

**SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDE SORUNLARA NEDEN
OLAN PATOJEN *SALMONELLA* SPP. VE PSİKROTROF
PSEUDOMONAS FLUORESCENS SUŞLARININ
BİYOKONTROLÜNDE BAKTERİYOFAJLARIN
KULLANIMI**

**THE USE OF BACTERIOPHAGES FOR THE
BIOCONTROL OF PATHOGENIC *SALMONELLA* SPP.
AND PSYCHROTROPHIC *PSEUDOMONAS
FLUORESCENS* STRAINS CAUSING PROBLEMS IN
MILK AND DAIRY PRODUCTS**

EMİNE KÜBRA TAYYARCAN

PROF. DR İSMAİL HAKKI BOYACI

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

*“yüz yıldır ülkemizde güzel bir gelecek için
seslere ve küllere, zincirlere ve ölümlere
bütün acılara.”
Behçet Aysan*

Kadim şehir Antakya’ya...

ÖZET

SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDE SORUNLARA NEDEN OLAN PATOJEN *SALMONELLA* SPP. VE PSİKROTROF *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* SUŞLARININ BİYOKONTROLÜNDE BAKTERİYOFAJLARIN KULLANIMI

Emine Kübra TAYYARCAN

Doktora, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

Temmuz 2023, 158 sayfa

Salmonella spp. ve düşük sıcaklıklarda gelişme gösterebilen psikrotroflar, süt ve süt ürünleri endüstrisinde sorun yaratan mikroorganizmalar arasındadır. *Salmonella*, dünya çapında gıda kaynaklı hastalık etmenlerinin başında gelmekte olup, yol açtığı ciddi sağlık riskleriyle daima gündemde olan patojenlerden biridir. *Pseudomonas fluorescens* kompleks suşları ise, soğutulmuş sütte baskın olarak görülen psikrotroflardan olup özellikle ısıl işlemler sonrasında aktif kalabilen ekstraselüler enzimlerinin yol açtığı pastörize-UHT sütlerde ve süt ürünlerinde raf ömrünün kısalması, jelleşme, aroma bozulmaları gibi sorunlarla öne çıkmaktadır. Bu nedenle bu türlerin çiğ sütte gelişmesinin ve enzim üretmesinin engellenmesi süt endüstrisi açısından önem taşımaktadır. Bakteriyofajlar, bakterileri spesifik olarak enfekte eden virüsler olup gıdalarda patojen/bozulma etmeni bakterilerle savaşta önemli bir alternatif olarak öne çıkmakta ve pek çok uygulamada başarı sağlanmaktadır. Bu çalışmanın amacı, süt endüstrisinde sorun yaratan bu bakterilerin biyokontrolü için çeşitli kaynaklardan ilgili bakteriyofajların

izolasyonu, tanımlanması ve kapsamlı karakterizasyonu ile bu bakteriyofajlardan hazırlanacak karışımların süt ortamında etkinliğinin saptanmasıdır. Bu amaçla ilk olarak bakteri ve bakteriyofaj izolasyonu yapılmıştır. Bakteriyofaj karakterizasyonunda önce konakçı spektrumu belirlenmiş ve hem *Salmonella* hem de *Pseudomonas fluorescens* fajlarının konakçı spesifitelerinin yüksek olduğu saptanmıştır. Transmisyon elektron mikroskobu görüntülerinden yola çıkılarak yapılan analizler sonucunda *Salmonella* fajlarının siphovirus ve myovirus, *Pseudomonas* fajlarının ise siphovirus ve tectivirus morfotiplerinde olduğu saptanmıştır. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi analizi ile bakteriyofajlar sınıflandırılmıştır. Daha sonra bakteriyofajların replikasyon parametrelerini belirlemek amacıyla gelişme ve adsorpsiyon eğrileri çıkarılmıştır. *Salmonella* fajlarının latent dönem sürelerinin 5-25 dakika, patlama büyüklüklerinin 42-176 POB/hücre aralığında; *Pseudomonas* bakteriyofajlarının ise 5-15 dakika ve 10-91 POB/hücre aralığında olduğu saptanmıştır. *Salmonella* bakteriyofajlarında yapılan kısmi sekans analizi sonucunda, bu fajların toksik gen bölgesi taşımadığı saptanmıştır. Buna ek olarak, üç *Pseudomonas* fajının tüm genom analizi yapılmış ve bunlardan birinin GenBank veritabanında bulunmayan yeni bir bakteriyofaj olduğu keşfedilmiştir. Karakterizasyonu takiben bakteriyofaj kokteyllerinin etkinliği süt örneklerinde ortaya konulmuş ve *Salmonella* için 1,01 log birime, *Pseudomonas* içinse UHT sütte 5,29, çiğ sütte ise 3,44 log birime kadar bakteriyel redüksiyon elde edilmiştir. *Pseudomonas* grubu ile yapılan çiğ süt denemesinde ayrıca fajların çiğ sütte görülen diğer baskın mikroorganizma grupları ile sütün fiziksel ve kimyasal özelliklerine etkisi de incelenmiştir. Çalışmalar sonucunda bakteriyofajların farklı içerikteki ve özellikteki sütlerde, sütün pH, titrasyon asitliği, renk gibi özellikleri üzerinde belirgin bir negatif etki göstermeden hedef mikroorganizma grubunun sayısını kontrol altında tutabildiği saptanmıştır. Böylece bu alanda ülkemiz ve dünya literatüründeki boşluklar doldurularak süt ve süt ürünleri endüstrisinde mevcut yöntemlerle üstesinden gelinemeyen sorunların doğal ve ekonomik yoldan çözümüne yönelik güncel ve özgün bir yaklaşım geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* spp., bakteriyofaj, çiğ süt, biyokontrol

ABSTRACT

THE USE OF BACTERIOPHAGES FOR THE BIOCONTROL OF PATHOGENIC *SALMONELLA* SPP. AND PSYCHROTROPHIC *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* STRAINS CAUSING PROBLEMS IN MILK AND DAIRY PRODUCTS

Emine Kübra TAYYARCAN

Doctor of Philosophy, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

July 2023, 158 pages

Salmonella spp. and psychrotrophic microorganisms are significant concerns in the dairy industry. *Salmonella*, a prominent foodborne pathogen, poses substantial health risks and remains a global public health concern. Conversely, strains belonging to the *Pseudomonas fluorescens* complex exhibit psychrotrophic characteristics and are primarily found in refrigerated milk. These bacteria are notable for their production of extracellular enzymes, which can retain their activity even after thermal processing. Consequently, this enzymatic activity can lead to detrimental effects such as a reduction in the shelf life of pasteurized-UHT milk and dairy products, gelation, and flavor deterioration. Therefore, the presence and management of these microorganisms are crucial considerations in maintaining food safety and ensuring the quality of dairy products. Bacteriophages are viruses that specifically infect bacteria and emerge as an important alternative in combating pathogenic/spoilage bacteria in food, achieving success in many applications. The aim of this study was to isolate, identify, and

comprehensively characterize relevant bacteriophages from various sources for the biocontrol of these bacteria causing problems in the dairy industry, and to determine the effectiveness of phage cocktails in milk. For this purpose, bacteria and bacteriophage isolation was first carried out. During the characterization of bacteriophages, the host range was initially determined, revealing a high degree of host specificity for both *Salmonella* and *Pseudomonas fluorescens* phages. Subsequent analysis utilizing transmission electron microscopy images allowed for the identification of the morphotypes of these phages. It was observed that *Salmonella* phages exhibited siphovirus and myovirus morphotypes, whereas *Pseudomonas* phages demonstrated siphovirus and tectivirus. Restriction fragment length polymorphism analysis was used to classify the bacteriophages. Subsequently, one-step growth and adsorption curves were obtained to determine the replication parameters of the bacteriophages and it was found that the latent period of *Salmonella* phages ranged from 5 to 25 min, and the burst sizes ranged from 42 to 176 plaque-forming units (PFU) per cell. For *Pseudomonas* bacteriophages, the latent periods ranged from 5 to 15 min, and the burst sizes ranged from 10 to 91 PFU per cell. Partial sequence analysis of *Salmonella* phages revealed the absence of toxic gene regions. Additionally, the complete genome analysis was performed for three *Pseudomonas* phages, and it was discovered that one of them was a new bacteriophage which was not found in the GenBank database. Following the characterization, the effectiveness of bacteriophage cocktails was demonstrated in milk. For *Salmonella*, a bacterial reduction up to 1.01 log units was achieved, while for *Pseudomonas*, reductions up to 5.29 log units in UHT milk and 3.44 log units in raw milk were obtained. In the raw milk experiment conducted with the *Pseudomonas* spp., the impact of phages on other dominant microorganism groups and the physical and chemical properties of milk were also examined. The studies revealed that bacteriophages could control the target microorganism group without significantly affecting the pH, titratable acidity, color, and other properties of milk in different types and compositions. This research contributes to addressing the existing gaps in the literature, providing a contemporary and innovative approach for the natural and cost-effective resolution of challenges in the dairy industry that cannot be adequately addressed by current methods in both Turkey and globally.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* spp., bacteriophage, raw milk, biocontrol

TEŞEKKÜR

Akademi yolculuğumun başından beri bilgisi ve tecrübesiyle yanımda olan, desteği, motivasyonu ve teşvikleriyle zor zamanlarımdan çok daha güçlü bir şekilde çıkmamı sağlayan, emeğime değer katan kıymetli danışmanım Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI'ya süreçteki tüm katkıları ve kazandırdığı bakış açısı için çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans ve doktora çalışmalarımın tüm aşamalarında yardımları ve öğretileri, samimiyeti ve kaygılarımı uzaklaştıran teskinleriyle yanımda olan sevgili hocam Doç. Dr. Esra ACAR SOYKUT'a emeği, sevgisi ve desteği için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmama katkılarından, yönlendirmeleri ve desteğinden ötürü Doç. Dr. F. Ceyda DUDAK ŞEKER'e teşekkür ederim.

Hem tezimin tüm aşamalarındaki yardımları hem de bir dost olarak bitmeyen desteği, anlayışı ve yıllardır eşlik ettiği tüm yollar için, benim için bu sürecin en önemli kazanımlarından olan Eylül EVRAN'a yürekten teşekkür ederim. Çoğu kez hiç anlatmadan anlayan, görünmez bağlar inşa edip mesafeleri aşan, destekleri ve dostluklarıyla hayatıma değer ve anlam katan Nurdan ERSÖZ ve Hafize ÖZ'e birlikte çıktığımız tüm yolculuklar ve keşfettiğimiz tüm renkler için sonsuz teşekkür ederim. Bu çok zorlu yolu başından beri beraber yürüdüğümüz, iyi ve kötü günlerden geçerken mücadele verdiğimiz dostum Banu SEZER'e teşekkür ederim. Hem deneysel çalışmalarındaki yardımları hem de dostluklarıyla hep yanımda oldukları, yükümü hafifletip neşe ve cesaret verdikleri için Kübra GÜVEN ve Esra EKİZ'e çok teşekkür ederim. Pervin ARI AKIN, Burcu GÜVEN, Demet ATAMAN SADIK ve Elif ERCİOĞLU BÜLBÜL'e destekleri ve dostlukları için teşekkür ederim. Daima uzanmaya hazır eliyle, keyifli sohbeti ve yol arkadaşlığıyla Zeyneb GÜNEYSU'ya yürekten teşekkür ederim. Merve ERYILMAZ'a, beraber yürüttüğümüz tüm çalışmalar ve arkadaşlığı için teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarındaki destek ve yardımlarından ötürü Şeyma Betül ENCÜ'ye teşekkür ederim.

Çocukluğumun, içinde özgürce koşturduğum o eşsiz bahçesini bana sundukları ve yanımda değilken bile hep yanımda olabildikleri için canım büyükbabam Abdullah TAYYARCAN ve anneannem Pakize TAYYARCAN'a; hem ailem, hem de dostum, yol arkadaşım olan, hayatta ne olursa olsun iyi insan olma ve iyi insan kalma çabasını,

gelecek hayallerini bölüştüğüm annem Dilek ve kardeşim Sena TAYYARCAN'a; kendimi bildim bileli hem kardeşim, hem en yakın dostum olan, birlikteyken hep çocuk kalabildiğimiz daimi oyun arkadaşı Aybüke ERTÜRK'e; tüm destekleri için teyzem Melek ERTÜRK, kuzenim Mustafa Eren ERTÜRK, ve Tuncay ERTÜRK'e teşekkür ederim.

Uzaktaki yakınım, canım dostum Serda MİRASOĞLU'na, tüm mesafeleri aşip her zaman benimle olduğu, en zor anlarda bile yüzümü güldürdüğü, yükümü hafiflettiği için sonsuz teşekkür ederim. Birlikte gülmenin, düşünmenin ve paylaşmanın çok büyük keyif olduğu dostum Hümeysra BAYKAŞ'a tüm destekleri için teşekkür ederim.

Hem anlattığı hikayelerle hem de kendi hikayesini yazma şekliyle daimi ilham kaynağı olan Zeynep GÜNAY'a teşekkür ederim.

Taşıdıkları sınırsız neşeyle, yalnızca bir çocuğun rehberliğinde anlaşılacak o gizleri anlattıkları, hayatımı kocaman bir gülümsemeye çevirdikleri için Ayşe-Ömer BADIR'a ve dostlarım Rabia-Ramazan BADIR'a çok teşekkür ederim.

Bana insanın kendini yalnızca yaptığı işle tanımlar ve zamanla tamamen “o iş” halini alırsa neleri ıskalayabileceğini gösteren, hayatta içinden bakmak, görmek, dinlemek, okumak ve durmak geçen bir şeylerin de olduğunu hatırlatan, yürümeye devam etme motivasyonu veren, umutlarımı ve gücümü tazeleyen, bu çalışmanın her anına dahil olmuş yazarlara, şairlere, şarkılara, kırlangıçlara, zeytin ağaçlarına, denizlere, gün batımlarına ve çıktığım tüm yolculuklarla, vardığım, kaldığım ve döndüğüm tüm şehirlere teşekkür ederim.

Tez çalışmam TÜBİTAK tarafından 120O481 ve 120O250 nolu projeler kapsamında desteklenmiştir. Doktora çalışmalarım süresince beni, BİDEB “2211-A Yurt İçi Genel Doktora Burs Programı” kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a ve “YÖK 100/2000 Doktora Bursu” kapsamında destekleyen Yükseköğretim Kurulu'na teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT..... | iii |
| TEŞEKKÜR..... | v |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | x |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xiv |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | xvi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Süt ve Süt Ürünlerinde Sorun Yaratın Bakteriler | 3 |
| 2.1.1. Patojen Bakteriler | 4 |
| 2.1.2. Psikrotrof Bakteriler | 6 |
| 2.1.3. Bozulma Etmeni ve Patojen Bakterilerle Mücadele Yöntemleri..... | 8 |
| 2.2. Bakteriyofajlar | 13 |
| 2.2.1. Bakteriyofajların Genel Özellikleri | 13 |
| 2.2.2. Faj Terapinin Kısa Tarihi..... | 16 |
| 2.2.3. Bakteriyofajların Gıdalarda Kullanımı | 19 |
| 2.3. Süt ve Süt Ürünlerinde <i>Pseudomonas fluorescens</i> ve <i>Salmonella</i> spp. Bakteriyofajlarının Kullanımı | 24 |
| 2.3.1. <i>Salmonella</i> spp. Bakteriyofajları..... | 24 |
| 2.3.2. <i>Pseudomonas fluorescens</i> Bakteriyofajları..... | 25 |
| 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR..... | 28 |
| 3.1. Kimyasallar ve Besiyerleri..... | 28 |
| 3.2. Bakteriler ve Bakteriyofajlar | 28 |
| 3.3. Bakteri İzolasyonu ve Tanımlaması | 29 |
| 3.4. Bakteriyofaj İzolasyonu ve Karakterizasyonu | 30 |
| 3.4.1. <i>Pseudomonas fluorescens</i> Bakteriyofajlarının İzolasyonu ve Saflaştırması | 30 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.2. Zenginleştirme, Titre Belirleme ve Konsantrasyon | 31 |
| 3.4.3. Konakçı Skalasının ve Plak Etkinliğinin Belirlenmesi | 32 |
| 3.4.4. RFLP Analizleri | 32 |
| 3.4.5. Morfolojik Karakterizasyon | 33 |
| 3.4.6. Genom Analizi | 34 |
| 3.4.7. Replikasyon Parametrelerinin Belirlenmesi..... | 35 |
| 3.4.8. pH ve Sıcaklık Duyarlılıklarının Belirlenmesi..... | 36 |
| 3.4.9. Litik Etkinin Belirlenmesi | 36 |
| 3.5. <i>Salmonella</i> Bakteriyofaj Kokteylinin Uygulamaları..... | 37 |
| 3.5.1. Bakteri Karışımları ve Bakteriyofaj Kokteylinin Hazırlanması..... | 37 |
| 3.5.2. <i>In-vitro</i> Etkinlik Denemeleri | 37 |
| 3.5.3. Bakteriyofaj Kokteylinin Sütteki Etkinliğinin Belirlenmesi | 37 |
| 3.5.4. Bakteriyofaj Kokteylinin Çiğ Sütteki Antimikrobiyal Aktivitesinin ve Sütün Mikrobiyal, Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi | 38 |
| 3.6. <i>Pseudomonas fluorescens</i> Bakteriyofaj Kokteylinin Uygulamaları | 38 |
| 3.6.1. Bakteri Karışımları ve Bakteriyofaj Kokteylinin Hazırlanması..... | 38 |
| 3.6.2. Bakteriyofaj Kokteylinin Farklı Yağ İçeriklerine Sahip Sütlerdeki Etkinliğinin Belirlenmesi | 39 |
| 3.6.3. Bakteriyofaj Kokteylinin Çiğ Sütteki Antimikrobiyal Aktivitesinin ve Sütün Mikrobiyal, Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi | 39 |
| 3.7. İstatistiksel Analizler..... | 41 |
| 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA..... | 42 |
| 4.1. <i>Salmonella</i> Bakteriyofajlarının Karakterizasyonu | 42 |
| 4.1.1. Konakçı Skalasını ve Plak Etkinliği Değerlerinin Belirlenmesi | 42 |
| 4.1.2. RFLP Analizleri | 44 |
| 4.1.3. Morfolojik Karakterizasyon | 50 |
| 4.1.4. Genotoksitenin Kontrol Edilmesi | 51 |
| 4.1.5. Replikasyon Parametrelerinin Belirlenmesi..... | 52 |
| 4.1.7. Litik Etkinin Belirlenmesi | 55 |
| 4.2. <i>Pseudomonas fluorescens</i> Bakteriyofajlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu | 57 |
| 4.2.1. Bakteri İzolasyonu ve Doğrulanması | 57 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2.2. Bakteriyofajların İzolasyonu, Saflaştırılması ve Zenginleştirilmesi..... | 61 |
| 4.2.2. Konakçı Skalası ve Plak Etkinliği Değerlerinin Belirlenmesi..... | 63 |
| 4.2.3. RFLP Analizleri..... | 70 |
| 4.2.4. Morfolojik Karakterizasyon..... | 80 |
| 4.2.5. Genomik Karakterizasyon | 83 |
| 4.2.6. Replikasyon Parametrelerinin Belirlenmesi | 86 |
| 4.2.7. pH ve Sıcaklık Stabilitelerinin Belirlenmesi | 94 |
| 4.4. <i>Salmonella</i> Bakteriyofaj Kokteylinin Uygulamaları | 100 |
| 4.4.1. <i>In-vitro</i> Etkinlik Denemeleri..... | 100 |
| 4.4.2. Bakteriyofaj Kokteylinin Sütteki Etkinliğinin Belirlenmesi | 102 |
| 4.4.3. Bakteriyofaj Kokteylinin Çiğ Sütteki Antimikrobiyal Aktivitesinin ve Sütün Mikrobiyal, Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi.. | 103 |
| 4.5. <i>Pseudomonas fluorescens</i> Bakteriyofaj Kokteylinin Uygulamaları..... | 105 |
| 4.5.1. Bakteriyofaj Kokteylinin Farklı Yağ İçeriklerine Sahip Sütlerdeki Etkinliğinin Belirlenmesi..... | 105 |
| 4.5.2. Bakteriyofaj Kokteylinin Çiğ Sütteki Antimikrobiyal Aktivitesinin ve Sütün Mikrobiyal, Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi.. | 108 |
| 5. YORUM..... | 121 |
| 6. KAYNAKLAR | 124 |
| EKLER..... | 140 |
| EK 1 – Çizelgeler..... | 140 |
| EK 2- Tezden Türetilmiş Yayınlar | 154 |
| EK 3 - Tezden Türetilmiş Bildiriler..... | 155 |
| EK 4 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu..... | 156 |
| ÖZGEÇMİŞ | 157 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.1. <i>Salmonella</i> bakteriyofajlarının <i>EcoRV</i> kesimine ait jel görüntüsü..... | 45 |
| Şekil 4.2. <i>Salmonella</i> bakteriyofajlarının <i>HindIII</i> kesimine ait jel görüntüsü | 45 |
| Şekil 4.3. SK-Ti1 ve SK-E2 bakteriyofajlarının fast digest <i>EcoRV</i> kesimi | 46 |
| Şekil 4.4. <i>Salmonella</i> bakteriyofajlarının <i>EcoRI</i> kesimine ait jel görüntüsü | 46 |
| Şekil 4.5. <i>Salmonella</i> bakteriyofajlarının <i>HpaI</i> kesimine ait jel görüntüsü | 47 |
| Şekil 4.6. <i>Salmonella</i> bakteriyofajlarının <i>EcoRI</i> kesimine göre oluşturulmuş filogenetik ilişkilerini gösteren dendrogram | 47 |
| Şekil 4.7. <i>Salmonella</i> bakteriyofajlarının TEM mikrografları | 50 |
| Şekil 4.8. SK-E1 (A), SK-E2 (B) ve SK-E3 bakteriyofajlarına ait gelişme eğrileri | 52 |
| Şekil 4.9. SK-T1 (A), SK-T2 (B) ve SK-Ti1 bakteriyofajlarına ait gelişme eğrileri..... | 52 |
| Şekil 4.10. SK-E1 (A), SK-E2 (B) ve SK-E3 bakteriyofajlarına adsorpsiyon eğrileri ... | 52 |
| Şekil 4.11. SK-T1 (A), SK-T2 (B) ve SK-Ti1 bakteriyofajlarına ait adsorpsiyon eğrileri | 53 |
| Şekil 4.12. <i>Salmonella</i> bakteriyofajlarının farklı pH ve sıcaklık değerlerinde stabilitesi | 55 |
| Şekil 4.13. SK-T2 fajının farklı MOI değerlerindeki litik etkinliği | 55 |
| Şekil 4.14. SK-Ti1 fajının farklı MOI değerlerindeki litik etkinliği | 56 |
| Şekil 4.15. SK-E2 fajının farklı MOI değerlerindeki litik etkinliği | 57 |
| Şekil 4.16. <i>P. fluorescens</i> bakteri izolasyonunda floresan kontrolü | 59 |
| Şekil 4.17. <i>P. fluorescens</i> bakteriyofaj izolasyonu için örneklerde bakteriyofaj varlığı araştırılmasında ilk denemeler..... | 61 |
| Şekil 4.18. Bakteriyofajların tek plak izolasyonu çalışmalarından örnekler..... | 62 |
| Şekil 4.19. Bakteriyofajların konakçı skalası belirleme çalışmalarından örnekler | 64 |
| Şekil 4.20. Bakteriyofaj DNA'larının yatay elektroforez görüntüleri | 70 |
| Şekil 4.21. <i>P. fluorescens</i> bakteriyofaj DNA'larının yatay elektroforez görüntüleri | 71 |
| Şekil 4.22. <i>P. fluorescens</i> bakteriyofaj DNA'larının <i>EcoRI</i> kesimine ait jel görüntüsü.71 | |
| Şekil 4.23. <i>P. fluorescens</i> bakteriyofajlarının <i>EcoRI</i> kesimine göre oluşturulmuş filogenetik ilişkilerini gösteren dendrogram | 73 |
| Şekil 4.24. <i>P. fluorescens</i> bakteriyofaj DNA'larının <i>EcoRV</i> kesimine ait jel görüntüsü | 74 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.25. <i>P. fluorescens</i> bakteriyofaj DNA'larının <i>KpnI</i> kesimine ait jel görüntüsü .. | 75 |
| Şekil 4.26. <i>P. fluorescens</i> bakteriyofaj DNA'larının <i>XbaI</i> kesimine ait jel görüntüsü... | 75 |
| Şekil 4.27. <i>P. fluorescens</i> bakteriyofaj DNA'larının <i>EcoRI</i> , <i>EcoRV</i> ve <i>HindIII</i> kesimlerine ait jel görüntüsü | 76 |
| Şekil 4.28. <i>P. fluorescens</i> bakteriyofaj DNA'larının <i>HindIII</i> kesimine ait jel görüntüsü | 78 |
| Şekil 4.29. <i>P. fluorescens</i> bakteriyofaj DNA'larının <i>XhoI</i> kesimine ait jel görüntüsü... | 78 |
| Şekil 4.30. <i>P. fluorescens</i> bakteriyofaj DNA'larının <i>KpnI</i> , <i>XhoI</i> ve <i>XbaI</i> kesimlerine ait jel görüntüsü..... | 79 |
| Şekil 4.31. L12.1 (A) ve L12.3 (B) bakteriyofajlarına ait TEM mikrografları | 81 |
| Şekil 4.32. L23.2 bakteriyofajına ait TEM mikrografı | 81 |
| Şekil 4.33. A11.1 (A) ve A11.5 (B) bakteriyofajlarına ait TEM mikrografı | 81 |
| Şekil 4.34. P22.1 (A) ve P22.2 (B) bakteriyofajlarına ait TEM mikrografları..... | 81 |
| Şekil 4.35 P41.1 bakteriyofajına ait TEM mikrografı | 82 |
| Şekil 4.36. <i>Pseudomonas</i> P22-1 bakteriyofajının ORF bölgeleri..... | 84 |
| Şekil 4.37. <i>Pseudomonas</i> P22-1, NV1 ve Bf7 bakteriyofaj genomların karşılaştırılması ve ORF bölgeleri..... | 84 |
| Şekil 4.38. L23.2 ve UFV-P2 bakteriyofaj genomlarının BLAST sonucu..... | 84 |
| Şekil 4.39. L12.3 bakteriyofaj genomuna ait olası ORF bölgeleri ve kodladığı proteinler | 85 |
| Şekil 4.40. A11 bakteriyofajlarına ait gelişme eğrileri | 86 |
| Şekil 4.41. L12 bakteriyofajlarına ait gelişme eğrileri | 86 |
| Şekil 4.42. L21 bakteriyofajlarına ait gelişme eğrileri | 87 |
| Şekil 4.43. L23 bakteriyofajlarına ait gelişme eğrileri | 87 |
| Şekil 4.44. P22 bakteriyofajlarına ait gelişme eğrileri..... | 87 |
| Şekil 4.45. PF ve PP bakteriyofajlarına ait gelişme eğrileri | 88 |
| Şekil 4.46. A11 bakteriyofajlarına ait adsorpsiyon eğrileri | 90 |
| Şekil 4.47. L12 bakteriyofajlarına ait adsorpsiyon eğrileri | 90 |
| Şekil 4.48. L21.2 bakteriyofajına ait adsorpsiyon eğrisi | 91 |
| Şekil 4.49. L23 bakteriyofajlarına ait adsorpsiyon eğrileri | 91 |
| Şekil 4.50. P22.1 bakteriyofajına ait adsorpsiyon eğrisi..... | 92 |
| Şekil 4.51. P41.2 bakteriyofajına ait adsorpsiyon eğrisi..... | 92 |
| Şekil 4.52. PF bakteriyofajlarının adsorpsiyon eğrileri | 93 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 4.53. PP.1 bakteriyofajına ait adsorpsiyon eğrisi | 93 |
| Şekil 4.54. L12 bakteriyofajlarının farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki stabilitesi | 94 |
| Şekil 4.55. L21 bakteriyofajlarının farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki stabilitesi | 95 |
| Şekil 4.56. L23 bakteriyofajlarının farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki değerlerindeki stabilitesi..... | 96 |
| Şekil 4.57. P22 bakteriyofajlarının farklı pH ve sıcaklık koşullarındaki stabilitesi..... | 96 |
| Şekil 4.58. P41 bakteriyofajlarının farklı pH ve sıcaklık koşullarındaki stabilitesi..... | 97 |
| Şekil 4.59. A11 bakteriyofajlarının farklı pH ve sıcaklık koşullarındaki stabilitesi | 98 |
| Şekil 4.60. PF1.1 bakteriyofajının farklı pH ve sıcaklık koşullarındaki stabilitesi..... | 98 |
| Şekil 4.61. PF2.1 bakteriyofajının farklı pH ve sıcaklık koşullarındaki stabilitesi..... | 99 |
| Şekil 4.62. PP.1 bakteriyofajının farklı pH ve sıcaklık koşullarındaki stabilitesi..... | 99 |
| Şekil 4.63. MOI 0,01, MOI 0,1, MOI 1, MOI 10 değerlerinde uygulanan <i>Salmonella</i> bakteriyofaj kokteylinin bakteri kokteyli üzerinde 24 saatlik süreçteki etkisi. | 101 |
| Şekil 4.64. Süt ortamında <i>Salmonella</i> bakteriyofaj kokteylinin bakteri eliminasyon etkinliği..... | 102 |
| Şekil 4.65. 4°C’de 5 gün boyunca depolanan çiğ süt örneklerinde <i>Salmonella</i> sayıları | 104 |
| Şekil 4.66. 4°C’de 5 gün boyunca depolanan çiğ süt örneklerinin pH (A) ve titrasyon asitliği (B) değerleri..... | 104 |
| Şekil 4.67. 4°C’de 5 gün depolanan tam yağlı süt örneklerindeki bakteri ve bakteriyofaj sayıları | 106 |
| Şekil 4.68. 4°C’de 5 gün depolanan yağsız süt örneklerindeki bakteri ve bakteriyofaj sayıları | 106 |
| Şekil 4.69. 4°C’de 5 gün (A) ve 25°C’de 24 saat (B) süreyle inkübe edilen çiğ süt örneklerindeki PF sayıları | 109 |
| Şekil 4.70. 4°C’de 5 gün (A) ve 25°C’de 24 saat (B) süreyle inkübe edilen çiğ süt örneklerindeki TMAB sayıları | 110 |
| Şekil 4.71. 4°C’de 5 gün (A) ve 25°C’de 24 saat (B) süreyle inkübe edilen çiğ süt örneklerindeki LAB sayıları..... | 111 |
| Şekil 4.72. 4°C’de 5 gün (A) ve 25°C’de 24 saat (B) süreyle inkübe edilen çiğ süt örneklerindeki EB sayıları..... | 112 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 4.73. 4°C’de 5 gün (A) ve 25°C’de 24 saat süreyle depolanan çiğ süt örneklerinin pH değerleri..... | 116 |
| Şekil 4.74. 4°C’de 5 gün (A) ve 25°C’de 24 saat süreyle depolanan çiğ süt örneklerinin titrasyon asitliği değerleri..... | 116 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2.1. <i>Caudoviricetes</i> sınıfının taksonomik yapısı. Turner vd.'den uyarlanmıştır [81]..... | 16 |
| Çizelge 2.2. Gıda güvenliği uygulamaları için onaylanmış olan bakteriyofaj ürünleri [105] | 21 |
| Çizelge 3.1. <i>Salmonella</i> spp. ile yürütülen çalışmalar kapsamında kullanılan bakteriyofajlar ve konakçıları..... | 29 |
| Çizelge 3.2. RFLP analizlerinde kullanılan kesim karışımının içeriği | 33 |
| Çizelge 3.3. Toksik gen bölgelerine ait primerler | 35 |
| Çizelge 3.4. Örnek grupları, kodları ve depolama koşulları | 39 |
| Çizelge 4.1. <i>Salmonella</i> bakteriyofajlarının konakçı skalası | 42 |
| Çizelge 4.2. <i>Salmonella</i> bakteriyofajların plak etkinliği değerleri..... | 44 |
| Çizelge 4.3. <i>Salmonella</i> fajlarının <i>EcoRI</i> kesimine göre hesaplanan benzerlik indeksleri | 48 |
| Çizelge 4.4. <i>Salmonella</i> bakteriyofaj DNA'larının <i>EcoRI</i> kesim sonucuna göre hesaplanan tahmini fragment boyutları ve toplam boyutları | 48 |
| Çizelge 4.5. <i>Salmonella</i> bakteriyofajlarının morfolojik özellikleri..... | 50 |
| Çizelge 4.6. <i>Salmonella</i> bakteriyofajlarının replikasyon parametreleri..... | 53 |
| Çizelge 4.7. Bakteri izolasyon kaynakları..... | 57 |
| Çizelge 4.8. <i>Pseudomonas</i> cinsine ait olan izolatlar | 59 |
| Çizelge 4.9. Tek plak izolasyonu ile saflaştırılması tamamlanarak titresini yükseltileen bakteriyofajlar | 62 |
| Çizelge 4.10. <i>P. fluorescens</i> bakteriyofajların konakçı skalası..... | 65 |
| Çizelge 4.11. <i>Pseudomonas</i> bakteriyofajlarının farklı cinsler üzerindeki litik aktiviteleri | 66 |
| Çizelge 4.12. <i>P. fluorescens</i> bakteriyofajların plak etkinliği değerleri..... | 68 |
| Çizelge 4.13. P41, L12, P22 ve L21 bakteriyofajlarının DNA'larının <i>EcoRI</i> kesim sonucuna göre hesaplanan fragment boyutları ve toplam boyutları | 72 |
| Çizelge 4.14. PF1, PF2, PP, L23 ve A11 bakteriyofajlarının DNA'larının <i>EcoRI</i> kesim sonucuna göre hesaplanan fragment boyutları ve toplam boyutları | 73 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Çizelge 4.15. A11.2, A11.4 ve A11.6 bakteriyofaj DNA'larının <i>EcoRI</i> kesim sonucuna göre hesaplanan fragment boyutları ve toplam boyutları..... | 77 |
| Çizelge 4.16. L12.3 ve L12.1 bakteriyofaj DNA'larının <i>EcoRV</i> kesim sonucuna göre hesaplanan fragment boyutları ve toplam boyutları..... | 77 |
| Çizelge 4.17. <i>P. fluorescens</i> bakteriyofajlarının morfolojik özellikleri | 82 |
| Çizelge 4.18. <i>P. fluorescens</i> bakteriyofajlarının replikasyon parametreleri..... | 88 |
| Çizelge 4.19. 4°C'de 5 gün boyunca depolanan çiğ süt örneklerinin Briks değerleri. | 105 |
| Çizelge 4.20. 4°C'de 5 gün boyunca depolanan çiğ süt örneklerinin Briks değerleri.. | 117 |
| Çizelge 4.21. 25°C'de 24 saat boyunca depolanan çiğ süt örneklerinin Briks değerleri | 118 |
| Çizelge 4.22. 4°C'de 5 gün boyunca depolanan çiğ süt örneklerinin renk değerleri ... | 119 |
| Çizelge 4.23. 25°C'de 24 saat boyunca depolanan çiğ süt örneklerinin renk değerleri | 120 |
| EK-1. Çizelge 1. P22-1 bakteriyofaj genomunda bulunan proteinler..... | 140 |
| EK-1. Çizelge 2. L23.2 ve UFV-P2 bakteriyofaj genomları tarafından kodlanan proteinler | 143 |
| EK 1-Çizelge 3. L12.3 bakteriyofajının olası ORF bölgeleri ve kodladıkları proteinler | 149 |
| EK-1. Çizelge 4. <i>EcoRI</i> kesimine göre bakteriyofajların benzerlik indeksleri | 153 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

| | |
|----------|---------------------|
| α | Alfa |
| β | Beta |
| κ | Kappa |
| p | Anlamlılık seviyesi |

Kısaltmalar

| | |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| EFSA | Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi |
| EOP | Plak Etkinliği |
| FTS | Fizyolojik Tuzlu Su |
| GRAS | Genellikle Güvenli Kabul Edilen |
| ICTV | Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi |
| KOB | Koloni Oluşturan Birimi |
| MALDI-TOF MS | Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi |
| MOI | İnfeksiyon Çokluğu |
| NCBI | Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi |
| ORF | Açık Okuma Çerçevesi |
| RFLP | Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi |
| POB | Plak Oluşturan Birim |
| TEM | Geçirimli Elektron Mikroskobu |
| TMAB | Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri |

1. GİRİŞ

Gıdaların zengin içeriği onları mikroorganizma gelişimine elverişli kılmaktadır. Bu mikroorganizmaların bir kısmı gıdalarda istenilen özelliklerin gelişmesine yardımcı olurken bir kısmı ise kritik sorunlara neden olabilmektedir. Gıdalardaki önemli mikroorganizma gruplarından biri patojenlerdir. Patojenlerin sebep olduğu gıda kaynaklı hastalıklar, bireyler, toplumlar ve ekonomi üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bir diğer grupsa bozulma etmeni mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar, gıdanın görünümünde, dokusunda, tat ve aromasında istenmeyen değişikliklere neden olmaktadır. Bu durum gıda endüstrisi için ekonomik kayıplara yol açabilmekte, ek olarak, gıda israfına da sebep olarak küresel gıda güvenliği ve sürdürülebilirlik anlamında negatif etki yaratmaktadır. Süt ve süt ürünleri endüstrisinde sorun yaratan patojen ve bozulma etmeni bakterilere, sırasıyla *Salmonella* spp. ve *Pseudomonas fluorescens* örnek verilebilir. *Salmonella* spp. dünya çapında gıda kaynaklı hastalıkların en yaygın nedenlerinden biri olup kontamine gıdaların tüketimi sonucu oluşan salgınlar periyodik olarak meydana gelmekte ve bu salgınlar çok sayıda insanı etkileyerek yaygın hastalıklara, hastaneye yatışlara ve hatta ölümlere yol açabilmektedir. Psikrotrof karakterdeki *Pseudomonas fluorescens* ise çiğ sütte soğukta bekleme süresince en sık rastlanan bozulma etmenlerinden biri olup süt ürünlerinde de önemli kalite problemlerine yol açmaktadır. Isıya dirençli enzimleri sebebiyle süte uygulanan pastörizasyon gibi ısı işlemler bile bu problemleri tamamen ortadan kaldıramamaktadır. Bu da ürün kaybı ve maddi kayıplarla birlikte pek çok sorunu gündeme getirmektedir. Bu bakterilerin kontrolü için sektörde etkin, ekonomik, doğa dostu ve güvenli bir alternatif duyulan ihtiyaç, bu çalışmanın çıkış noktası olmuştur. Son yıllarda patojen ve bozulma etmeni bakterilerle mücadelede öne çıkan alternatiflerden biri de faj terapidir. Bakteriyofajlar, bakterileri spesifik olarak enfekte eden virüsler olup antibiyotik ve diğer kimyasal ajanlara kıyasla önemli avantajları bulunmaktadır. Bu avantajları bakteriyofajları patojen ya da bozulma etmeni bakterilerin eliminasyonunda güçlü bir alternatif haline getirmektedir. Bakteriyofajların hem insan ve hayvanlardaki enfeksiyonların tedavisinde, hem de tarımsal öneme sahip ürünler ve gıda sektöründe başarılı uygulamaları bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı, süt endüstrisinde sorun yaratan bakterilerin başında gelen *Salmonella* spp. ve *Pseudomonas fluorescens*'in

biyokontrolü için çeşitli kaynaklardan ilgili bakteriyofajların izolasyonu, tanımlaması ve kapsamlı karakterizasyonu ile bu bakteriyofajların süt ortamında bakteri eliminasyon etkinliğinin saptanmasıdır. Buna ek olarak, bakteriyofaj kokteyllerinin ortam mikrobiyotası ile sütün fiziksel ve kimyasal özelliklerine etkisi de incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda; *Pseudomonas fluorescens* grubu suşlar çiğ süt ve süt fabrikası ortamı gibi çeşitli kaynaklardan izole edilmiş ve MALDI-TOF MS analizi ile doğrulanarak bir kültür koleksiyonu oluşturulmuştur. Ardından bu bakterilerin konakçı olarak kullanılmasıyla benzer kaynaklardan yerel bakteriyofaj izolasyonu gerçekleştirilmiştir. *Pseudomonas fluorescens* fajlarının ve daha önceki çalışmalar kapsamında izole edilen *Salmonella* bakteriyofajlarının konakçı skalasının çıkarılması, morfolojik özelliklerinin belirlenmesi ve restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi analizleri ile karakterizasyon aşamaları gerçekleştirilmiştir. Sonrasında *Salmonella* bakteriyofajları için toksik gen bölgelerinin analizi yapılmış ve üç adet *Pseudomonas fluorescens* bakteriyofajının da tüm dizi analizi gerçekleştirilerek var olan dizilimlerle farklılıkları ortaya konmuş, bu bakteriyofajlardan birinise henüz GenBank veritabanında bulunmayan yeni bir faj olduğu saptanmıştır. Buna ek olarak, bakteriyofajların replikasyon parametreleri belirlenmiş ve çeşitli pH ve sıcaklık değerlerinde stabiliteleri incelenmiştir. Ardından bu bakteriyofajlardan faj kokteylleri hazırlanarak UHT süt ve çiğ süt gibi farklı özellik ve içerikteki sütlerde ve farklı inkübasyon koşullarında bakteriyofajların etkinliği saptanmıştır. Bakteriyofajların gıda uygulamalarında en kritik aşamalardan biri gerçek örnek denemeleri olup, hem gıdanın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin olumsuz etkilenmemesi hem de en yüksek seviyede bakteriyel eliminasyonun sağlanabilmesi için bakteriyofajların gıda ortamına etkilerinin detaylı bir şekilde araştırılması önem arz etmektedir. Bu bağlamda mevcut tez çalışması kapsamında bakteriyofajların yalnızca hedef mikroorganizma grubuna değil, bütüncül olarak sütteki baskın mikrobiyotaya ve sütün fiziksel ve kimyasal özelliklerine etkisi de incelenmiştir. Elde edilen bulgular, çalışma kapsamında çalışılan bakteriyofajların gıda uygulamalarında başarıyla kullanılma potansiyelini ortaya koymuş, sütteki etkilerinin detaylı bir şekilde gözlemlenebilmesine olanak sağlamıştır. Ayrıca bu çalışma kapsamında izole edilip tanımlanan ve özellikleri iyi bilinen bakteri ve bakteriyofajlardan bir koleksiyon hazırlanması ile hem ülkemizdeki altyapıyankatki sağlanmış, hem de süt ve süt ürünleri açısından sorun yaratan mikroorganizmalara yönelik yeni mücadele yöntemleri için temel oluşturulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Süt ve Süt Ürünlerinde Sorun Yaratan Bakteriler

Süt, yaygın tüketimi ve zengin besin içeriği nedeniyle halk sağlığı açısından kritik önemi olan oldukça değerli bir gıdadır. Sığır sütü ortalama olarak % 87 su, % 4-5 laktoz, % 3-4 yağ, % 3 protein, % 0,8 mineral ve %0,1 oranında vitaminlerden oluşmaktadır. Süt genellikle insan beslenmesinde önemli bir protein kaynağı olarak kabul edilmekte ve litrede yaklaşık 32 g protein sağlamaktadır. İstisnai kalite ve biyolojik önemine ek olarak, süt proteinlerinin enzimatik hidrolizi yoluyla ortaya çıkan biyoaktif peptitler, insan sağlığının korunmasına potansiyel olarak katkıda bulunabilecek bir dizi biyolojik işlev göstermektedir. Süt, çok önemli bir kalsiyum kaynağı olmasının yanında, fosfor, magnezyum, çinko ve selenyum gibi bazı mineralleri ve yağda çözünen A, D ve E vitaminleriyle tiamin ve riboflavin gibi suda çözünen B kompleks vitaminlerini içermektedir [1].

