hypothesis Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 42–57. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00034-09>
- Worley-Morse, T. O., & Gunsch, C. K. (2015). Modeling phage induced bacterial disinfection rates and the resulting design implications. *Water Research*, 68, 627–636. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.025>
- Wu, B., Wang, R., & Fane, A. G. (2017). The roles of bacteriophages in membrane-based water and wastewater treatment processes: A review. *Water Research*, 110, 120–132. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.12.004>
- Wu, L., Ning, D., Zhang, B., Li, Y., Zhang, P., Shan, X., Zhang, Q., Brown, M. R., Li, Z., Van Nostrand, J. D., Ling, F., Xiao, N., Zhang, Y., Vierheilig, J., Wells, G. F., Yang, Y., Deng,

- Y., Tu, Q., Wang, A., ... Zhou, J. (2019). Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants. *Nature Microbiology*, 4(7), 1183–1195. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0426-5>
- Wu, Q., & Liu, W.-T. (2009). Determination of virus abundance, diversity and distribution in a municipal wastewater treatment plant. *Water Research*, 43(4), 1101–1109. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.039>
- Xiao, X., Guo, H., Ma, F., Zhang, J., Ma, X., & You, S. (2023). New insights into mycelial pellets for aerobic sludge granulation in membrane bioreactor: Bio-functional interactions among metazoans, microbial communities and protein expression. *Water Research*, 228, 119361. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.119361>
- Yang, Q., Zhao, H., & Du, B. (2017a). Bacteria and bacteriophage communities in bulking and non-bulking activated sludge in full-scale municipal wastewater treatment systems. *Biochemical Engineering Journal*, 119, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.12.017>
- Yang, Q., Zhao, H., & Du, B. (2017b). Bacteria and bacteriophage communities in bulking and non-bulking activated sludge in full-scale municipal wastewater treatment systems. *Biochemical Engineering Journal*, 119, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.12.017>
- Yang, Y., Wang, L., Xiang, F., Zhao, L., & Qiao, Z. (2020). Activated Sludge Microbial Community and Treatment Performance of Wastewater Treatment Plants in Industrial and Municipal Zones. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(2), 436. <https://doi.org/10.3390/ijerph17020436>
- Yasir, M. (2020). *Analysis of Microbial Communities and Pathogen Detection in Domestic Sewage Using Metagenomic Sequencing*. <https://doi.org/10.3390/d13>
- Ye, M., Sun, M., Zhao, Y., Jiao, W., Xia, B., Liu, M., Feng, Y., Zhang, Z., Huang, D., Huang, R., Wan, J., Du, R., Jiang, X., & Hu, F. (2018). Targeted inactivation of antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in a soil-lettuce system by combined

- polyvalent bacteriophage and biochar treatment. *Environmental Pollution*, 241, 978–987. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.070>
- Yu, P., Mathieu, J., Li, M., Dai, Z., & Alvarez, P. J. J. (2016). Isolation of Polyvalent Bacteriophages by Sequential Multiple-Host Approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(3), 808–815. <https://doi.org/10.1128/AEM.02382-15>
- Yu, P., Mathieu, J., Yang, Y., & Alvarez, P. J. J. (2017). Suppression of Enteric Bacteria by Bacteriophages: Importance of Phage Polyvalence in the Presence of Soil Bacteria. *Environmental Science & Technology*, 51(9), 5270–5278. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00529>
- Zhang, B., Yu, P., Wang, Z., & Alvarez, P. J. J. (2020). Hormetic Promotion of Biofilm Growth by Polyvalent Bacteriophages at Low Concentrations. *Environmental Science & Technology*, 54(19), 12358–12365. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c03558>
- Zhao, R., Feng, J., Liu, J., Fu, W., Li, X., & Li, B. (2019). Deciphering of microbial community and antibiotic resistance genes in activated sludge reactors under high selective pressure of different antibiotics. *Water Research*, 151, 388–402. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.034>
- Zhen, G., Pan, Y., Lu, X., Li, Y.-Y., Zhang, Z., Niu, C., Kumar, G., Kobayashi, T., Zhao, Y., & Xu, K. (2019). Anaerobic membrane bioreactor towards biowaste biorefinery and chemical energy harvest: Recent progress, membrane fouling and future perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 115, 109392. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109392>
- Zhu, G., Wang, X., Wang, S., Yu, L., Armanbek, G., Yu, J., Jiang, L., Yuan, D., Guo, Z., Zhang, H., Zheng, L., Schwark, L., Jetten, M. S. M., Yadav, A. K., & Zhu, Y. G. (2022). Towards a more labor-saving way in microbial ammonium oxidation: A review on complete ammonia oxidation (comammox). *Science of The Total Environment*, 829, 154590. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.154590>

Zhu, W., Lomsadze, A., & Borodovsky, M. (2010). Ab initio gene identification in metagenomic sequences. *Nucleic Acids Research*, 38(12), e132–e132. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq275>



## ÖZGEÇMİŞ

| Kişisel Bilgiler |  |
|------------------|--|
| Adı Soyadı       | Şuheda REİSOĞLU  |
| Doğum Yeri       |  |
| Doğum Tarihi     | Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.                               |
| Uyruğu           | <input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer: |
| E-Posta Adresi   |  |

| Eğitim Bilgileri |                           |
|------------------|---------------------------|
| Lisans           |                           |
| Üniversite       | İstanbul Üniversitesi     |
| Fakülte          | Fen Fakültesi             |
| Bölümü           | Biyoloji (TEBİP Programı) |
| Mezuniyet Yılı   | 2021                      |

| Yüksek Lisans |                         |
|---------------|-------------------------|
| Üniversite    | İstanbul Üniversitesi   |
| Enstitü Adı   | Fen Bilimleri Enstitüsü |
| Anabilim Dalı | Biyoloji Anabilim Dalı  |
| Programı      | Biyoteknoloji Programı  |

| Makale ve Bildiriler  |  |
|---|--|
| <p>[1. Reisoglu, Ş., &amp; Aydın, S. (2023a). Bacteriophages as a promising approach for the biocontrol of antibiotic resistance pathogens and the reconstruction of microbial interaction networks in wastewater treatment systems: A review. Science of The Total Environment, 164291.</p> <p>2. Reisoglu, Ş., &amp; Aydın, S. (2023b). Bacteriophage and Their Potential Use in Bioaugmentation of Biological Wastewater Treatment Processes. Sustainability, 15(16), 12216.</p> |  |