Sütün ekonomik etkisi de oldukça önemlidir ve süt endüstrisinin üretim, ticaret, istihdam ve gelir yaratma gibi çeşitli yönlerinde gözlemlenebilmektedir. Süt üretimi dünya çapında önemli bir tarımsal faaliyettir. Uluslararası Sütçülük Federasyonu (International Dairy Federation, IDF)'na göre, küresel süt üretimi 2020 yılında yaklaşık 910 milyon tona ulaşmıştır. 2022'de dünya süt üretiminin 2021'e göre yüzde 0,6 artışla yaklaşık 930 milyon ton olacağı tahmin edilmektedir [2,3]. Bu kapsamlı üretim, milyonlarca süt çiftçisinin geçimini desteklemekte ve birçok ülkenin ekonomisine katkıda bulunmaktadır. Süt ve süt ürünlerinin dünya çapında ticareti yapılmakta ve bu da onu uluslararası ticarete önemli bir sektör haline getirmektedir. Birçok ülke hem süt hem de süt ürünleri ithalatı ve ihracatı yapmaktadır. Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) verilerine göre 2021 yılında dünya süt ve süt ürünleri dış ticareti 89,6 milyon ton süt eşdeğerine ulaşarak bir rekor kırmıştır. Aynı yıl yağsız süttozu ticareti bir önceki yıla göre % 5 artarken peynir ticaretinin de % 3,8 oranında arttığı belirtilmiştir. Süt ve süt ürünleri ticareti, ülkelerin ihracat gelirlerine ve ticaret dengesine önemli katkılar sağlamaktadır [3].

Süt ve süt ürünleri sektörü, ülkemiz için de kritik öneme sahiptir. Türkiye’de 1.062.547 adet süt işletmesi bulunmakta ve hastalık bulunmayan işletmelerde toplam 860 bin ton süt üretilmektedir. Ayrıca ülkemiz, koyun, keçi ve sığır varlığında Avrupa ülkeleri arasında ilk sırada yer almakta, sağılan inek sayısında ise dünyada 10. sırada bulunmaktadır. TÜİK verilerine göre hayvansal ürünler toplam üretim değeri içerisinde en büyük pay %50,9 ile süte aittir. Buna ek olarak, Türkiye’nin 110’dan daha çok ülkeye süt ve süt ürünleri ihraç ettiği, dünya peynir üretiminde ise dördüncü sırada olduğu belirtilmektedir. Ülkemizde kişi başı süt tüketimi yıllık 274 kg değerine kadar ulaşmış durumdadır [3].

Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda, süt ve süt ürünlerinin hem halk sağlığı hem de ekonomik değer açısından önemi ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple, söz konusu sektörde karşılaşılan problemlerin tespit edilmesi ve üstesinden gelinmesi için etkili, ekonomik ve doğal çözümler üretilmesi gereklilik arz etmektedir. Süt ve süt ürünlerindeki mikrobiyal problemler incelendiğinde, patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmalar öne çıkmaktadır. Bu gruplar ile süt ve süt ürünlerine olan etkileri bu bölümde daha detaylı olarak incelenmiş ve sunulmuştur.

2.1.1. Patojen Bakteriler

Gıda kaynaklı patojenler hem ülkemizde hem de dünyada en önemli sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesinde, hastalık etmeni bakterilerin sayılarını minimuma indirmek ya da onları bütünüyle ortadan kaldırmak hedeflenmektedir. Bu hedefe yönelik uygulamalar sayesinde gıdalar daha güvenli hale gelse de günümüzde gıda kaynaklı hastalıklar hala pek çok ülke için sorun teşkil etmekte, hem can kaybına hem de ekonomik kayba yol açan salgınların önüne geçilememektedir.

Gıda kaynaklı patojenler arasında öne çıkan cinslerden biri de *Salmonella*’dır. *Salmonella*, *Enterobacteriaceae* ailesine ait Gram-negatif, çubuk şekilli, çoğunlukla hareketli, mezofilik ve fakültatif bir anaeroptur [4]. Optimum gelişme sıcaklıkları 38 °C olup 5-46 °C arasında da gelişimini sürdürebilmektedir. Su aktivitesi değerlerinin 0,94-0,99 ve pH değerlerinin 3,8-9,5 arasında olduğu ortamlarda canlı kalabilmektedirler.

Salmonella türleri süt ve süt ürünlerinde, et ürünlerinde ve taze ürünlerde yaygın olarak bulunabilmektedir [5].

Salmonella'nın, dünya genelinde gastrointestinal enfeksiyona neden olan en yaygın bakteriyel patojenlerden olduğu bilinmektedir [6]. Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority, EFSA) tarafından yayınlanan raporlarda, Avrupa Birliği'nde yaklaşık dört gıda kaynaklı salgından birinin *Salmonella* spp. ile ilişkili olduğu bildirilmektedir [7]. Ayrıca *Salmonella* türlerinin neden olduğu gıda kaynaklı salgınların insidans oranının yıllar içerisinde yükselme eğiliminde olduğu belirtilmiştir [8]. 2020 yılında AB'de 52.702 salmonelloz vakası rapor edilmiştir ve salmonelloz, kampilobakteriyozdan sonra insanlarda en sık bildirilen ikinci zoonoz olmaya devam etmektedir [9]. Tüm bunlara ek olarak, Mayıs 2022 itibariyle, Belçika'da üretilen ve dünya çapında en az 113 ülkeye dağıtılan çikolata ürünleri kaynaklı bir *Salmonella* salgınıyla ilişkili olarak, Avrupa'daki 14 ülkenin yanı sıra ABD ve Kanada'dan ilgili ürünlerin tüketimiyle bağlantılı 369 vaka bildirilmiştir [10]. Bu verilerin ışığında, alınan tüm önlemlere rağmen günümüzde gelişmiş ülkelerde bile *Salmonella* kaynaklı hastalıkların hala önemli bir problem olduğu görülmektedir.

Günümüze dek kayıt altına alınan 2.500'den fazla *Salmonella* serotipi arasında, özellikle Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da insan hastalıklarıyla ilişkilendirilen en yaygın serotipler, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) ve *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*)'dur [11]. Bu patojenler, gıda zincirinde çiğ materyalden başlayarak son ürüne dek hemen her aşamada bir kontamasyon kaynağı olabilmektedir. Son yıllarda *Salmonella* kaynaklı salgınlarda kıyma, hindi, tavuk ya da domuz eti, yumurta, ton balığı, sebzeler, meyve ve meyve özleri, taze ürünler, tahıllar, yemişler ve hindistancevizi gibi çok çeşitli gıdalara rastlanılmaktadır [12]. Gıdaların çok çeşitli kompozisyonlara sahip olması, *Salmonella*'nın bulaşıcı dozunu da etkileyebilmektedir. Örneğin, yağ içeriği daha yüksek olan gıdalarda bakteri hücreleri dış etkenlere karşı korunabilmekte ve böylece daha az sayıda hücre bulaşısı bile hastalığa neden olabilmektedir [13]. Alınan tüm önlemlere karşın hala *Salmonella*'nın önemli bir

risk faktörü olduğu ve bu bakteriyle mücadelede yeni, etkin ve doğal yöntemlere ihtiyaç duyulduğu ortaya çıkmaktadır.

2.1.2. Psikrotrof Bakteriler

Süt ve süt ürünlerinin güvenliğini ve kalitesini koruyabilmek için, üretimin her aşamasında mikrobiyal üremenin kontrolü hayati önem taşımaktadır. Soğutma ve soğukta depolamanın rutin bir prosedür halini almasıyla çiğ sütün mikrobiyal kalitesi önemli oranda artmış ve bozulmaya sebep olan mikroorganizmaların birçoğunun gelişimi engellenebilmiştir. Fakat düşük sıcaklıklarda uzun süreli depolama durumunda süt ortamındaki mikrobiyal popülasyon değişmekte ve zamanla Gram-pozitif ve Gram-negatif psikrotrof bakteriler ortamda dominant hale gelmektedir.

Psikrotroflar optimum gelişme sıcaklıkları 20-30°C olan fakat 7°C altında da gelişme gösterebilen, doğada son derece yaygın olan bir gruptur [14]. Çiğ sütte bulunan psikrotrotroflar, ağırlıklı olarak Gram-negatif ve çok daha az sayıda Gram-pozitif cinslerden oluşmaktadır [15]. Bu bakteriler içinde de *Pseudomonas* türlerinin özellikle baskın olduğu tespit edilmiştir. Hatta daha çok *Pseudomonas* türleri tarafından ısıl işleme dayanıklı enzimlerin üretildiği ve bu enzimlerin, pastörize süt, UHT süt ve diğer süt ürünlerinde bozulmaya sebep olduğu belirtilmiştir [16,17]. Yapılan alışmalar, düşük depolama sıcaklıklarında çiğ sütte bulunan bakterilerin %50'den fazlasını *Pseudomonas* türlerinin oluşturduğunu tespit etmiştir [18,19]. Isıl işlem öncesinde çiğ sütte sayısı giderek artan ve 10^5 KOB/mL'nin üzerine çıkan psikrotroflar, UHT sütte jelatinizasyon problemine, pastörize sütte çeşitli flavor sorunlarına ve raf ömrünün kısılmasına, sert peynirlerde ransit ve sabunsu tat oluşumuna, tereyağında ransiditenin hızlanmasına, yoğurtta ise bitter ya da meyvemsi flavor oluşumuna sebep olabilmektedir [20].

Pseudomonas spp. ve özellikle *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*) etkileri pastörize ve UHT sütte en yaygın olarak görülen bozulma etmeni mikroorganizmalardandır [17,21]. Bu bakterilerin büyük bir kısmı ekstraselüler proteolitik, lipolitik ve fosfolipolitik enzimlere sahiptir. Bu enzimlerin aktivitesi, soğuk depolama süresince bir kayıp olmaksızın devam etmektedir. Ayrıca enzimlerin bazıları

pastörizasyondan sonra aktivitesinin büyük kısmını, sterilizasyondan sonra ise %30-40 kadarını koruyabilmektedir [14]. Buna ek olarak *Pseudomonas* türlerinin diğer psikrotroflardan daha kısa bir jenerasyon süresine sahip olması, *Pseudomonas* spp.'ın çok düşük seviyedeki kontaminasyonla bile kısa süre içerisinde süt ortamında dominant hale gelmesine yol açmaktadır [22].

Pseudomonas türlerindeki proteinazlar, sütün κ -, α 1- ve β -kazeinlerini degrade edebilmekte, bu da kolloidal sistemin bozulmasına ve ürünlerde güçlü bitter tat oluşumu ile koagülasyona sebep olmaktadır [23]. UHT sütte meydana gelen jelleşme problemi süt endüstrisi için büyük bir endişe kaynağıdır. Jelleşmenin sebeplerinden biri, kazeinlerin doğal süt proteinazları, bakteriyel proteinazlar veya her ikisi ile birden proteolizidir. Sütteki kolloidal yapının bozulması ve jelleşme ile bunların tetiklediği kaynama gecikmesi gibi problemler, sütün raf ömrünü ve pazar potansiyelini sınırlayan, son zamanlarda kamuoyu tarafından da sıklıkla dile getirilen bir problem halini almıştır [24–26]. Lipazlar ise krema, tereyağı, peynir ve UHT ürünlerinde yağ parçalanmasına bağlı trigliseritleri hidrolize ederek aroma kusurları oluşturmaktadır [27]. Lesitinazlar ise süt yağı globül membranlarını tahrip ederek süt yağının lipazların etkisine karşı duyarlılığını artırmaktadır [28]. Bakterilerin aktiviteleri, soğutma sıcaklıklarında daha da belirginleşmekte ve süt ürünlerinde bulduklarında gri renk oluşumundan hoş olmayan bitter tatlara, jelyasyondan peynir üretim veriminde düşüşe, pH dalgalanmalarından sabunlaşmaya pek çok probleme sebep olmaktadır. Ek olarak, bazı *Pseudomonas* suşlarının renkli veya floresan pigmentler üreterek gıdalarda renk bozulmasına neden olduğu bilinmektedir. 2010 yılında Avrupa'da görülen ve “mavi mozarella” adı verilen vakadan sonra bir süt bozulma etmeni olarak *P. fluorescens*'e duyulan ilgi artmıştır. Bu peynir numuneleri üzerinde yapılan analizler, peynirlerde 10^6 KOB/g gibi yüksek miktarda *P. fluorescens* varlığını ortaya koymuştur [29].

Pseudomonas gessardii (*P. gessardii*), *Pseudomonas libanensis* (*P. libanensis*), *Pseudomonas rhodesiae* (*P. rhodesiae*) ve *Pseudomonas tolaasii* (*P. tolaasii*), *Pseudomonas fluorescens* grup suşlarına ait Gram-negatif bakterilerdir. Bu türlerin bozulmaya katkıda bulunabilecek hücre dışı enzimler ürettikleri bilinmesine rağmen, süt endüstrisi üzerindeki özel önemleri ve etkileri diğer türlere kıyasla daha az çalışılmıştır

[30,31]. *P. tolaasii*, *P. libanensis* ve *P. gessardii*'nin süt ürünlerinde çeşitli renk pigmentlerinin üreticileri olduğu bildirilmiştir. [29,32]. Benzer şekilde *P. rhodesiae* da süt ve süt ürünlerindeki bozulmalarla ilişkilendirilen suşlardan biri olmuştur [33].

Tüm bu bilgilerden hareketle, bu gruptaki mikroorganizmaların hem süt hem de süt ürünleri için kritik problemlere yol açabildiği ve çiğ sütte bu bakterilerin gelişimini ve enzim üretimini sınırlandırmanın önemi ortaya çıkmaktadır.

2.1.3. Bozulma Etmeni ve Patojen Bakterilerle Mücadele Yöntemleri

Gıda kaynaklı patojenler ve bozulma etmeni mikroorganizmalar, insan sağlığına yönelik potansiyel riskleri ve gıda endüstrisi üzerinde yaratabilecekleri ekonomik etkiler nedeniyle önemlidir. Gıdaların mikrobiyal güvenliğini ve stabilitesini sağlamak için tek tek ve kombine halde pek çok kontrol yöntemi kullanılmaktadır. Bu kontrol yöntemleri, güvenli ve yüksek kaliteli gıda ürünlerinin üretimini sağlayarak olası tehlikeleri önlemek, tespit etmek ve azaltmak için birlikte uygulanmaktadır.

Gıdaların mikrobiyal kontrolünü sağlamak amacıyla uygulanan yöntemler bütüncül olarak incelendiğinde bazı temel yaklaşımlar ortaya çıkmaktadır. Bunlardan biri İyi Tarım Uygulamaları (Good agricultural practices, GAP)'dır. Bu prosedürler, mahsulün üretimi ve hasadı sırasında bulaşma riskini en aza indirmek için uygulanmaktadır. Taze ürünlerde mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için gübrenin uygun şekilde işlenmesi, sulama suyunun kalite kontrolü ve hijyen uygulamaları gibi önlemleri içermektedir [34]. Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları (Hazard analysis and critical control points, HACCP) da gıda işletmelerinin gıda güvenliği için önem arz eden tehlikeleri saptamak, değerlendirmek ve kontrol altına almak için kullandıkları sistematik bir yaklaşımdır. Bu yaklaşım gıda üretim sürecinde tehlikelerin önlenebileceği, ortadan kaldırılabileceği veya güvenli seviyelere indirilebileceği kritik kontrol noktalarının belirlenmesini içermektedir [35]. İyi üretim uygulamaları (Good manufacturing practices, GMP), güvenli ve yüksek kaliteli gıdaların üretimini sağlamak için gıda işleme ve üretimi sırasında izlenen bir dizi yönerge ve prosedürdür. Bu uygulamalar arasında sıhhi bir ortamın sağlanması, uygun ekipman bakımı, personel eğitimi gibi önlemler yer almaktadır [36]. Gıda kaynaklı patojenlerin ve bozulma etmeni bakterilerin gelişimini önlemek için sanitasyon ve hijyen uygulamaları da çok önemlidir. Bu uygulamalar, gıda ile temas eden yüzeylerin,

ekipmanın ve kapların düzenli olarak temizlenmesini içermektedir. El yıkama, temiz üniforma giyme ve uygun hijyen protokollerini takip etme gibi gıda üretim süreçlerinde çalışan personeller için uygulanan kişisel hijyen önlemleri de aynı derecede önemlidir [37]. Gıda ürünlerinin güvenliğini sağlamak için ayrıca, gıda kaynaklı patojenlerin ya da bozulma etmenlerinin varlığına yönelik düzenli testler yapılmaktadır. Mikrobiyolojik testler zararlı bakterilerin, virüslerin ve parazitlerin varlığını belirleyebilmekte, bu da potansiyel kontaminasyon kaynaklarının saptanmasına ve uygun önlemlerin alınmasına yardımcı olmaktadır [38]. Bu uygulamalar dışında, gıda üretimi, depolanması ve nakliye süreçleri boyunca uygun sıcaklık kontrolünün sürdürülmesi de gıda kaynaklı patojenlerin gelişimini engellemek için hayati önem taşımaktadır. Bozulabilir gıda maddelerinde mikrobiyal çoğalmayı önlemek için soğuk hava depoları, soğutma ve sıcaklık izleme sistemleri kullanılmaktadır [39]. Tüm bunlara ek olarak, devlet kurumları ve diğer düzenleyici kurumlar da gıda ürünlerinin güvenliğini sağlamak için standartları ve kuralları uygulamaktadır. Bunlar, gıda tedarik zincirinin bütünlüğünü korumaya ve tüketicileri gıda kaynaklı hastalıklardan korumaya yardımcı olan gıda güvenliği düzenlemelerinin denetimlerini ve uygulanmasını içermektedir. Tüm bu önlemler, ülkelere ve yürürlükteki belirli düzenlemelere bağlı olarak değişebilmektedir. Gıda güvenliği, halk sağlığını korumak ve gıda ürünlerinin güvenliğini sağlamak için birden fazla paydaşın birlikte çalışmasını içeren kapsamlı bir bütün olmakla birlikte, çağın ve yeni bilimsel gelişmelerin ışığında güncellenmeye açık, dinamik bir süreç olarak yorumlanmalıdır.

Bu bütüncül yaklaşımların dışında, literatürde hem bozulma etmeni hem de patojen bakterilerle mücadele için etkinliği test edilen konvansiyonel ve yenilikçi çok sayıda yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerin bir kısmı *P. fluorescens* ve *Salmonella* spp. özelinde incelenmiştir.

Süt kalitesini iyileştirmeye yönelik çabalara rağmen *Pseudomonas* bulaşısının önüne tamamen geçilememekte, sağım hijyeni önlemleri ve çiğ sütün soğutulması dışında çiftlik ortamında bakteri üremesini bastırmak için kısıtlı sayıda yöntem bulunmaktadır [40]. Literatürde ise *P. fluorescens* de dahil olmak üzere, psikrotrof mikroorganizmalar ile mücadelede kullanılan pek çok alternatif yöntem denenmiştir. Örneğin Azot gazının çiğ

sütteki psikrotrofları ve mezofilleri kontrol etme potansiyeli, literatürde incelenen konular arasındadır [41]. Benzer şekilde, koyun sütünde yüksek hidrostatik basıncın *P. fluorescens* suşlarına etkisi farklı sıcaklık ve basınç değerlerinde incelenmiş ve bu koşullarda bakteriyel inhibisyon gözlenmiştir [42].

Araştırılan yöntemlerden bazıları da kimyasal temelli olup farklı antimikrobiyal bileşenlerin kullanımını içermektedir. Örneğin bir çalışmada, laktobionik asidin *P. fluorescens*'e karşı antibakteriyel etkinliği ve etki mekanizması araştırılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir [43]. Bir başka çalışmada dört esansiyel yağın (bergamot, tarçın, manuka ve kekik) *P. fluorescens*'e karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite değerlendirilmiştir [44]. Linaloolün etkisini inceleyen bir başka çalışmada da bu bileşenin güçlü bir antibakteriyel özelliği olduğu tespit edilmiş ve etki mekanizmaları araştırılmıştır [45]. Biyoaktif bileşenler de antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılabilir ve paketlenme sistemlerine entegre edilebilmektedir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, laktoferrin, kuersetin ve hidroksiapatitin *P. fluorescens* eliminasyonu için sinerjistik bir etki gösterdiği tespit edilmiştir [46]. Bu kimyasallar dışında, çeşitli proses atıkları da incelenmiş olup, bir çalışmada, zeytin değirmeni atık suyu polifenol ekstraktının, *P. fluorescens* suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesi test edilmiş ve MIC değerinin üstündeki konsantrasyonlarda belirgin bakteriyel redüksiyon elde edilebilmiştir [47]. Bunlara ek olarak, alternatif bir yaklaşımla soya fasulyesi ve nohuttan izole edilen nativ ve esterifiye proteinlerin, 4°C'de 30 gün bekletilen çiğ sütteki psikrotrof bakterilerin gelişimini kontrol etme ve süt kalitesini korumadaki etkinliği de araştırılmıştır [48].

Çeşitli bakteriyosinlerin de hem kendi başlarına hem de diğer yöntemlerle kombinasyon halinde kullanıldığı görülmüştür. Örneğin bir çalışmada, *Propionibacterium thoenii* tarafından üretilen bir bakteriyosin olan propionisin PLG-1'in aralarında *P. fluorescens* de bulunan psikrotrofların üzerindeki etkileri araştırılmış ve inhibisyon gözlemlenmiştir [49]. Nisin ile birlikte yüksek basınç uygulamasının etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada, 500 IU/mL nisin ile 5 dakika süreyle 250 MPa basınç uygulamasının *P. fluorescens* sayısında 8-log birimden fazla bir azalma sağladığı saptanmıştır [50].

P. fluorescens inhibisyonu için araştırılan yöntemlerden bazıları da diğer mikroorganizmaların kullanımını içermektedir. Örneğin bir çalışmada, *Lactobacillus rhamnosus*'un soğutulmuş çiğ süttten izole edilen farklı *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas putida* popülasyonlarına depolama süresi boyunca gösterdiği inhibisyon etkisi araştırılmıştır [51]. Bir başka çalışmada ise, yerel ürünlerden izole edilen laktobasil suşlarının (*Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* ve *Lactobacillus salivarius*) antibakteriyel aktivitesi değerlendirilmiştir [52].

Literatür *Salmonella* spp. özelinde araştırıldığında ise, bakteriyle mücadele için benzer yaklaşımların kullanıldığı görülmektedir. Isıl işlem, gıdalardaki *Salmonella*'yı kontrol etmek için yaygın olarak kullanılan temel bir yöntemdir. Pişirme, pastörizasyon ve diğer ısıl işlemlerle bakteriler etkili bir şekilde kontrol altına alınabilmektedir. Örneğin, buhar pastörizasyonunun badem yüzeyinde *Salmonella* kontaminasyonunu azaltma üzerindeki etkisi araştırılmış ve 25 saniyelik buhar uygulamasının, çiğ bademlerdeki bakteriyel yükte görsel kalite bozulması olmaksızın 5-log birimlik bir azalma elde etmek için yeterli olduğu bildirilmiştir [53]. Yüksek basınçlı işleme (High pressure processing, HPP) patojenleri etkisiz hale getirmek için gıdaları yüksek seviyelerde hidrostatik basınca tabi tutmayı içeren bir yöntemdir. HPP'nin olgunlaşma sürecine ek bir önlem olarak uygulanmasıyla, *Salmonella* popülasyonunda daha büyük bir düşüşe neden olduğu ve olgunlaştırılmış sosislerde daha düşük sayıda bakteri varlığının tespit edilebildiği bildirilmiştir [54]. Soğuk plazma işlemi, gıdaları antimikrobiyal özelliklere sahip reaktif oksijen ve nitrojen türleri üreten termal olmayan bir plazma uygulamasına tabi tutmayı içermekte ve bu yöntemin *Salmonella* dekontaminasyonu amacıyla hem tek başına hem de diğer yöntemlerle kombine halde sıklıkla kullanıldığı görülmektedir [55–57]. Gama ışınlama gibi klasik yöntemlere ek olarak, yüksek yoğunluklu atımlı ışık (High intensity pulsed light, HIPL) ve ultraviyole-C (UV-C) Işık gibi görece yeni yöntemler de gıdalardaki ve gıdayla temas eden yüzeylerdeki *Salmonella*'yı etkisiz hale getirmek için kullanılmıştır [58–60]. Bunlar haricinde, nanoteknolojinin de gıdalardaki *Salmonella*'yı kontrol etmek için yenilikçi yaklaşımlar sunduğu görülmektedir. Son yıllarda özellikle gümüş nanopartiküllerin gıdalarda *Salmonella* gelişimini engellemek için kullanımına dair araştırmalar bulunmaktadır [61,62].

Farklı gıda gruplarında ve gıda ile temas eden yüzeylerde *Salmonella*'yı kontrol etmek için organik asitler de dahil olmak üzere çok çeşitli kimyasalların kullanılabilirdiği görülmüştür. Bunların arasında asetik asit, propiyonik asit, sitrik asit, sodyum hipoklorit, hidrojen peroksit, klor ve klor dioksit gazı bulunmaktadır [63–67]. Fenolik bileşenler, uçucu yağlar ve çeşitli bitki ekstraktları da gıdalardaki *Salmonella*'ya karşı mücadelede yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Örneğin yapılan bir çalışmada bitkilerden elde edilen 17 çeşit esansiyel yağın ve dokuz yağ bileşeninin elma suyunda gıda kaynaklı patojenlere karşı antibakteriyel aktivitesi incelenmiş ve sonuç olarak melisa yağı, karvakrol, kekik yağı, terpineol, geraniol, limon yağı, sitral, limon otu yağı, tarçın yaprağı yağı ve linaloolun *Salmonella*'ya karşı en etkili antimikrobiyal aktiviteyi gösteren ajanlar olduğu belirlenmiştir [68]. Bir başka çalışmada tarçın esansiyel yağının tek ve ultrasound teknolojisiyle kombine halde antibakteriyel etkileri araştırılmış ve başarılı redüksiyon değerleri elde edilmiştir [69]. Baharat yağı nanoemülsiyonları da, taze meyve ve sebzeler başta olmak üzere pek çok gıda grubunda patojenlerle mücadelede denenilen alternatiflerden biri olmuştur [70].

Kimyasallar dışında, çeşitli mikroorganizma gruplarının *Salmonella* inhibisyonu üzerine etkisi de araştırılmıştır. Bunlar arasında en yaygın denenilen gruplardan biri probiyotikler olmuştur. Probiyotikler, tüketildiğinde sağlık yararları sağlayabilen canlı mikroorganizmalardır. Bazı probiyotik suşlar, *Salmonella* da dahil olmak üzere gıda patojenlerinin gelişimini engelleme yeteneği göstermektedir ve bu konuda yürütülmüş çok sayıda çalışma bulunmaktadır [71–73]. Probiyotikler dışında, aynı kaynaklar için yarışarak *Salmonella*'yı geride bırakan ve gelişimini engelleyen zararsız bakteri suşlarının kullanımını içeren rekabetçi dışlama stratejisi de bir kontrol yöntemi olarak araştırılmaktadır.

Tüm bunlar, gıdalardaki *P. fluorescens* ve *Salmonella*'nın kontrolü için üzerinde çalışılan geleneksel ve yenilikçi yöntemlerden sadece birkaçıdır. Bu yöntemler umut verici olsa da, kendi içlerinde dezavantajları bulunmakta ve etkinliklerini optimize etmek, gıda kalitesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek ve ticari uygulama güvenliklerini sağlamak için çok daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Alınan tüm önlemlere ve kontrol

yöntemlerinin çeşitliliğine karşın, bu mikroorganizmalarla mücadelede hala çevre dostu ve doğal, ekonomik ve etkili yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2. Bakteriyofajlar

2.2.1. Bakteriyofajların Genel Özellikleri

Bakteriyofajlar, kısaca fajlar, bakterileri spesifik olarak enfekte eden virüslerdir. Tam bir hücre yapısına sahip olmayan ve sadece tek bir nükleik asit içeren son derece küçük yapılardır. Yüksek konakçı spesifiteleri nedeniyle, bazen yalnızca belirli bakterileri ve hatta aynı tür içindeki bazı suşları enfekte edebilmektedirler [74]. Bakteriyofajlar, dünya üzerindeki en yaygın ve çeşitli türlerden biri olup çöllerden kutuplara kadar ekstrem iklim şartlarının yaşandığı ekosistemlerde varlığını sürdürebilmektedir [75]. Örneğin deniz suyunun mililitresinde yaklaşık 10^7 virüs bulunmakta, benzer şekilde orman veya tarım topraklarının gramında da yaklaşık 10^9 seviyesinde bakteriyofaj varlığına rastlanmaktadır [76,77].

Bakteriyofajlar enfeksiyon döngülerine göre, genel olarak litik veya lizojenik bakteriyofajlar olarak sınıflandırılmaktadır. Litik döngünün ilk aşaması adsorpsiyon olup bu aşamada bakteriyofaj, bakteri hücresinin yüzeyindeki spesifik reseptörleri tanımakta ve bunlara bağlanmaktadır. Bu bağlanmaya tipik olarak bakteriyofajın kuyruk lifleri üzerindeki protein yapıları aracılık etmektedir. Ardından gelen penetrasyon aşamasında bakteriyofaj, genellikle tek sarmallı veya çift sarmallı bir DNA olan genetik materyalini bakteri hücrelerine enjekte etmektedir. Bu süreç genellikle, bakteriyofajın kuyruk kılıfının kasılarak viral DNA'yı bakteri hücre duvarı ve zarı boyunca ilerletmesini içermektedir. Daha sonra gelen, replikasyon ve transkripsiyon aşamasıdır. Bu aşamada bakteriyofaj bakteri hücresinin içine girdikten sonra, bakteriyofaj DNA'sı konağın hücresel mekanizmasının kontrolünü ele alır. Viral DNA, bakteriyofaj genomunun birden çok kopyası üretilerek çoğaltılır. Bakteriyofaj genlerinin transkripsiyonu da meydana gelir ve bu süreç viral proteinlerin senteziyle sonuçlanır. Bunu takiben yeni sentezlenen bakteriyofaj DNA'sı ve proteinleri, olgun bakteriyofaj virionlarını oluşturmak için bir araya gelir. Viral DNA, bakteriyofajın baş bölgesini oluşturan protein kapsidi içinde paketlenir. Diğer kuyruk bileşenleri ile birlikte kuyruk lifleri veya sivri uçlar da birleştirilir. Bakteriyofajların sayısı arttıkça, lizin, holin gibi hidrolazlar hücre duvarının

ana bileşeni olan peptidoglikanı parçalayarak bu yapıyı zayıflatır. Litik döngü, yeni oluşan olgun bakteriyofajların, bakteri hücresi parçalanırken çevredeki ortama salınmasıyla sonuçlanır. Bu bakteriyofajlar, diğer duyarlı bakteri hücrelerini enfekte etmeye ve yeni litik döngüleri başlatmaya devam edebilmektedir [74,75,78,79]. Lizojenik döngüde ise bakteriyofaj, genomunu konakçı bakterinin DNA'sına entegre ederek bir probakteriyofaj haline gelir. Probakteriyofaj, konağın DNA'sı ile birlikte kopyalanmakta ve daha sonra belirli koşullar altında litik döngüye girebilmektedir. Litik döngüye benzer şekilde, lizojenik döngü, bakteriyofajın bakteri hücresinin yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanmasıyla başlar. Bakteriyofaj, genetik materyalini hücre duvarı ve zarından geçerek bakteri hücresine enjekte eder. Litik döngüden farklı olarak, lizojenik döngüde bakteriyofaj DNA'sı bakteri kromozomuna entegre olur. İntegraz adı verilen bir enzim bu işlemi kolaylaştırmaya yardımcı olur. Entegre bakteriyofaj DNA'sı artık probakteriyofaj olarak isimlendirilmektedir. Bir kez entegre edildikten sonra, probakteriyofaj, normal bakteri hücre bölünmesi sırasında bakteri kromozomu ile birlikte çoğalmaktadır. Probakteriyofaj kopyalanır ve bakteri hücresi bölünürken yavru hücrelere aktarılır. Bu durum, bakteri popülasyonunda probakteriyofajın kalıtımını sağlamaktadır. Entegre probakteriyofajı içeren bu bakteri hücresi, lizojeni olarak bilinen bir duruma girer. Bu durumda, probakteriyofaj uykuda kalır ve aktif olarak yeni bakteriyofaj parçacıkları üretmez. Bakteri hücresi normal büyümesine ve replikasyonuna devam eder ve probakteriyofaj DNA'sı bakteriyel kromozom içinde stabil bir şekilde korunur. Çeşitli stres faktörlerine maruz kalma gibi belirli koşullar altında, probakteriyofaj lizojenik durumdan çıkıp litik döngüye girebilir. Bu sürece indüksiyon denir. İndüksiyon, probakteriyofaj DNA'sının bakteriyel kromozomdan ayrılmasına ve litik döngüyü başlatmasına neden olan çeşitli faktörler tarafından tetiklenebilir. Probakteriyofaj lizojenik durumdan çıktıktan sonra, viral DNA replike olur ve bakteri hücresi içinde bakteriyofaj proteinleri sentezlenir. Yeni bakteriyofaj parçacıklarının montajı, litik döngüye benzer şekilde gerçekleşir. Sonunda, bakteri hücresi parçalanır ve yeni oluşan bakteriyofaj partiküllerini çevreleyen ortama salar. Bu bakteriyofajlar daha sonra diğer bakteri hücrelerini enfekte etmeye ve litik veya lizojenik bir döngü oluşturmaya devam edebilir. Lizojenik döngü, bakteriyofajın bakteri konakçısı ile uzun bir süre bir arada var olmasına, DNA'sını kopyalayıp sonraki nesil bakteri hücrelerine iletmesine izin vermektedir [78,79]. Daha detaylı bir inceleme yapıldığında ise, bu iki döngünün de kendi içinde çeşitlendiği ortaya çıkmakta ve sınıflandırmanın daha farklı kategorilere göre yapılması görüşü öne çıkmaktadır. Bu görüşe göre bakteriyofajlar; “litik ve ılımlı

(temperate) olmayan”, “kronik ve ılımlı olmayan”, “litik ve ılımlı”, ve “kronik ve ılımlı” olmak üzere dört sınıfa ayrılabilir [80].

Bakteriyofaj genom boyutları 3,4 kb ile yaklaşık 500 kb arasında değişmekte ve her bakteriyofaj genomu, henüz tam olarak karakterize edilmemiş çok sayıda protein ve gen içermektedir. Bakteriyofajlar, içerdikleri nükleik asit tipine göre çift sarmallı DNA (dsDNA) bakteriyofajları, tek sarmallı DNA (ssDNA) bakteriyofajları, çift sarmallı RNA (dsRNA) bakteriyofajları ve tek sarmallı RNA (ssRNA) bakteriyofajları olarak gruplandırılabilir. Şu ana dek karakterize edilmiş bakteriyofajların çoğunun çift sarmallı DNA'ya sahip olan kuyruklu bakteriyofajlar olduğu belirtilmektedir [74].

Bakteriyofajların sınıflandırılması, konakçı aralığı, boyutu, yapısı ve morfolojisi, nükleik asit ve genomik benzerliğe dayalı olarak Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) tarafından düzenli olarak güncellenmektedir. ICTV'nin son kararı ile resmileşen bakteriyofaj sınıflandırmasındaki en önemli değişiklik, morfolojiye dayalı *Myoviridae*, *Podoviridae* ve *Siphoviridae* ailelerinin ve *Caudovirales* takımının kaldırılmasıdır. Bu takım, ikosaedral kapsitlere ve çift sarmallı DNA genomuna sahip tüm kuyruklu bakteriyel ve arkeal virüsleri bir araya getiren *Caudoviricetes* sınıfı ile değiştirilmiştir. Aynı zamanda, "podovirus", "myovirus" veya "siphovirus" gibi terimlerin, bu ayırt edici özellikleri yansıtmak için serbestçe kullanılabilmesi; ancak herhangi bir resmi taksonomik anlamı veya önemi bulunmayacağı bildirilmiştir. Şu anda, *Caudoviricetes* sınıfında dört takıma (*Crassvirales*, *Kirjokansivirales*, *Thumleimavirales* ve *Methanobavirales*) bölünmüş 14 aile bulunmaktadır. Henüz familya veya takım düzeyinde sınıflandırılmamış 37 alt familya ve 631 cins ile birlikte toplam 33 ek familya kurulmuş ancak bunlar henüz bir takıma tahsis edilmemiştir [81]. *Caudoviricetes* sınıfının taksonomik yapısı aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. *Caudoviricetes* sınıfının taksonomik yapısı. Turner vd.'den uyarlanmıştır [81].

| Takım | Familya | Alt-familya | Cins | Tür |
|--------------------------|--------------------------|-------------|------|------|
| | <i>Crevaviridae</i> | 2 | 3 | 4 |
| | <i>Intestiviridae</i> | 3 | 11 | 18 |
| <i>Crassvirales</i> | <i>Suoliviridae</i> | 5 | 16 | 36 |
| | <i>Steigviridae</i> | 1 | 12 | 15 |
| | <i>Anaerodiviridae</i> | - | 1 | 1 |
| <i>Methanobavirales</i> | <i>Leisingerviridae</i> | - | 1 | 1 |
| | <i>Graaviviridae</i> | - | 2 | 2 |
| | <i>Haloferuviridae</i> | - | 3 | 3 |
| <i>Kirjokansivirales</i> | <i>Pyrstoviridae</i> | - | 1 | 1 |
| | <i>Shortaselviridae</i> | - | 1 | 1 |
| | <i>Druskaviridae</i> | - | 2 | 2 |
| <i>Thumleimavirales</i> | <i>Hafunaviridae</i> | - | 4 | 10 |
| | <i>Halomagnusviridae</i> | - | 1 | 1 |
| | <i>Soleiviridae</i> | - | 1 | 1 |
| Tanımlanmamış | - | 84 | 690 | 2156 |

2.2.2. Faj Terapinin Kısa Tarihi

Bakteriyofajların keşfi, 1800'lü yılların sonlarına dayanmaktadır. İngiliz bakteriyolog Ernest Hanbury Hankin, ilk olarak 1896'da Hindistan'daki Ganga ve Yamuna nehirlerinin sularında tespit ettiği bir antibakteriyel aktivite bildirmiştir. Bu antibakteriyelin filtrelenebilir ve ısıya duyarlı olduğunu da kaydeden Hankin, bu maddenin kolera etmenini sınırladığını saptanmıştır. Fakat bu duruma neyin sebep olduğu açıklanamamış, dolayısıyla Hankin'in bakteriyofaj varlığıyla ilgili bulgularının sonuçları belirsiz kalmıştır [82–84].

1915'te İngiliz bakteriyolog Frederick William Twort Londra'daki Brown Enstitüsü'nde *Staphylococcus* üzerinde çalışırken bakteri kültürlerinin yok edildiğini fark etmiş, ancak bu duruma herhangi bir görünür bakterinin neden olmadığını tespit etmiştir. Daha fazla araştırmanın ardından Twort, bu eliminasyondan bilinmeyen bir ajanın sorumlu olduğunu

varsaymış, ayrıca bu ajanın bakterileri öldürme sürecinde kendisini çoğalttığı sonucuna da varmıştır [83,85].

Bakteriyofaj kavramı ise ilk olarak 1917'de Kanadalı-Fransız bir mikrobiyolog olan Félix d'Herelle tarafından tanımlanmıştır. D'Herelle, dizanteriye neden olan bakterileri yüksek oranda içerdiği bilinen Hindistan'daki Ganj Nehri'nden bir su örneğini filtreleyerek çıkarılan bir deney yapmıştır. Bu filtrelenmiş suyu bir petri kabındaki bakteri kültürüne eklemiş ve kısa bir süre sonra kaptaki bakterilerin tamamen yok edildiğini, filtrelenmiş su içermeyen kontrol kültürlerinde ise böyle bir durum gözlenmediğini tespit etmiştir. Bu deney, doğada bakteriyofajların varlığına dair güçlü kanıtlar sağlamıştır. D'Herelle, bakterileri enfekte etme ve yok etme yeteneklerini vurgulamak için bu virüslere "bakteri yiyiciler" anlamına gelen "bakteriyofajlar" adını vermiştir. Bakteriyofajların, "faj terapi" adını verdiği yaklaşımla, bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılabileceğini de öne sürmüştür. D'Herelle, bakteriyofajlar ve onların potansiyel terapötik uygulamaları hakkında kapsamlı araştırmalar yürütmüştür. Bu dönemde özellikle dizanteri üzerine yaptığı çalışmalar dikkat çekici olmuştur. D'Herelle'in bakteriyofajlar üzerindeki bu çalışmaları kabul görmüş ve diğer bilim adamları tarafından daha fazla araştırma yapılmasına yol açmıştır [83,84,86].

Bu keşiflerin ardından 1920'ler boyunca faj terapi çalışmaları büyük artış göstermiştir. Koleradan dizanteriye, bubonik vebadan konjunktivite ve deri enfeksiyonlarına pek çok hastalığın tedavisi için bakteriyofaj çalışmaları yürütülmüştür [87]. Hatta bu dönemde ilk ticari bakteriyofaj ürünlerinin üretimi de başlamış, örneğin Brezilya'daki Oswaldo Cruz Enstitüsü'nde dizanteriye karşı kullanılmak üzere bakteriyofaj üretimleri gerçekleştirilmiştir [88].

Bu yoğun çalışmalar, beraberinde faj terapiye yönelik eleştirel bir bakış açısı da getirmiştir. Bu bağlamda, 1930'ların başından itibaren faj terapi denemelerinde kontrol gruplarının eksikliği, bakteriyofajların etkinliklerinin düşük oluşu, bakteriyofaj lizatlarının saflıklarının yetersiz olması gibi eleştirilerin yer aldığı çok sayıda çalışma yayınlanmıştır [87,89,90]. Bunlara karşın hem terapi uygulamaları hem de bakteriyofaj doğasını anlamak üzerine yapılan çalışmalar devam etmiştir. Bu süreçte dikkate değer

çalışmalar yürütenlerden biri de Alman-Amerikalı bir fizikçi ve biyolog olan Max Delbrück'tür. 1937-1939 yılları arasında Delbrück, Salvador Luria ve Alfred Hershey ile birlikte bakteriyofajların viral doğasını gösteren deneyler yapmışlar ve bu deneyler sonucunda bakteriyofajların, genetik materyallerini bakterilere enjekte ettikten sonra, konağın hücresel mekanizmasını kullanarak çoğaldıklarını ve bakteriyel liziz yaptığını göstermişlerdir. Buna ek olarak, 1940 yılında Ruska, ilk kez bir bakteriyofajın elektron mikroskobu görüntüsünü almıştır [87,91].

1940'larda penisilin başta olmak üzere antibiyotiklerin keşfi ve kullanıma başlanmasıyla birlikte faj terapi tarihinde de önemli bir kırılma noktası yaşanmıştır. Antibiyotiklerin üretiminin kolaylığı ve gittikçe yaygınlaşması ile faj terapiye de daha mesafeyle ve eleştirel yaklaşılmaya başlanılmıştır. 1970'lere kadar içlerinde beta-laktamların, tetrasiklinlerin, glukopeptitlerin, sülfonamidlerin ve rifampisinlerin de bulunduğu 40'ı aşkın antibakteriyel bileşenin keşfedildiği, üretildiği ve aktif şekilde kullanıldığı bir dönem başlamıştır. Bu dönemde Batı'nın bakteriyofajlara karşı ilgisi bitse de Doğu Avrupa ve Sovyetler Birliği'nde bakteriyofaj araştırmaları ve kullanımı devam etmiştir [87,92]. Bu dönemde faj terapi araştırmalarında başı çeken iki kuruluş Gürcistan'daki Eliava Bakteriyofaj, Mikrobiyoloji ve Viroloji Enstitüsü ve Polonya'daki Hirszfild İmmünoloji ve Deneysel Terapi Enstitüsü olmuştur. 1977 yılında Sanger tarafından ilk kez bir bakteriyofaj genomu dizilenmiştir. 1980'li yıllarda Slopek, Smith ve Huggins, insanlarda ve çeşitli hayvan modellerinde septisemi ve menenjit gibi enfeksiyonlara sebep olan antibiyotik dirençli bakterilere karşı bakteriyofaj terapi kullanımını araştırmıştır ve 1990'lı yıllarda bakteriyofaj terapinin hayvan modellerinde test edilmesi yeniden gündeme gelmiştir [87,91,93–97].

2000'lerin başında ise yeni antibiyotik keşiflerinin azalması ve antibiyotik direnci sorununun yükselişi bir alternatif metot arayışına sebep olmuş ve böylece faj terapi çalışmalarındaki artışın da önü açılmıştır. 2006 yılında *Listeria monocytogenes*'in biyokontrolü amacıyla ilk ticari bakteriyofaj ürünü üretilmiş, 2009 yılında Wright ve arkadaşları tarafından çoklu ilaç direncine sahip *Pseudomonas aeruginosa*'nın sebep olduğu kronik otitise karşı ilk faz I/II kontrollü klinik denemeleri gerçekleştirilmiştir. 2015 yılında Phagoburn adı verilen denemeler kapsamında yanık enfeksiyonundan

muzdarip hastalarda faj terapi denemeleri gerçekleştirilmiştir. 2017 yılında Schooley ve arkadaşları *Acinetobacter baumannii* septisemisine karşı bakteriyofaj terapiyi kişiselleştirmeyi başarmıştır [87,98–100].

Tüm bu gelişmelerin ardından, özellikle son 10 yılda bakteriyofaj çalışmaları her alanda büyük ilerleme göstermiştir. İnsanlardaki terapötik kullanımın yanı sıra, patojen ya da bozulma etmeni bakterilerin problem yarattığı tüm alanlarda yenilikçi bir yaklaşım olarak etkinliği araştırılmaya devam etmektedir. Bakteriyofajların genetik ve moleküler yapıları, konakçıları ile olan etkileşimleri ve ekolojisi daha detaylı incelendikçe, bakteriyofajlar üzerine yapılan çalışmalar da çeşitlenmiştir. Bakteriyofajların kendileri olduğu kadar endolizinlerinin etkileri de hem tek başına hem de antibiyotik ve diğer antimikrobiyal bileşenlerle kombine halde denenmekte ve başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Bakteriyofajlar gıdadan tarım ve hayvancılığa, atık su arıtımından okyanus ekosistemine kadar pek çok alanda önemli bir potansiyel olarak görülmektedir. Bakterilerle mücadelenin yanı sıra, onların tespiti amacıyla kullanılan biyosensör sistemlerinin tanımlayıcı elemanı olarak da değerlendirilmektedir. Bakteriyofaj doğasının gizleri ve bakteriler ile olan etkileşimleri daha iyi anlaşıldıkça, bakteriyofajların ve bakteriyofajlarla ilişkili araştırma konularının önümüzdeki yıllarda da bilimsel literatür için önemini koruyacağı öngörülmektedir.

2.2.3. Bakteriyofajların Gıdalarda Kullanımı

Son yıllarda özellikle antibiyotik direnci geliştiren bakterilerin sayısındaki artış, araştırmacıları antibiyotiğe alternatif tedavi yöntemleri bulmaya yönlendirmiş ve öne çıkan alternatiflerden biri de faj terapi olmuştur. İnsanlara uygulanan faj terapinin yanı sıra bu ürünler çiftliklerde, gıda ürünleri ve ekipmanlarında, veterinerlik gibi farklı alanlarda da kullanılmaktadır. Bakteriyofajlar, gıda güvenliğini sağlamak amacıyla, hayvanlarda bulunan mikrobiyal yükü azaltma, proses esnasında gıdaların mikrobiyal yükünü kontrol altına alma, gıdanın temasta bulunduğu yüzeylerin ve ekipmanların sanitasyonu ve son ürünlerde depolama süresince kontaminasyonun engellenmesi gibi alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır [101]. Bunlara ek olarak, son yıllarda bakteriyofajların ve bakteriyofaj litik enzimlerinin gıda endüstrisinde sorunlara neden olan biyofilmlerin kontrolünde kullanımını araştıran çalışmalarda önemli sonuçlar elde edilmiştir [102,103].

Bakteriyofajların gıda endüstrisinde antimikrobiyal etkili biyokontrol ajanları olarak kullanımının, geleneksel antimikrobiyal ürünler ile dezenfektanlara göre bazı avantajları vardır. Bakteriyofajların geniş konakçı skalasına sahip olma, tek bir cinse veya türe spesifik olabilme, antibiyotik direnci bulunan bakterilere karşı da etkili olabilme, insanlar, hayvanlar, bitkiler ve çevre için güvenli olma, gıdaların organoleptik özelliklerine etki etmeme ve ekipmanlarda aşınmaya/hasara sebep olmama gibi özellikleri bu avantajlar arasında sayılabilir [104]. Bakteriyofajlar, hem insan vücudunun hem de tüm taze gıdaların normal mikrobiyotasının bir parçasıdır ve meyve-sebzelerden et ve süt ürünlerine kadar çeşitli gıdalarda yüksek sayılarda doğal olarak bulunmaktadır. Dolayısıyla, söz konusu bakteriyofajlar olduğunda, antibiyotik tedavisinde görülen bazı istenmeyen reaksiyonlar ortaya çıkmamaktadır. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda, bakteriyofaj temelli biyokontrol metotları, alternatifleri arasında en çevre dostu girişimlerden biri olarak görülmektedir [105].

2006 yılında, doğrudan gıdada kullanılacak bir bakteriyofaj preparatının ilk onayı, FDA (US Food and Drug Administration) tarafından *Listeria monocytogenes*'e özgü bakteriyofaj kokteyli ListShield™'e, bir gıda katkı maddesi olarak verilmiştir. Daha sonra FDA, *Listeria*'ya spesifik olarak hazırlanan Listex™ ürününü “genellikle güvenli kabul edilen” (generally recognized as safe, GRAS) olarak sınıflandırmıştır. İlerleyen yıllarda, bir dizi bakteriyofaj ürününe (örneğin SalmoFresh™ ve PhageGuard S™) daha FDA tarafından GRAS onayı verilmiştir [105]. Tüm bu gelişmelerin ışığında, son dönemlerde piyasaya sürülen ticari bakteriyofaj ürünlerinin sayısı hızla artmaya başlamıştır. Ticari faj ürünleriyle öne çıkan firmalara örnek olarak, gıda güvenliğini sağlamak üzere özellikle *Listeria*'ya karşı kullanılan bakteriyofaj kokteylleri üreten EBI Food Safety (Wageningen, Hollanda) verilebilir. Biochimpharm (Tiflis, Gürcistan) firması ise dispepsi, dizanteri, kolit ve enterokolit gibi enfeksiyonlara karşı kullanılmak üzere, hem sıvı hem de tablet formda çeşitli bakteriyofaj miksleri üretmektedir. Biophage Pharma Inc. (Montreal, Kanada) bakteriyofajların çevresel kullanımı ile antibakteriyel direnç sorunlarını çözmeye yönelik çalışmalar yürütmektedir. Bunlara ek olarak, Omnilytics (Salt Lake City, Utah) biberde ve domateste zararlı bakterileri kontrol altına almak için bakteriyofaj temelli ürünler üretmektedir [106]. Ayrıca, Gürcistan'da, George Eliava Institute ve Phage Therapy Center, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde ilgili bakteriye

özgü bakteriyofajlar ile tedavi gerçekleştirmektedir. Yine Eliava tarafından kurulan Eliava BioPreparations Ltd. tarafından ticari bakteriyofaj miksleri üretilmekte olup diğer ülkelere ihraç edilmektedir. Hali hazırda temin edilebilen ticari bakteriyofaj biyokontrol ürünlerinin çoğu çevreden izole edilmiş, genetik olarak değiştirilmemiş doğal bakteriyofajları içermektedir. Bu preparatların çoğu, hiçbir katkı maddesi veya koruyucu madde içermemektedir ve tipik olarak saflaştırılmış bakteriyofajlar ile düşük miktar tuz içeren su bazlı çözeltilerdir. Piyasadaki çeşitli bakteriyofaj preparatları ayrıca Kosher ve Helal sertifikalı olup organik gıdalarda kullanılabilir özelliktedir [105]. Gıdaların biyokontrolü amacıyla piyasaya sürülen bakteriyofaj miksleri, üretildikleri firmalar ve etkili oldukları bakteriler aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 2.2. Gıda güvenliği uygulamaları için onaylanmış olan bakteriyofaj ürünleri [105]

| Firma | | | Ürün adı | Hedef bakteri |
|------------------------|------|--------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| FINK | TEC | GmbH | Secure Shield E1 | <i>Escherichia coli</i> |
| (Almanya) | | | | |
| Intralytix, Inc. (ABD) | | | Ecolicide® | <i>Escherichia coli</i> O157:H7 |
| | | | EcoShield™ | <i>Escherichia coli</i> O157:H7 |
| | | | ListShield™ | <i>Listeria monocytogenes</i> |
| | | | SalmoFresh™ | <i>Salmonella</i> spp. |
| | | | ShigaShield™ | <i>Shigella</i> spp. |
| Passport | Food | Safety | Finalyse® | <i>Escherichia coli</i> O157:H7 |
| Solutions (ABD) | | | | |
| Phagelux (Çin) | | | AgriPhage™ | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. Vesicatorica, <i>Pseudomonas syringae</i> pv. Tomato |
| | | | SalmoPro® | <i>Salmonella</i> spp. |
| Microos | Food | Safety | PhageGuard Listex™ | <i>Listeria monocytogenes</i> |
| (Hollanda) | | | PhageGuard S™ | <i>Salmonella</i> spp. |

Uygulama alanları gittikçe yaygınlaşan bakteriyofajların, daha etkin ve verimli bir şekilde hayata geçirilebilmesi için özelliklerinin iyi bir şekilde ortaya konması, sınıflandırma ve karakterizasyonunun yapılması büyük önem taşımaktadır. Böylece hem faj terapi daha güvenli bir şekilde uygulanabilmekte hem de özelliği iyi bilinen bakteriyofaj karışımları

hazırlanıp hedef bakteri türleri artırılarak bakteriler daha etkili bir şekilde elimine edilebilmektedir. Bakteriyofajların litik aktivitesinin kendi konakçısı dışındaki tür ve suşlar için de denenerek konakçı özgüllüklerinin ortaya konması önemli bir aşama olarak ortaya çıkmaktadır. Aynı cinse ait bakteriyofajların aynı cins içinde farklı türlere etkili olabildiği de bilinmektedir. Konakçı skalası ortaya konan bakteriyofajlar arasından elde edilmek istenen etkiye göre en çok sayıda türe etki edeni ya da sadece hedeflenen türe etkili olan seçilebilmektedir. Böylece oluşturulacak son ürünün spesifitesi ve etki alanı belirlenebilmektedir. Konakçı skalası kadar replikasyon parametrelerinin (gelişme eğrisi, latent dönem süresi, patlama büyüklüğü vb.) belirlenmesi de bakteriyofaj terapinin etkinliği açısından önemlidir. Örneğin, faj terapi uygulamalarında kullanılacak bakteriyofajların latent döneminin kısa olması, patlama büyüklüğünün ise yüksek olması istenmektedir [107]. Benzer şekilde, bakteriyofajların çeşitli pH ve sıcaklık değerlerinde aktivitelerinin izlenmesi, uygulama yapılacak gıda ortamına göre bakteriyofajların seçilmesini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca mikslere sıcaklık ve pH direnci en yüksek olan bakteriyofajlar dahil edilerek uygulamanın etkinliği artırılabilir. Faj terapi uygulamalarında izole edilen bakteriyofajların sınıflandırılması ve karakteristik özelliklerinin ayrıntılı bir şekilde belirlenmesi de önem taşımaktadır. Sınıflandırma aşamasında restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism, RFLP) analizi ile bakteriyofajların filogenetik ağaçlarının oluşturulması literatürde yaygın olarak kullanılan yöntemler arasındadır [108–110].

Bakteriyofajların güvenli oluşu yapılan çalışmalarla ortaya konmuş ve hayvan/insanlarda tedavi amacıyla kullanımı yaygınlaşmış olsa da bazı bakteriyofajların bakteriyel virülense önemli katkıda buldukları veya transdüksiyon yoluyla gerçekleşen yatay gen transferlerinde vektör özelliği gösterdikleri de bilinmektedir. Bir dizi insan patojeni için virülens faktörleri; plazmidler, bakteriyofajlar, konjugatif transpozonlar, bütünleyici ve konjugatif elementler ve patojenisite adaları gibi mobil ve bütünleştirici genetik elemanlar üzerinde kodlanmaktadır. Tarihsel olarak, bakteriyofajlar, patojen bakterilerin ortaya çıkmasında önemli bir rol oynadığı bilinen, en çok çalışılmış ve en iyi bilinen elemanlardandır [111]. Zamanla, bir dizi toksin geninin de bakteriyofajlar tarafından kodlandığı keşfedilmiştir ve buna göre bakteriyel patojenitede bakteriyofajların rolü, toksin genlerinin bakteri suşları arasında yayılmasına yol açmaktır. Bununla birlikte, toksin genlerinin bakteriyofajlar tarafından kodlanan çeşitli virülens faktörlerinin

yalnızca bir alt kümesi olduğu gittikçe daha açık bir hale gelmiştir. Örneğin, bazı bakteriyofajlar, bakteriyofaj tarafından kodlanmayan virülens genlerinin ekspresyonunu arttıran düzenleyici faktörleri şifrelerken, diğerleri, virülensle ilgili bakteriyel bileşenleri değiştiren enzimleri kodlamaktadır. Dahası, bakteriyofajlar, bakteriyel virülense doğrudan katkıda bulunmalarını sağlayan özelliklere de sahip olabilmektedir [112]. Virülens faktörlerini kodlayan bakteriyofajlar, bakteriyel konakçıları, bakteriyofaj lizojenik dönüşümü olarak bilinen bir süreçte, patojenik olmayan bir suştan patojenik bir suşa veya artmış virülense sahip bir suşa dönüştürebilmektedirler. Bu virülens faktörleri, *Podoviridae*, *Siphoviridae*, *Myoviridae* ve *Inoviridae* ailelerinin üyesi olan bir dizi morfolojik çeşitlilikte bakteriyofaj üzerinde bulunmaktadır [113]. Tüm bu nedenlerden dolayı, terapi amacıyla ya da gıda gibi alanlarda kullanılması planlanan bakteriyofajların, bu toksinleri kodlayan genleri içerip içermediğinin kontrol edilmesi gerekmektedir.

Bakteriyofajların gıda endüstrisinde kullanımı birçok çalışmada araştırılmış ve bakteriyofaj etkinliği gösterilmiş olsa da bakteriyofajların gıda ürünlerinde kullanımına ilişkin bazı zorluklar bulunmaktadır. Her gıda sistemi farklı bileşimlere sahip olmakla birlikte; pH, iyonik bileşim, yağ, karbonhidrat, protein kompozisyonları ile üretim, işleme, depolama ve tüketime kadar geçen sürede sıcaklık profilleri değişiklikler göstermektedir. Gıda ürünlerinin bu kompleks ve stabil olmayan yapıları faj terapi uygulamalarında zorluklara yol açmaktadır. Gıdalardaki bakteriyofaj çalışmalarında model olarak seçilen gıdanın tipi, kimyasal kompozisyonu ve fiziksel özellikleri büyük önem taşımaktadır [114]. Örneğin, *Staphylococcus aureus* ve bakteriyofaj K ile yapılan bir çalışmada, bakteriyofaj K'nın ineklerde görülen mastitis hastalığının önlenmesi için kullanımı ve peynir altı suyu proteinlerinin bakteriyofaj-patojen bakteri interaksyonunu inhibe etme üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda peynir altı suyu proteinlerinin bakteri yüzeyine bağlanması ile birlikte bakteriyofajın bakteriye adsorbe olmasını engellediği ve dolayısıyla bakteri lizinin gerçekleşmediği bildirilmiştir [115]. Gıda matrisi ile bakteriyofaj stabilitesi arasındaki ilişkinin açıklanmasına ilişkin literatürde yapılan çalışmalarda genellikle süt ve süt ürünlerinin kullanımı yaygındır [116,117]. *Listeria* A511 bakteriyofajı ile yapılan çalışmada, süt yağ globülleri içerisinde bakteriyofaj stabilitesi araştırılmıştır. Çalışmada süt yağ, kazein ve peynir altı suyu olarak üç farklı fraksiyona ayrılmış ve bu fraksiyonlara bakteriyofaj eklenerek farklı sürelerde bakteriyofaj aktivitesine bakılmıştır. Çiğ sütün, yağ fraksiyonunun ve peynir altı suyu

fraksiyelerinin bakteriyofaj titresini sırasıyla 2,4, 2,6 ve 2,1 log birim düşürdüğü bildirilmiştir. Kazein fraksiyonunun ise bakteriyofaj titresinde 0,8 log birimlik düşüşe neden olduğu belirtilmiştir [116]. Bu nedenle bakteriyofajların gıda uygulamalarında sürecin en önemli kısmını, izolasyon ve karakterizasyon aşamalarından sonraki gıda etkileşimi çalışmaları oluşturmaktadır. En etkili ve bakteriyofaj terapiye uygun bakteriyofajlar izole edilse de, laboratuvar ortamında elde edilen başarı, kompleks matrisinden ötürü her zaman gıda uygulamasına da taşınamayabilmektedir. Bu nedenle bakteriyofajların gıda bileşenleriyle ilişkisi ve etkileşimi, bu bileşenlerin bakteriyofajlar üzerindeki olumlu/olumsuz etkileri ile bakteriyofajların gıdanın mikrobiyotasında bulunan diğer mikroorganizma grupları ile fiziksel ve kimyasal yapısına etkisinin araştırılması da kritik önem arz etmektedir.

2.3. Süt ve Süt Ürünlerinde *Pseudomonas fluorescens* ve *Salmonella* spp. Bakteriyofajlarının Kullanımı

2.3.1. *Salmonella* spp. Bakteriyofajları

Literatürdeki *Salmonella*'ya özgü bakteriyofajların çoğunluğunun *S. Typhimurium* bakteriyofajı olduğu, hemen ardından da *S. Enteritidis* bakteriyofajlarının geldiği belirtilmiştir. Ayrıca bu bakteriyofajların genellikle siphovirus, miyovirus ve podovirus gruplarına ait olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada, çiğ süt örneğinden izole edilen ZCSE6 bakteriyofajı moleküler ve kimyasal olarak karakterize edilmiştir. Bu bakteriyofajın infeksiyon çokluğu (Multiplicity of infection, MOI) değeri 1 olacak şekilde, 37°C'de 3 saatlik inkübasyonun ardından bakteri miktarında 1000 kat düşüşe sebep olarak sütte *Salmonella* gelişimini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir [118]. Bir başka çalışmada bakteriyofaj LPSent1'in süt örneklerine 100 veya 1000 MOI değerinde uygulanması sonucu, 4°C veya 25°C'de *Salmonella* Enteritidis sayısında önemli bir düşüş olduğu gösterilmiştir [119]. Benzer şekilde, çikolatalı sütte bakteriyofaj muamelesi sonrası 8°C'de 24 saat depolamayı takiben *Salmonella* seviyelerinin tespit edilemez düzeye indiği belirtilmiştir. Gıdalara bakteriyofaj uygulaması yapıp 15°C'de saklandığında ise, çikolatalı süt için *Salmonella* sayılarının 24-48 saat içinde tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü, ancak 5 gün sonra yeniden bakteri çoğalması görüldüğü raporlanmıştır [120]. Yağlı ve yağsız sütle yapılan

bir çalışmada, tek bir lizojenik bakteriyofaj uygulandıktan ve 4°C'de depolama yapıldıktan sonra, *Salmonella* seviyelerinin tespit sınırının altına dūřtūđđ belirtilmiştir [121]. Benzer şekilde, bakteriyofaj kokteyli uygulamasının, tavuk gōđsđ ve sđtte 3,0-log birimlik *Salmonella* inokulasyonunu takiben, bakteri sayısını saptanabilir sınırların altına dūřürdđđ bildirilmiştir [122]. Sđtteki bakteriyofajın inhibitör etkisi, erken depolama dōneminde fark edilebilir bulunmuş ve 4 saat ve 3. günde 3 log'dan fazla azalma gōstermiřtir [123]. Bakteriyofaj uygulanmış çiđ ve pastörize sđt kullanılarak yapılan peynirlerde *Salmonella* seviyeleri 1-2 log azalırken, bakteriyofajsız sđtten yapılan peynirde *Salmonella* sayısının ~1 log arttıđđ belirtilmiştir [124]. *Salmonella* bakteriyofajlarının kđmes hayvanları ve yumurta, sebze-meyve ile et temelli çeşitli gıda gruplarında uygulamaları bulunsa da, sđt ve sđt ũrđnlerine dair çalışmaların daha kısıtlı olduğu gōrđlmektedir.

2.3.2. *Pseudomonas fluorescens* Bakteriyofajları

2018 yılı itibariyle tam genomik sekansı çıkarılarak NCBI GenBank veritabanında yayınlanmış yaklaşık 239 *Pseudomonas* bakteriyofajı bulunduğu, bunların sadece 26'sının *P. fluorescens*' i enfekte ettiđđ bildirilmiştir [125]. Çiğ sđtlerde, pastörize ve UHT sđtlerde bozulma etmeni olan *P. fluorescens* yanında *Pseudomonas fragi* (*P. fragi*) ile *Pseudomonas putida* (*P. putida*) da yer almaktadır [17,21]. Yapılan araştırmalar sonucunda gen bankasında bazıları kısmi dizi analizi yapılmış altı adet *P. putida* bakteriyofajı bulunduğu saptanmıştır [126–129] *P. fragi*' ye etkili herhangi bir bakteriyofajın dizi analizi yapılarak gen bankasına dahil edilmediđđ gōrđlmüřtür, ancak 1973 yılında bu tđre etkili bir bakteriyofajın izole edildiđđ bilgisine ulaşılmıştır [130]. Pf 10 olarak adlandırılmış bakteriyofajın, homolog konakısının *P. floreseins* olmasına karşın iki farklı *P. putida* suşuna etkili olduğu gōsterilmiřtir. Başka bir araştırmada ise *P. putida* ve *P. floreseins* bakteriyofajları incelenmiştir [131].

Literatũrde, gıdaların bozulması ve kalite kayıplarından sorumlu olan *P. fluorescens*' in ve oluşturduğu biyofilmlerin eliminasyonu amacıyla bakteriyofaj izolasyonu ve karakterizasyonuna yōnelik çalışmalar [27,108–110,125,132,133] bulunmaktadır. Ancak hem bu çalışmaların kapsamı hem de izolasyonu ile tanımlama ve karakterizasyonu tamamlanan bakteriyofajların sayısı sınırlıdır. Bu çalışmalarda izolasyonun ardından bazı

karakterizasyon aşamaları gerçekleştirilmiş olsa da, özellikle genetik karakterizasyonların eksik olduğu görülmektedir. Ayrıca bu bakteriyofajların çiğ ya da pastörize sütte söz konusu bakterilerin biyokontrolü amacıyla kullanılmasına yönelik ayrıntılı çalışmalar da bulunmamaktadır. Bakteriyofajların etkinliğinin ve bakteri eliminasyon kapasitesinin süt matrisi içinde test edilmesi ve gerçek örnek denemelerinin yapılması ileri uygulamalara geçilebilmesi açısından elzemdir. Hu ve arkadaşlarının çalışmasında, çeşitli *Pseudomonas* türlerine etkili bakteriyofajların izolasyonu ve kısmi karakterizasyonu ile bunların sütteki etkinliği üzerine denemeler yapılmıştır [27]. Fakat bu çalışmada ürünlerdeki bozulma ve raf ömrü kaybının başlıca nedenlerinden olan *P. fluorescens*'e etkili bakteriyofajlar izole edilmemiştir. İzole edilen diğer bakteriyofajlarınsa replikasyon parametreleri belirlenmemiş, genetik herhangi bir karakterizasyona gidilmemiştir. Faj terapinin etkin bir şekilde kullanılabilmesi için bakteriyofajların latent dönem, patlama büyüklüğü gibi özelliklerinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Kokteyllere dahil edilecek bakteriyofajların bu parametrelere göre seçilmesi durumunda uygulamanın etkinliği de artmaktadır. Ayrıca gıda ürünlerinde kullanılması planlanan bakteriyofajların genetik yapısının tanınması da önem arz etmektedir. Buna ek olarak izole edilen, tanımlanan ve GenBank veritabanına kaydedilen *P. fluorescens* bakteriyofajlarının sayısının da diğerlerine oranla kısıtlı olduğu görülmektedir. Diğer bozulma etmeni ve patojenlere kıyasla, bu grupta ilgili çalışmaların hem içerik ve kapsam açısından zayıf hem de sayı açısından azınlıkta olması, bu alanda daha ileri çalışmalar yürütülmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

Süt, zengin besinsel içeriğiyle geniş bir tüketim alanı olan, halk sağlığı için kritik önemde bir gıdadır. İçerdiği çeşitli besin öğeleri, sütü aynı zamanda mikrobiyal gelişime çok elverişli bir gıda haline getirmektedir. Bu mikroorganizmaların bir kısmı sütte bozulmalara yol açarak raf ömrü kısalması ve ürünlerde istenmeyen koku/tat/doku oluşumu gibi sorunlara neden olabilmektedir. Bir kısmı ise direkt ya da dolaylı yoldan tüketim ile gıda kaynaklı hastalıklara sebep olarak halk sağlığı açısından ve de ekonomik açıdan ciddi problemlere yol açabilmektedir. Bir bozulma etmeni olan *P. fluorescens* ve gıda kaynaklı bir patojen olan *Salmonella* spp. sütte sorun yaratan bu mikroorganizmalar arasında öne çıkmaktadır. Sütte bu bakterilerin kontrolü için yeni, doğa dostu, etkili, ekonomik ve bütüncül yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Mevcut tez çalışmasının çıkış noktası bu ihtiyaç olmuştur. Son yıllarda bakterilerle mücadelede öne çıkan

alternatiflerden biri olan faj terapinin daha etkin bir şekilde kullanılabilmesi için yerel suş ve fajların izolasyonu, kapsamlı karakterizasyonu ve gerçek gıda ortamlarında etkinlik denemelerinin yürütülmesi gerekmektedir. Bu tez çalışması kapsamında, süt ve süt ürünlerinde problemlere neden olan iki temel bakteri grubuyla mücadelede kullanılmak üzere bakteriyofajların izolasyonu ve kapsamlı karakterizasyonu ile gıda uygulamasına hazır hale getirilmesi, bu yolla ülkemize has yerel ve tanımlı izolatlardan bir kütüphane oluşturulması, tanımlanan bu fajlardan hazırlanan bakteriyofaj kokteyllerinin farklı özellik ve içerikteki sütlerde etkinliğinin denemesi ve bakteriyofajların sütün çeşitli mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal özelliklerine etkisi araştırılmıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasallar ve Besiyerleri

Tez kapsamında kullanılan bakterilerin yeni stoklarının hazırlanmasında kullanılan Tyriptic Soy Broth, bakteriyofajların izolasyonu, titrelerinin yükseltilmesinde ve konakçı skalalarının belirlenmesinde kullanılan Tyriptic Soy Broth, Tyriptic Soy Yumuşak Agar (% 0,6 agar) ve Tyriptic Soy Agar (% 1,5 agar), *Salmonella* suşlarının saflaştırılması ve sayımında kullanılan Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar, *Pseudomonas* suşlarının saflaştırılması ve sayımında kullanılan King's Agar B, çiğ süt denemelerinde toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayımında kullanılan Plate Count Agar (PCA), laktik asit bakterileri (LAB) sayımında kullanılan De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar ve *Enterobacteriaceae* sayımında kullanılan Violet Red Bile Glucose (VRBG) agar Merck'ten (Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir. SM tamponu içeriğinde yer alan NaCl, MgSO₄.7H₂O, Tris-Cl ve jelatin Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) temin edilmiştir. Bakteriyofajların konsantrasyonu aşamasında kullanılan PEG8000 ve kloroform Merck'ten temin edilmiştir. Bakteriyofajların DNA izolasyonu ve RFLP analizleri için kullanılan DNaz, RNaz ve tüm kesim enzimleri ile markerlar Thermo'dan (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, ABD) temin edilmiştir.

3.2. Bakteriler ve Bakteriyofajlar

Tez çalışmasının *Salmonella* spp. ile yürütülen kısımlarında “Gıda Kaynaklı Patojen Bakterilerin Biyokontrolünde Bakteriyofaj Terapi Ve Fitoterapinin Birlikte Kullanımı” başlıklı yüksek lisans tez çalışması kapsamında izole edilen bakteriyofajlar kullanılmıştır [134]. Çalışmalarda kullanılan bakteriyofajlarla ilgili bilgiler Çizelge 3.1'de verilmiştir. *Salmonella* bakteriyofajlarının izolasyonu ve konakçı skalası incelenirken, kültür koleksiyonumuzda bulunan *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis ATCC BAA-1045* (*S. Enteritidis*), *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium IC* (*S. Typhimurium IC*), *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium ATCC BAA-190* (*S. Typhimurium*), *Salmonella sp. enterica st. Anatum*, *Salmonella sp. choleraesuis 08 LAL*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli K12*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus italicus*, *Escherichia coli*

tp, *Escherichia coli* O157:H7, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* ve *Enterococcus faecium* suşları kullanılmıştır. *Pseudomonas fluorescens* bakteriyofajlarının konakçı skalası denemelerinde kullanılan *Streptococcus thermophilus* 231S, *Lactobacillus delbrueckii* subsp.*bulgaricus* 231L, *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus plantarum* daha önce izole edilmiş ve farklı çalışmalarda kullanılmış olan suşlardır [135,136].

Çizelge 3.1. *Salmonella* spp. ile yürütülen çalışmalar kapsamında kullanılan bakteriyofajlar ve konakçıları

| Bakteriyofaj adı | Konakçı bakteri |
|------------------|--------------------------|
| SK-E1 | <i>S. Enteritidis</i> |
| SK-E2 | <i>S. Enteritidis</i> |
| SK-E3 | <i>S. Enteritidis</i> |
| SK-T1 | <i>S. Typhimurium</i> |
| SK-T2 | <i>S. Typhimurium</i> |
| SK-Ti1 | <i>S. Typhimurium</i> IC |

3.3. Bakteri İzolasyonu ve Tanımlaması

Tez çalışması kapsamında çiğ süt ve pastörize süt ile süt fabrikası ortamından alınan örnekler izolasyon kaynağı olarak kullanılmıştır. Sıvı örneklerden 10'ar ml, 90 ml fizyolojik tuzlu suya (FTS, % 0,85 NaCl) eklenerek seri dilüsyonları yapılmıştır. Seyreltilmiş numunelerden King's B agara yüzeye yayma yöntemiyle ekim yapılmış ve petriler 30°C'de yaklaşık 48 saat inkübe edilmiştir. 360 nm'de UV ışığı altında floresan gösteren farklı koloniler seçilmiştir. *P. fluorescens*, *P. putida* ve *P. fragi*' nin doğrulanması için öncelikle kültürel inceleme, daha sonra ise MALDI-TOF ile tanımlama yapılmıştır [137]. Bu tanımlama işlemi hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Doğrulama aşamalarında referans suş olarak *Pseudomonas fluorescens* Migula (ATCC® 13525™), *Pseudomonas putida* Migula (ATCC® 47054™) ve *Pseudomonas fragi* (ATCC® 4973™) kullanılmıştır. Kültürel doğrulama aşamasında koloni morfolojisi, pigmentasyon gibi parametreler dikkate alınmıştır. Böylece bakteriyofaj izolasyonuna başlanmadan önce moleküler tanımlaması yapılmış bir bir kültür koleksiyonu oluşturulmuştur.

3.4. Bakteriyofaj İzolasyonu ve Karakterizasyonu

3.4.1. *Pseudomonas fluorescens* Bakteriyofajlarının İzolasyonu ve Saflaştırması

P. fluorescens kompleks suşlarının bakteriyofajlarının izolasyonu için çiğ süt ile süt fabrika ortam ve atıklarından alınan örnekler (AOÇ Süt Fabrikası) kullanılmıştır. Çiğ süttten bakteriyofaj izolasyonu yapılırken, çiğ süt örneklerinin hazırlanması aşamasında, sütler tüplere dağıtılmış ve süt yağının ayrımı için 10.000 rpm ve 4°C’ de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Yağ ayrıldıktan sonra, kazeinin çökmesi amacıyla çiğ süte % 10’luk laktik asit çözeltisi eklenip yaklaşık 15 dakika beklenmiş ve daha sonra sırasıyla kaba filtre kağıdından ve 0,45 µm por çaplı steril şırınga filtreden geçirilerek bakteri ve artıklarından arındırılmıştır.

Bakteriyofajların izolasyonu için 200 mL örnek, 200 mL çift kuvvet TSB’ye eklenmiş ve logaritmik fazdaki ilgili konakçı bakterinin 4 mL’si ile inoküle edilmiştir. Bu karışım 24 saat boyunca 150 rpm’de ve 30°C’de inkübe edilmiş ve daha sonra santrifüj edilmiştir (10 dakika, 10.000 ×g, 4°C). Berrak süpernatant kloroform ile muamele edildikten sonra bakteriyofaj lizatı spot test ile bakteriler üzerinde denenmiştir. Bunun için çift tabaka agar yöntemi kullanılmış olup, yumuşak agara bakteri eklendikten sonra daha önceden dökülmüş olan agar üzerine bu karışım homojen bir şekilde yayılmış, yumuşak agarın kurummasının ardından bakteriyofaj lizatından agar üzerinde belirli bölgelere damlatma yapılmıştır. Daha sonra petriler, 30°C’de 12-24 saat süreyle inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrasında bakteriyofaj plakları kontrol edilmiştir [108]. Varlığı saptanan bakteriyofajlara, ilk aşama saflaştırması için tek plak izolasyonu yapılmıştır. Bakteriyofaj süspansiyonlarının FTS ya da sıvı besiyerinde dilüsyonları hazırlandıktan sonra, bakteriyofajın her bir dilüsyonundan 100’er µL ve bakteriyofajın logaritmik fazdaki konakçı kültüründen 150 µL alınarak, önceden eritilmiş 3 mL yumuşak agara eklendikten sonra agar üzerine dökülmüştür. İnkübasyonun tamamlanmasını takiben tek tek düşen plaklardan bir tanesi steril enjektör ucuyla alınıp steril bir tüp içerisine aktarılmıştır. Daha sonra üzerine 100 µL besiyeri eklenip karıştırılmış ve ardından oda sıcaklığında beklenerek bakteriyofajların besiyerine geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra 10 µL aktif konakçı kültür bu tüp içine eklenmiş ve adsorpsiyonun gerçekleşmesinden sonra üzerine steril besiyeri ilave edilerek inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda ortamdaki

hücre artıkları santrifüj işlemi ile uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatant, 0,22 µm porlu filtrelerden geçirilerek steril bakteriyofaj filtratı olarak kullanılmış ve bu işlem iki ya da üç kez tekrarlanmıştır [138].

3.4.2. Zenginleştirme, Titre Belirleme ve Konsantrasyon

İzole edilen bakteriyofajların zenginleştirilmesi için bakteriyofaj ve aktif konakçı bakteri kültürü sıvı ortamda istenilen titreye ulaşmaya kadar pasajlar yaparak karşılaştırılmıştır. Bu amaçla her pasajda 10 µL bakteriyofaj ile artan miktarda konakçı bakteri karşılaştırılmış ve bakteriyofaj-bakteri adsorpsiyonunun sağlanması amacıyla bir süre beklendikten sonra karışımın hacmi steril sıvı besiyeri ile 1 mL'ye tamamlanmıştır. Bakteriyofaj-bakteri karışımları 30°C ve 37°C'de 12-24 saat süreyle inkübasyona bırakılarak bakteriyofaj aktivitesi gözlenmiş ve bakteriyofaj istenen titreye ulaşana dek, bakteri miktarı bir önceki pasaja göre artırılarak zenginleştirmeye devam edilmiştir. Zenginleştirilen bakteriyofajların titresi belirlenirken, çift tabaka agar yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, son pasaja ait bakteriyofajın uygun dilüsyonları hazırlanmıştır. Logaritmik fazdaki bakteriden 150 µL, 3 mL yumuşak agar ile karıştırıldıktan sonra agar üzerine yayılmıştır. Agarın katılaştıktan sonra bakteriyofaj dilüsyonlarından petride belirlenmiş bölgelere 10'ar µL damlatıldıktan sonra 30 ve 37°C'de 12-24 saat inkübasyon yapılmış ve ardından bakteriyofaj plakları sayılmıştır [138].

Bakteriyofajlar, sonraki analizlerde kullanılmak üzere hazırlanırken PEG8000 kullanılarak konsantre edilmiştir. Bu amaçla bakteriyofaj örneğine bakteriyel genomik materyali uzaklaştırmak için son konsantrasyonları 1 µg/mL olacak şekilde DNaz ve RNaz eklenmiştir. 37°C'de 1-2 saat inkübasyonun ardından ortama son konsantrasyonu 1 M olacak şekilde NaCl eklenerek 1 saat buzlu su içerisinde bekletilmiştir. Ardından 18.000 ×g ve 4°C'de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatanta son konsantrasyonu % 10 olacak şekilde PEG 8000 eklenmiş, çözünmesini takiben bir gece buzlu su içinde bekletilmiştir. 4°C'de 15 dakika boyunca 18.000 ×g'lik santrifüj işlemi uygulanmış ve pellet, 700 µL bakteriyofaj tamponu (SM tamponu: 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄.7H₂O, 50 mM Tris-Cl pH 7,5, % 0,01 jelatin (a/h)) içerisinde çözülmüştür. Üzerine eşit hacimde kloroform eklenerek, 4°C'de 9.000 ×g hızla 15 dakika santrifüj edilerek üst faz alınmıştır [139].

3.4.3. Konakçı Skalasının ve Plak Etkinliğinin Belirlenmesi

Zenginleştirme ve titre belirleme aşamaları tamamlanan bakteriyofajlar, farklı türde ve suşta bakteriler ile karşılaştırılmış ve bu bakteriler üzerinde etkileri spot test ile araştırılmıştır [140]. Bu amaçla; 3 mL yumuşak agara 300 µL bakteri eklenmiş ve agar üstüne yayılmıştır. Agarın kurumasını takiben, agar üzerinde ilgili bölgelere bakteriyofajlardan damlatılmıştır. Petriler 30 ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben damlatma yapılan bölgelerdeki liziz oluşumu gözlenmiştir. Yeni izole edilmiş bakteriyofajlar ilk önce spot testinde liziz bölgelerine göre ve plak morfolojisi açısından taranmaktadır. Çoğu bakteriyofaj için berrak plaklar litik bakteriyofajın bir göstergesi olarak kabul edilirken bulanık plaklar (özellikle merkezlerinde bulanık olanlar) lizojenik bakteriyofaj ihtimali olarak değerlendirilmektedir. Tez kapsamında ilk aşamada spot test ile bakteriyofaj plakları incelenmiş ve berrak/bulanık olma durumlarına göre sınıflandırılmıştır [141]. Bakteriyofajın test edilen suşta verdiği titrenin homolog konakçısında verdiği titreye bölünmesiyle bakteriyofajların plak etkinliği (efficiency of plating, EOP) hesaplanmıştır.

3.4.4. RFLP Analizleri

Bakteriyofaj DNA'ları, GeneJET Viral DNA and RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, ABD) kullanılarak izole edilmiştir. DNA izolasyonuna geçilmeden önce, bakteriyofaj süpernatantları içerisine son derişimleri 1 µg/mL olacak şekilde DNaz ve RNaz eklenmiş ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Böylece konakçı bakteriye ait DNA ve RNA moleküllerinin parçalanması sağlanmıştır. İnkübasyondan sonra DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonu aşamasına geçilmiştir. İzole edilen DNA'ların saflık ve konsantrasyon kontrolleri ile kesime alınacak DNA'ların miktarının belirlenmesi amacıyla yatay elektroforezde yürütülmüştür. Jel görüntüleri, BioRad marka Gel Doc™ XR+ (Biorad, Hercules, CA, ABD) model jel görüntüleme sistemi kullanılarak elde edilmiştir.

DNA izolasyonunu takiben, son hacim 20 µL olacak şekilde kesim karışımları hazırlanmıştır. *P. fluorescens* bakteriyofajlarıyla yapılan çalışmalarda *EcoRI*, *EcoRV*,

HindIII, *KpnI*, *XbaI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. *Salmonella* bakteriyofaj DNA'ları ise *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI*, *HindIII*, *PstI* ve *HpaI* enzimleri ile kesilmiştir [142–145]. Kesimler, enzimlerin üreticisi olan firmanın (Thermo Scientific, Fast Digest Mix ve klasik) talimatlarına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Kesim karışımları hızlı kesim enzimleri ile 37°C'de 30 dk, klasik enzimlerle 37°C'de 3 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda kesim karışımı TAE (40 mM Tris, 20 mM asetik asit, 1 mM EDTA pH 8) tamponu içinde hazırlanan % 0,8'lik agaroz jelde 60 V ile yürütülmüştür. Jel görüntüleri, BioRad marka Gel DocTM XR+ model jel görüntüleme sistemi kullanılarak elde edilmiştir. DNA marker olarak, Lambda (*E. coli* Lambda bakteriyofajı) *EcoRI/HindIII* Marker kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. RFLP analizlerinde kullanılan kesim karışımının içeriği

| Bileşen | Miktar |
|---------------------|----------|
| Steril deiyonize su | Değişken |
| Kesim tamponu | 2 µL |
| DNA örneği | Değişken |
| Restriksiyon enzimi | 1 µL |
| Toplam hacim | 20 µL |

Bakteriyofaj genom büyüklüklerini belirlemek ve filogramları oluşturmak için GelJ v.2.0 yazılımı (GelJ, San Diego, CA, ABD) kullanılmıştır. Dendrogramlar Dice katsayısı 1 olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve kümeleme için aritmetik ortalamalı ağırlıksız çift grup yöntemi (UPGMA) kullanılmıştır [146].

3.4.5. Morfolojik Karakterizasyon

Bakteriyofajların morfolojik karakterizasyonu, TEM analizi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla konsantrasyon işlemi takiben bakteriyofaj partikülleri 25.000 ×g'de 1,5 saat süreyle gerçekleştirilen santrifüj sonucunda çöktürülmüştür. Daha sonra karbon formvar gridler üzerinde % 2'lik uranil asetat ile boyanan bakteriyofajlar, FEI Tecnai G2 F20 S-Twin (80 kV) ve FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin CTEM (120 kV) cihazları kullanılarak görüntülenmiştir.

3.4.6. Genom Analizi

Genom analizinden önce, *P. fluorescens* bakteriyofaj DNA'ları, GeneJET Viral DNA and RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, ABD) kullanılarak izole edilmiştir. RFLP profilleri birbirinden farklı, litik aktivitesi yüksek üç bakteriyofajın genomik materyali saflık ve miktar tayinleri yapıldıktan sonra BM Labosis (BMLabosis BM Lab. Sist. Ltd. Şti., Ankara, Türkiye) firmasına gönderilmiş ve tüm sekans analizleri yaptırılmıştır. Sekanslama işlemi, Illumina NovaSeq 6000 platformu kullanılarak yapılmıştır. Bakteriyofajların dizi analizi sonrası ham datalarının işlenmesi, yani biyoinformatik analizler yine BM Labosis tarafından gerçekleştirilmiştir. P22.1 (*P. tolaasii* ile izole edilen) ve L23.2 (*P. fluorescens* ile izole edilen) bakteriyofajlarına ait datalar, referans bakteriyofaj genom dizilimleri (NCBI GenBank'ta bulunan) ile BWA 0.7.17 yazılımı kullanılarak işlenmiştir. NCBI GenBank'ta yapılan araştırmalar sonucunda konakçısı *Pseudomonas libanensis* olan L12.3 bakteriyofajı için referans bir bakteriyofaj dizilimi bulunmadığı için bu bakteriyofaj genomundan elde edilen data için SPAdes v3.15.5 yazılımı kullanılarak *de novo* analiz yapılmıştır. Biyoinformatik analizler sonucunda teslim edilen baz dizilimleri, Geneious Prime yazılımı kullanılarak işlenmiştir. Öncelikle NCBI sayfasına gitmeden bu yazılım ile nBLAST programı kullanılarak ilgili bakteriyofaj genomunun hangi dizilimler ile örtüştüğü görüntülenmiştir. Ayrıca her bir bakteriyofaj genomunun muhtemel açık okuma çerçevelerinin tespiti yapılmıştır.

Salmonella bakteriyofajlarıyla yürütülen çalışmalarda ise, bakteriyofajların toksik özellik kodlayan bölgeler içerip içermedikleri kontrol edilerek genotoksisiteleri ortaya konmuştur. Bu amaçla bakteriyofajlar tarafından kodlanan toksin ürettiği bilinen bakteriler için, *stx1*, *stx2*, *hly* ve *cdt* bölgelerinin kontrolü yapılmış ve bu kontrol için literatürdeki çalışmalarda söz konusu bölgelerin tespiti için kullanılmış primerlerden yararlanılmış ve dizi analizi yaptırılmıştır. Buna ek olarak, *Salmonella* bakteriyofajlarında lizogeni ve bakteriyofaj direnci ile ilişkilendirilen gen bölgelerinden olan *sieA* bölgesi de taranmıştır. Bu bölge dışında lizogeni ve transdüksiyon ile ilişkilendirilmiş gen bölgelerinden olan *int*, *cI* ve *vtx* bölgeleri de taranmış, böylece izole edilen bakteriyofajların litik/lizojenik karakteri hakkında daha detaylı fikir elde

edilebilmiştir [147–151]. Bu analizler için dizayn edilen primerle ilgili bilgiler aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 3.3. Toksik gen bölgelerine ait primerler

| Gen | Sekans |
|-----------|----------------------------|
| HLYE-C | TCGGGCGTTAAAAGTACACAGATCG |
| HLYE-N | GCCGGAAGATGGAATGGTGAAAGTA |
| HlyE1 | F 5'TCGGCATCCACATTAGTTG3' |
| HlyE2 | CAGTTGCAGCTAGCGATTCA |
| ctdB-F617 | TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG |
| ctdB-R878 | CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG |
| sieA | TTCTGGGGATAGGATTGCAG |
| sieA | CGATCATGGCAAAGTACCAC |
| IntF | GCCCTCCC GCACGATGAT-3 |
| IntR | ATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTA- |
| Cl-f | TCGCCTGTATCGTGCATCAA |
| Cl-r | GCGGGAATTCTTCCTTTGCC |

3.4.7. Replikasyon Parametrelerinin Belirlenmesi

Tek aşamalı gelişme eğrisi ve adsorpsiyon hızı deneyleri literatürdeki yöntemler baz alınarak gerçekleştirilmiştir [152,153]. Bakteriyofajların tek aşamalı gelişme eğrileri çıkarılırken, orta logaritmik fazdaki bakteri kültürü, MOI değeri 0,001 olacak şekilde bakteriyofaj ile karıştırılmış ve bu karışım, bakteriyofajların adsorbe olmasına izin vermek için 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra karışım 7.000 $\times g$ 'de 4 dakika santrifüj edilmiş, pellet 30 mL Tryptic Soy Broth içinde yeniden çözülmüş ve 30 ve 37°C'de inkübasyon başlatılmıştır. 120 dakika boyunca belirli zaman aralıklarında numuneler alınmış, 13.000 $\times g$ 'de 30 saniye santrifüjlenmiş ve daha sonra çift tabaka agar yöntemi ile bakteriyofaj titreleri belirlenmiştir. Bakteriyofaj titrelerinin sabit kaldığı süreden bakteriyofajların latent dönemleri saptanmıştır. Artarak sabit kalan bakteriyofaj sayısının latent dönemdeki bakteriyofaj sayısına oranlanmasıyla bakteriyofaj patlama büyüklükleri hesaplanmıştır [108,136]. Bakteriyofajların adsorpsiyon eğrilerini çıkarmak için öncelikle 950 μL steril besiyerine birkaç damla kloroform ilave edilmiş ve

tüpler buzda bekletilmiştir. 0,01 MOI ile log-faz bakteri ve bakteriyofaj karıştırıldıktan sonra 30 ve 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. 10 dakika boyunca her dakika başı 50 µL numune alınarak daha önce hazırlanan besiyeri-kloroform karışımına ilave edilerek buz üzerinde bekletilmiştir. Bakteriyofaj titresi, çift tabaka agar yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve adsorpsiyon hızı sabiti şu formülle hesaplanmıştır: $k = (2.3/Bt) \times \log (P_0/P)$ burada k, adsorpsiyon hızı sabitidir; B bakteri konsantrasyonudur ve t, titrenin P₀'dan P'ye düştüğü zaman aralığıdır [153].

3.4.8. pH ve Sıcaklık Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Bakteriyofajların pH ve sıcaklık stabilitesi belirlenirken, pH'ı 0,1 M HCl veya NaOH kullanılarak önceden 2-11 aralığındaki değerlere ayarlanmış olan 9,9 mL steril Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS, Merck, Darmstadt, Almanya) içeren tüplere 100 µL bakteriyofaj süspansiyonu ilave edilmiştir. Bakteriyofajlar 30°C’de 1 saat inkübe edildikten sonra çift tabaka agar yöntemiyle bakteriyofaj titreleri belirlenmiştir. Benzer şekilde, önceden ısıtılmış 9,9 mL steril TPS içeren tüplere 100 µL bakteriyofaj süspansiyonu ilave edilmiş ve 1 saat boyunca sıcaklığı 30°C ila 90°C arasında değişen su banyosunda bekletilmiştir. İnkübasyonun sonunda çift tabaka agar yöntemiyle bakteriyofaj titreleri belirlenmiştir.

3.4.9. Litik Etkinin Belirlenmesi

Bakteriyofaj aktivitesi açısından farklı MOI değerlerinin kullanımından kaynaklanan değişimleri gözlemek ve lizis süresini belirlemek için bakteriyel redüksiyon denemeleri yapılmıştır. Bunun için bakteri kültürleri 37°C’de geliştirilmiş ve bulanıklık, bakteri yoğunluğunun bir göstergesi olarak 600 nm’de bir UV-Vis Spektrofotometre (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, ABD) ile ölçülmüştür. OD₆₀₀ değeri yaklaşık 0,1’e ulaştığında MOI değerleri 1, 10, 100 ve 1000’i karşılayacak titrede hazırlanan fajlar bakteri kültürü üzerine eklenmiştir. Bu karışım 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sırasında her saat numuneler alınarak OD₆₀₀ değeri ölçülmüştür.

3.5. *Salmonella* Bakteriyofaj Kokteylinin Uygulamaları

3.5.1. Bakteri Karışımları ve Bakteriyofaj Kokteylinin Hazırlanması

Salmonella bakteriyofajlarından bakteriyofaj kokteyli hazırlanırken daha önceki aşamalarda gerçekleştirilmiş karakterizasyon denemelerinden elde edilen sonuçlar ve toksik gen bölgesi bulundurmama durumu göz önüne alınmış ve nihayetinde SK-T2, SK-T1 ve SK-E2 bakteriyofajları seçilmiştir. Bakteri kokteyli ise konakçı olarak kullanılan *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* ve *S. Typhimurium* IC serovarlarının karıştırılması ile elde edilmiştir. Bakteriyofajlar, son karışımda her birinin titresini yaklaşık 10^9 POB/mL olacak şekilde eşit hacimde karıştırılarak faj kokteyli hazırlanmıştır. Benzer şekilde, çalışma kapsamında kullanılan bakteriler ile son karışımda her bir bakterinin miktarı yaklaşık 10^5 - 10^6 KOB/mL olacak şekilde eşit hacimde bir araya getirilerek bir bakteri kokteyli hazırlanmıştır.

3.5.2. *In-vitro* Etkinlik Denemeleri

Bakteriyofaj kokteylinin bakteri eliminasyon etkinliği saptanırken, ilk aşamada *in vitro* olarak bakteriyofaj ve bakteri karışımları farklı MOI (0,01, 0,1, 1 ve 10) değerlerinde karıştırılmıştır. Bu karışımlar 37°C'de inkübasyona bırakılarak 0, 2, 4, 6 ve 24. saatler sonunda karışımdan örnek alınarak XLD agar yüzeye yayma yöntemiyle ekim yapılarak bakteri sayısı saptanmıştır [154].

3.5.3. Bakteriyofaj Kokteylinin Sütteki Etkinliğinin Belirlenmesi

In-vitro denemelerden sonra, hazırlanan bakteriyofaj kokteylinin buzdolabı sıcaklığındaki etkinliği süt ortamında test edilmiştir. Oluşturulan bakteriyofaj miksinin süt ortamındaki etkinliği test edilirken taze yağsız süt, yağsız süt tozu kullanılarak hazırlanmış ve sterilize edilmiştir. Süte öncelikle hazırlanan bakteri karışımından eklenmiş, daha sonra bir önceki aşamada belirlenen optimum MOI değeri sağlanacak şekilde bakteriyofaj kokteyli ilave edilmiştir. Kontrol grubuna ise bakteri ve bakteriyofaj ile aynı miktarda steril PBS eklenmiştir. Örnekler 4°C'de inkübe edilmiş, 0, 2, 4 ve 6 saatlik inkübasyondan sonra alınan örneklerdeki canlı bakteri sayıları ilgili selektif besiyerlerine ekim yapılarak kontrol edilmiştir.

3.5.4. Bakteriyofaj Kokteylinin Çiğ Sütteki Antimikrobiyal Aktivitesinin ve Sütün Mikrobiyal, Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi

Çiğ süt deneyleri için dört farklı deney grubu oluşturulmuştur. Birinci grup negatif kontrol grubu olarak belirlenmiş ve bu gruba sadece steril FTS eklenmiştir. İkinci grup ise 10 mL bakteriyofaj kokteyli ve 10 mL steril FTS ilave edilen sadece bakteriyofaj uygulaması yapılan gruptur. Üçüncü gruba 10 mL bakteri kokteyli ve 10 mL steril FTS eklenmiştir. Dördüncü gruba ise 10 mL bakteri kokteyli ve 10 mL bakteriyofaj kokteyli eklenmiştir. Örnekler 5 gün boyunca 4°C'de inkübe edilmiş ve her 24 saatte bir numuneler alınarak ilgili dilüsyonlar steril FTS ile hazırlanmış ve XLD agara ekim yapılarak bakteri sayısı tespit edilmiştir. Depolanan çiğ süt örneklerinin titre edilebilir asitliği, standart yöntemlere göre belirlenmiştir. Bu amaçla süt örneklerinden bir miktar erlene alınmış ve üzerine % 1'lik fenol ftalein çözeltisinden 0,5 mL eklenerek karışım, N/10'luk NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Titrasyon, beliren hafif pembe rengin 10-15 saniye değişmeden kalmasına göre sonuçlandırılmış ve harcanan hacimler not edilmiştir. Numunelerin titrasyon asitliği değerleri % laktik asit cinsinden hesaplanmış ve ifade edilmiştir [155]. Aynı numunelerde pH değerleri, pHmetre (Ohaus ST3100, Ohaus Corporation, ABD) ile, refraktif indeks değerleri ise refraktometre (RFM 330, Bellingham Stanley Ltd., Kent, İngiltere) ile ölçülmüştür.

3.6. *Pseudomonas fluorescens* Bakteriyofaj Kokteylinin Uygulamaları

3.6.1. Bakteri Karışımları ve Bakteriyofaj Kokteylinin Hazırlanması

Bakteriyofajların süt ortamındaki etkinliklerinin kontrolünde ilk aşamada bir bakteriyofaj kokteyli oluşturularak süt denemesi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle bakteri karışımları ve bakteriyofaj kokteylleri hazırlanmıştır. Gıda denemeleri, tüm genom analizi yapılarak toksik gen bölgesi içermediği saptanan L12.3, L23.2 ve P22.1 bakteriyofajları ve bu bakteriyofajların konakçıları ile gerçekleştirilmiştir. Her suşun konsantrasyonu nihai karışımda aynı olacak şekilde eşit hacimlerde seyreltilmelerinden bakteri karışımı hazırlanmıştır. Bakteriyofaj kokteyli benzer şekilde bakteriyofajların uygun dilüsyonları, nihai titre 10⁹ PFU/mL olacak şekilde karıştırılarak hazırlanmış ve uygulamada test edilecek MOI değerlerini karşılayacak şekilde seyreltilmiştir.

3.6.2. Bakteriyofaj Kokteylinin Farklı Yağ İçeriklerine Sahip Sütlerdeki Etkinliğinin Belirlenmesi

Bakteriyofaj kokteylinin sütteki antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi için Ankara'daki marketlerden temin edilen tam yağlı (% 3) ve yağsız UHT süt kullanılmıştır. Bunun için steril cam şişelere 40 mL süt örneği alınmıştır. Uygulama grupları olarak üç grup oluşturulmuş ve süte 5 mL (yaklaşık 10^4 KOB/mL) bakteri karışımı eklenip oda sıcaklığında bir süre bekletildikten sonra her birine üç farklı MOI değerini (10, 100 ve 1000) karşılayacak şekilde 5 mL bakteriyofaj kokteyli eklenmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak başka bir grup oluşturulmuş ve 40 mL süte 5 mL bakteri karışımı ve 5 mL steril besiyeri eklenmiştir. Negatif kontrol için 40 mL süt örneğine 10 mL steril besiyeri eklenmiştir. Tüm deney grupları 5 gün boyunca 4°C'de inkübe edilmiş ve her 24 saatte bir numuneler alınmıştır. İlgili dilüsyonlar hazırlandıktan sonra King Agar B üzerine 100 µL, yüzeye yayma yöntemiyle ekilmiştir. 30°C'de 24-48 saat inkübasyondan sonra canlı bakteri sayısı belirlenmiştir.

3.6.3. Bakteriyofaj Kokteylinin Çiğ Sütteki Antimikrobiyal Aktivitesinin ve Sütün Mikrobiyal, Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi

Sağım sonrası steril kaplara alınan çiğ süt örnekleri soğuk zincir koşullarında laboratuvara taşınarak hızlı bir şekilde analizleri yapılmıştır. Her bir steril cam şişeye 280 mL süt örneği alınmıştır. Çiğ süt deneyleri için dört farklı deney grubu oluşturulmuştur. Birinci grup negatif kontrol grubu olarak belirlenmiş ve bu gruba sadece steril FTS eklenmiştir. İkinci grup ise 10 mL bakteriyofaj kokteyli ve 10 mL steril FTS ilave edilen sadece bakteriyofaj uygulaması yapılan gruptur. Üçüncü gruba 10 mL bakteri kokteyli ve 10 mL steril FTS eklenmiştir. Dördüncü gruba ise 10 mL bakteri kokteyli ve 10 mL bakteriyofaj kokteyli eklenmiştir. Böylece hem düşük hem de yüksek *P. fluorescens* kontaminasyonu durumunda bakteriyofaj kokteylinin etkisini incelemek mümkün olmuştur.

Çizelge 3.4. Örnek grupları, kodları ve depolama koşulları

Örnek grupları

Kodlar

| | 4°C'de 5 gün depolama | 25°C'de 24 saat depolama |
|-------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Çiğ süt | A1.1 | B1.1 |
| Çiğ süt ve bakteriyofaj kokteyli | A1.2 | B1.2 |
| Çiğ süt ve bakteri karışımı | A2.1 | B2.1 |
| Çiğ süt, bakteri karışımı ve bakteriyofaj kokteyli | A2.2 | B2.2 |

3.6.3.1. Bakteriyofaj Kokteylinin Çiğ Sütün Mikrobiyal Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi

Farklı bakteri gruplarının mikrobiyolojik analizleri için aseptik koşullarda süt örnekleri alınmış ve örnekler iyice karıştırıldıktan sonra FTS kullanılarak desimal dilüsyonlar hazırlanmıştır. Daha sonra uygun dilüsyonlardan 100 µL alınarak, ilgili agarlara yüzeye yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Floresan *Pseudomonas* sayıları (PF), King's Agar B kullanılarak, 25°C'de 48 saat inkübasyondan sonucunda floresan yayan kolonilerin sayımı ile belirlenmiştir. Toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayıları, Plate Count Agar'da, 2 gün süreyle 25°C'de inkübasyonu takiben tespit edilmiştir. Laktik asit bakterilerinin (LAB) sayısı, MRS Agar'a yapılan ekim sonrası 37°C'de 24-48 saat süreyle yapılan inkübasyonu takiben belirlenmiştir. Örneklerdeki *Enterobacteriaceae* sayısı (EB) tespit edilirken, 10 mL erimiş VRBG agarın üzerine 1 mL süt eklenmesini takiben, agarın katılaşmasından sonra tekrar 10 mL kadar erimiş VRBG eklenmiştir. Petriler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır [156,157].

3.6.3.2. Bakteriyofaj Kokteylinin Çiğ Sütün Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi

Depolanan çiğ süt örneklerinin titre edilebilir asitliği, standart yöntemlere göre belirlenmiştir. Bu amaçla süt örneklerinden bir miktar erlene alınmış ve üzerine % 1'lik fenol ftalein çözeltisinden 0,5 mL eklenerek karışım, N/10'luk NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Titrasyon, beliren hafif pembe rengin 10-15 saniye değişmeden kalmasına göre sonuçlandırılmış ve harcanan hacimler not edilmiştir. Numunelerin titrasyon asitliği değerleri % laktik asit cinsinden hesaplanmış ve ifade edilmiştir [155]. Aynı numunelerde

pH değerleri, pHmetre (Ohaus ST3100, Ohaus Corporation, ABD) ile, refraktif indeks değerleri ise refraktometre (RFM 330, Bellingham Stanley Ltd., Kent, İngiltere) ile ölçülmüştür. Süt örneklerinin renk değerlerini ölçmek için bir için bir renk ölçer (Konika Minolta CM-3600d, Tokyo, Japonya) kullanılmıştır. Hunter ölçęinde, 100 değerine sahip bir L değeri beyazı, 0 değerine sahip bir L değeri ise siyahı göstermektedir. Pozitif a^* değeri kırmızılığı, b^* ise sarılığı ifade etmektedir.

3.7. İstatistiksel Analizler

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda, tüm sonuçlar ortalama değerler olarak sunulmuştur ve hata çubukları üç bağımsız deneyden elde edilen sonuçların standart sapmalarını göstermektedir. Numune gruplarının ortalamaları, % 95'lik bir güven aralığında ($p<0,05$), Fisher's en küçük önemli fark (Fisher's least significant difference, LSD) tek yönlü ANOVA (Minitab 17.1.1, Minitab LLC, İngiltere) kullanılarak karşılaştırılmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında, süt ve süt ürünleri endüstrisinde problemlere sebep olan patojen *Salmonella* spp. ve bozulma etmeni *Pseudomonas fluorescens*'in biyokontrolü amacıyla bakteri ve bakteriyofaj izolasyonu, karakterizasyonu ve bu bakteriyofajların farklı içerik ve özellikteki sütlerde etkinlik denemeleri gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasının sonuçları *Salmonella* bakteriyofajlarının karakterizasyonu, *Pseudomonas fluorescens* fajlarının karakterizasyonu, *Salmonella* bakteriyofaj kokteylinin uygulamaları ve *Pseudomonas fluorescens* bakteriyofaj kokteylinin uygulamaları olmak üzere dört temel başlıkta özetlenmiştir.

4.1. *Salmonella* Bakteriyofajlarının Karakterizasyonu

4.1.1. Konakçı Skalası ve Plak Etkinliği Değerlerinin Belirlenmesi

Yeni izole edilmiş fajlar ilk önce spot testindeki liziz bölgelerine göre ve plak morfolojileri açısından taranmaktadır. Bu amaçla ilk aşamada spot test ile bakteriyofaj plakları incelenmiş ve berrak/bulanık olma durumlarına göre sınıflandırılmıştır. *Salmonella* bakteriyofajlarının konakçı skalası Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Salmonella* bakteriyofajlarının konakçı skalası

| Bakteri suşları | Bakteriyofajlar | | | | | |
|--------------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | SK-E1 | SK-E2 | SK-E3 | SK-T1 | SK-T2 | SK-Ti1 |
| <i>S. Enteritidis</i> | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ |
| <i>S. Typhimurium</i> IC | ++ | + | ++ | +++ | ++ | + |
| <i>S. Typhimurium</i> | + | + | ++ | +++ | + | ++ |
| <i>S. 08 LAL</i> | ++ | ++ | ++ | + | +++ | ++ |
| <i>S. Anatum</i> | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |

| Bakteriyofajlar | | | | | | |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Bakteri suşları | SK-E1 | SK-E2 | SK-E3 | SK-T1 | SK-T2 | SK-Ti1 |
| <i>E. coli</i> K12 | - | - | - | - | - | - |
| <i>E. coli</i> tp | - | - | - | - | - | - |
| <i>E. italicus</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. aureus</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>E. faecalis</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>E. coli</i> tp | - | - | - | - | - | - |
| <i>E. coli</i> O157:H7 | - | - | - | - | - | - |
| <i>P. aeruginosa</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>E. faecium</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>E. aerogenes</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. pyogenes</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>M. luteus</i> | - | - | - | - | - | - |

“+++”: Yüksek düzeyde litik aktivite, “++”: orta düzeyde litik aktivite, “+”: düşük düzeyde litik aktivite, “-”: litik aktivite yok.

Yapılan çalışmalar sonucunda bakteriyofajların *Salmonella* cinsi içerisinde geniş bir etki skalasına sahip olduğu, serovar bazında litik aktivitenin farklılık gösterebildiği, buna karşın *Salmonella* dışındaki cinslere karşı etki göstermediği saptanmıştır. Çalışmada beş farklı *Salmonella* serovarı kullanılmış ve bunların hiçbirinin bakteriyofajlara dirençli olmadığı tespit edilmiştir. Her bakteriyofaj, farklı *Salmonella* serovarlarında sergiledikleri litik aktivite derecesinde farklılık göstermiştir. Buna göre bakteriyofajlar, birkaç konakçıda berrak plak oluşumu göstermiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan *Salmonella* bakteriyofajlarından hiçbirinin *Salmonella* spp. dışındaki bakterileri (*M. luteus*, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* vb.) lize edemediği görülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak, bakteriyofajların *Salmonella* cinsleri üzerinde güçlü bir litik etkiye sahip olduğu ve farklı cins ve türlere karşı litik aktivite göstermediği belirlenmiştir.

Konakçı skalasının belirlenmesini takiben, bakteriyofajların konakçı olarak kullanılan diğer suşlar üzerindeki etkinliğini daha net bir şekilde ortaya koyabilmek amacıyla plak etkinliği değerleri de hesaplanmıştır. *Salmonella* bakteriyofajlarının plak etkinliği değerleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

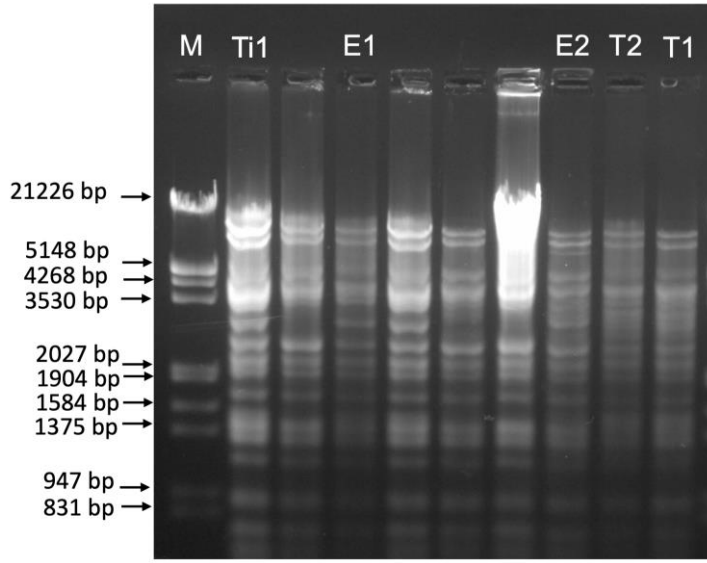
Çizelge 4.2. *Salmonella* bakteriyofajların plak etkinliği değerleri

| Fajlar | Plak etkinliği değerleri | | |
|--------|--------------------------|----------------------|-------------------|
| | S. Enteritidis | S. Typhimurium IC | S. Typhimurium |
| SK-Ti1 | 1,04 | 1,00 | 0,95 |
| SK-E2 | 1,00 | 0,95 | 0,95 |
| SK-E3 | 1,00 | 1,06 | 1,03 |
| SK-T1 | 1,03 | 1,15 | 1,00 |
| SK-T2 | 0,96 | 0,96 | 1,00 |

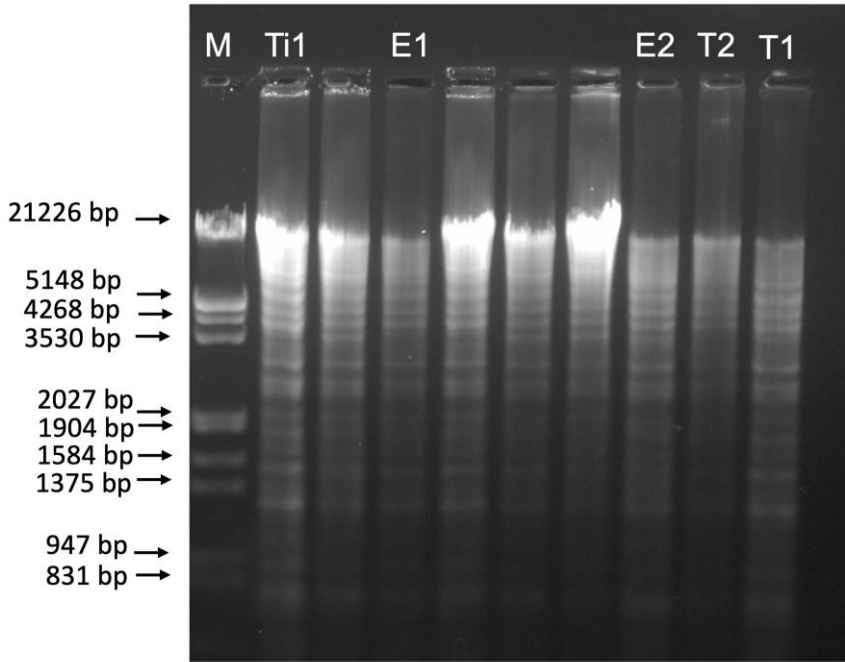
Plak etkinliği değeri 0,5 ve üzerinde olduğunda bakteriyofajın etkinliği “yüksek etkinlik” olarak tanımlanırken, bu değer 0,001’in altında ise bakteriyofaj etkisiz olarak kabul edilmektedir [107]. *Salmonella* bakteriyofajlarının plak etkinliği değerleri incelendiğinde, tamamının konakçı suşlara karşı yüksek etkinlikte olduğu görülmektedir. Bakteriyel redüksiyon ve gıda uygulamaları açısından ele alındığında bu durum bakteriyofajlar için bir avantaj teşkil etmektedir.

4.1.2. RFLP Analizleri

Konakçı skalasının belirlenmesini takiben, bakteriyofajlarının RFLP analizi yapılarak kesim profilleri ve birbirlerinden farklılıkları ortaya konmuştur. *Salmonella* bakteriyofaj genomlarına ait jel görünleri aşağıda verilmiştir.



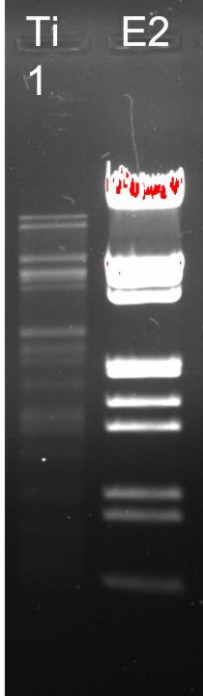
Şekil 4.1. *Salmonella* bakteriyofajlarının *EcoRV* kesimine ait jel görüntüsü



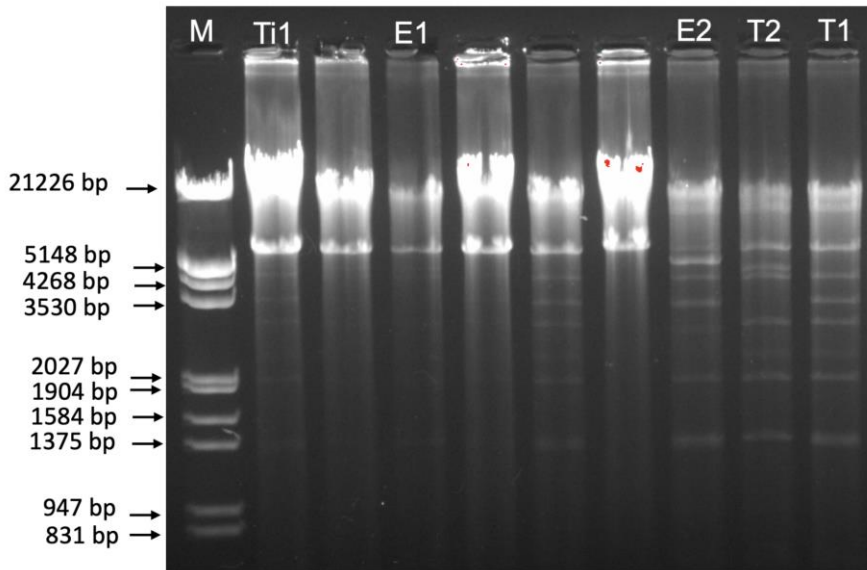
Şekil 4.2. *Salmonella* bakteriyofajlarının *HindIII* kesimine ait jel görüntüsü

Salmonella bakteriyofaj DNA'larının *EcoRV* ile kesimi sonucu bakteriyofajların benzer kesim profilleri gösterdiği görülmüştür. *HindIII* kesiminde ise yine tek bir banttandır (3.530 baz) kaynaklanan bazı farklılıklar göze çarpmaktadır.

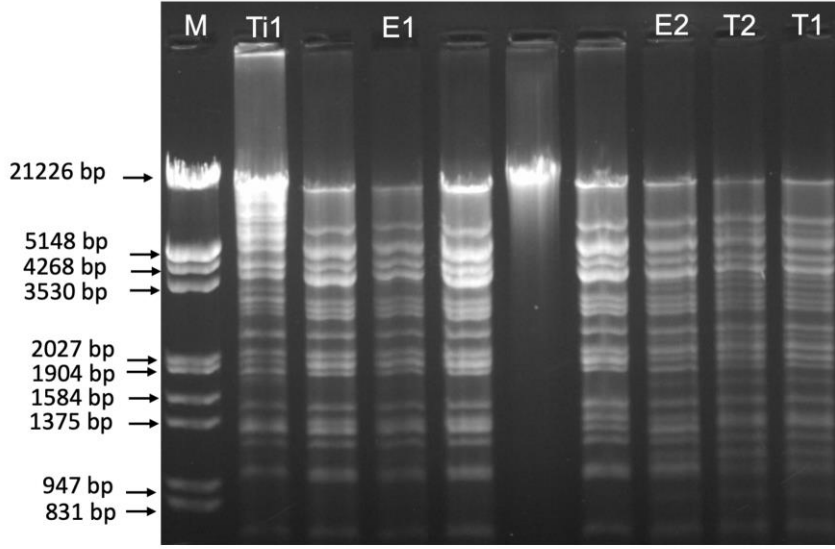
SK-Ti1 ve SK-E2 bakteriyofaj genomları fast digest özellikteki *EcoRV* ile de reaksiyona sokulmuş ve bu kesimden hareketle bu iki bakteriyofajın birbirinden farklı olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.3. SK-Ti1 ve SK-E2 bakteriyofajlarının fast digest *EcoRV* kesimi



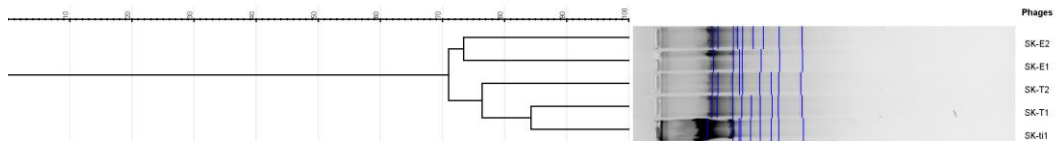
Şekil 4.4. *Salmonella* bakteriyofajlarının *EcoRI* kesimine ait jel görüntüsü



Şekil 4.5. *Salmonella* bakteriyofajlarının *HpaI* kesimine ait jel görüntüsü

HpaI restriksiyon enzimi ile kesime alınan *Salmonella* bakteriyofaj genomlarının 3 farklı profil verdiği tespit edilmiştir. SK-Ti1 bakteriyofaj genomunun diğerlerinden farklı olarak 21.226-5.148 bazlık ara bölgede büyük bir bandının olduğu görülmüştür.

Kesimlerini tamamlanmasını takiben, jel görüntüleri analiz edilerek çalışma kapsamında kullanılan fajların dendrogramları oluşturulmuştur. *Salmonella* fajlarının dendrogramı aşağıdaki şekilde sunulmuştur.



Şekil 4.6. *Salmonella* bakteriyofajlarının *EcoRI* kesimine göre oluşturulmuş filogenetik ilişkilerini gösteren dendrogram

Dendrogramdan da takip edilebileceği şekilde, *EcoRI* kesimlerine göre bu bakteriyofajların birbirlerinden farklılıkları ortaya konmuştur. Buna ek olarak, fajların benzerlik indeksleri de belirlenmiş ve aşağıdaki çizelgede sunulmuştur.

Çizelge 4.3. *Salmonella* fajlarının *EcoRI* kesimine göre hesaplanan benzerlik indeksleri

| Fajlar | SK-Ti1 | SK-E1 | SK-E2 | SK-T2 | SK-T1 |
|--------|--------|-------|-------|-------|-------|
| SK-Ti1 | 1,00 | 0,63 | 0,44 | 0,67 | 0,78 |
| SK-E1 | 0,63 | 1,00 | 0,63 | 0,63 | 0,63 |
| SK-E2 | 0,44 | 0,63 | 1,00 | 0,56 | 0,67 |
| SK-T2 | 0,67 | 0,63 | 0,56 | 1,00 | 0,67 |
| SK-T1 | 0,78 | 0,63 | 0,67 | 0,67 | 100 |

Bu sonuçlara göre, en yüksek benzerlik %78 oranıyla SK-Ti1 ve SK-T1 bakteriyofajları arasında bulunmuştur. En düşük benzerlik ise %44 oranıyla SK-Ti1 ve SK-E2 bakteriyofajları arasında tespit edilmiştir.

RFLP analizleri kapsamında, bakteriyofajların kesim profilleri arasındaki farklılıkların ortaya konulmasını takiben jel görüntülerinden hareketle bakteriyofajların tahmini fragment boyutları ve toplam genom boyutları hesaplanmıştır. Bu değerler aşağıdaki tabloda sunulmuştur.

Çizelge 4.4. *Salmonella* bakteriyofaj DNA'larının *EcoRI* kesim sonucuna göre hesaplanan tahmini fragment boyutları ve toplam boyutları

| Bant No | Fragment boyutları (bp) | | | | | |
|---------------|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Marker | SK-Ti1 | SK-E1 | SK-E2 | SK-T1 | SK-T2 |
| 1 | 21.226 | 24.125 | 17.874 | 19.052 | 19.052 | 19.463 |
| 2 | 5.148 | 7.319 | 7.181 | 14.480 | 14.480 | 15.099 |
| 3 | 4.268 | 5.644 | 5.544 | 7.181 | 7.460 | 7.319 |
| 4 | 3.530 | 5.256 | 4.987 | 5.960 | 5.544 | 5.075 |
| 5 | 2.027 | 3.650 | 2.611 | 4.901 | 4.901 | 3.541 |
| 6 | 1.904 | 2.677 | 1.731 | 3.335 | 2.712 | 2.677 |
| 7 | 1.584 | 2.028 | 1.350 | 2.457 | 2.028 | 1.990 |
| 8 | 1.375 | 1.756 | - | 1.743 | 1.756 | 1.769 |
| 9 | 947 | 1.342 | - | 1.354 | 1.366 | 1.354 |
| 10 | 831 | - | - | - | - | - |
| 11 | 564 | - | - | - | - | - |
| TOPLAM | | 53.799 | 41.277 | 60.463 | 59.299 | 58.286 |

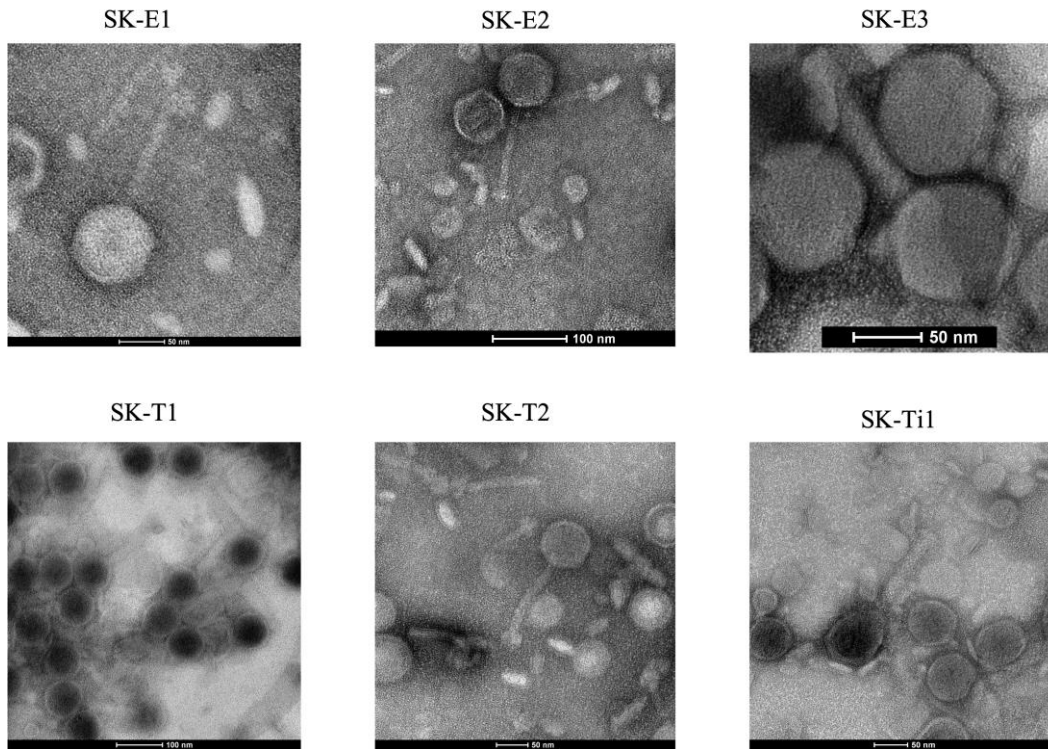
Bakteriyofajların sınıflandırılmasında temel olan aşamalardan biri de genetik farklılıkların ortaya konmasıdır. Bu amaçla, birçok alanda kullanılabilen ve en güvenilir yöntemlerden biri olan RFLP çalışmalarının gerçekleştirilmektedir. Bu sayede aynı konakçı spektrumuna sahip iki fajın birbirinden farklı olduğu ortaya konabilmektedir. Dolayısıyla fajlar ile yapılan genetik çalışmaların başlangıcında restriksiyon enzimleri ile kesim analizleri ve oluşan fragmentlerin DNA/DNA hibridizasyon çalışmaları yapılabilmektedir. Temel analizler olarak gerçekleştirilen bu çalışmalardan sonra fajların farklılığı ortaya konmakta ve bir sonraki çalışmalara geçilmektedir.

Literatürde *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* sınıflandırılmasında RFLP analizinin kullanıldığı pek çok çalışma bulmak mümkündür. Örneğin bu çalışmalardan birinde 33 adet *S. Enteritidis* fajının sınıflandırılması için kullanılan yöntemlerden biri de RFLP olmuş ve bu amaçla *EcoRI* ile *HindIII* restriksiyon enzimleri kullanılmıştır [158]. Bir başka çalışmada *EcoRV* enzimi kullanarak faj DNA fragmentlerinin RFLP profilleri çıkarılarak sınıflandırma gerçekleştirilmiştir [144]. *HindIII* and *EcoRV* enzimlerinin kullanıldığı başka bir çalışmada, *Salmonella* fajlarının sınıflandırılması ve karakterizasyonu için RFLP analizinin yanı sıra, litik spektrumun çıkarıldığı ve faj replikasyon parametrelerinin ortaya konduğu görülmüştür [143]. Switt ve arkadaşlarının çalışmasında, özdeş genom büyüklüklerini ve benzer veya özdeş liziz profillerini temsil eden *Salmonella* faj izolatları ayrıca *EcoRI* enzimi kullanılarak RFLP analizi ile karakterize edilmiştir. Bu çalışmada faj izolatları *EcoRI* enzimine direnç gösterdiğinde RFLP analizi için ek enzimler (*RsaI*, *KpaI*, *HpaI*, *PsaI* ve *SalI*) kullanıldığı belirtilmiştir [145]. Bu çalışma kapsamında da ilgili enzimler kullanılarak kesimler gerçekleştirilmiş ve fajlar arasındaki farklar ortaya konmuştur.

Literatürdeki *Salmonella* bakteriyofajlarının genom boyutları arasında büyük bir varyasyon bulunmaktadır. Tanımlı *Salmonella* faj genomlarının, 22 ila 250 kb arasında değişebildiği belirtilmektedir. Bu grupta genom büyüklüğü 200 kb'dan büyük olan jumbo fajlar da bulunmaktadır. Dünyadaki çok çeşitli çevresel kaynaklardan izole edilen bu fajlardaki çeşitlilik, konakçı çeşitliliğine paralel şekilde değişmektedir [159,160]. Bu çalışma kapsamında kullanılan bakteriyofajların yaklaşık genom büyüklüklerinin ise 41,2 kb ile 60,5 kb aralığında değiştiği saptanmıştır.

4.1.3. Morfolojik Karakterizasyon

Salmonella bakteriyofajlarının TEM mikrografları aşağıdaki şekilde verilmiştir. Bu mikrograflardan yola çıkılarak yapılan analizler, SK-E1, SK-E2 ve SK-T2 bakteriyofajlarının ikosahedral bir kafa ve uzun bir kuyruğa, buna karşılık SK-E3 ve SK-T1'in ise ikosahedral bir kafa ve kontraktıl kılıflı bir kuyruğa sahip olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.7. *Salmonella* bakteriyofajlarının TEM mikrografları

Salmonella bakteriyofajlarının kafa çapı, kuyruk uzunluğu ve morfolojileriyle ilgili bilgiler, aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir.

Çizelge 4.5. *Salmonella* bakteriyofajlarının morfolojik özellikleri

| Bakteriyofajlar | Morfoloji | Kafa çapı (nm) | Kuyruk uzunluğu (nm) |
|-----------------|------------|----------------|----------------------|
| SK-E1 | Siphovirus | 80,20 ± 5,60 | 142,20 ± 4,20 |
| SK-E2 | Siphovirus | 73,87 ± 5,24 | 142,57 ± 15,58 |

| Bakteriyofajlar | Morfoloji | Kafa çapı (nm) | Kuyruk uzunluğu (nm) |
|-----------------|------------|----------------|----------------------|
| SK-E3 | Myovirus | 80,67 ± 6,06 | 126,43 ± 25,75 |
| SK-T1 | Myovirus | 74,00±4,20 | 135,25±8,92 |
| SK-T2 | Siphovirus | 77,20 ± 4,40 | 155,83±13,00 |
| SK-Ti1 | Myovirus | 90,10 ± 470 | 134,67±9,10 |

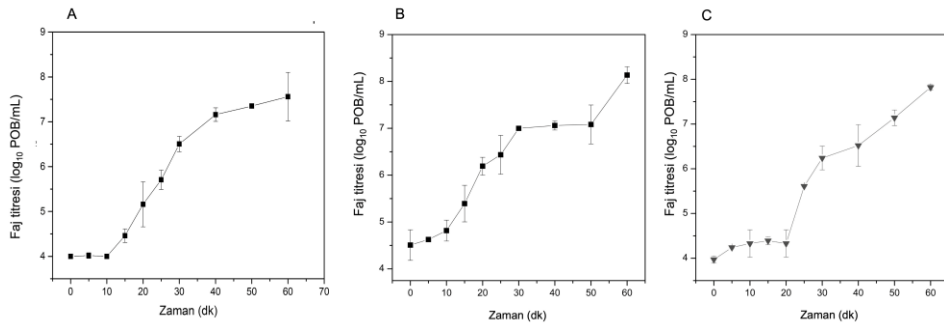
Literatürdeki *Salmonella*'ya etkili fajların morfotipleri değişkenlik göstermesine karşın diğerlerinden daha yaygın olan morfotipler bulunmaktadır. Örneğin bir çalışmada, incelenen 177 *Salmonella* bakteriyofajından 161'inin kuyruklu yapıda olduğu ve *Myoviridae*, *Siphoviridae* ve *Podoviridae* familyalarına ait olduğu, kalan 16 filamentli veya izometrik fajınsa, *Inoviridae*, *Leviviridae*, *Microviridae* ve *Tectiviridae* ailelerinin üyeleri olduğu bildirilmiştir [161]. Bu çalışma kapsamında kullanılan bakteriyofajların da literatürdeki *Salmonella* fajlarının çoğu gibi siphovirus ve myovirus yapısında olduğu görülmüştür.

4.1.4. Genotoksisitenin Kontrol Edilmesi

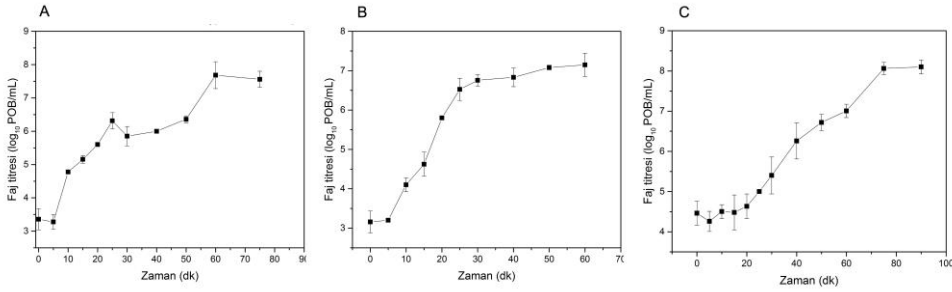
Salmonella bakteriyofajlarında, genotoksik bölgelerin taraması için ilgili primerler kullanılarak dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizi sonucunda elde edilen ham baz dizilimleri elde edildikten sonra öncelikle bu dizilerde oluşan pik ve karşılık gelen bazın doğruluğu kontrol edilmiş, yanlış okunan bazlar ya da okunamayan bölgeler dizilimden çıkarıldıktan sonra NCBI sayfasındaki BLAST ve ORF Finder araçları kullanılarak gen bankasında bulunan DNA ve protein dizilimleri ile elde edilen dizilimler hem nükleik asit hem de amino asit dizilimi olarak birbiriyle karşılaştırılmıştır. *Salmonella* bakteriyofajlarında toksin üretiminden sorumlu, *hly*, *cdt*; lizogeni ve bakteriyofaj direnci ile ilişkilendirilen *sieA*, *int* ve *cl* gen bölgeleri için tarama yapılmış, *Salmonella* bakteriyofajlarında toksik gen bölgesine ve/veya lizogeni-bakteriyofaj direnci ile ilgili gen bölgelerine ya da uyuşan küçük bir bölge bile tespit edilmemiştir. Böylece bu bakteriyofajların gıda uygulamaları için kullanıma uygun olduğu belirlenmiştir.

4.1.5. Replikasyon Parametrelerinin Belirlenmesi

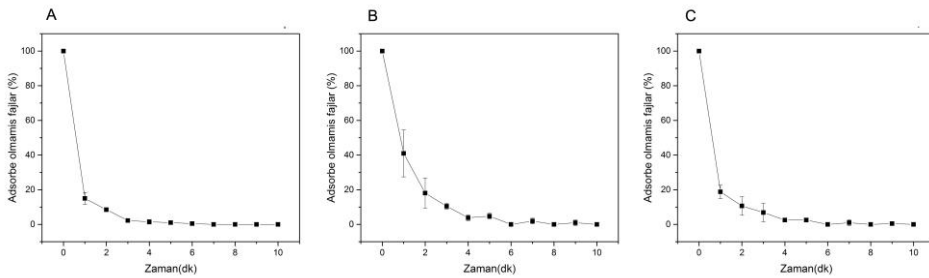
Faj terapi uygulamaları için hangi bakteriyofajların en verimli şekilde kullanılabileceğine karar verilirken replikasyon parametreleri de göz önünde bulundurulmaktadır. Bu amaçla çalışma kapsamında kullanılan bakteriyofajların tek aşamalı gelişme eğrileri ile adsorpsiyon eğrileri çıkarılarak bunlardan hareketle replikasyon parametreleri hesaplanmıştır. *Salmonella* bakteriyofajlarının gelişme eğrileri ve adsorpsiyon eğrileri aşağıdaki şekillerde sunulmuştur.



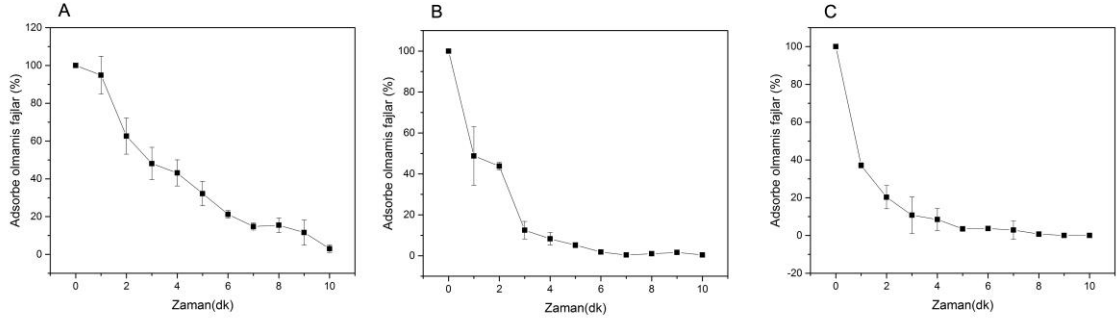
Şekil 4.8. SK-E1 (A), SK-E2 (B) ve SK-E3 bakteriyofajlarına ait gelişme eğrileri



Şekil 4.9. SK-T1 (A), SK-T2 (B) ve SK-Ti1 bakteriyofajlarına ait gelişme eğrileri



Şekil 4.10. SK-E1 (A), SK-E2 (B) ve SK-E3 bakteriyofajlarına adsorpsiyon eğrileri



Şekil 4.11. SK-T1 (A), SK-T2 (B) ve SK-Ti1 bakteriyofajlarına ait adsorpsiyon eğrileri

Bakteriyofajların gelişme ve adsorpsiyon eğrilerinden hareketle belirlenen latent dönem süresi, patlama büyüklüğü ve adsorpsiyon hız sabiti gibi temel replikasyon parametreleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 4.6. *Salmonella* bakteriyofajlarının replikasyon parametreleri

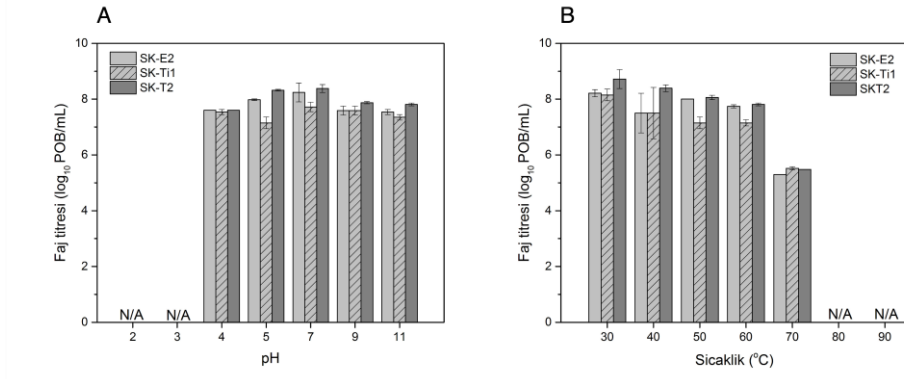
| Bakteriyofajlar | Latent dönem süresi (dk) | Patlama büyüklüğü (POB/enfekte hücre) | Adsorpsiyon hız sabiti (mL/dk) |
|-----------------|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| SK-E1 | 15 | 176 | $1,20 \times 10^{-8}$ |
| SK-E2 | 10 | 88 | $3,00 \times 10^{-8}$ |
| SK-E3 | 20 | 163 | $1,18 \times 10^{-8}$ |
| SK-T1 | 5 | 42 | $5,15 \times 10^{-8}$ |
| SK-T2 | 15 | 113 | $2,92 \times 10^{-8}$ |
| SK-Ti1 | 25 | 80 | $4,39 \times 10^{-8}$ |

Gelişme eğrilerinden elde edilen sonuçlara göre, SK-T1 bakteriyofajının en kısa latent dönem süresine, SK-E1 bakteriyofajının en yüksek patlama büyüklüğüne sahip olduğu saptanmıştır. *S. Enteritidis* bakteriyofajlarının adsorpsiyon oranlarının genellikle daha yüksek olduğu, SK-E1'in inkübasyonun ilk 4 dakikasında % 95'inden fazlasının konak hücrelere adsorbe olduğu görülmüştür. SK-E2'nin ve SK-E3'ün ise ve inkübasyonun ilk 3 dakikasında bakteriyofajların % 90'dan fazlasının konak hücrelere adsorbe olduğu görülmüştür. *S. Typhimurium* bakteriyofajlarında ise yaklaşık % 90'lık bir adsorpsiyon oranı için gerekli olan sürenin 3-7 dakika arasında değiştiği görülmüştür.

Replikasyon parametreleri bakteriyofaj uygulamaları için bakteriyofaj seçiminde önemli olup genel olarak latent periyodu kısa, patlama büyüklüğü yüksek olan bakteriyofajlar uygulamalarda daha etkin bir şekilde kullanılabilmekte ve daha başarılı bakteri eliminasyonu sağlanabilmektedir [141]. Bu çalışma kapsamında kullanılan bakteriyofajların latent dönem sürelerinin 5-25 dakika arasında, patlama büyüklüklerinin ise 42-176 POB/enfekte hücre arasında değiştiği görülmüştür. Literatürdeki diğer *Salmonella* bakteriyofajlarının latent dönem süreleri ve patlama büyüklüklerinde de benzer aralıklar gözlenmiştir. Örneğin bir çalışmada LPST153 bakteriyofajının latent dönem süresinin 10 dakika ve patlama büyüklüğünün yaklaşık 113 POB/enfekte hücre [162], bir başka çalışmada LPST10'un latent dönem süresinin yaklaşık 10 dakika, patlama büyüklüğününse 101 POB/enfekte hücre olduğu saptanmıştır [163]. Bir diğer çalışmada, bakteriyofaj vB_SalP_TR2'nin latent dönem süresinin 15 dakika ve patlama büyüklüğünün 211 POB/enfekte hücre olduğu bulunmuştur [164]. Bu yaklaşık değerlerin dışında, çok daha uzun latent dönem süresine sahip *Salmonella* bakteriyofajları da olduğu görülmüştür. Örneğin dört *Salmonella* bakteriyofajı ile yürütülen bir çalışmada, latent dönem sürelerinin 53-65 dakika arasında değiştiği, patlama büyüklüklerininse 92 ve 177 POB/enfekte hücre arasında değiştiği belirtilmiştir [165]. Bu açıdan bakıldığında, izole edilen bakteriyofajların bakteriyofaj terapi uygulamalarında kullanıma uygun olduğu görülmektedir.

4.2.7. pH ve Sıcaklık Stabilitelerinin Belirlenmesi

Salmonella bakteriyofajlarının pH ve sıcaklık stabiliteleri Şekil 4.12'de verilmiştir. Buna göre, bakteriyofajların pH 4-11 aralığında yüksek oranda stabil olduğu, pH 3 ve altında sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü saptanmıştır. Sıcaklık değerleri incelendiğindeyse, bakteriyofajların 60°C'ye kadar görece stabil kalırken sonrasında aktivite kaybı yaşadığı, 80°C ve üstünde ise genellikle sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir.

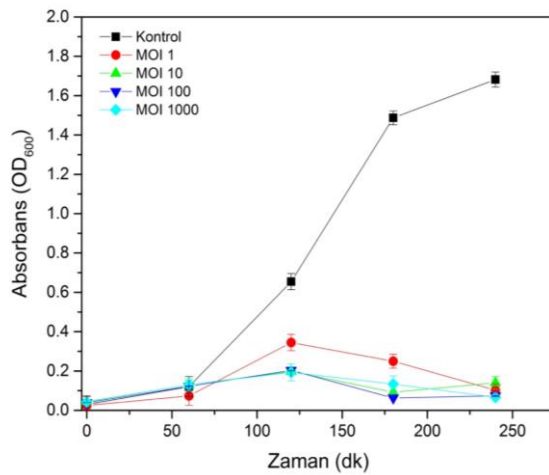


Şekil 4.12. *Salmonella* bakteriyofajlarının farklı pH ve sıcaklık değerlerinde stabilitesi

4.1.7. Litik Etkinin Belirlenmesi

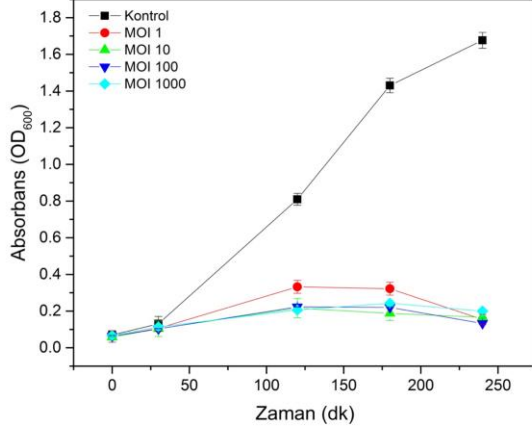
Çalışma kapsamında, gıda uygulamalarında kullanılması planlanan *Salmonella* bakteriyofajlarının tek başlarına kullanılmaları durumunda farklı MOI değerlerindeki litik etkileri UV-Vis spektrofotometre ile OD₆₀₀ değerindeki absorbans değerleri takip edilerek belirlenmiştir.

SK-T2 bakteriyofajına ait değerler aşağıdaki şekilde verilmiştir. Deney sonucunda kontrol örneğinde ilk 2 saat içerisinde hızlı bir artış olduğu gözlenmiş fakat MOI 1, 10, 100 ve 1000 değerlerinde aynı durum yaşanmamıştır. Bakteriyofajın olduğu gruplardaki bakteri sayısındaki artış, kontrol örneğine kıyasla çok daha yavaş gerçekleşmiştir. Uygulama grupları arasında, MOI 1 değerinde bakteri sayısındaki artış diğerlerine göre daha hızlı olmuştur. En düşük titrede fajı bu grup içerdiği için bu beklenen bir durumdur. En güçlü litik etki MOI 100 değerinde bulunmuştur.



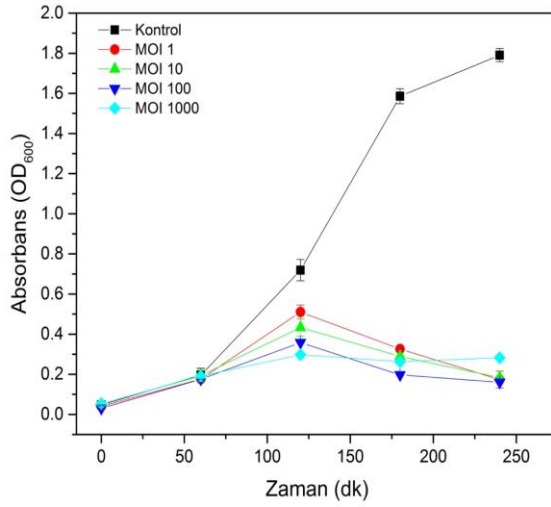
Şekil 4.13. SK-T2 fajının farklı MOI değerlerindeki litik etkinliği

SK-Ti1 fajının farklı MOI değerlerindeki litik aktivitesi aşağıdaki şekilde verilmiştir. Buna göre, tüm MOI değerlerinde bakteri yoğunluğu ilk iki saat içerisinde artmış daha sonra düşüşe geçmiştir. En fazla düşüşün ise MOI 100 değerinde olduğu görülmüştür.



Şekil 4.14. SK-Ti1 fajının farklı MOI değerlerindeki litik etkinliği

SK-E2 fajının farklı MOI değerlerinde konakçısı üzerindeki litik etkisi aşağıdaki şekilde verilmiştir. Bu sonuçlara göre, kontrol grubunda ve MOI 1, 10, 100 ve 1000 değerlerinde ilk iki saatte bakteri sayısında artış gözlenmiştir. İki saat içerisinde bakteri sayısında en fazla artış kontrol örneğinde gerçekleşmiştir. İkinci saatten sonra tüm MOI değerlerinde bakteri sayısında düşüş görülmüştür. Dördüncü saate kadar MOI 1, 10 ve 100 değerlerinde bakteri sayısındaki düşüş devam ederken MOI 1000 değerindeki düşüş miktarı azalmıştır.



Şekil 4.15. SK-E2 fajının farklı MOI değerlerindeki litik etkinliği

4.2. *Pseudomonas fluorescens* Bakteriyofajlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu

4.2.1. Bakteri İzolasyonu ve Doğrulanması

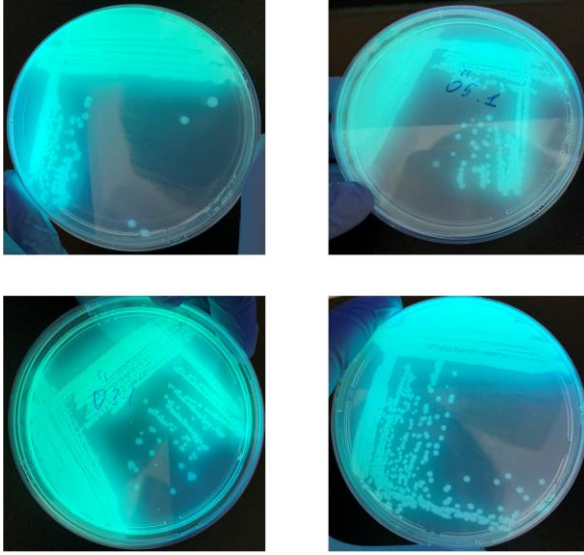
Bakteri izolasyonu çalışmaları kapsamında, AOÇ Süt Fabrikası'na gelen farklı çiğ süt tanklarından farklı zamanlarda örnek alınmış ve bunun dışında Ankara ve Bolu'da çiğ süt satan yerel üreticilerden yine farklı farklı zamanlarda temin edilen örneklerden *Pseudomonas fluorescens* grubu suşların izolasyonu için çalışma yürütülmüştür. Bunun dışında AOÇ Süt Fabrikası atık suyundan ve ekipman yüzeylerinden de örnek alınmıştır. İzolasyon için kullanılan kaynaklar aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir.

Çizelge 4.7. Bakteri izolasyon kaynakları

| Örnek kaynağı | Örnek adı | Örnek sayısı |
|---------------|--------------|--------------|
| | Çiğ süt PÖ-1 | 3 |
| | Çiğ süt PÖ-2 | 3 |
| | Çiğ süt A-1 | 3 |
| | Çiğ süt A-2 | 3 |
| | Çiğ süt Ç-1 | 5 |
| | Çiğ süt Ç-2 | 5 |
| | Çiğ süt Ç-3 | 5 |

| | | |
|------------------------|------------------------------|-------------|
| Atatürk Orman Çiftliği | Çiğ süt L-1 | 3 |
| Süt Fabrikası | Çiğ süt L-2 | 3 |
| | Çiğ süt L-3 | 3 |
| | Ekipman yüzeyi sürüntü 1 | 2 |
| | Ekipman yüzeyi sürüntü 2 | 2 |
| | Ekipman yüzeyi sürüntü 3 | 2 |
| | Fabrika atık suyu-1 | 3 |
| | Fabrika atık suyu-2 | 3 |
| | Fabrika atık suyu-3 | 3 |
| | Ankara yerel üretici çiğ süt | Çiğ süt P-1 |
| Çiğ süt P-2 | | 3 |
| Çiğ süt P-3 | | 3 |
| Çiğ süt P-4 | | 3 |
| Çiğ süt P-5 | | 3 |
| Çiğ süt Ö-1 | | 3 |
| Çiğ süt Ö-2 | | 3 |
| Çiğ süt Ö-3 | | 3 |
| Çiğ süt Ö-4 | | 3 |
| Çiğ süt Ö-5 | | 3 |
| Çiğ süt Ö-6 | | 3 |

Temin edilen örneklerin seri dilüsyonları hazırlandıktan sonra, uygun dilüsyonlardan King B agar üzerine ekim yapılarak 30°C'de yaklaşık 48 saat inkübe edilmiştir. 360 nm'de UV ışığı altında floresan gösteren farklı koloniler seçilmiş ve kolonilerin saflaştırma işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. İzolasyon sürecinde, King B agar üzerindeki kolonilerin floresan kontrolüne dair bazı fotoğraflar aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.16. *P. fluorescens* bakteri izolasyonunda floresan kontrolü

İzolasyonu ve saflaştırma süreci tamamlanan izolatların tanımlaması MALDI-TOF MS Biotyper cihazı ile yapılmıştır. *Pseudomonas* cinsine ait olduğu belirlenen izolatlar ve tanımlama sonucu aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 4.8. *Pseudomonas* cinsine ait olan izolatlar

| İzolatın kodu | Tanımlama sonucu | Grup | İzolasyon kaynağı |
|---------------|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Ö1.1 | <i>Pseudomonas extremorientalis</i> | <i>P. fluorescens</i> grubu | Yerel üretici çiğ süt Ö-1 |
| Ö1.2 | <i>Pseudomonas azotoformans</i> | <i>P. fluorescens</i> grubu | Yerel üretici çiğ süt Ö-1 |
| Ö1.3 | <i>Pseudomonas rhodesiae</i> | <i>P. fluorescens</i> grubu | Yerel üretici çiğ süt Ö-1 |
| Ö1.4 | <i>Pseudomonas putida</i> | <i>P. putida</i> grubu | Yerel üretici çiğ süt Ö-1 |
| Ö1.5 | <i>Pseudomonas putida</i> | <i>P. putida</i> grubu | Yerel üretici çiğ süt Ö-1 |
| Ö1.6 | <i>Pseudomonas putida</i> | <i>P. putida</i> grubu | Yerel üretici çiğ süt Ö-2 |
| Ö2.1 | <i>Pseudomonas libanensis</i> | <i>P. fluorescens</i> grubu | Yerel üretici çiğ süt Ö-2 |
| Ö2.2 | <i>Pseudomonas rhodesiae</i> | <i>P. fluorescens</i> grubu | Yerel üretici çiğ süt Ö-2 |
| Ö3.1 | <i>Pseudomonas extremorientalis</i> | <i>P. fluorescens</i> grubu | Yerel üretici çiğ süt Ö-3 |
| Ö3.2 | <i>Pseudomonas proteolytica</i> | - | Yerel üretici çiğ süt Ö-3 |
| Ö4.1 | <i>Pseudomonas koreensis</i> | - | Yerel üretici çiğ süt Ö-4 |
| Ö5.1 | <i>Pseudomonas synxantha</i> | <i>P. fluorescens</i> grubu | Yerel üretici çiğ süt Ö-5 |

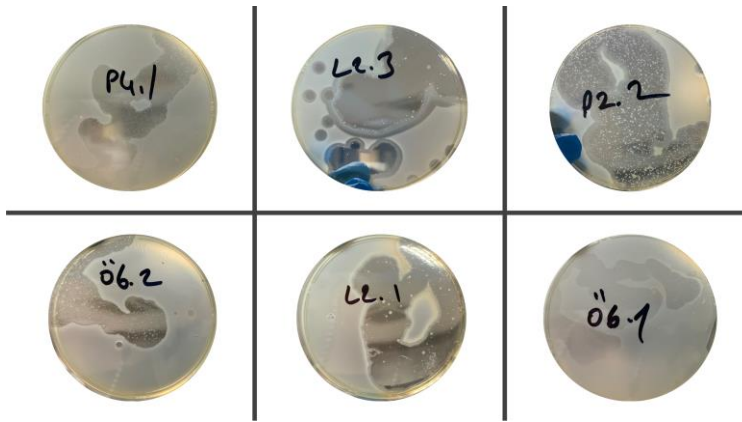
| | | | |
|-------|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Ö5.2 | <i>Pseudomonas extremorientalis</i> | <i>P.fluorescens grubu</i> | Yerel üretici çiğ süt Ö-6 |
| Ö6.1 | <i>Pseudomonas extremorientalis</i> | <i>P.fluorescens grubu</i> | Yerel üretici çiğ süt Ö-6 |
| Ö6.2 | <i>Pseudomonas libanensis</i> | <i>P. fluorescens grubu</i> | Yerel üretici çiğ süt Ö-6 |
| PÖ1.1 | <i>Pseudomonas gessardii</i> | <i>P. fluorescens grubu</i> | AOÇ çiğ süt PÖ-1 |
| PÖ1.2 | <i>Pseudomonas gessardii</i> | <i>P. fluorescens grubu</i> | AOÇ çiğ süt PÖ-1 |
| PÖ2.1 | <i>Pseudomonas koreensis</i> | - | AOÇ çiğ süt PÖ-2 |
| P1.2 | <i>Pseudomonas proteolytica</i> | - | Yerel üretici çiğ süt P-1 |
| P2.1 | <i>Pseudomonas tolaasii</i> | <i>P.fluorescens grubu</i> | Yerel üretici çiğ süt P-2 |
| P2.2 | <i>Pseudomonas tolaasii</i> | <i>P. fluorescens grubu</i> | Yerel üretici çiğ süt P-2 |
| P2.6 | <i>Pseudomonas tolaasii</i> | <i>P.fluorescens grubu</i> | Yerel üretici çiğ süt P-2 |
| P4.1 | <i>Pseudomonas gessardii</i> | - | Yerel üretici çiğ süt P-4 |
| P4.2 | <i>Pseudomonas gessardii</i> | - | Yerel üretici çiğ süt P-4 |
| P5.2 | <i>Pseudomonas gessardii</i> | <i>P. fluorescens grubu</i> | Yerel üretici çiğ süt P-5 |
| P5.3 | <i>Pseudomonas gessardii</i> | <i>P. fluorescens grubu</i> | Yerel üretici çiğ süt P-5 |
| A1.1 | <i>Pseudomonas rhodesiae</i> | <i>P. fluorescens grubu</i> | AOÇ çiğ süt A-1 |
| Ç1.1 | <i>Pseudomonas grimontii</i> | <i>P. fluorescens grubu</i> | AOÇ çiğ süt Ç-1 |
| Ç2.2 | <i>Pseudomonas extremorientalis</i> | <i>P. fluorescens grubu</i> | AOÇ çiğ süt Ç-2 |
| Ç2.3 | <i>Pseudomonas extremorientalis</i> | <i>P. fluorescens grubu</i> | AOÇ çiğ süt Ç-2 |
| Ç2.4 | <i>Pseudomonas extremorientalis</i> | <i>P. fluorescens grubu</i> | AOÇ çiğ süt Ç-2 |
| Ç3.1 | <i>Pseudomonas rhodesiae</i> | <i>P. fluorescens grubu</i> | AOÇ çiğ süt Ç-3 |
| Ç3.2 | <i>Pseudomonas rhodesiae</i> | <i>P. fluorescens grubu</i> | AOÇ çiğ süt Ç-3 |
| L1.1 | <i>Pseudomonas tolaasii</i> | <i>P. fluorescens grubu</i> | AOÇ çiğ süt L-1 |
| L1.2 | <i>Pseudomonas libanensis</i> | <i>P. fluorescens grubu</i> | AOÇ çiğ süt L-1 |
| L2.1 | <i>Pseudomonas tolaasii</i> | <i>P. fluorescens grubu</i> | AOÇ çiğ süt L-2 |
| L2.2 | <i>Pseudomonas tolaasii</i> | <i>P. fluorescens grubu</i> | AOÇ çiğ süt L-2 |
| L2.3 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | <i>P. fluorescens grubu</i> | AOÇ çiğ süt L-2 |

Çalışmanın ilk aşamasında, çiğ süt ve süt fabrikası ortamı örneklerinden birbirinden farklı *Pseudomonas* tür ve suşları izole edilmeye çalışılmıştır. Bu bakterilerin izolasyonu, kendilerinin neden olduğu sorunu çözmek için aranacak bakteriyofajlara konakçı olmaları dolayısıyla tez çalışması genelinin kritik noktalarından birini oluşturmaktadır. Bu amaçla

farklı kaynaklardan çok sayıda *Pseudomonas* tür ve suşu izole edilerek MALDI-TOF ile moleküler tanımlaması yapılmış ve bu suşlardan birçoğunun *Pseudomonas fluorescens* grubu suşları içerisinde yer alması da bir avantaj olarak görülmüştür. Bu kapsamda *P. fluorescens* dışında, *P. extremorientalis*, *P. azotoformans*, *P. rhodesiae*, *P. putida*, *P. fragi*, *P. libanensis*, *P. rhodesiae*, *P. proteolytica*, *P. koreensis*, *P. gessardii*, *P. tolaasii* ve *P. grimontii* gibi suşlar izole edilmiştir. Çiğ süt örneklerinden elde edilen suşların, literatür geneliyle uyumlu olduğu görülmüştür. Bir çalışmada, ticari bir mandırada dört farklı silo tankında saklanan dört çiğ süt örneğinden alınan 32 izolatin ön taraması, tüm örneklerde çeşitli suşların bulunduğunu göstermiş, bununla birlikte, fenotipik testler ve 16S rRNA dizilimi ile hepsinin *P. fluorescens* grubundaki *Pseudomonas* türleri olduğu belirlenmiştir [166]. De Jonghe ve ark., depolanmış çiğ sütte *P. fluorescens* suşlarının baskın olduğunu bulmuşken, Marchand ve ark. (2009), *Pseudomonas fragi* ve *Pseudomonas lundensis*'in en yaygın suşlar olduğunu raporlamıştır. Caldera ve ark. (2016) ise, çiğ sütte çiğ sütte *P. gessardii*, *P. fragi*, *P. brenneri*, *P. proteolytica*, *P. peli* ve *P. rhodesiae* türlerinin baskın olarak bulunduğunu bildirmiştir [30,167,168].

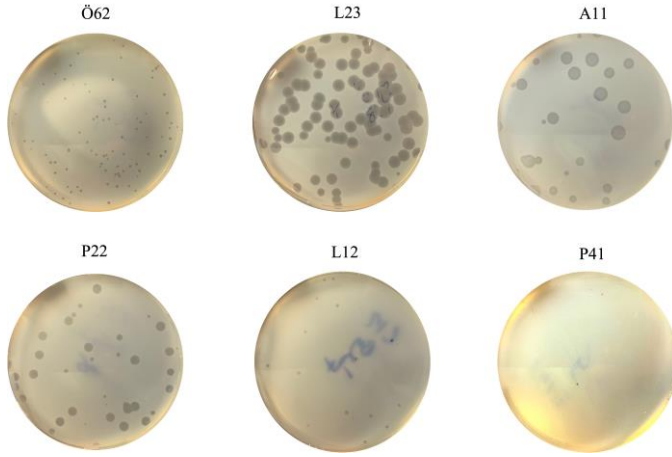
4.2.2. Bakteriyofajların İzolasyonu, Saflaştırılması ve Zenginleştirilmesi

Tez kapsamında, *P. fluorescens* grup suşlarına etkili bakteriyofajların izolasyonu için de benzer şekilde çiğ süt örnekleri kullanılmıştır. Gerekli ön işlemler yapıldıktan sonra, bakteriyofaj lizati spot test ile bakteriler üzerinde denenmiş ve inkübasyon sonrasında bakteriyofaj plakları kontrol edilmiştir. Bakteriyofaj izolasyonu için ilk aşamada yapılan denemelerden elde edilen bazı sonuçlar aşağıdaki fotoğraflarda verilmiştir.



Şekil 4.17. *P. fluorescens* bakteriyofaj izolasyonu için örneklerde bakteriyofaj varlığı araştırılmasında ilk denemeler

Varlığı saptanan bakteriyofajlara, ilk aşama saflaştırması için tek plak izolasyonu yapılmıştır. Tek plak olarak devam edilen bu işlem, bakteriyofaj plaklarının saflığından emin olunana dek tekrarlanmıştır. Elde edilen son süpernatant, 0,22 µm gözenekli filtrelerden geçirilerek steril bakteriyofaj filtratı olarak kullanılmıştır. Tek plak izolasyonu tamamlanan bakteriyofajların istenilen titreye ulaşınca dek zenginleştirilmiştir. İzole edilen bakteriyofajların tek plak izolasyonuna ait bazı fotoğraflar aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.18. Bakteriyofajların tek plak izolasyonu çalışmalarından örnekler

Yukarıda verilen şekillerden de görülebileceği üzere, farklı kaynaklardan ve farklı konakçılar ile yapılan bakteriyofaj izolasyonu sonucunda, birbirinden farklı plak morfolojileri ve litik aktiviteler gösteren bakteriyofajlar izole edilmiştir. Tek plak izolasyonu ile saflaştırılması tamamlanarak titresi yükseltilecek bakteriyofajların listesi aşağıda verilmiştir

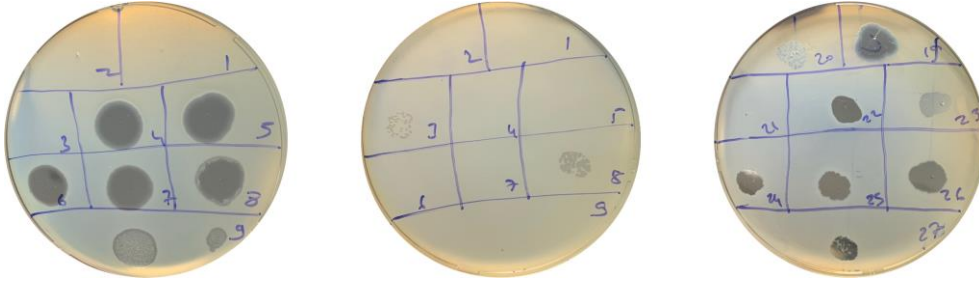
Çizelge 4.9. Tek plak izolasyonu ile saflaştırılması tamamlanarak titresi yükseltilecek bakteriyofajlar

| Bakteriyofaj | Konakçı suş | Bakteriyofaj titresi (POB/mL) |
|--------------|--------------------------------|-------------------------------|
| L12.1 | <i>Pseudomonas libanensis</i> | 1,0 x 10 ⁹ |
| L12.2 | <i>Pseudomonas libanensis</i> | 1,0 x 10 ⁹ |
| L12.3 | <i>Pseudomonas libanensis</i> | 3,0 x 10 ⁹ |
| L23.1 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 1,7 x 10 ¹⁰ |
| L23.2 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 1,0 x 10 ¹¹ |
| L23.3 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 9,0 x 10 ⁹ |
| L23.4 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 7,0 x 10 ¹⁰ |
| L21.1 | <i>Pseudomonas tolaasii</i> | 1,9 x 10 ¹¹ |
| L21.2 | <i>Pseudomonas tolaasii</i> | 1,0 x 10 ¹⁰ |
| L21.3 | <i>Pseudomonas tolaasii</i> | 5,0 x 10 ¹⁰ |
| Ö62.1 | <i>Pseudomonas libanensis</i> | 4,0 x 10 ¹⁰ |
| Ö62.2 | <i>Pseudomonas libanensis</i> | 3,0 x 10 ¹⁰ |
| Ö62.3 | <i>Pseudomonas libanensis</i> | 5,0 x 10 ⁹ |
| P41.1 | <i>Pseudomonas gessardii</i> | 6,0 x 10 ⁹ |
| P41.2 | <i>Pseudomonas gessardii</i> | 2,0 x 10 ¹⁰ |
| P41.3 | <i>Pseudomonas gessardii</i> | 1,0 x 10 ¹⁰ |
| A11.1 | <i>Pseudomonas rhodesiae</i> | 2,0 x 10 ¹⁰ |
| A11.2 | <i>Pseudomonas rhodesiae</i> | 1,3 x 10 ¹¹ |
| A11.3 | <i>Pseudomonas rhodesiae</i> | 3,0 x 10 ¹⁰ |
| A11.4 | <i>Pseudomonas rhodesiae</i> | 1,0 x 10 ⁹ |
| A11.5 | <i>Pseudomonas rhodesiae</i> | 7,0 x 10 ⁹ |
| A11.6 | <i>Pseudomonas rhodesiae</i> | 7,0 x 10 ⁹ |
| A11.7 | <i>Pseudomonas rhodesiae</i> | 1,5 x 10 ¹⁰ |
| A11.8 | <i>Pseudomonas rhodesiae</i> | 5,0 x 10 ¹⁰ |
| P22.1 | <i>Pseudomonas tolaasii</i> | 1,0 x 10 ¹⁰ |
| P22.2 | <i>Pseudomonas tolaasii</i> | 1,0 x 10 ¹⁰ |
| P22.3 | <i>Pseudomonas tolaasii</i> | 1,0 x 10 ¹⁰ |

4.2.2. Konakçı Skalası ve Plak Etkinliği Değerlerinin Belirlenmesi

Zenginleştirme ve titre belirleme aşamaları tamamlanan bakteriyofajlar, çalışma kapsamında kullanılan diğer suşlarla karşılaştırılmış konakçı skalaları belirlenmiştir.

Denemeler sonucunda liziz oluşumları gözlemlenmiş ve çalışılan bakteriyofajların çalışılan diğer bakteriler üzerine etki gösterip göstermediği saptanmıştır. Bakteriyofaj plakları, bu aşamada elde edilecek sonuçlara göre liziz görülmemesi ve berrak ya da bulanık özellikte plak görülmesine göre sınıflandırılmıştır.



Şekil 4.19. Bakteriyofajların konakçı skalası belirleme çalışmalarından örnekler

Çalışma kapsamında kullanılan bakteriyofajların konakçı skalaları aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 4.10. *P. fluorescens* bakteriyofajların konakçı skalası

| Fajlar | Bakteri suşları | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| | L1.2 | L2.1 | L2.3 | A1.1 | P2.2 | P4.1 | Ö6.2 | Ö3.1 | Ö1.5 | Ç2.3 | PP ^a | PF ^b | PA ^c | PFG ^d |
| L12.1 | 6 | 6 | 5 | - | 4 | - | - | - | - | - | - | 5 | - | - |
| L12.2 | 5 | 6 | 5 | - | 4 | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - |
| L12.3 | 5 | 4 | 4 | - | 2 | - | 1 | - | - | - | - | 3 | - | 3 |
| L23.1 | 5 | 6 | 6 | 6 | 4 | - | - | 6 | - | - | - | - | - | - |
| L23.2 | 5 | 6 | 6 | 6 | 4 | - | - | 6 | - | - | - | - | - | - |
| L23.3 | 5 | 6 | 6 | 5 | 6 | - | - | 5 | - | - | - | - | - | - |
| L23.4 | 5 | 6 | 6 | 6 | 5 | - | - | 5 | - | - | - | - | - | - |
| L21.1 | 5 | 6 | 5 | 6 | 4 | - | 3 | - | - | - | - | - | - | - |
| L21.2 | 5 | 6 | 5 | 2 | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L21.3 | 5 | 6 | 5 | 1 | 5 | - | 2 | - | - | - | 2 | - | - | - |
| Ö62.1 | - | - | - | - | 2 | - | 5 | - | - | - | - | 5 | - | - |
| Ö62.2 | - | - | - | - | 1 | - | 5 | - | - | - | - | 2 | - | - |
| Ö62.3 | - | - | - | - | 2 | - | 6 | - | - | - | - | - | - | - |
| P41.1 | - | - | - | - | 2 | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| P41.2 | - | - | - | - | - | 4 | - | - | - | - | - | 5 | - | - |
| P41.3 | - | - | - | - | - | 4 | - | - | - | - | 5 | - | - | - |
| A11.1 | 5 | 5 | 6 | 6 | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| A11.2 | 5 | 2 | 5 | 6 | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| A11.3 | 5 | 6 | 5 | 6 | 5 | - | 3 | 3 | - | - | - | - | - | - |
| A11.4 | 1 | 4 | 1 | 6 | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| A11.5 | - | - | - | 6 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| A116 | 5 | 4 | 6 | 6 | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| A11.7 | 2 | 2 | 2 | 6 | 4 | - | 5 | - | - | - | 5 | 5 | - | - |
| A11.8 | 5 | 5 | 6 | 6 | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| P22.1 | 5 | 3 | 6 | 2 | 6 | - | - | 4 | - | - | - | - | - | - |
| P22.2 | 5 | 1 | 6 | 1 | 4 | - | - | 4 | - | - | - | - | - | - |
| P22.3 | 3 | 1 | 4 | 6 | 4 | - | - | - | - | - | 4 | 6 | - | - |
| PF1. | 5 | 5 | 5 | - | 5 | - | - | - | - | - | - | 6 | - | - |
| PF2.1 | - | - | - | - | 5 | - | - | - | - | - | - | 6 | - | - |
| PP.1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 6 | 1 | - | - |
| PFG.2 | - | 2 | 1 | - | 2 | 1 | - | - | - | - | 3 | 1 | - | 5 |

- : Litik etki yok, 1 : Bulanık zon üstü birkaç plak, 2 : Bulanık zon, 3 : Tek tek düşmüş berrak plaklar, 4 : Berrak zon, üzerinde yoğun koloni, 5 : Berrak zon, üzerinde az sayıda koloni, 6 : Tamamen berrak zon, ^a: *Pseudomonas putida*, ^{**b}: *Pseudomonas fluorescens*, ^c: *Pseudomonas aeruginosa*, ^d: *Pseudomonas fragi*

Çalışma kapsamında ayrıca, uygulamada kullanılacak bakteriyofajların farklı cinsler üzerindeki litik aktiviteleri de test edilmiştir. Bu denemelerin sonuçları çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Pseudomonas bakteriyofajlarının farklı cinsler üzerindeki litik aktiviteleri

| Bakteri suşları | Fajlar | | |
|----------------------------------------------------------------|--------|-------|-------|
| | L23.2 | P22.1 | L12.3 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | - | - | - |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC BAA-1045 | - | - | - |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC BAA-190 | - | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> K12 | - | - | - |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> 231S | - | - | - |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 231L | - | - | - |
| <i>Lactobacillus brevis</i> | - | - | - |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | - | - | - |

-: liziz yok.

Konakçı skalası çalışmaları sonucunda, izole edilen bakteriyofajların konakçı özgülüğünün yüksek olduğu, büyük çoğunluğunun kendi konakçı suşu dışında diğer *Pseudomonas* türlerine karşı litik aktivite göstermediği ya da çok zayıf litik aktivite gösterdiği, bunun yanında farklı suşlarda da litik aktivitenin değişebildiği saptamıştır. Nascimento ve arkadaşlarının benzer bir çalışmasında, izole edilen yedi *P. fluorescens* bakteriyofajının tümü, test edilen dokuz cinsin 23 bakteri suşu arasında yalnızca konakçı bakteriyi veya az sayıda *Pseudomonas* suşunu enfekte ettiği belirtilmiştir. Bu bakteriyofajlar da son derece spesifik bakteriyofajlar olarak öne çıkmaktadır [40]. Sillankorva ve arkadaşlarının çalışmasında ise φIBB-PF7A bakteriyofajının yalnızca *P. fluorescens* suşlarına etkili olduğu ve diğer *Pseudomonas* türlerine karşı litik aktivite göstermediği saptanmıştır [108]. Sun ve arkadaşlarının çalışmasında KSL-1 bakteriyofajının yalnızca kendi konakçı suşunda litik aktivite gösterdiği, diğer *P. fluorescens* suşları olan A46 ve AR4’e karşı bile litik aktivite göstermediği belirtilmiştir. Genel itibariyle literatürdeki *P. fluorescens* bakteriyofajları yüksek spesifiteleri ile öne çıkmaktadır. Tüm bu bilgiler ışığında, tez kapsamında izole edilmiş olan *P. fluorescens*

grubu bakteriyofajların konakçı skalasının literatür ile uyum sağladığı görülmüştür [169]. Bakteriyofaj terapi çalışmalarında konakçı skalası geniş bakteriyofajlar tercih edilmektedir. Literatür incelendiğinde de bu grupta bulunan bakteriyofajların son derece spesifik karakterde bir litik etkiye sahip olduğu görülmüştür. Eliminasyon amacıyla kullanılacak nihai bakteriyofaj ürünü bir bakteriyofaj kokteyli olacağından, esas hedef olan çiğ sütte sorun yaratan grupların yeterli kısmını hedefleyen bir ürün elde edilebilecektir. Üstelik bu bakteriyofaj kokteyline *P. putida* ve *P. fragi* bakteriyofajlarının da katılmasıyla etki alanı genişletilebilecektir. Bir diğer bakış açısıyla, hedeflenen mikroorganizma grubu dışında çok sayıda tür ve cinse etki edecek bakteriyofajların sütte istenmeyen değişimlere de sebep olarak organoleptik özellikle etki etme riski bulunabileceğinden, bakteriyofaj spesifikliğı dezavantaj olmaktan çıkmaktadır.

Bakteriyofajların konakçı özgülüklerinin belirlenmesinde plak etkinliğı değerleri de sıklıkla kullanılmaktadır. Böylece konakçı spektrumları daha nesnel sonuçlarla açıklanabilmektedir. Çalışma kapsamında kullanılan bakteriyofajların, ilgili konakçı bakteriler üzerinde verdikleri plak etkinliğı değerleri aşağıdaki çizelgede sunulmuştur.

Çizelge 4.12. *P. fluorescens* bakteriyofajların plak etkinliği değerleri

| Fajlar | Plak etkinliği değeri | | | | | | | | | |
|--------|-----------------------|------|------|--------|---------|------|---------|----------|----------|------|
| | L12 | L21 | L23 | P22 | A11 | P41 | Ö62 | PF | PP | PFR |
| L12.1 | 1,00 | 0,01 | 0,50 | 0,0005 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,000005 | 0,00 | 0,00 |
| L12.2 | 1,00 | 0,20 | 1,00 | 0,12 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| L12.3 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,80 | 0,00 | 0,00 | 0,00001 | 0,60 | 0,00 | 0,05 |
| L21.1 | 3,00 | 1,00 | 2,00 | 2,00 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| L21.2 | 1,00 | 1,00 | 0,05 | 0,45 | 0,00001 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| L21.3 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,000001 | 0,00 |
| L23.1 | 1,00 | 0,08 | 1,00 | 0,20 | 0,0002 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| L23.2 | 0,50 | 0,01 | 1,00 | 1,00 | 0,00005 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| L23.3 | 1,00 | 0,20 | 1,00 | 1,00 | 0,30 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| P41.1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,0005 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

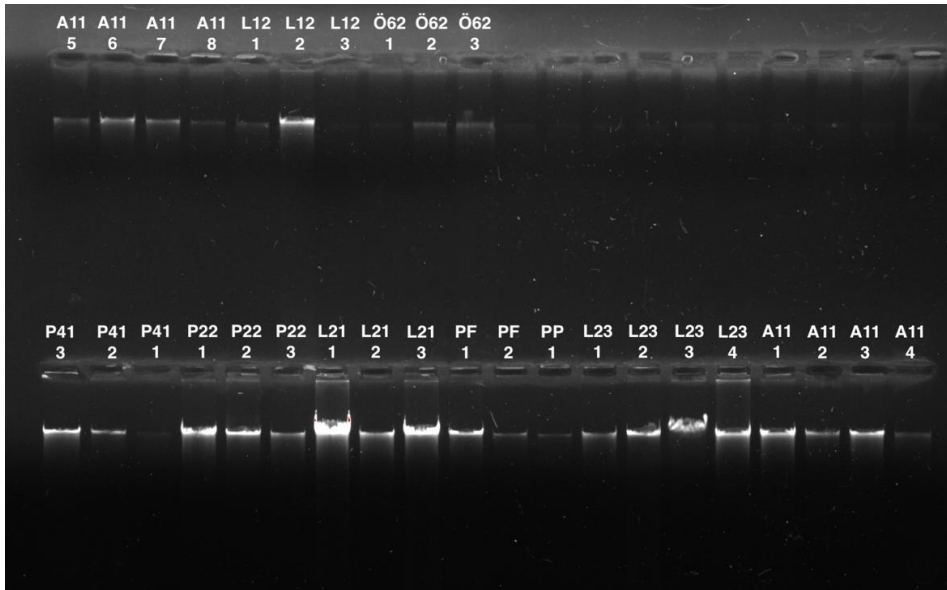
| Fajlar | Plak etkinliği değeri | | | | | | | | | |
|--------|-----------------------|----------|----------|---------|--------|------|------|--------|------|------|
| | L12 | L21 | L23 | P22 | A11 | P41 | Ö62 | PF | PP | PFR |
| P41.2 | 0,001 | 0,0001 | 0,001 | 0.0006 | 0,0001 | 1,00 | 0,00 | 0.0001 | 0,00 | 0,00 |
| P41.3 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 5,00 | 0,01 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 5,00 | 0,00 |
| P22.1 | 0,0025 | 0,0025 | 0,0025 | 1,00 | 0,0025 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| P22.2 | 0,75 | 0,10 | 0,75 | 1,00 | 0,40 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| P22.3 | 0,000025 | 0.000025 | 0,000025 | 1,00 | 0,0025 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| A11.1 | 0,00002 | 0.00002 | 0,002 | 0,00002 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| A11.2 | 0,0001 | 0.0001 | 0,0001 | 0,0001 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| A11.4 | 0,00002 | 0.00002 | 0,00002 | 0,050 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| A11.5 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,20 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| A11.6 | 0,00001 | 0,00001 | 0,00001 | 0,03 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| A11.8 | 0,00002 | 0,00002 | 0,00002 | 0,00002 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| PF1.1 | 0,03 | 0,0001 | 0,03 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,00 | 0,00 | 0,00 |
| PF2.1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,00 | 0,00 | 0,00 |
| PP1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,03 | 1,00 | 0,00 |

Plak etkinliği değeri 0,5 ve üzerinde olduğunda bakteriyofajın etkinliği “yüksek etkinlik”, 0,5 ile 0,1 arasında ise “orta etkinlik”, 0,1 ile 0,001 arasında ise “düşük etkinlik” olarak tanımlanırken, bu değer 0,001'in altında ise etkisiz olarak kabul edilmektedir [107]. Bu sonuçlara göre P41.3 bakteriyofajı, 6 konakçı üzerinde yüksek etkinlik gösterirken, L12.3 bakteriyofajı 5 ve L21.1 bakteriyofajı 4 konakçı üzerinde yüksek etkinlik göstermiştir. Bakteriyofajların etkinliklerinin *Pseudomonas fluorescens* kompleks suşları arasındaki etkinlik değerleri daha yüksekken, *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas fragi* üzerindeki etkinlik değerleri daha düşük çıkmıştır.

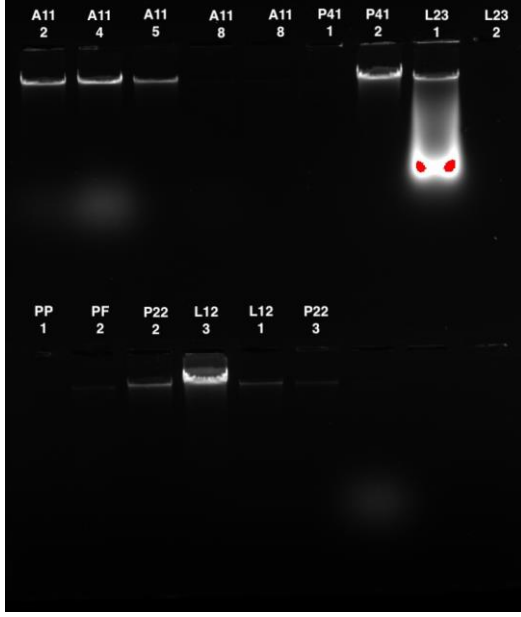
4.2.3. RFLP Analizleri

Bu aşamada çalışma kapsamında izole edilerek saflaştırılmış olan, titresi ve aktivitesi itibariyle bir sonraki aşamaya geçmeye uygun bakteriyofajların DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'ların saflık ve konsantrasyon kontrolleri ile kesime alınacak DNA'ların miktarının belirlenmesi amacıyla yatay elektroforezde yürütülmüştür. Böylece kesime alınacak DNA'ların yoğunluk ve saflıklarıyla ilgili daha detaylı bilgi edilebilmiş, kesime alınacak miktarlara bunlara göre karar verilebilmiştir. Jel görüntüleri, jel görüntüleme sistemi kullanılarak elde edilmiştir.

P. fluorescens bakteriyofajlarının RFLP analizlerine ilişkin jel görüntüleri aşağıda paylaşılmıştır.

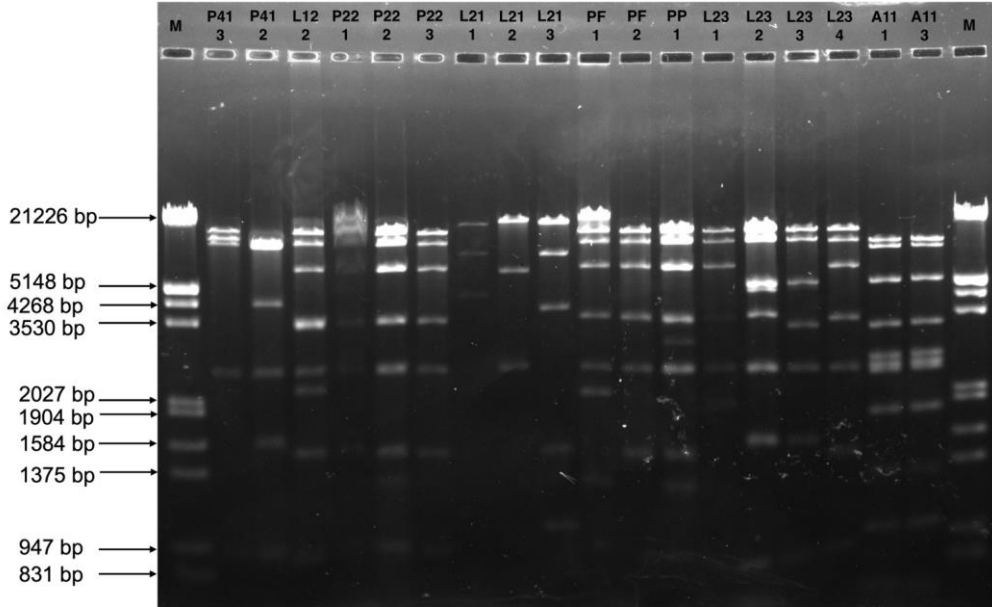


Şekil 4.20. Bakteriyofaj DNA'larının yatay elektroforez görüntüleri



Şekil 4.21. *P. fluorescens* bakteriyofaj DNA'larının yatay elektroforez görüntüleri

Kesimi tamamlanan bakteriyofaj DNA'larına ait jel görüntüleri aşağıda paylaşılmıştır.



Şekil 4.22. *P. fluorescens* bakteriyofaj DNA'larının *EcoRI* kesimine ait jel görüntüsü

Şekilde görüldüğü üzere bakteriyofaj DNA'larının *EcoRI* enzimiyle kesimi sonucu birbirinden farklı kesim profilleri gözlenmiştir. P41 konakçısının iki bakteriyofajı da birbirinden farklı kesim profili göstermiştir. P22.1, P22.2 ve P22.3 bakteriyofajları benzer bir kesim profili sergilerken aynı durum A11.1 ve A11.3 bakteriyofajlarında da

görülmüştür. L21 grubu bakteriyofajlar incelendiğinde L21.1 ve L21.3 bakteriyofajları benzer bir kesim profili gösterirken L21.2 bunlardan farklı bir profil sergilediği görülmüştür. Yeni izolatlardan olan PF.1 (*Pseudomonas fluorescens*), PF.2 (*Pseudomonas fragi*) ve PP.1 (*Pseudomonas putida*) bakteriyofajlarına bakıldığında ise bu üç bakteriyofajın da birbirinden farklı kesim profili gösterdiği görülmüştür. L23.1 ve L23.4 bakteriyofajları ile L23.2 ve L23.3 bakteriyofajları da birbiriyle benzer bir kesim profili göstermiştir.

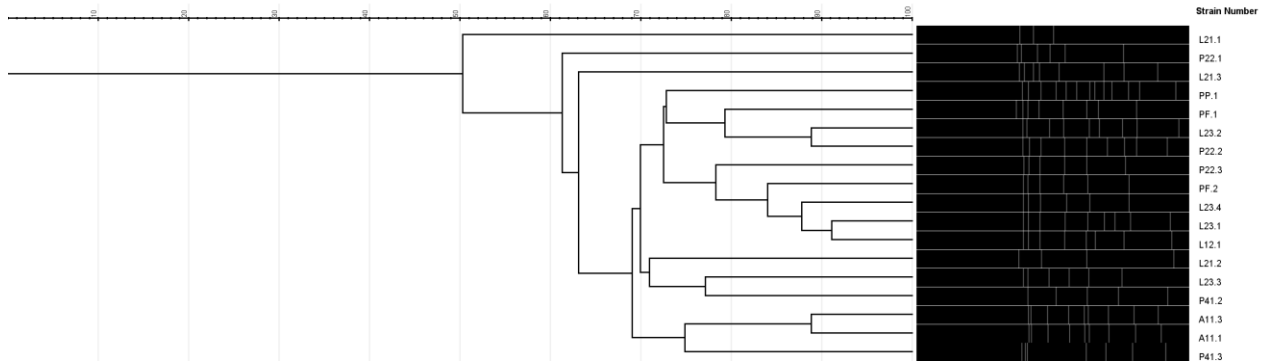
Çizelge 4.13. P41, L12, P22 ve L21 bakteriyofajlarının DNA'larının EcoRI kesim sonucuna göre hesaplanan fragment boyutları ve toplam boyutları

| Bant No | Fragment boyutları (bp) | | | | | | | | | |
|------------|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Marker | P41.3 | P41.2 | L12.1 | P22.1 | P22.2 | P22.3 | L21.1 | L21.2 | L21.3 |
| 1 | 21.226 | 15.927 | 12.307 | 14.925 | 19.394 | 15.251 | 14.606 | 17.379 | 18.157 | 17.763 |
| 2 | 5.148 | 13.693 | 4.155 | 12.049 | 16.278 | 11.550 | 11.796 | 9.772 | 7.077 | 14.295 |
| 3 | 4.268 | 12.571 | 1.856 | 7.509 | 8.299 | 7.218 | 7.509 | 4.528 | 1.873 | 9.772 |
| 4 | 3.530 | 1.890 | 1.320 | 3.168 | 5.130 | 3.168 | 3.168 | - | 1.171 | 7.659 |
| 5 | 2.027 | 1.450 | 1.175 | 1.890 | 3.121 | 1.873 | 1.873 | - | - | 3.761 |
| 6 | 1.904 | 1.242 | - | 1.637 | 1.286 | 1.430 | 1.275 | - | - | 1.479 |
| 7 | 1.584 | 1.176 | - | 1.283 | - | 1.280 | - | - | - | 1.283 |
| 8 | 1.375 | - | - | 1.172 | - | 1.228 | - | - | - | 1.184 |
| 9 | 947 | - | - | - | - | 1.175 | - | - | - | - |
| 10 | 831 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | 564 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TOPLAM | 43.404 | 47.950 | 20.812 | 43.632 | 53.508 | 44.173 | 40.226 | 31.679 | 28.277 | 57.197 |

Çizelge 4.14. PF1, PF2, PP, L23 ve A11 bakteriyofajlarının DNA'larının *EcoRI* kesim sonucuna göre hesaplanan fragment boyutları ve toplam boyutları

| Bant No | Fragment boyutları (bp) | | | | | | | | | |
|---------|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Marker | PF1 | PF2 | PP1 | L23.1 | L23.2 | L23.3 | L23.4 | A11.1 | A11.3 |
| 1 | 21.226 | 20.269 | 14.925 | 15.585 | 14.925 | 15.251 | 14.925 | 14.925 | 11.796 | 12.049 |
| 2 | 5.148 | 15.251 | 12.307 | 12.049 | 12.049 | 12.842 | 12.307 | 12.049 | 10.620 | 10.844 |
| 3 | 4.268 | 12.307 | 7.509 | 7.218 | 7.509 | 5.224 | 5.321 | 7.361 | 5.521 | 5.624 |
| 4 | 3.530 | 7.814 | 3.265 | 4.155 | 3.121 | 3.265 | 2.785 | 2.988 | 2.747 | 2.824 |
| 5 | 2.027 | 3.315 | 1.840 | 3.031 | 1.840 | 1.793 | 1.808 | 1.779 | 1.943 | 1.962 |
| 6 | 1.904 | 1.873 | 1.257 | 2.302 | 1.472 | 1.555 | 1.296 | 1.257 | 1.793 | 1.824 |
| 7 | 1.584 | 1.574 | - | 1.779 | 1.349 | 1.293 | - | - | 1.412 | 1.418 |
| 8 | 1.375 | 1.228 | - | 1.648 | 1.250 | 1.226 | - | - | 1.231 | 1.236 |
| 9 | 947 | - | - | 1.479 | 1.173 | 1.168 | - | - | 1.180 | 1.184 |
| 10 | 831 | - | - | 1.378 | - | - | - | - | - | - |
| 11 | 564 | - | - | 1.259 | - | - | - | - | - | - |
| TOPLAM | 43.404 | 63.630 | 41.102 | 51.883 | 44.688 | 43.617 | 38.442 | 40.358 | 38.243 | 38.964 |

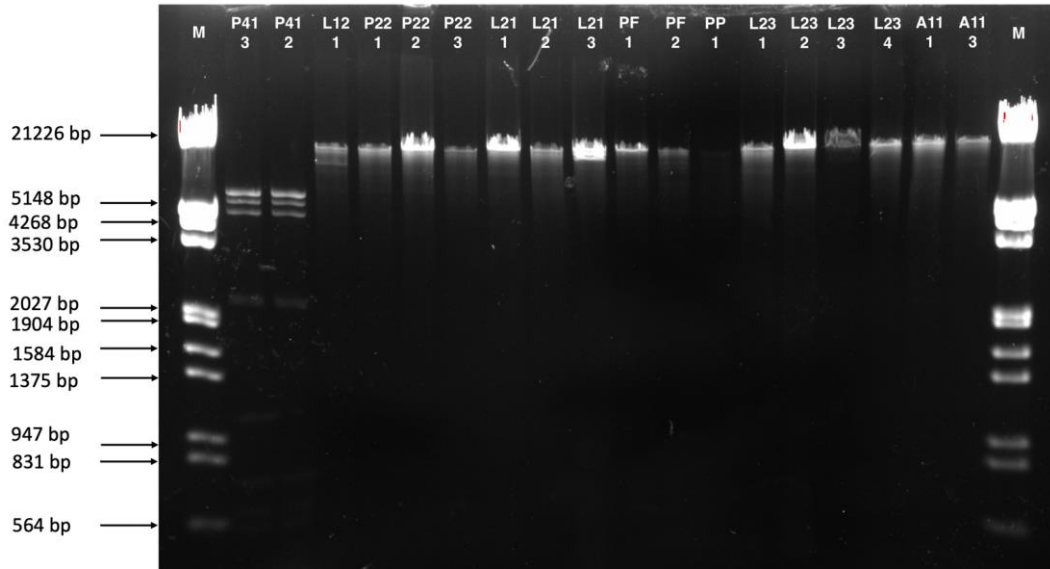
Bakteriyofajların tahmini genom büyüklüklerinin hesaplanmasını takiben, aralarındaki filogenetik ilişkilerin ortaya konulabilmesi amacıyla dendrogramları çıkarılmıştır. Dendrogramları oluşturmak için GelJ v.2.0 yazılımı kullanılmıştır. Dendrogramlar Dice katsayısı 1 olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve kümeleme için aritmetik ortalamalı ağırlıksız çift grup yöntemi (UPGMA) kullanılmıştır.



Şekil 4.23. *P. fluorescens* bakteriyofajlarının *EcoRI* kesimine göre oluşturulmuş filogenetik ilişkilerini gösteren dendrogram

Kesim profillerinden ve dendrogramdan elde edilen sonuçlara göre, izole edilen bakteriyofajların neredeyse tamamının birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir. Aynı konakçı ile aynı örnekten izole edilen bakteriyofajlarda bile farklılık görülmüştür. Bu sonuçlar, EK1'deki çizelgede verilen benzerlik indeksleri ile de daha net bir şekilde izlenebilmektedir. Bu tabloya göre, bakteriyofajların büyük kısmının benzerlik indeksleri 0,5 ve altındayken en yüksek benzerlik oranı % 82 ile L23.1 ve L12.1 bakteriyofajları arasında görülürken, L23.2 ve P22.2 bakteriyofajları arasında % 78'lik bir benzerlik görülmüştür.

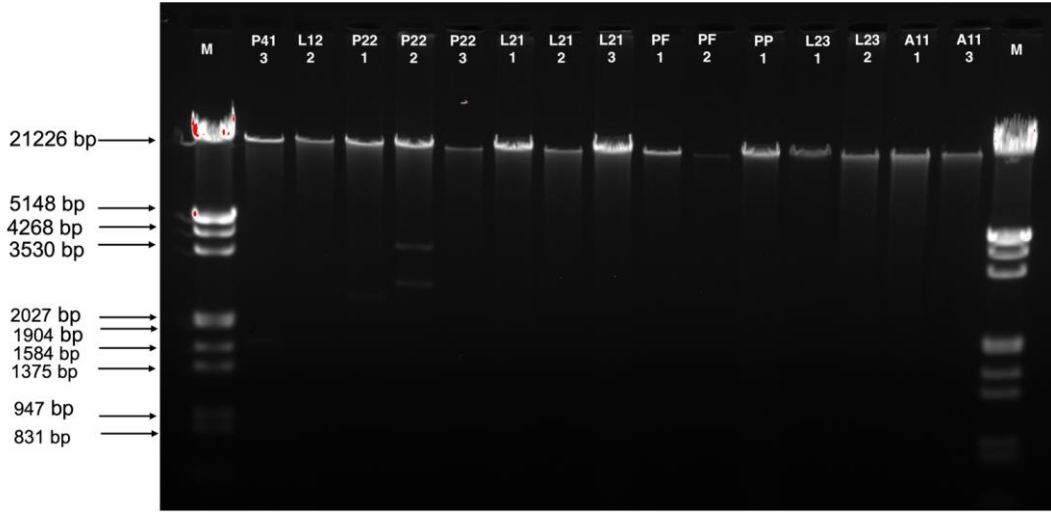
Bakteriyofaj DNA'larının *EcoRV* kesimine ait jel görüntüsü aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.24. *P. fluorescens* bakteriyofaj DNA'larının *EcoRV* kesimine ait jel görüntüsü

Şekilde görüldüğü üzere, 18 adet bakteriyofaj *EcoRV* enzime kesime alınmıştır. Yapılan analiz sonrasında bu bakteriyofajlardan yalnızca P41.3 ve P41.2'de bu enzimin kesim bölgesi olduğu saptanmıştır. Bu iki bakteriyofaj da *EcoRV* için benzer bir kesim profili göstermiştir.

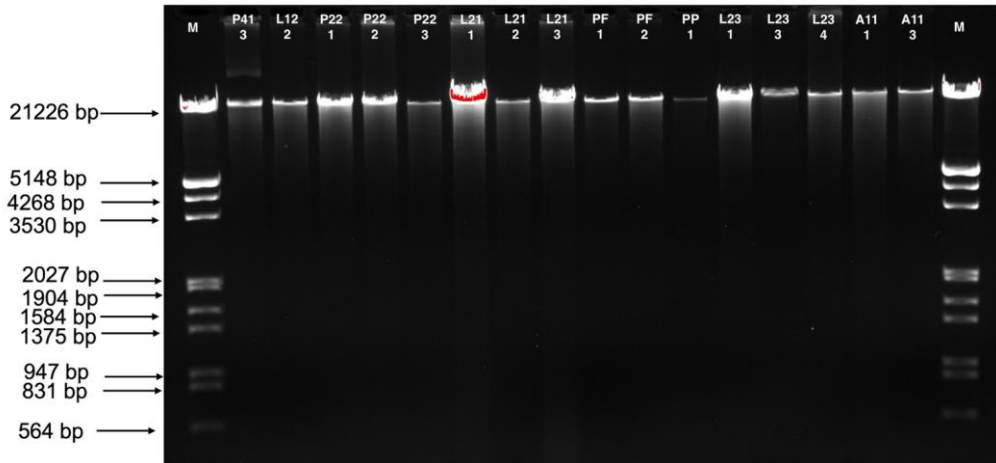
Bakteriyofaj DNA'larının *KpnI* kesimine ait jel görüntüsü aşağıdaki şekilde verilmiştir.



Şekil 4.25. *P. fluorescens* bakteriyofaj DNA'larının *KpnI* kesimine ait jel görüntüsü

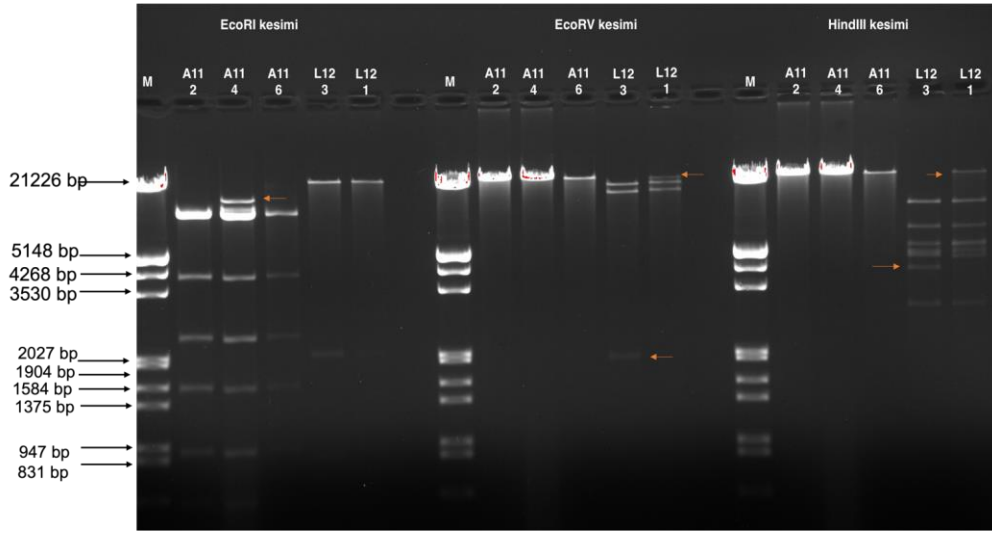
Bakteriyofaj DNA'larının *KpnI* kesimine ait görüntüler incelendiğinde, kesim yapılan bakteriyofajlardan yalnızca P22.1 ve P22.2'de bu enzimin kesim bölgesi olduğu görülmüştür. Bu iki bakteriyofajın kesim profili farklılık göstermiştir.

Bakteriyofajların *XbaI* kesimine ait jel görüntüsü aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.26. *P. fluorescens* bakteriyofaj DNA'larının *XbaI* kesimine ait jel görüntüsü

Bakteriyofaj DNA'larının *XbaI* kesimine ait görüntüler incelendiğinde, kesim yapılan hiçbir bakteriyofajda bu enzimin kesim bölgesinin bulunmadığı görülmüştür.



Şekil 4.27. *P. fluorescens* bakteriyofaj DNA'larının *EcoRI*, *EcoRV* ve *HindIII* kesimlerine ait jel görüntüsü

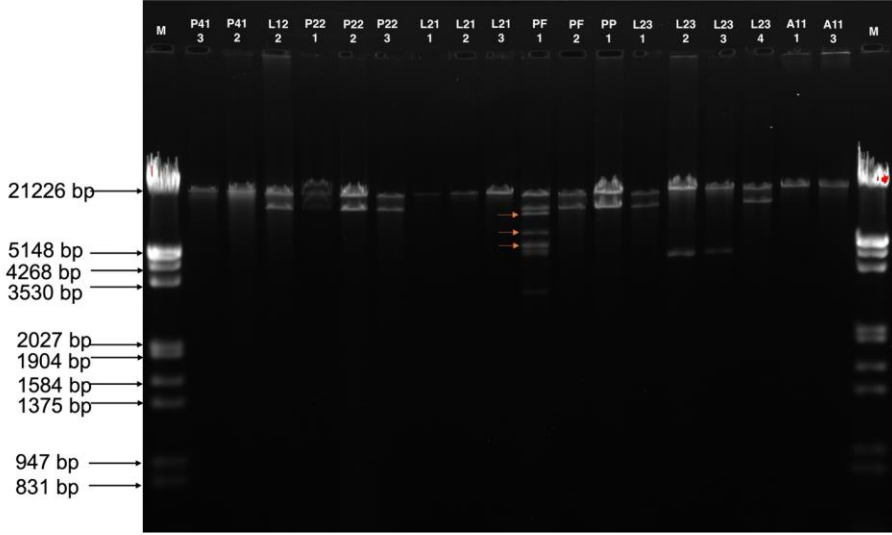
A11.2, A11.4, A11.6, L12.3 ve L12.2 bakteriyofajlarıyla yapılan *EcoRI*, *EcoRV* ve *HindIII* kesimleri sonucunda A11.2 ve A11.6 bakteriyofajlarının *EcoRI* kesimlerinin benzer profil gösterdiği ve her üç A11 bakteriyofajının da *EcoRV* ile *HindIII* enzimlerinin kesim bölgelerini taşımadığı saptanmıştır. L12.1 ve L12.3 bakteriyofajları ise hem *EcoRV* hem de *HindIII* kesim profilleri açısından farklılık göstermiştir. Kesim bölgelerinin görülmesini takiben bu jeller incelenerek bakteriyofajların öngörülen toplam genom büyüklükleri hesaplanmıştır. Fragment boyuları ve toplam boyutlar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 4.15. A11.2, A11.4 ve A11.6 bakteriyofaj DNA'larının *EcoRI* kesim sonucuna göre hesaplanan fragment boyutları ve toplam boyutları

| Bant No | Fragment boyutları (bp) | | | |
|---------|-------------------------|--------|--------|--------|
| | Marker | A11.2 | A11.4 | A11.6 |
| 1 | 21.226 | 12.686 | 16.166 | 12.686 |
| 2 | 5.148 | 4.278 | 12.542 | 4.317 |
| 3 | 4.268 | 2.035 | 4.162 | 2.436 |
| 4 | 3.530 | 1.469 | 2.230 | 1.583 |
| 5 | 2.027 | - | 2.003 | - |
| 6 | 1.904 | - | 1.605 | - |
| 7 | 1.584 | - | 1.454 | - |
| 8 | 1.375 | - | - | - |
| 9 | 947 | - | - | - |
| 10 | 831 | - | - | - |
| 11 | 564 | - | - | - |
| TOPLAM | 43.404 | 20.469 | 40.163 | 21.023 |

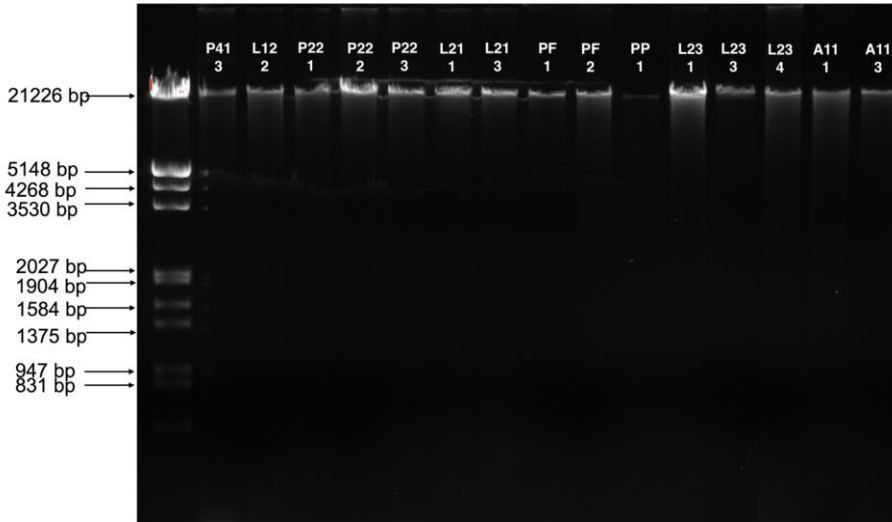
Çizelge 4.16. L12.3 ve L12.1 bakteriyofaj DNA'larının *EcoRV* kesim sonucuna göre hesaplanan fragment boyutları ve toplam boyutları

| Bant No | Fragment boyutları (bp) | | |
|---------|-------------------------|--------|--------|
| | Marker | L12.3 | L12.1 |
| 1 | 21.226 | 19.738 | 22.223 |
| 2 | 5.148 | 17.545 | 20.695 |
| 3 | 4.268 | - | 18.174 |
| 4 | 3.530 | - | - |
| 5 | 2.027 | - | - |
| 6 | 1.904 | - | - |
| 7 | 1.584 | - | - |
| 8 | 1.375 | - | - |
| 9 | 947 | - | - |
| 10 | 831 | - | - |
| 11 | 564 | - | - |
| TOPLAM | 43.404 | 37.283 | 61.092 |



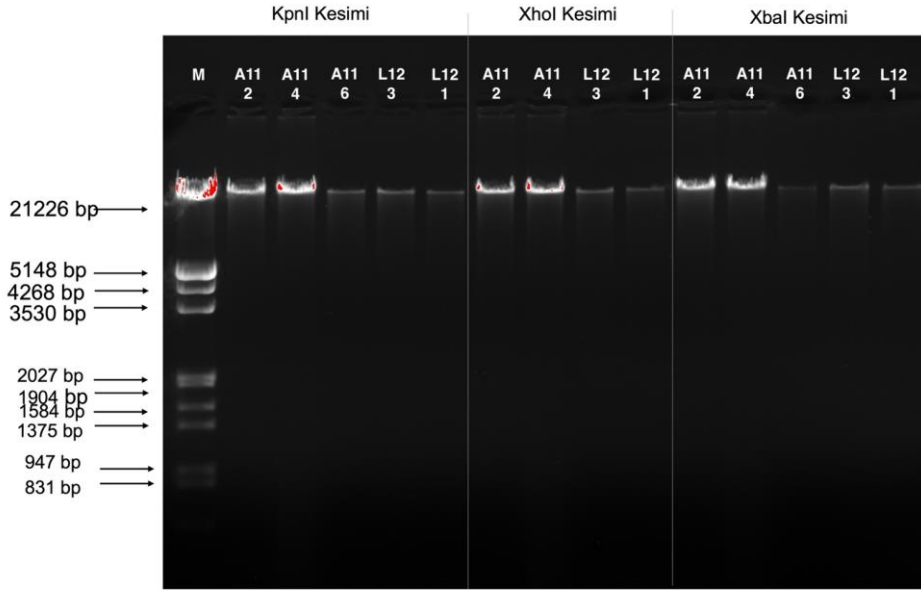
Şekil 4.28. *P. fluorescens* bakteriyofaj DNA'larının *Hind*III kesimine ait jel görüntüsü

*Hind*III kesimleri incelendiğinde, P41, L21 ve A11 grup bakteriyofajlarında bu enzimin kesim bölgesinin bulunmadığı saptanmıştır. Kesim bölgesi bulunan bakteriyofajlar arasında ise L12, P22 grup bakteriyofajları ile PF.2, PP.1, L23.1, ve L23.4 bakteriyofajları benzer kesim profili göstermiştir. L23.2 ve L23.3 bakteriyofajları aynı kesim profilini gösterirken PF.1 bakteriyofajı diğer hepsinden farklı bir kesim profili göstermiştir.



Şekil 4.29. *P. fluorescens* bakteriyofaj DNA'larının *Xho*I kesimine ait jel görüntüsü

Bakteriyofaj DNA'larının *Xho*I kesimine ait görüntüler incelendiğinde, kesim yapılan hiçbir bakteriyofajda bu enzimin kesim bölgesinin bulunmadığı görülmüştür.



Şekil 4.30. *P. fluorescens* bakteriyofaj DNA'larının *KpnI*, *XhoI* ve *XbaI* kesimlerine ait jel görüntüsü

Bakteriyofaj DNA'larının *KpnI*, *XhoI* ve *XbaI* kesimine ait görüntüler incelendiğinde, kesim yapılan hiçbir bakteriyofajda bu enzimin kesim bölgesinin bulunmadığı görülmüştür.

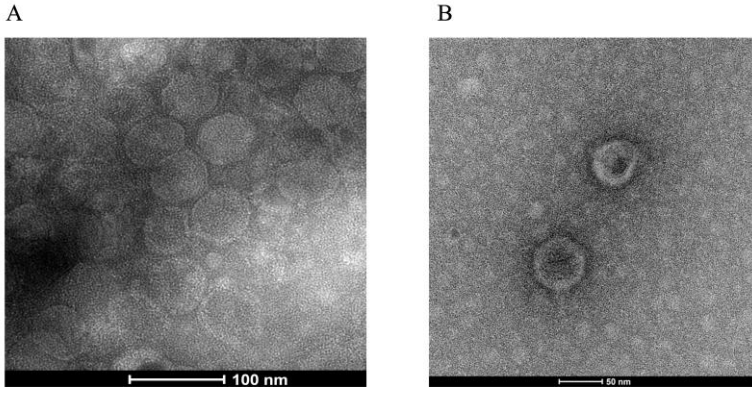
Tüm bu kesimler, jel görüntülemeleri ve fragment analizleri sonucunda, bakteriyofajlar klasifiye edilerek aralarındaki farklılıklar net bir şekilde ortaya konulabilmiştir. Buna ek olarak bakteriyofajların tahmini genom büyüklükleri de hesaplanmıştır.

Kesim profillerinin incelenmesi sonucunda, analize alınan bakteriyofajların neredeyse tamamının birbirinden farklı bakteriyofajlar olduğu saptanmıştır. Bakteriyofaj DNA'larının *EcoRI* enzimi ile kesimi sağlanabilmişken, 4 bakteriyofaj hariç hiçbir bakteriyofajda *EcoRV* enziminin kesim bölgesinin bulunmadığı saptanmıştır. Bakteriyofajlardan yalnızca 1 tanesi *KpnI* enzimiyle kesilebilirken benzer şekilde *HindIII* enzimiyle de sınırlı sayıda kesim yapılabilmektedir. Bunlara ek olarak hiçbir bakteriyofajda *XbaI* enziminin kesim bölgesinin bulunmadığı saptanmıştır. Literatürde, Radhakrishnan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada atık su örneklerinden *P. fluorescens* bakteriyofajları izole edilmiştir. İzole edilen bakteriyofajları *EcoRI*, *HindIII*, *NheI*, *KpnI* ve *AluI* olacak şekilde beş farklı enzim ile kesilmiş, bu enzimler arasından *EcoRI*, *HindIII* enzimlerinin agaroz jelde temiz bir bant oluşturduğu bildirilmiştir. İzole edilen ve RFLP

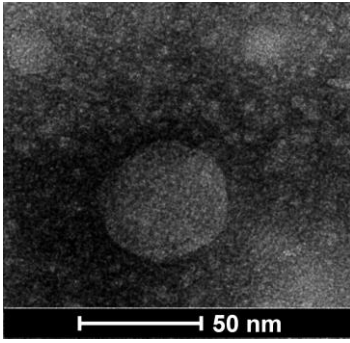
analizleri yapılan yedi bakteriyofajın genom uzunluklarının 26 ve 82 kbp arasında değiştiği bildirilmiştir [110]. Lopez ve arkadaşları kumeslerde sorun yaratan *Pseudomonas* suşlarına özęü bakteriyofaj izolasyonu yapmışlardır. Konakçı suş olarak *P. aeruginosa* (ATCC 25619) ve *P. fluorescens* (ATCC 13525) suşları kullanılarak 11 adet bakteriyofajın izolasyonu geręekleřtirilmiřtir. Bakteriyofajlar *HaeIII*, *HinfI* and *AluI* enzimleri kullanılarak kesilmiş ve agaroz jelde (% 1,5) yürütölmüştür. *HaeIII* enzimi beş bakteriyofajın birbirlerinden farklı olduğunu ortaya koymuştur [170]. Narlarda bakteriyel yanıklık hastalığına neden olan *Pseudomonas* spp. ile yapılan bir çalışmada *Pseudomonas* sp. SK 10 bakterisi izole edilmiş ve bu bakteriye karşı etkili olan bakteriyofajların izolasyonu geręekleřtirilmiřtir. Bakteriyofajlar *EcoRI* ve *HindIII* enzimleri ile kesilmiş ve agaroz jelde (% 0,5) yürütölmüştür. Bakteriyofajların genom boyutu moleköler ağırlık etiketleri ile belirlenmiştir. *PRϕL2* ve *SSϕL8* bakteriyofajlarının genom boyutu sırasıyla 25403 kb ve 29877 kb olarak belirlenmiştir. İki enzim ile kesim sonuçlarına göre iki bakteriyofajın genomik olarak birbirlerinden farklı olduklarının net bir şekilde görölebildiği bildirilmiştir [171]. Bir başka çalışmada izole edilen ve karakterizasyonları geręekleřtirilen *P. fluorescens* bakteriyofajlarının genom büyüklüklerinin 32 il3 45 kbp arasında değiştiği bildirilmiştir [40]. Bir diğer çalışmada izole edilen *Pseudomonas lactis* bakteriyofajlarının DNA'larının *XbaI* enzimi ile kesilmediği, buna karşılık *SpeI*, *NdeI*, ve *XhoI* ile kesilebildiği belirtilmiştir. Bu çalışmadaki bakteriyofajların genom büyüklükleri yaklaşık olarak 47 ve 49 kb olarak bulunmuştur [172]. Buna ek olarak, 2018 yılı itibariyle sekans bilgileri NCBI veritabanına girilmiş olan 150 *Pseudomonas fluorescens* bakteriyofajlarının genom büyüklüklerinin 3.573 bp ile 316.674 bp arasında değiştiği bildirilmiştir. Mevcut çalışmada kullanılan bakteriyofajların genom büyüklüklerinin ise yaklaşık olarak 20 kb ile 64 kb arasında değişkenlik gösterdiği saptanmıştır.

4.2.4. Morfolojik Karakterizasyon

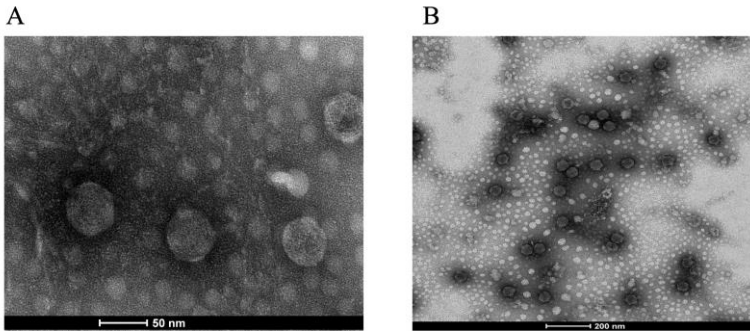
Bakteriyofaj karakterizasyonunda önemli bir aşama da bakteriyofajların morfolojik yapılarının ve kafa çapı, kuyruk uzunluğu gibi özelliklerinin yanında morfotiplerinin belirlenmesidir. *P. fluorescens* bakteriyofajlarının TEM mikrografları aşağıda verilmiştir.



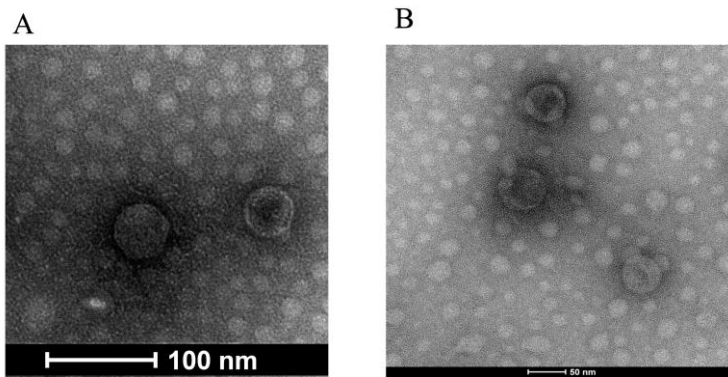
Şekil 4.31. L12.1 (A) ve L12.3 (B) bakteriyofajlarına ait TEM mikrografları



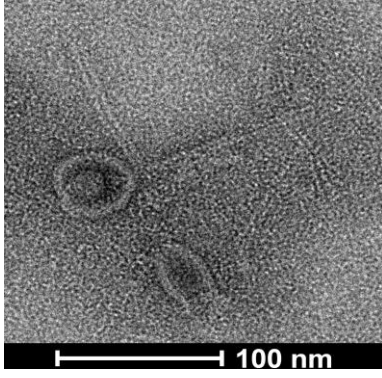
Şekil 4.32. L23.2 bakteriyofajına ait TEM mikrografi



Şekil 4.33. A11.1 (A) ve A11.5 (B) bakteriyofajlarına ait TEM mikrografi



Şekil 4.34. P22.1 (A) ve P22.2 (B) bakteriyofajlarına ait TEM mikrografları



Şekil 4.35 P41.1 bakteriyofajına ait TEM mikrografı

Bakteriyofajların TEM görüntülerinin alınmasının ardından, kafa çapı ve kuyruk uzunluğu gibi özelliklerinin belirlenmesi amacıyla ölçümler yapılmış, ayrıca mikrograflardan hareketle bakteriyofajların hangi morfolojik ailelere ait oldukları belirlenmiştir. Bakteriyofajların morfolojik özellikleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 4.17. *P. fluorescens* bakteriyofajlarının morfolojik özellikleri

| Bakteriyofajlar | Morfoloji | Kafa çapı (nm) | Kuyruk uzunluğu (nm) |
|-----------------|------------|------------------|----------------------|
| P41.1 | Siphovirus | $48,13 \pm 6,87$ | $108,51 \pm 9,52$ |
| P22.1 | Tectivirus | $50,01 \pm 2,27$ | - |
| P22.2 | Tectivirus | $54,19 \pm 3,08$ | - |
| L12.1 | Tectivirus | $56,76 \pm 5,84$ | - |
| A11.1 | Tectivirus | $47,44 \pm 2,70$ | - |
| A11.5 | Tectivirus | $59,42 \pm 2,99$ | - |
| L12.3 | Tectivirus | $58,81 \pm 3,35$ | - |
| L23.2 | Tectivirus | $48,48 \pm 4,26$ | - |

Bakteriyofaj karakterizasyonunda en yaygın kullanılan yöntemlerin birisi de TEM görüntülemesi yoluyla yapılan morfolojik karakterizasyondur. Mevcut çalışmada TEM görüntülemesi yapılan bakteriyofajların çoğunun tectivirus morfotipinde olduğu saptanmıştır. Bu bakteriyofajların kafa çaplarının 47,44 ile 59,42 nm arasında değiştiği görülmüştür. Ayrıca incelenen bakteriyofajlardan birinin de siphovirus yapısında olduğu belirlenmiştir. Bu bakteriyofajın ortalama kafa çapı 48,13 nm ölçülürken kuyruk uzunluğu ortalama 108,51 nm olarak ölçülmüştür. Literatürdeki *P. fluorescens* bakteriyofajları da farklı morfolojik özellikler göstermektedir. Sillankorva ve arkadaşlarının çalışmasında izole edilmiş olan *P. fluorescens* bakteriyofajının *Podoviridae* ailesine ait olduğu belirtilmiş olup bu bakteriyofajda da uzun kuyruk yapısı gözlenmemiştir [108] Nascimento ve arkadaşlarının çalışmasında da benzer şekilde UFJF_PfSW6 ve UFJF_PfDIW6 bakteriyofajlarının *Podoviridae* ailesine ait olduğu saptanmıştır. Buna karşın, Sun ve arkadaşlarının çalışmasında izole edilmiş olan bakteriyofajın siphovirus morfotipinde ve yaklaşık 103 nm uzunluğunda bir kuyruğa sahip olduğu belirtilmiştir [169].

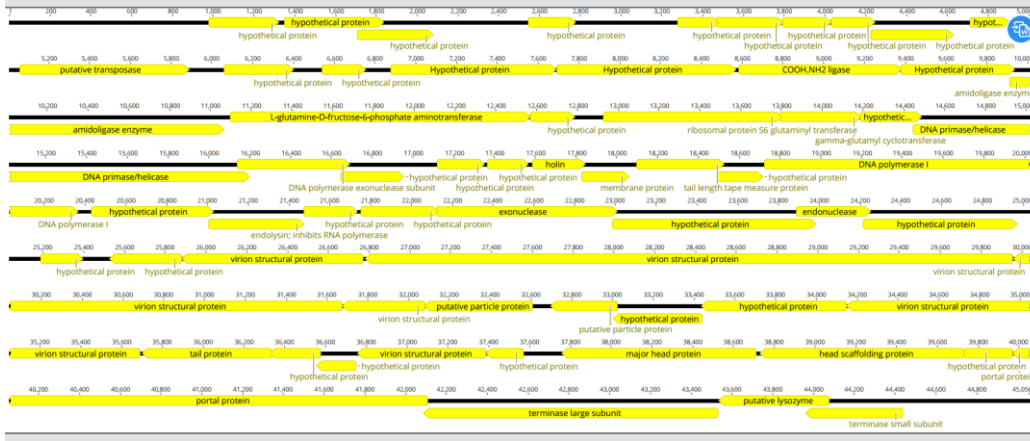
4.2.5. Genomik Karakterizasyon

GeneJET Viral DNA and RNA Purification Kit kullanılarak izole edilen bakteriyofaj DNA'larının RFLP dizilimleri belirlenmiş ve birbirinden farklı çıkan bakteriyofaj genomlarından 3 adedinde tüm dizi analizi yaptırılmıştır. Bu analiz ile biyoinformatik analizler kullanılarak oluşan contiglerin birleştirilmesi BM Labosis tarafından yapılmıştır.

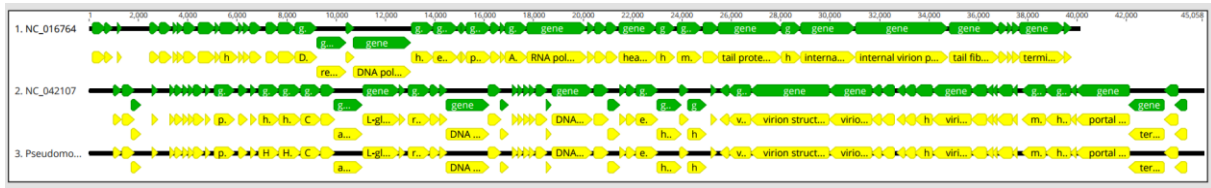
P. tolaasii P22.1, ve *P. fluorescens* L23.2 ve *P. libanensis* olan L12.3 bakteriyofajına ait diziler Geneious Prime yazılımı kullanılarak işlenmiştir. Öncelikle NCBI sayfasına gitmeden bu yazılım ile nBLAST programı kullanılarak ilgili bakteriyofaj genomunun hangi dizilimler ile örtüştüğü görüntülenmiş ve muhtemel açık okuma çerçevelerinin tespiti edilmiştir.

Biyoinformatik analizler sonucunda % GC miktarının 52 olduğu saptanan P22-1 bakteriyofaj genomunun 45.058 bazlık büyüklüğe sahip olduğu ve GenBank' da yer alan NC_042107 kodlu *P. tolaasii* NV1 [173] bakteriyofaj genomu ile yüksek benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla oluşan açık okuma çerçeveleri de birbirine eş düşmüştür. 64 adet ORF tespit edilmiş ve bunlar içinde patojenik etkiye sahip

Pseudomonas'larda bulunabilecek herhangi bir virü lens gen bölgesine ve/veya antibiyotik direnç genine rastlanmamıştır. ORF bölgeleri, Şekil 4.36'da, ifade ettikleri proteinler ise EK-1'de verilmiştir. Ayrıca çalıştığımız bakteriyofaj genomu ve *P. tolaasii* NV1, kendilerinden yaklaşık 5.000 baz daha kısa olan NC_016764 kodlu *Pseudomonas* Bf7 bakteriyofajı ile BLAST programı ile karşılaştırılmıştır.

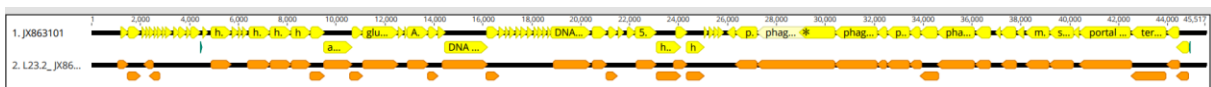


Şekil 4.36. *Pseudomonas* P22-1 bakteriyofajının ORF bölgeleri



Şekil 4.37. *Pseudomonas* P22-1, NV1 ve Bf7 bakteriyofaj genomlarının karşılaştırılması ve ORF bölgeleri

P. fluorescens L23.2 bakteriyofaj genomunun uzunluğu ise 45.517 baz olarak bulunmuştur. Bu genom yapılan nBLAST sonucunda uzunluğu 45.516 baz ve GenBank numarası JX863101 olan *Pseudomonas fluorescens* UFV-P2 bakteriyofaj genomu ile yüksek benzerlik göstermiştir [174]. Genomun % GC miktarı % 51,5 olarak bulunurken 41 adet ORF bölgesine sahip olduğu görülmüştür. Bu bölgelerin kodladığı olası proteinler EK-1'de verilmiştir. Bu genomlarda da antibiyotik direnç geni ve virü lenslikle ilgili bir gene rastlanmamıştır.



Şekil 4.38. L23.2 ve UFV-P2 bakteriyofaj genomlarının BLAST sonucu

Konakçısı *P. libanensis* olan L12.3 için daha önce GenBank' a girişi yapılmış referans bir bakteriyofaj genomu bulunmadığı için, ortaya çıkan dizilimin birleşim işlemi de novo yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Baz sayısı 39.652 olan genomun, gen bankasında bulunan hiçbir bakteriyofaj ile benzerlik göstermediği tespit edilmiştir. Bu genomun ilk etapta belirlenen ORF sayısı 22 olmuştur. Genomun nBLAST yapıldıktan sonra ORF sayısının 49 olabileceği tespit edilmiştir. Olası gen bölgeleri arasında antibiyotik direnç genine veya patojenik gen bölgesine rastlanmamıştır. İlgili gen bölgelerinin bakteriyofajların kendi yapılarını oluşturmak için gereksinim duyduğu bölgelerden oluştuğu ve kodladığı proteinlerinde önceden sınıflandırılmış standard proteinler (gp19, gp15 gibi) olduğu görülmüştür. Olası gen bölgelerine ait proteinlerin listesi EK-1'de verilmiştir.



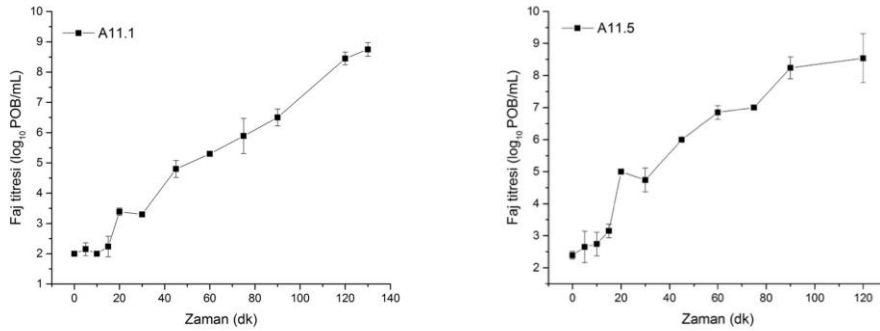
Şekil 4.39. L12.3 bakteriyofaj genomuna ait olası ORF bölgeleri ve kodladığı proteinler

Dizi analizleri sonucunda 3 bakteriyofaj genomunun 39.652 ile 45.515 baz uzunluğunda oldukları tespit edilmiştir. Elde edilen bu uzunlukların öncelikle RFLP sonucunda elde edilen genom büyüklükleri ile paralel olduğu görülmüştür. Aynı zaman dizilerin BLAST sonucunda uyum gösterdikleri bakteriyofajların birbirinden tamamen farklı olması RFLP sonucunda alınan farklılıkları doğrular nitelikte olmuştur. Aynı zamanda çalışılan bakteriyofajların da DNA dizilimlerinin farklı olduğu kesinleşmiştir. Özellikle L12.3 bakteriyofaj genomuna ait dizilim ülkemizi de temsil edecek nitelikte GenBank da yerini alacak, böylece hem bilimsel hem de uygulama açısından büyük katkı sağlayacaktır.

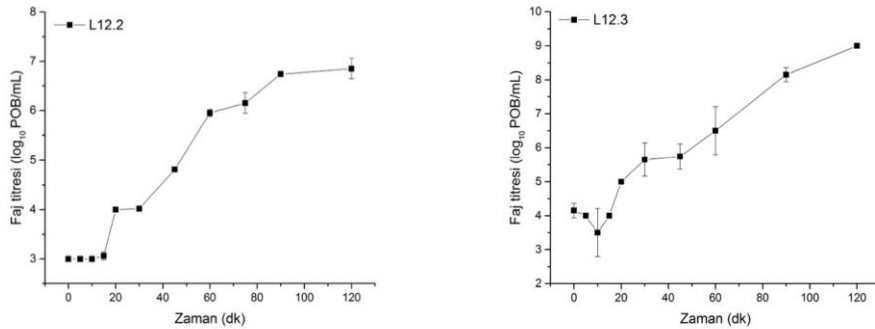
4.2.6. Replikasyon Parametrelerinin Belirlenmesi

Tek aşamalı gelişme eğrisi ve adsorpsiyon hızı deneyleri literatürdeki yöntemler baz alınarak gerçekleştirilmiştir. Bakteriyofajların gelişme eğrileri elde edildikten sonra, bu eğrilerden hareketle latent dönem süreleri ve patlama büyüklükleri belirlenmiştir. Ardından bakteriyofajların adsorpsiyon eğrileri oluşturulmuş ve bu verilerden hareketle adsorpsiyon hız sabitleri hesaplanmıştır.

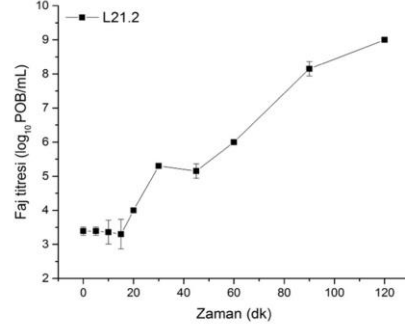
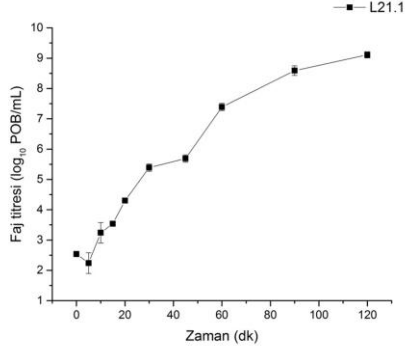
P. fluorescens bakteriyofajlarının gelişme eğrileri aşağıdaki şekillerde sunulmuştur.



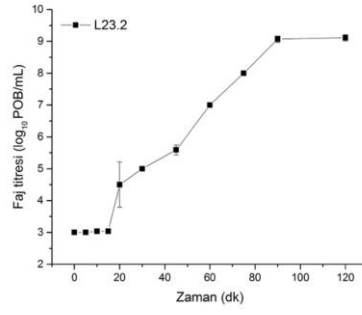
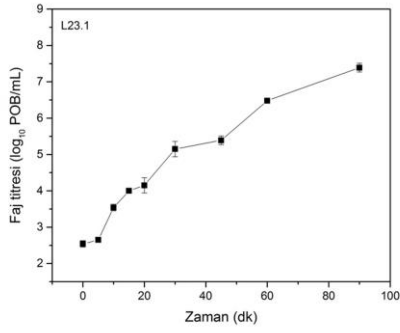
Şekil 4.40. A11 bakteriyofajlarına ait gelişme eğrileri



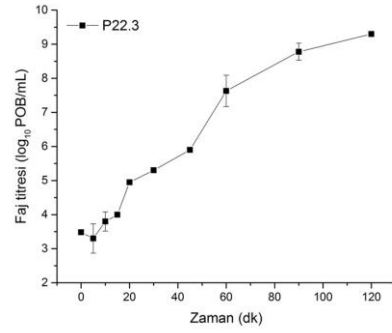
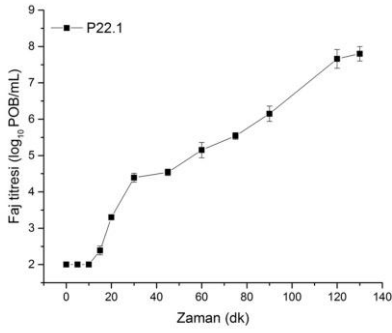
Şekil 4.41. L12 bakteriyofajlarına ait gelişme eğrileri



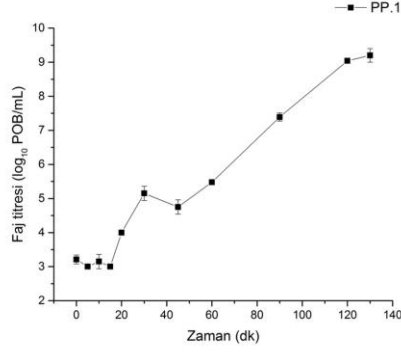
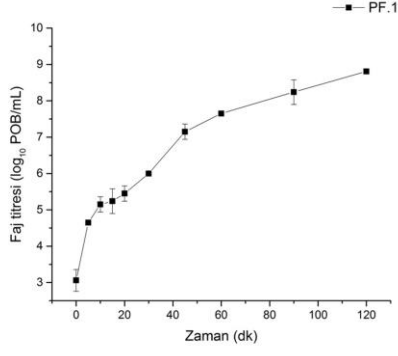
Şekil 4.42. L21 bakteriyofajlarına ait gelişme eğrileri



Şekil 4.43. L23 bakteriyofajlarına ait gelişme eğrileri



Şekil 4.44. P22 bakteriyofajlarına ait gelişme eğrileri



Şekil 4.45. PF ve PP bakteriyofajlarına ait gelişme eğrileri

Bakteriyofajların gelişme eğrilerinden yola çıkılarak hesaplanan latent dönem süresi ve patlama büyüklüğü değerleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

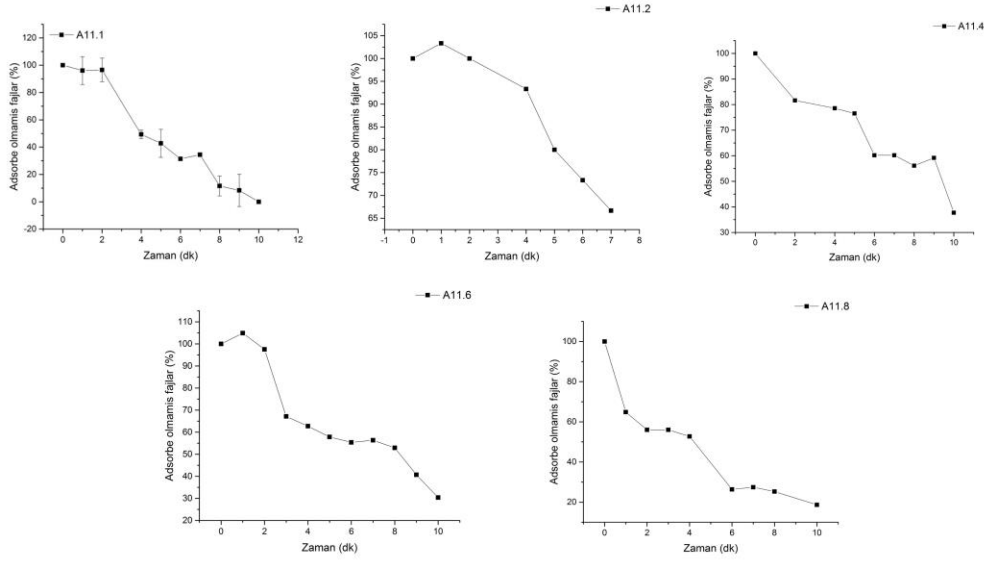
Çizelge 4.18. *P. fluorescens* bakteriyofajlarının replikasyon parametreleri

| Bakteriyofaj | Latent dönem süresi (dk) | Patlama büyüklüğü (POB/enfekte hücre) |
|--------------|--------------------------|---------------------------------------|
| A11.1 | 15 | 20,00 |
| A11.5 | 15 | 43,33 |
| L12.2 | 15 | 56,52 |
| L12.3 | 15 | 60,00 |
| L21.1 | 5 | 10,00 |
| L21.2 | 15 | 80,00 |
| L23.1 | 15 | 43,00 |
| L23.2 | 15 | 91,00 |
| P22.1 | 10 | 80,00 |
| P22.3 | 15 | 80,00 |
| PF.1 | <5 | 22,00 |
| PP.1 | 15 | 60,00 |

Replikasyon parametreleri bakteriyofajların bakteriyel eliminasyon aktivitelerinde önemli bir role sahiptir. Bakteriyofaj terapi uygulamalarında kısa latent periyodu ve yüksek patlama büyüklüğüne sahip bakteriyofajların daha çok tercih edildiği bilinmektedir [141]. *Pseudomonas* bakteriyofajları ile yapılan çalışmalarda bazı bakteriyofajların latent dönem süresinin 100 dakikayı geçebildiği gözlemlenmiştir [40,172]. Aynı şekilde bakteriyofajların patlama büyüklüğünün, enfekte hücre başına 25 ila 153 POB arasında değişebildiği de görülmüştür [40,108,109,172,175]. Bu çalışmada kullanılan bakteriyofajların literatürdeki aynı ve yakın grup bakteriyofajlara nispeten daha kısa latent dönem süresine sahip olduğu ve patlama büyüklüklerinin 20 ila 91 POB/enfekte hücre arasında değiştiği görülmüştür.

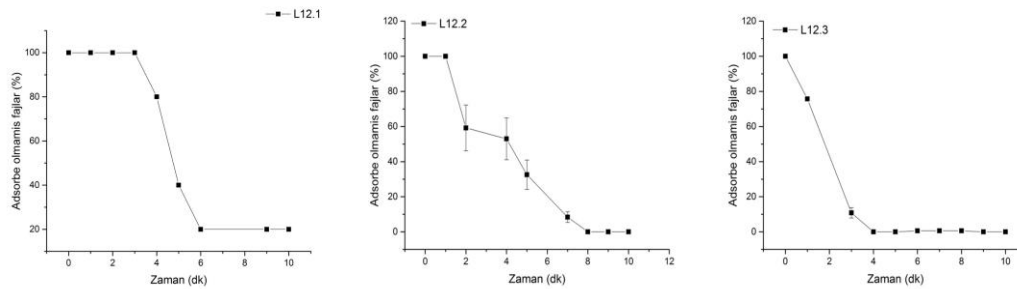
Gelişme eğrilerine ek olarak, *P. fluorescens* bakteriyofajlarının adsorpsiyon kinetiklerinin daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla ayrıca adsorpsiyon eğrileri de çıkarılmıştır. Eğriler aşağıda paylaşılmıştır.

A11.1 bakteriyofajının adsorpsiyon eğrisi incelendiğinde, bakteriyofajların yaklaşık % 90'ının adsorpsiyonu için gerekli olan sürenin yaklaşık 10 dakika olduğu saptanmıştır. Bakteriyofajın adsorpsiyon hız sabiti ise 4.93×10^{-7} mL/dk olarak hesaplanmıştır. A11.2 bakteriyofajının yaklaşık % 35'inin adsorpsiyonu için gerekli olan sürenin yaklaşık 7 dakika olduğu, adsorpsiyon hız sabitinin ise $3,42 \times 10^{-8}$ mL/dk olarak hesaplanmıştır. A11.4 bakteriyofajının % 65'inin, A11.6 bakteriyofajının % 70'inin adsorpsiyonu için gerekli olan sürenin yaklaşık 10 dakika olduğu saptanmıştır. A11.4 ve A11.6'nın adsorpsiyon hız sabitleri sırasıyla $1,17 \times 10^{-7}$ mL/dk ve $8,75 \times 10^{-9}$ mL/dk olarak hesaplanmıştır. A11.8 bakteriyofajının % 80'inin adsorpsiyonu için gerekli olan sürenin yaklaşık 10 dakika olduğu saptanmıştır. Bakteriyofajın adsorpsiyon hız sabiti ise $1,40 \times 10^{-8}$ mL/dk olarak hesaplanmıştır.



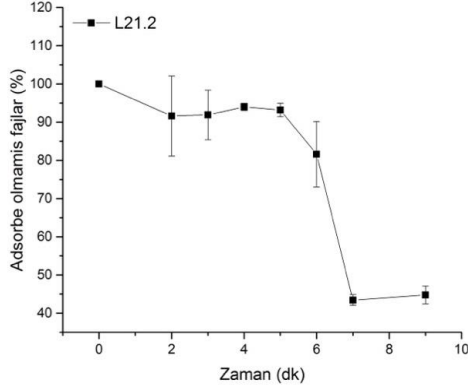
Şekil 4.46. A11 bakteriyofajlarına ait adsorpsiyon eğrileri

L12.1 bakteriyofajının adsorpsiyon eğrisi incelendiğinde, bakteriyofajların % 80'inin adsorpsiyonu için gerekli olan sürenin yaklaşık 6 dakika olduğu saptanmıştır. Bakteriyofajın adsorpsiyon hız sabiti ise $1,13 \times 10^{-7}$ mL/dk olarak hesaplanmıştır. L12.2'nin yaklaşık % 90'ının adsorpsiyonu için geçen sürenin 7 dakika olduğu tespit edilmiş, hız sabiti ise $1,43 \times 10^{-7}$ mL/dk olarak hesaplanmıştır. L12.3 bakteriyofajının yaklaşık % 90'ının adsorpsiyonu için geçen sürenin 3 ila 4 dakika arasında olduğu tespit edilmiştir. Bakteriyofajın adsorpsiyon hız sabiti ise $2,83 \times 10^{-7}$ mL/dk olarak hesaplanmıştır.



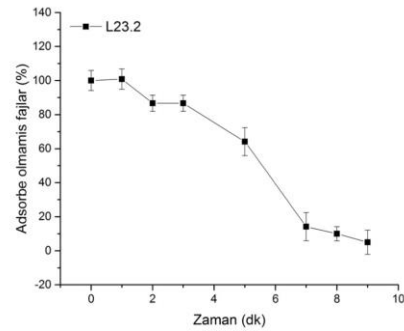
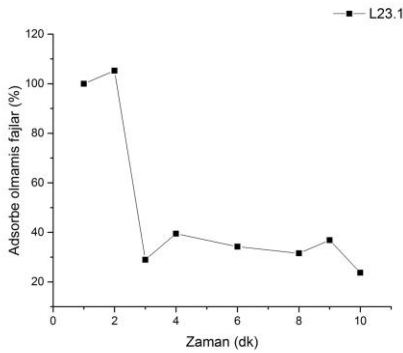
Şekil 4.47. L12 bakteriyofajlarına ait adsorpsiyon eğrileri

L21.2 bakteriyofajının adsorpsiyon eğrisi incelendiğinde, 10 dakika içinde bakteriyofajların yaklaşık % 60'ının adsorpsiyonunun gerçekleştiği belirlenmiştir. Bakteriyofajın adsorpsiyon hız sabiti ise $4,35 \times 10^{-8}$ mL/dk olarak hesaplanmıştır.



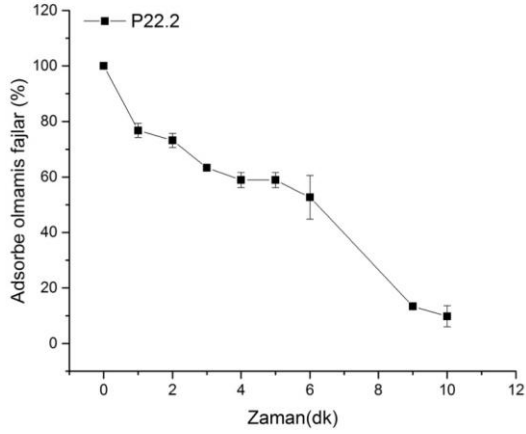
Şekil 4.48. L21.2 bakteriyofajına ait adsorpsiyon eğrisi

L23.1 bakteriyofajının adsorpsiyon eğrisinden elde edilen sonuca göre, bakteriyofajların % 80'inin konakçı hücreye adsorbe olması için geçen sürenin yaklaşık 10 dakika olduğu saptanmıştır. Bakteriyofajın adsorpsiyon hız sabiti ise $2,40 \times 10^{-8}$ mL/dk olarak hesaplanmıştır. L23.2 bakteriyofajının ise % 95'inin konakçı hücreye adsorbe olması için geçen sürenin yaklaşık 9 dakika olduğu saptanmıştır. Bakteriyofajın adsorpsiyon hız sabiti ise $5,13 \times 10^{-8}$ mL/dk olarak hesaplanmıştır.



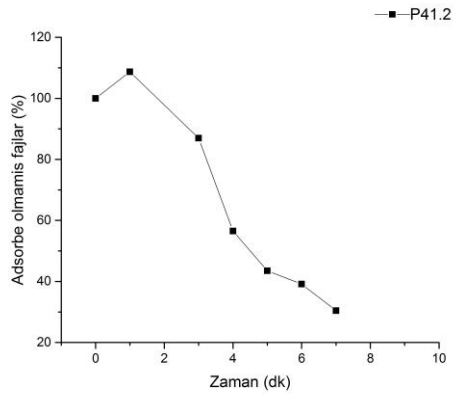
Şekil 4.49. L23 bakteriyofajlarına ait adsorpsiyon eğrileri

P22.1 bakteriyofajının adsorpsiyon eğrisinden elde edilen sonuca göre, bakteriyofajların % 90'ının konakçı hücreye adsorbe olması için geçen sürenin yaklaşık 10 dakika olduğu saptanmıştır. Bakteriyofajın adsorpsiyon hız sabiti ise $3,09 \times 10^{-7}$ mL/dk olarak hesaplanmıştır.



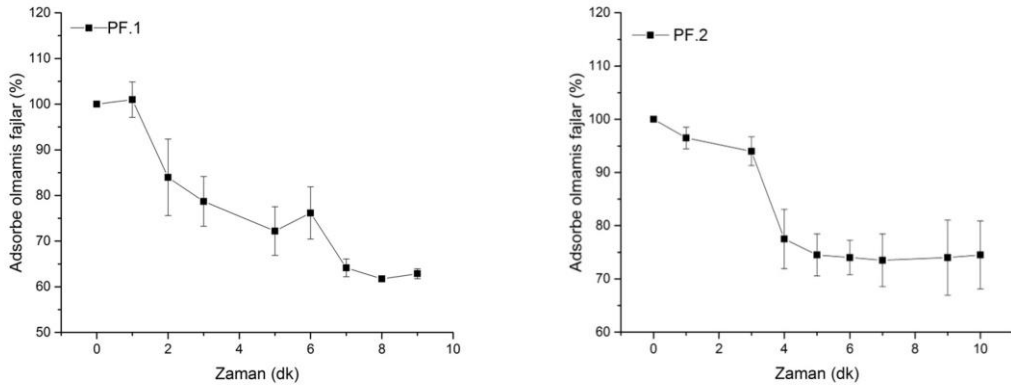
Şekil 4.50. P22.1 bakteriyofajına ait adsorpsiyon eğrisi

P41.2 bakteriyofajına ait adsorpsiyon eğrisi incelendiğinde, bakteriyofajların yaklaşık % 70'inin adsorpsiyonu için geçen sürenin 7 dakika olduğu tespit edilmiştir. Bakteriyofajın adsorpsiyon hız sabiti ise $8,79 \times 10^{-8}$ mL/dk olarak hesaplanmıştır.



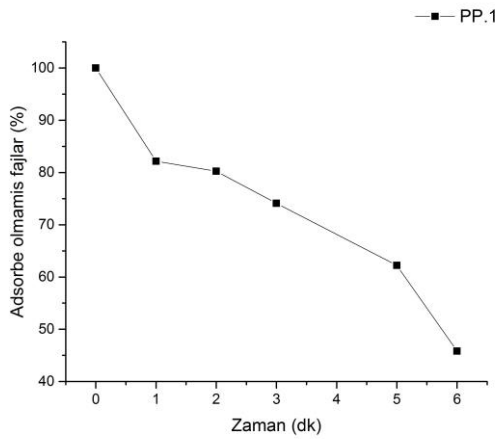
Şekil 4.51. P41.2 bakteriyofajına ait adsorpsiyon eğrisi

PF.1 bakteriyofajının adsorpsiyon eğrisi incelendiğinde, ilk 10 dakika içerisinde bakteriyofajların yaklaşık % 40'ının adsorpsiyonunun gerçekleşebildiği tespit edilmiştir. Bakteriyofajın adsorpsiyon hız sabiti ise $1,52 \times 10^{-8}$ mL/dk olarak hesaplanmıştır. PF.2 bakteriyofajının 10 dakika içinde yaklaşık % 30'unun adsorpsiyonunun gerçekleştiği ve bakteriyofajın adsorpsiyon hızının düşük olduğu tespit edilmiştir. Bakteriyofajın adsorpsiyon hız sabiti ise $2,71 \times 10^{-8}$ mL/dk olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.52. PF bakteriyofajlarının adsorpsiyon eğrileri

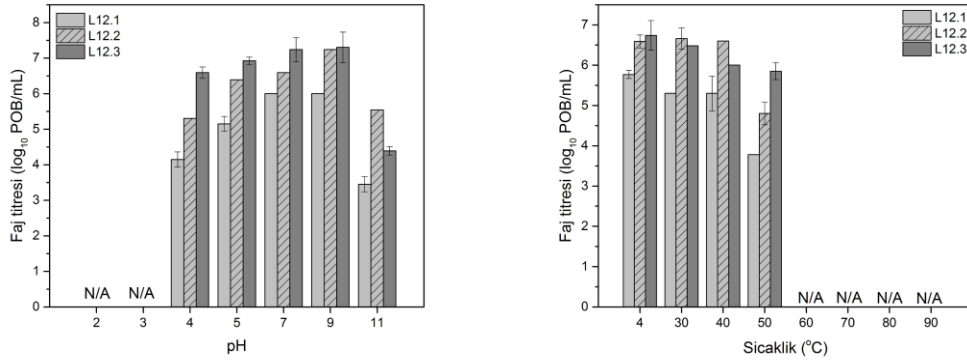
PP.1 bakteriyofajının adsorpsiyon eğrisi incelendiğinde, 10 dakika içinde bakteriyofajların yaklaşık % 30'unun adsorpsiyonunun gerçekleştiği ve bakteriyofajın adsorpsiyon hızının düşük olduğu tespit edilmiştir. Bakteriyofajın adsorpsiyon hız sabiti ise $4,68 \times 10^{-8}$ mL/dk olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.53. PP.1 bakteriyofajına ait adsorpsiyon eğrisi

4.2.7. pH ve Sıcaklık Stabilitelerinin Belirlenmesi

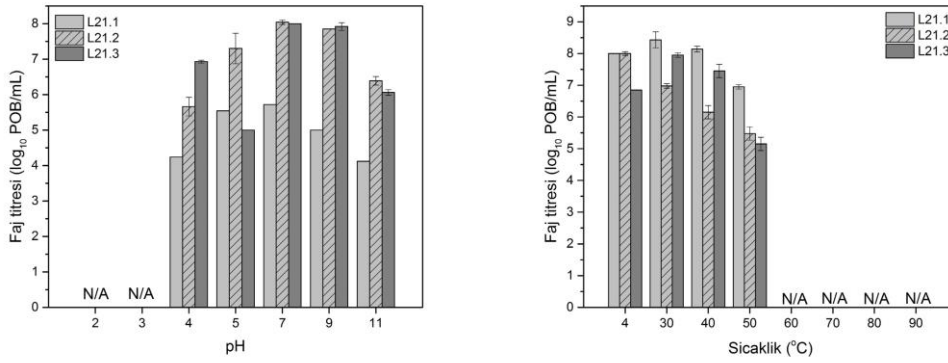
Yapılan denemeler sonucunda, L12.1 bakteriyofajının pH 7-9 aralığında stabil olduğu, pH 7'nin altına düştüğünde ve 9'un üstüne çıktığında stabilitesini yitirdiği, pH 3'ün altında ise sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü saptanmıştır. Sıcaklık denemeleri ise bakteriyofajın 40°C'ye kadar stabil kalırken sonrasında hızla aktivite kaybı yaşadığı ve sayısının 60°C üstünde tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir. L12.2 bakteriyofajının pH 5-9 aralığında stabil olduğu, pH 4 ve 11'de yaklaşık 2 log-birimlik düşüş yaşadığı, buna karşın pH 3'ün altında sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü saptanmıştır. Ayrıca bu bakteriyofajın 40°C'ye kadar stabil kalırken sonrasında hızla aktivite kaybı yaşadığı, 50°C'de yaklaşık 2 log-birimlik düşüş yaşadığı, 60°C üstünde ise sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir. L12.3 bakteriyofajının pH 4-9 aralığında yüksek oranda stabil olduğu, pH 11'de yaklaşık 3 log-birimlik düşüş yaşadığı, buna karşın pH 3 ve altında sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü saptanmıştır. Sıcaklık denemeleri ise bakteriyofajın 50°C'ye kadar stabil kalırken sonrasında hızla aktivite kaybı yaşadığı, 60°C üstünde ise sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 4.54. L12 bakteriyofajlarının farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki stabilitesi

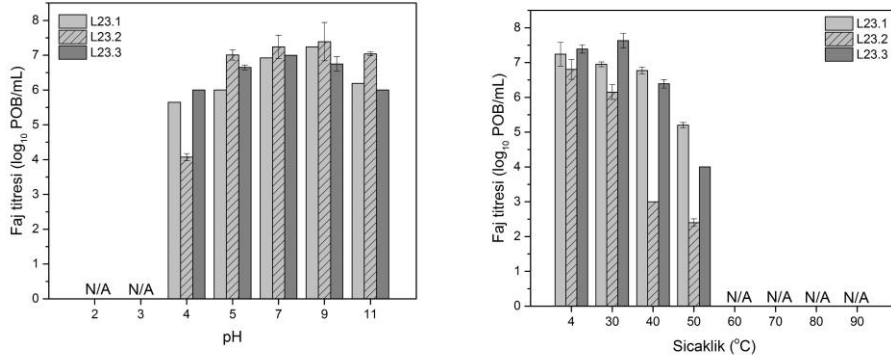
L21.1 bakteriyofajının pH 5-9 aralığında yüksek oranda stabil olduğu, pH 4 ve pH 11'de yaklaşık 2 log-birimlik düşüş yaşadığı, buna karşın pH 3 ve altında sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü saptanmıştır. Sıcaklık denemeleri ise bakteriyofajın 40°C'ye kadar stabil kalırken sonrasında aktivite kaybı yaşadığı, 60°C üstünde ise sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir. L21.2 bakteriyofajının pH 5'te yaklaşık 1 log-birimlik düşüş yaşadığı, pH 4'te yaklaşık 3 log-birimlik, pH 11'de

ise yaklaşık 2 log-birimlik düşüş yaşadığı saptanmıştır. Sıcaklık denemeleri ise bakteriyofajın 40°C'ye kadar stabil kalırken sonrasında hızla aktivite kaybı yaşadığı, 60°C ve üstünde ise sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir. L21.3 bakteriyofajının pH 7-9 aralığında yüksek oranda stabil olduğu, pH 5'te yaklaşık 3 log-birimlik düşüş yaşadığı, pH 11'de ise yaklaşık 2 log-birimlik düşüş yaşadığı belirlenmiştir. Ayrıca bakteriyofajın 40°C'ye kadar stabil kalırken sonrasında hızla aktivite kaybı yaşadığı, 60°C ve üstünde ise sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü tespit edilmiştir.



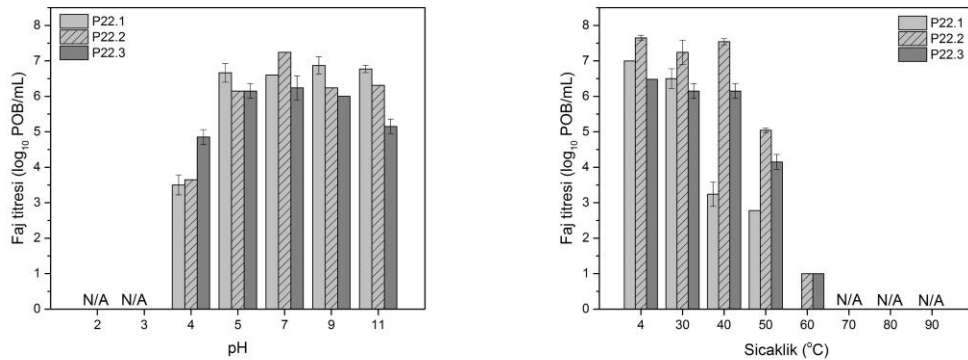
Şekil 4.55. L21 bakteriyofajlarının farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki stabilitesi

L23.1 bakteriyofajının pH 7-9 aralığında yüksek oranda stabil olduğu, pH 4 ve 5'te yaklaşık 1-2 log-birimlik düşüşler yaşadığı, pH 11'de ise yaklaşık 2 log-birimlik düşüş yaşadığı saptanmıştır. Diğer gruplara oranla bu pH değerlerindeki düşüş sayısının daha az olduğu gözlenmiştir. Sıcaklık denemeleri ise bakteriyofajın 40°C'ye kadar stabil kalırken sonrasında hızla aktivite kaybı yaşadığı, 60°C ve üstünde ise sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir. L23.2 bakteriyofajının pH 5-11 aralığında yüksek oranda stabil olduğu, pH 4'te yaklaşık 3 log-birimlik düşüş yaşadığı, pH 3 ve altında sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü saptanmıştır. L23.3 bakteriyofajının diğer bakteriyofajlara nispeten pH 4-11 aralığında daha stabil olduğu, pH 4'te ve 11'de yaklaşık 1-2 log-birimlik düşüş yaşadığı ve diğer bakteriyofajlarda olduğu şekilde, pH 3 ve altında sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü saptanmıştır. Sıcaklık denemeleri ise bakteriyofajın 40°C'ye kadar stabil kalırken sonrasında hızla aktivite kaybı yaşadığı, 60°C ve üstünde ise sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir.



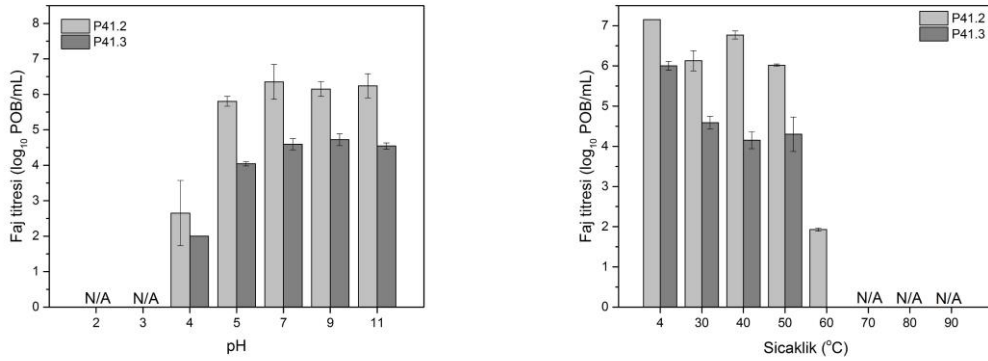
Şekil 4.56. L23 bakteriyofajlarının farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki değerlerindeki stabilitesi

P22.1 bakteriyofajının pH 5-11 aralığında yüksek oranda stabil olduğu, pH 4'te yaklaşık 4 log-birimlik düşüş yaşadığı saptanmıştır. P22.2 bakteriyofajının pH 5, 9 ve 11 değerlerinde 1-2 log-birimlik düşüşler yaşadığı, pH 4 değerinde ise 3-log birimden fazla düşüş yaşadığı görülmüştür. Sıcaklık denemelerinde ise bakteriyofajın 40°C'ye kadar stabil kalırken sonrasında hızla aktivite kaybı yaşadığı, fakat diğer bakteriyofajların aksine 60°C'de 1 saat inkübasyon sonucunda hala belirli bir miktar bakteriyofajın aktif kalabildiği saptanmıştır. P22.3 bakteriyofajının pH 5-9 aralığında yüksek oranda stabil olduğu, pH 4'te yaklaşık 2 log-birimlik düşüş yaşadığı, pH 11'de ise 2 log-birimden daha az düşüş yaşadığı belirlenmiştir. Sıcaklık denemelerinde ise bakteriyofajın 40°C'ye kadar stabil kalırken sonrasında aktivite kaybı yaşadığı, diğer bakteriyofajların aksine 60°C'de 10¹ POB/mL seviyesinde aktif kalabildiği, 70°C ve üstünde ise sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 4.57. P22 bakteriyofajlarının farklı pH ve sıcaklık koşullarındaki stabilitesi

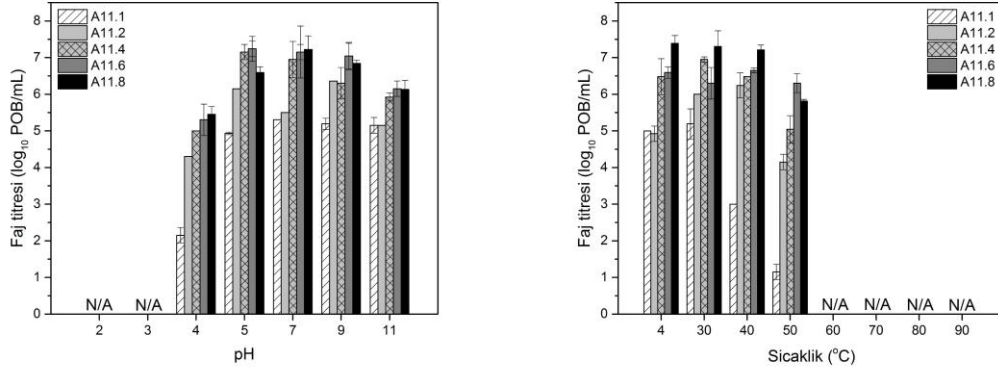
P41.2 bakteriyofajının pH 5-11 aralığında yüksek oranda stabil olduğu, pH 4'te önemli bir düşüş yaşadığı ve pH 3 ve altında sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir. Sıcaklık denemelerinde ise bakteriyofajın 50°C'ye kadar stabil kalırken sonrasında aktivite kaybı yaşadığı, diğer bakteriyofajların aksine 60°C'de 10² POB/mL seviyesinde aktif kalabildiği, 70°C ve üstünde ise sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir. P41.3 bakteriyofajının pH 7-11 aralığında yüksek oranda stabil olduğu, pH 5'te ufak bir düşüş yaşarken pH 4'te yaklaşık 2-log birimlik bir düşüş yaşadığı belirlenmiştir. Sıcaklık denemelerinde ise bakteriyofajın 50°C'ye kadar stabil kalırken sonrasında aktivite kaybı yaşadığı, 60°C ve üstünde ise sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 4.58. P41 bakteriyofajlarının farklı pH ve sıcaklık koşullarındaki stabilitesi

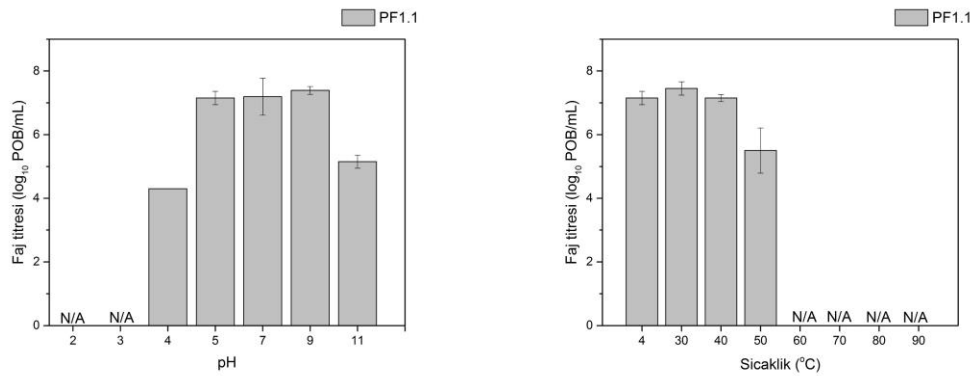
A11.1 bakteriyofajının pH 5-11 aralığında yüksek oranda stabil olduğu, pH 4'te yaklaşık 3-log birimlik bir düşüş yaşadığı belirlenmiştir. A11.2 bakteriyofajının pH 5-9 aralığında yüksek oranda stabil olduğu, pH 4'te yaklaşık 2-log birimlik ve pH 11'de ise yaklaşık 1-log birimlik düşüş yaşadığı tespit edilmiştir. Ayrıca 40°C'ye kadar stabil kalırken sonrasında aktivite kaybı yaşadığı, 60°C ve üstünde ise sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir. A11.4 bakteriyofajının pH 5-9 aralığında yüksek oranda stabil olduğu, pH 4'te yaklaşık 2-log birim ve pH 11'de yaklaşık 1-log birim düşüş yaşadığı belirlenmiştir. Bakteriyofajın 40°C'ye kadar stabil kalırken sonrasında aktivite kaybı yaşadığı görülmüştür. A11.6 bakteriyofajının pH 5-9 aralığında yüksek oranda stabil olduğu, pH 4'te yaklaşık 3-log birim ve 11'de yaklaşık 2-log birim düşüş yaşadığı, 50°C'ye kadar stabil kalırken sonrasında aktivite kaybı yaşadığı, 60°C ve üstünde ise sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü tespit edilmiştir. A11.8 bakteriyofajının pH 5-9 aralığında yüksek oranda stabil olduğu, pH 4'te yaklaşık 2-log birim ve 11'de

yaklaşık 1-log birim düşüş yaşadığı, pH 3 ve altında sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü görülmüştür. Sıcaklık denemelerinde ise bakteriyofajın 40°C'ye kadar stabil kalırken sonrasında aktivite kaybı yaşadığı, 60°C ve üstünde ise sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir.



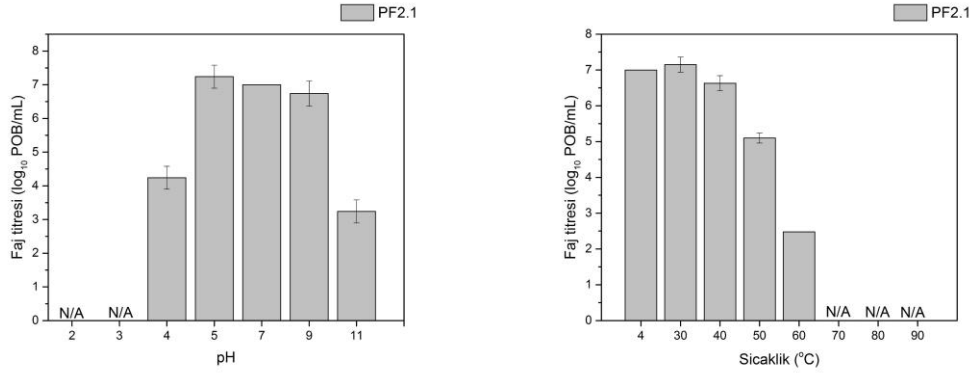
Şekil 4.59. A11 bakteriyofajlarının farklı pH ve sıcaklık koşullarındaki stabilitesi

PF1.1 bakteriyofajının pH 5-9 aralığında yüksek oranda stabil olduğu, pH 4 ve 11'de yaklaşık 3 ve 2-log birimlik düşüş yaşadığı, pH 3 ve altında sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir. Sıcaklık denemelerinde ise bakteriyofajın 40°C'ye kadar stabil kalırken sonrasında aktivite kaybı yaşadığı, 60°C ve üstünde ise sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir.



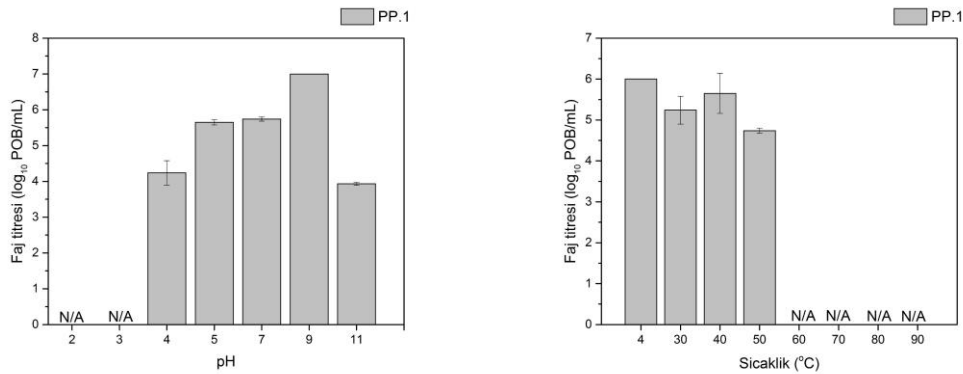
Şekil 4.60. PF1.1 bakteriyofajının farklı pH ve sıcaklık koşullarındaki stabilitesi

PF2.1 bakteriyofajının pH 5-9 aralığında yüksek oranda stabil olduğu, pH 4 ve 11’de 3-log birimden fazla düşüş yaşadığı, pH 3 ve altında sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir. Sıcaklık denemelerinde ise bakteriyofajın 40°C’ye kadar stabil kalırken sonrasında aktivite kaybı yaşadığı, 60°C ve 10² POB/mL seviyesinin üstünde aktif kalabildiği, 70°C ve üstünde ise sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 4.61. PF2.1 bakteriyofajının farklı pH ve sıcaklık koşullarındaki stabilitesi

PP.1 bakteriyofajının pH 5-9 aralığında yüksek oranda stabil olduğu, pH 4 ve 11’de yaklaşık 2-log birimlik düşüş yaşadığı, pH 3 ve altında sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir. Sıcaklık denemelerinde ise bakteriyofajın 50°C’ye kadar stabil kalırken sonrasında aktivite kaybı yaşadığı, 60°C ve üstünde ise sayısının tespit edilemeyecek seviyelere düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 4.62. PP.1 bakteriyofajının farklı pH ve sıcaklık koşullarındaki stabilitesi

Bu denemelere ek olarak, süt uygulamalarında kullanılacak olan bakteriyofajlar ayrıca düşük sıcaklık/uzun süre pastörizasyon koşullarını simüle etmesi amacıyla 63°C’de 30 dakika süreyle de inkübe edilmiş, işlem sonrasında aktif faj tespit edilememiştir.

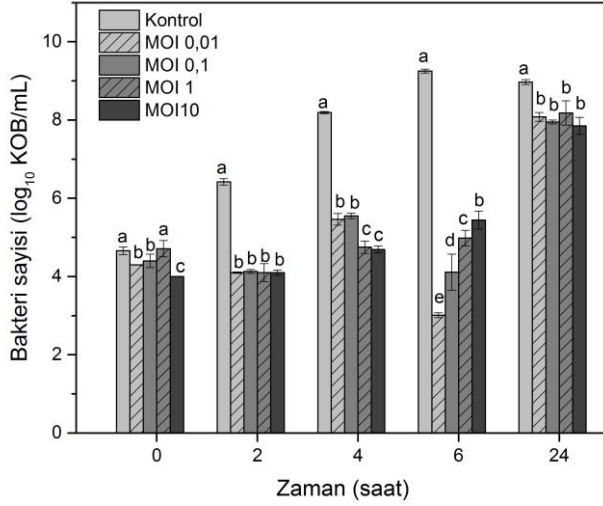
pH ve sıcaklığın bakteriyofajlarının stabilitesi üzerindeki etkisi çalışma kapsamında gösterilmiştir. Genel olarak, bakteriyofajların nötr ve alkali koşullar altında stabil olduğu bulunmuştur. Öte yandan pH 2 ve pH 3’te bakteriyofaj sayısının tespit sınırının (10^1 POB/mL) altına düştüğü ve genel olarak pH 5’in altına düştüğünde bakteriyofaj sayılarında önemli bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak her bakteriyofajların genel itibariyle yüksek sıcaklıklara duyarlı olduğu bulunmuştur. 40°C’de bile bakteriyofaj titrelerinde dler gözlenmiş olup ve 50°C ve 60°C’de 1 saatlik inkübasyondan sonra bakteriyofaj titrelerinin neredeyse yarı yarıya azaldığı grlmtir. 70, 80 ve 90°C’de yapılan deneylerde tüm bakteriyofaj titrelerinin tespit limitinin altına düştüğü gözlemlenmiştir. *Pseudomonas* bakteriyofajlarının termal direnci, literatürde açıklanan izolatlar arasında değişkenlik göstermektedir. Bazı araştırmacılar, süt endüstrisindeki ısıl işlemlerde kullanılanlara benzer zaman/sıcaklık kombinasyonlarına maruz kaldıktan sonra canlı kalan bakteriyofajlar bildirmiştir [169,175]. Öte yandan ısıl işlemlere (>60°C, 30 dakika) maruz bırakıldıktan sonra inaktive edilen bakteriyofajlar da bildirilmiştir [109,172]. Bakteriyofajlar, gıdanın kendisinden ve üretim süreçlerinden kaynaklanan farklı pH ve sıcaklık koşullarına maruz kaldıklarından, gıda uygulamalarında bakteriyofajların, pH ve sıcaklık kararlılığı önemlidir. Süt rnlerinde kullanılacak bakteriyofajların maruz kalacağı pH değerlerinin genel olarak 4,5-6,8 aralığında, sıcaklık değerlerinin ise 4°C ile 121°C arasında değiştiği bilinmektedir [27]. Bu çalışmada kullanılan bakteriyofajlar pH stabilitelei açısından incelendiğinde çiğ sütte kullanıma uygun oldukları grlmtir. Ayrıca sıcaklığa duyarlı oldukları için pastörizasyon gibi işlemler sonucunda canlılıklarını kaybetmeleri ve nihai üründe aktif olarak bulunmamaları beklenir. Bu açıdan incelendiğinde çalışılan bakteriyofajların nihai uygulama için uygun adaylar oldukları gözlenmiştir.

4.4. *Salmonella* Bakteriyofaj Kokteylinin Uygulamaları

4.4.1. *In-vitro* Etkinlik Denemeleri

Hazırlanan bakteriyofaj kokteyli, MOI 0,01, MOI 0,1, MOI 1 ve MOI 10 değerlerini karşılayacak şekilde bakteri kokteyli üzerine eklenmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. Bu

karışımdan 0, 2, 4, 6 ve 24. Saatlerde örnek alınarak uygun dilüsyonlar hazırlanmış ve yüzeye yayma yöntemiyle selektif besiyerine ekim yapılarak bakteriyofaj etkinliği takip edilmiştir.



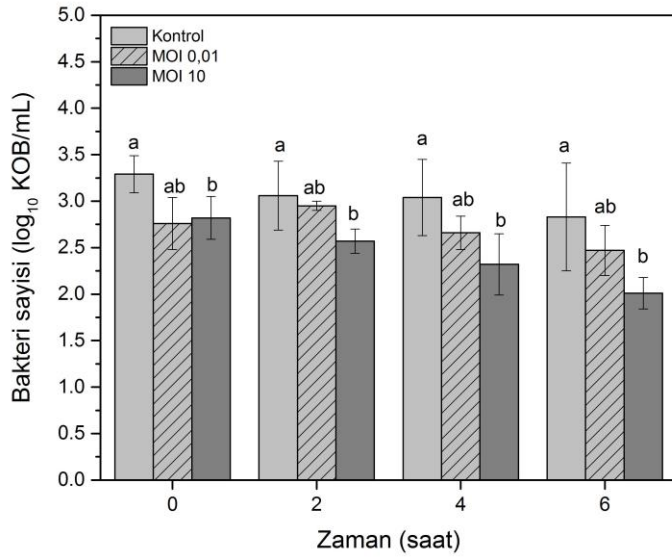
Şekil 4.63. MOI 0,01, MOI 0,1, MOI 1, MOI 10 değerlerinde uygulanan *Salmonella* bakteriyofaj kokteylinin bakteri kokteyli üzerinde 24 saatlik süreçteki etkisi.

In-vitro denemede elde edilen sonuçlara göre, ilk 6 saatlik süreç değerlendirildiğinde, kontrol ve uygulama grupları arasında önemli farkların bulunduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre 6. saat sonunda MOI 0,01, 0,1, 1 ve 10 grupları için kontrole kıyasla 6,23, 5,14, 4,26 ve 3,80 log-birimlik bakteriyel redüksiyon elde edilmiştir. 6. saat sonrasında faj uygulaması yapılan gruplarda da bakteri sayısı hızla artmasına rağmen, 24. saat sonunda kontrol grubuna kıyasla MOI 0,01, 0,1, 1 ve 10 için sırasıyla 0,89, 1,02, 0,79 ve 1,12 log-birimlik azalmalar gözlenmiştir. Bu örneklerde, farklı MOI değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamasına karşın, bakteriyofaj uygulaması yapılmayan kontrol grubu ile uygulama yapılan tüm gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

37°C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından en ideal MOI değerleri bakteriyofaj kokteylinin bakteri sayısını düşürme oranına göre belirlenmiş ve hem 6 saat hem de 24 saat sonuçları göz önünde bulundurularak uygulaması sonucunda, MOI 0,01 ve MOI 10 değerlerindeki bakteriyofajların daha güçlü bir etki gösterdiği saptanmıştır. Bu sebeple sütte *Salmonella* miktarını azaltmak için bakteriyofaj bazlı biyokontrol uygulamasında hem MOI 0,01 hem de MOI 10 değerlerinin denenmesine karar verilmiştir.

4.4.2. Bakteriyofaj Kokteylinin Sütteki Etkinliğinin Belirlenmesi

Oluşturulan bakteriyofaj miksini süt ortamındaki etkinliği test edilirken steril taze yağsız süt kullanılmıştır. Süte öncelikle hazırlanan bakteri karışımından eklenmiş, daha sonra bir önceki aşamada belirlenen optimum MOI değerleri sağlanacak şekilde bakteriyofaj kokteyli ilave edilmiştir. Kontrol grubuna ise bakteri ve bakteriyofaj ile aynı miktarda steril PBS eklenmiştir. Örnekler 4°C’de inkübe edilmiş, 0, 2, 4 ve 6 saatlik inkübasyondan sonra alınan örneklerdeki canlı bakteri sayıları ilgili selektif besiyerlerine ekim yapılarak kontrol edilmiştir. Süt ortamında yapılan denemeye dair sonuçlar aşağıdaki şekilde verilmiştir.



Şekil 4.64. Süt ortamında *Salmonella* bakteriyofaj kokteylinin bakteri eliminasyon etkinliği

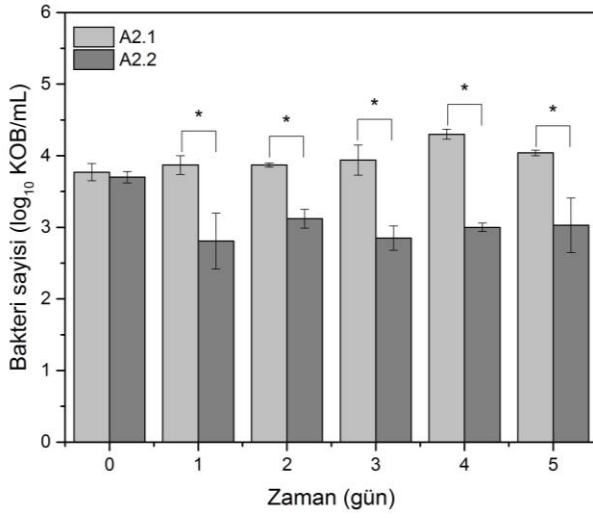
Bu sonuçlara göre 4°C’de süt ortamında bakteri eliminasyonu açısından en etkin sonuç MOI 10 değerinde alınmıştır. Bu grupta kontrol grubuna oranla, 6 saatlik inkübasyon sonucunda bakteri sayısında 0,77 log-birimlik bir azalma görülmüştür. Buna karşın MOI 0,01’de 6 saatlik inkübasyon sonucunda bakteri sayısındaki düşüş 0,38 log-birimle sınırlı kalmıştır. İnkübasyon sonucunda üç farklı gruptaki bakteri sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p<0,05$) olduğu gözlenmiştir. Bakteriyofajların aktivitesini etkileyen en önemli parametrelerden biri de sıcaklıktır. *Salmonella* fajları ile yapılan diğer çalışmalarda da, düşük sıcaklıklarda fajın etkinliğinin daha sınırlı olduğu saptanmıştır

[176]. Sıcaklık, bakteriyofajların adsorpsiyon, penetrasyon, çoğalma ve latent dönem sürelerinde temel bir rol oynamaktadır. Optimum sıcaklıklardan daha düşük sıcaklıklarda, daha az faj genetik materyali konakçı hücrelere nüfuz etmekte, bu da etkinliği sınırlandırmaktadır [177]. Ayrıca düşük sıcaklıklarda bakteri gelişiminin sınırlı olması sebebiyle faj etkinliğinin de daha düşük olduğu belirtilmektedir. Bu sebeple düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilen denemelerde, daha sınırlı redüksiyon değerleri elde edilmektedir. Literatürde, *Salmonella* ile yapılan gıda denemelerinde, bakteri sayısında çeşitli düzeylerde düşüş elde edildiği görülmektedir. Örneğin bir çalışmada, tavuk sosislerine faj uygulamasından sonra *Salmonella* sayısı 1,8-2,1 log azaltıldığı belirtilmiştir [178]. Ye ve ark. (2010), alfalfa filizlerine faj kokteyli uygulandıktan sonra *Salmonella* seviyelerinin yaklaşık 3 log azaldığını tespit etmiştir [179]. Ayrıca, Huang ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada (2018), faj uygulamasının *Salmonella* sayısını sütte MOI 1 ve 100 için yaklaşık 1,44 ve 2,37 log birim, sosiste MOI 1 için 0,52 log birim ve marulda 2,02 log birim azalttığını belirtmiştir [152].

4.4.3. Bakteriyofaj Kokteylinin Çiğ Sütteki Antimikrobiyal Aktivitesinin ve Sütün Mikrobiyal, Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi

4.4.3.1. Mikrobiyolojik Analizler

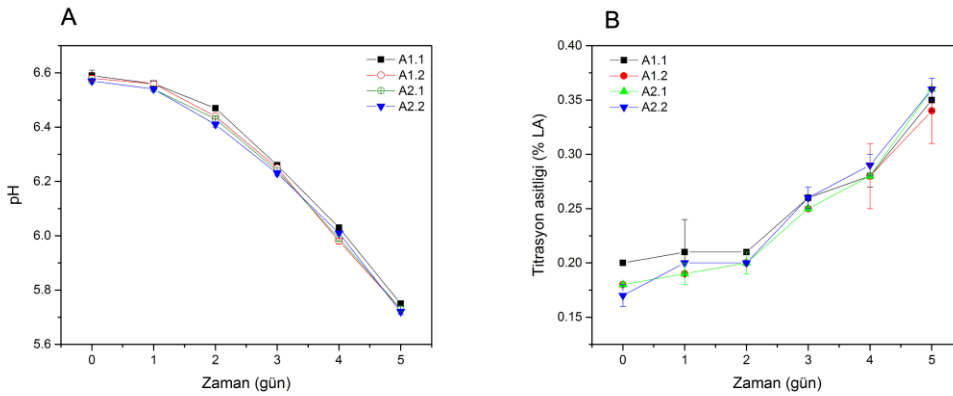
Salmonella bakteriyofajlarıyla yapılan denemeler sonucunda, A1.1 ve A1.2 gruplarında inkübasyon süresince *Salmonella* varlığı saptanmamıştır. 4°C'de 5 gün sonunda A2.1 grubunda bakteri sayısında 0,27 log-birimlik artış gözlenirken A2.2 grubunda 0,67 log-birim azalış görülmüştür. Faj kokteyli içermeyen kontrollerle karşılaştırıldığında 1,01 log birimlik bakteriyel azalma tespit edilmiştir. t0 hariç tüm depolama günlerinde, bakteriyofaj uygulanan ve uygulanmayan gruplardaki bakteri sayılarının anlamlı ölçüde farklı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 4.65. 4°C’de 5 gün boyunca depolanan çiğ süt örneklerinde *Salmonella* sayıları

4.4.3.2. pH ve Titrasyon Asitliği

4°C’de 5 gün süreyle depolanan çiğ süt örneklerinin pH değerleri aşağıdaki şekilde verilmiştir. Bu sonuçlara göre, 4°C’de 5 günlük depolama sonucunda, A1.1 ve A2.1 gruplarının pH değerlerinde 0,84 birimlik düşüş gözlenirken, A1.2 ve A2.2 gruplarının ikisinde de 0,85 birimlik düşüş gözlenmiştir. 4°C’de 5 gün süreyle depolanan çiğ süt örneklerinin titrasyon asitliği değerleri Şekil 4.66’da verilmiştir. Buna göre 4°C’de gerçekleşen depolama sonucunda A1.1 ve A1.2 gruplarında titrasyon asitliği değeri sırasıyla 0,15 ve 0,16 birim artarken; A2.1 ve A2.2 gruplarında sırasıyla 0,18 ve 0,20 birim artmıştır.



Şekil 4.66. 4°C’de 5 gün boyunca depolanan çiğ süt örneklerinin pH (A) ve titrasyon asitliği (B) değerleri

4.4.3.3. Briks Değerleri

Çiğ süt değerlerinin depolama süresince Briks değerlerinde görülen değişim aşağıdaki çizelgede verilmiştir. Depolama süresince tüm gruplarda Briks değerlerinde düşüş görülmüştür. Son gün alınan örneklerde yalnızca dışardan bakteri inokülasyonu yapılan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur.

Çizelge 4.19. 4°C’de 5 gün boyunca depolanan çiğ süt örneklerinin Briks değerleri

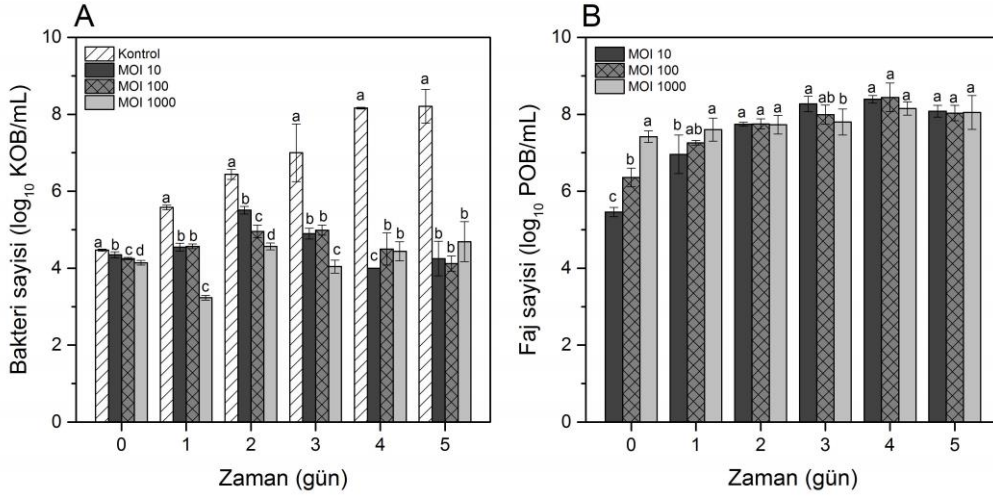
| Örnek | Zaman (gün) | | | | | |
|-------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| A1.1 | 8,83±0,05 ^b | 8,88±0,05 ^c | 8,80±0,00 ^b | 8,80±0,00 ^{bc} | 8,78±0,05 ^a | 8,70±0,00 ^b |
| A1.2 | 9,18±0,32 ^a | 8,83±0,05 ^c | 8,75±0,06 ^b | 8,78±0,05 ^c | 8,73±0,05 ^a | 8,70±0,00 ^b |
| A2.1 | 9,05±0,17 ^{ab} | 9,40±0,12 ^a | 9,20±0,35 ^a | 8,85±0,06 ^b | 8,75±0,00 ^a | 8,75±0,06 ^a |
| A2.2 | 8,95±0,06 ^{ab} | 9,20±0,12 ^b | 8,88±0,05 ^b | 8,95±0,06 ^a | 8,80±0,12 ^a | 8,70±0,00 ^b |

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak gösterilmiş olup, farklı üst simgeler ilgili sütunda farklı örnek gruplarının renk değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bir fark olduğunu göstermektedir.

4.5. *Pseudomonas fluorescens* Bakteriyofaj Kokteylinin Uygulamaları

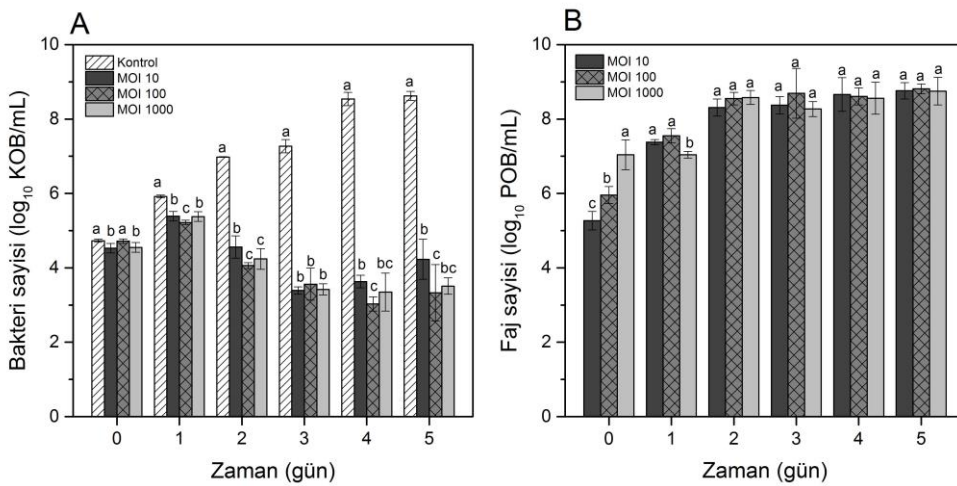
4.5.1. Bakteriyofaj Kokteylinin Farklı Yağ İçeriklerine Sahip Sütlerdeki Etkinliğinin Belirlenmesi

Aşağıdaki şekil, üç farklı MOI’de ve kontrol grubunda bakteriyofaj kokteylleri ile muamele edilmiş tam yağlı süt numunelerinde 5 gün boyunca gözlenen bakteri ve bakteriyofaj sayılarını göstermektedir. 4°C’de depolamanın ardından, MOI 10, 100 ve 1000 için kontrole kıyasla bakteri sayısında sırasıyla 3,96, 4,09 ve 3,52 log-birim azalmalar gözlenmiştir. Ayrıca bakteriyofaj kokteyli uygulanmayan kontrol grubunda bakteri sayısının 5 gün içerisinde 4,47 log KOB/mL’den 8,21 log KOB/mL’ye yükseldiği belirlenmiştir. Depolama süresi boyunca bakteriyofaj sayısındaki artış da takip edilmiştir. Sonuçlara göre MOI 10, 100 ve 1000 için bakteriyofaj sayılarında sırasıyla 2,61, 1,67 ve 0,63 log-birimlik artışlar görülmüştür.



Şekil 4.67. 4°C’de 5 gün depolanan tam yağlı süt örneklerindeki bakteri ve bakteriyofaj sayıları

Aşağıdaki şekil, bakteriyofaj uygulanmış ve uygulanmamış yağsız süt örneklerinde 5 günlük depolama süresi boyunca tespit edilen bakteri ve bakteriyofaj sayılarını göstermektedir. Buna göre, MOI’leri 10, 100 ve 1000 olan bakteriyofaj kokteyli ile muamele edilen numunelerde depolama süresinin sonunda kontrole kıyasla 4,39, 5,29 ve 5,10 log-birimlik önemli bakteri azalmaları gözlenmiştir. Herhangi bir bakteriyofaj uygulaması yapılmayan yağsız süt örneğinde bakteri sayısının 5 gün sonunda 4,73 log KOB/mL’den 8,62 log KOB/mL’ye yükseldiği tespit edilmiştir. Ayrıca MOI 10, 100 ve 1000 grupları için ilk güne kıyasla bakteriyofaj sayılarında sırasıyla 3,49, 2,85 ve 1,70 log-birim artış tespit edilmiştir.



Şekil 4.68. 4°C’de 5 gün depolanan yağsız süt örneklerindeki bakteri ve bakteriyofaj sayıları

Literatürde, sütte *Pseudomonas fluorescens* suşlarının kontrolü için farklı MOI'lerde bakteriyofaj kokteyli uygulanmasına yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Bakteriyofaj kokteylinin süt uygulamasında elde edilen sonuçlar, tüm MOI grupları için başarılı bir bakteriyel azalma göstermiştir. Literatürde benzer bakteriyofaj gruplarına sahip süt uygulamalarında bakteri sayısında genel olarak 2-3 log-birim azalma gözlemlendiği bildirilmektedir [27,40,172]. Mevcut çalışmada, 5 günlük inkübasyonun sonunda bazı uygulama gruplarında 5,29 log-birime kadar bakteri azalması gözlemlenmiştir. Tüm uygulama gruplarında bakteriyofaj sayısında artış gözlenmiş ve buna bağlı olarak bakteriyofaj sayısı arttıkça bakteri sayısındaki azalmanın da arttığı saptanmıştır. Üç uygulama grubuna (MOI 10, 100 ve 1000) farklı konsantrasyonlarda bakteriyofajlar eklenmesine rağmen, depolamayı takip eden günlerde bakteriyofaj sayıları arasında anlamlı bir fark oluşmadığı gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Depolamanın ilk günlerinde farklı MOI'lerdeki bakteri sayıları arasında önemli farklılıklar bulunurken, depolamanın sonuna doğru farklı MOI grupları arasında anlamlı bir fark oluşmamıştır ($p<0,05$). Tam yağlı ve yağsız süt için yapılan her iki uygulamada da maksimum bakteri azalmasının sağlandığı grup MOI 100 grubu olmuştur. Literatürde çok sayıda çalışma, daha yüksek MOI değerlerinde daha fazla bakteri eliminasyonunun sağlandığını göstermiştir [180]. Yapılan bir çalışmada yüksek titrede bakteriyofaj uygulandığında “dışarıdan lizis” olarak bilinen bir sürecin meydana geldiği ve bunların replikasyon olmaksızın sitoplazmik membranın lizisine neden olduğu bildirilmiştir [181]. Bununla birlikte, aşırı yüksek bakteriyofaj konsantrasyonlarının bakteriyofaj immün sistemini uyararak duyarsız mutantlara neden olabileceği de akılda tutulmalıdır [182]. Bu nedenle, mümkün olan en düşük ve en etkili MOI ile çalışılmalıdır. Bu sebeple bu çalışma kapsamındaki denemelerde daha yüksek MOI değerlerine yer verilmemiş ve optimum MOI 100 olarak belirlenmiştir.

Yağsız ve tam yağlı süt sonuçları karşılaştırıldığında yağsız sütte hem bakteriyofaj sayısındaki artışın hem de bakteri sayısındaki azalmanın daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durum, gıda bileşenlerinin bakteriyofaj aktivitesi üzerindeki sınırlayıcı etkisi ile açıklanabilmektedir. Bakteriyofajlar ve gıda matrisi arasındaki etkileşim üzerine yapılan çalışmalar sınırlı olmakla birlikte, yağ ve protein gibi bileşenlerin gıdadaki bakteriyofaj aktivitesi üzerinde olumsuz etkiye sahip olabileceği bilinmektedir. Sütteki yağ globüllerinin antibakteriyofaj aktivitesi ile ilişkili olduğu daha önceki çalışmalarda ortaya konmuştur [183]. Literatürde gıda matrisi ile bakteriyofaj stabilitesi arasındaki ilişkiyi

açıklamaya yönelik yapılan çalışmalarda süt ve süt ürünlerinin kullanımının daha yaygın olduğu görülmektedir. Örneğin *Listeria* A511 bakteriyofajıyla yapılan bir çalışmada yağ globüllerinde bakteriyofaj stabilitesi araştırılmış ve çiğ sütün yağ, peynir altı suyu ve kazein fraksiyonlarının bakteriyofaj titrelerini azalttığı bildirilmiştir [116]. Bu durum, tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlarla da uyumludur. Yağ içeriği yüksek sütte bakteriyofaj sayısının ve buna bağlı olarak bakteriyofajların inhibisyon aktivitesinin daha düşük olduğu ortaya çıkmıştır.

4.5.2. Bakteriyofaj Kokteylinin Çiğ Sütteki Antimikrobiyal Aktivitesinin ve Sütün Mikrobiyal, Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi

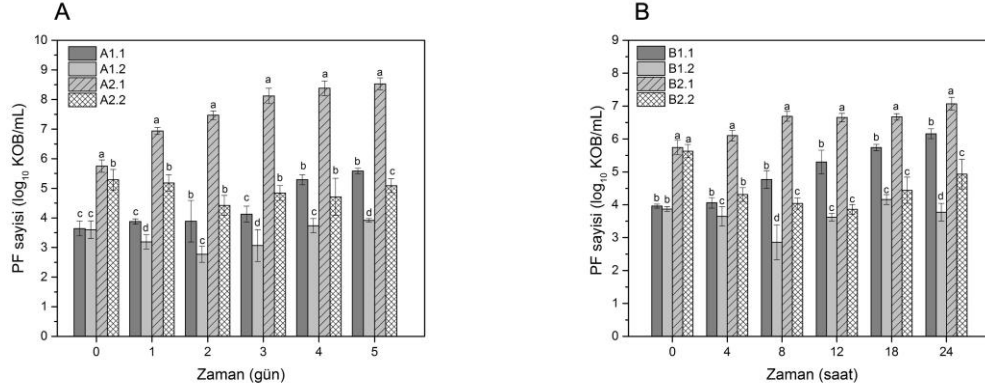
Bakteriyofajların süt ortamındaki etkinliği tespit edildikten sonra, daha kapsamlı bir çiğ süt denemesi tasarlanarak bakteriyofaj kokteylinin çiğ sütteki *P. fluorescens* grubu suşlarına ek olarak diğer baskın mikroorganizma gruplarına ve çiğ sütün bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerine etkisi de incelenmiştir.

4.5.2.1. Mikrobiyolojik Analizler

4°C'de 5 gün ve 25°C'de 24 saat süreyle inkübe edilen çiğ süt örneklerindeki PF sayıları Şekil 4.69'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre, 4°C'de 5 gün sonunda A1.1 ve A2.1 grupları için PF sayısında 1,94 ve 2,78 log-birimlik artışlar gözlenmiştir. Depolama sırasında, bakteri sayısının negatif kontrolde 5,58 log KOB/mL'ye ve bakteri karışımı ile inoküle edilen A2.1 grubunda 8,53 log KOB/mL'ye kadar yükseldiği görülmüştür. Bakteriyofaj kokteyli içermeyen kontrollerle karşılaştırıldığında A1.2 ve A2.2'de sırasıyla 1,67 ve 3,44 log birimlik bakteriyel redüksiyon tespit edilmiştir. t0 hariç tüm depolama günlerinde, bakteriyofaj uygulanan ve uygulanmayan gruplardaki bakteri sayılarının anlamlı ölçüde farklı olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$).

Benzer şekilde, bakteriyofajsız tüm numunelerde 25°C'de 24 saat boyunca bakteri sayısının arttığı gözlenmiştir. Bakteri ve bakteriyofaj eklenmemiş kontrol grubunda, PF sayısı 24 saat içinde 2,2 log birim artarken, PF bakteri karışımı ile kontamine edilmiş grupta bakteri sayısı 1,3 log birim artmıştır. 24 saatin sonunda, B1.2 ve B2.2 için kontrollerine kıyasla PF sayısında sırasıyla 2,38 ve 2,15 log-birimlik azalmalar

gözlenmiştir. Bakteriyofaj uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında t0 hariç tüm zamanlar için anlamlı ($p<0,05$) fark olduğu belirlenmiştir.



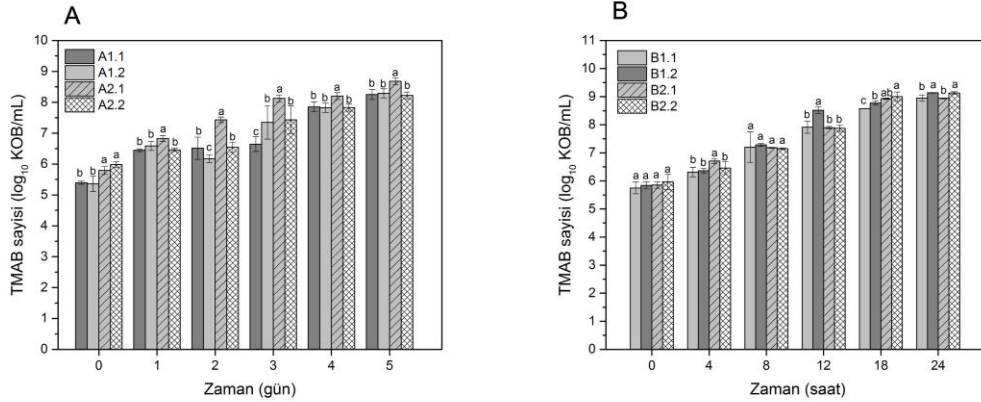
Şekil 4.69. 4°C’de 5 gün (A) ve 25°C’de 24 saat (B) süreyle inkübe edilen çiğ süt örneklerindeki PF sayıları

Denemeler sonucunda oda sıcaklığında ve buzdolabı sıcaklığında depolanan çiğ süt örneklerinde bakteriyofaj kokteylinin etkin bir şekilde çalışarak hedef bakteri sayısının baskılanmasına yardımcı olduğu saptanmıştır. Bakteriyofaj uygulaması yapılmayan örneklerde bakteri sayısı hızla yükselerek enzim üretimini mümkün kılan sayılara ulaşmışken, bakteriyofaj uygulaması sayesinde bu yükseliş kontrol altında tutulabilmiştir. Literatürdeki bir başka çalışmada, bakteriyofajın, soğuk depolama koşullarında sütte *Pseudomonas lactis* gelişimini baskılayıp baskılamadığını araştırmak için CM-LB broth, yağsız süt ve tam yağlı süte bakteriyofaj ekleyerek canlı hücre sayısındaki düşüş izlenmiştir. Bakteriyofaj enfeksiyonu olmadan, CM-LB broth, yağsız süt ve tam yağlı süt için tüm örneklerde *P. lactis* sayıları yaklaşık 1×10^{10} KOB/mL’ye yükseldiği belirtilmiştir. Bakteri sayıları bakteriyofajın eklenmesinden yaklaşık 32 veya 48 saat sonrasında kadar artmaya devam etse de, bakteri sayılarının tüm uygulama gruplarında kademeli olarak azalmaya başladığı ve CM-LB broth, yağsız süt ve tam yağlı sütte, bakteriyofajla uygulanan gruplardaki canlı bakteri sayılarının, bakteriyofaj uygulanmayanlara kıyasla 1000 kat azaldığı ve canlı hücre sayılarının, enfeksiyondan 128 saat sonra (yaklaşık 5 gün) kadar düşük kaldığı rapor edilmiştir [172].

4°C ve 25°C’de inkübe edilen sütteki bakteriyofaj kokteylinin TAMB sayıları üzerindeki etkisi Şekil 4.70’te gösterilmiştir. Buna göre, 4°C’de inkübasyon sırasında tüm gruplarda TAMB sayıları artmıştır. TAMB sayıları dalgalanma göstermekle birlikte en yüksek sayı

özellikle inkübasyonun son iki gününde bakteri inokülasyonu yapılan A2.1 grubunda gözlenmiştir. Bu gruptaki bakteri sayısı 4. ve 5. günlerde diğer gruplardan anlamlı olarak farklı bulunmuştur ($p<0,05$). Depolamanın başından sonuna kadar gruplarda TMAB sayılarının 2,24-2,93 log-birim arasında arttığı tespit edilmiştir.

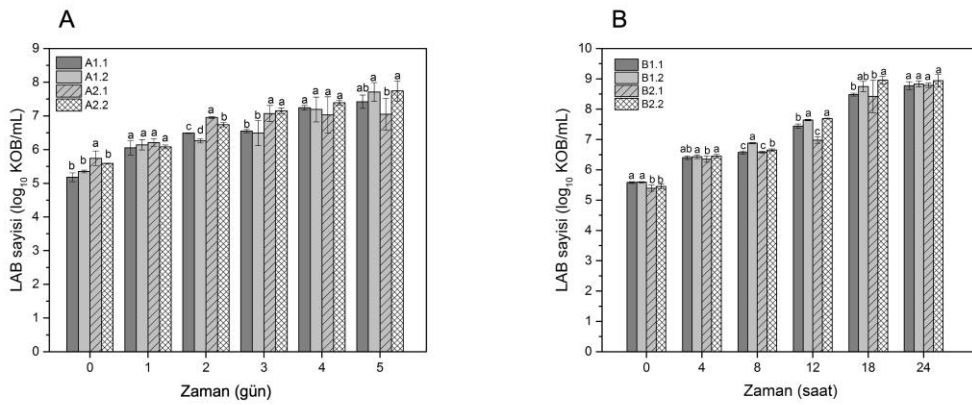
25°C’de inkübe edilen örneklerde ise, 24 saat sonunda B1.1 ve B1.2 gruplarında sırasıyla 3,20 ve 3,30 log birimlik artış gözlenmiştir. B2.1 ve B2.2 gruplarında ise TMAB sayılarında sırasıyla 3,09 ve 3,17 log-birimlik artış saptanmıştır. İnkübasyon sonucunda bakteriyofaj eklemesi yapılan ve yapılmayan gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Bakteriyofaj eklenen gruplardaki TMAB sayıları, diğerlerinden daha yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.70. 4°C’de 5 gün (A) ve 25°C’de 24 saat (B) süreyle inkübe edilen çiğ süt örneklerindeki TMAB sayıları

4°C’de 5 gün ve 25°C’de 24 saat süreyle inkübe edilen çiğ süt örneklerindeki LAB sayıları şekil 4.71’de verilmiştir. Buna göre, 4°C’de yapılan depolama sonucunda LAB sayıları A1.1 ve A1.2 gruplarında sırasıyla 2,24 ve 2,36 log-birimlik artış göstermiştir. Buna karşılık A2.1 ve A2.2 gruplarında sırasıyla 1,31 ve 2,15 log-birimlik artış görülmüştür. Bakteri inokülasyonu yapılmayan gruplarda LAB sayılarında daha düşük artışlar olduğu görülmüştür. Depolamanın 1. ve 4. günlerinde örnekler arasında anlamlı bir fark bulunmazken 5 günün sonunda örnek grupları arasında anlamlı farklar ($p<0,05$) görülmüş ve bakteriyofaj uygulaması yapılan gruplarda son günde LAB sayıları diğerlerinden daha yüksek çıkmıştır. Yalnızca bakteri inokülasyonu yapılan grupta ise LAB sayılarının daha düşük olduğu görülmüştür.

25°C’de gerçekleşen depolama sürecinde ise, 24 saat sonunda B1.1 ve B1.2 gruplarındaki LAB sayısında sırasıyla 3,19 ve 3,24 log-birimlik artış görülmüştür. Buna karşılık B2.1 ve B2.2 gruplarında 3,40 ve 3,49 log-birimlik artışlar saptanmıştır. İlk 4 saat içinde örnek grupları arasında ciddi farklar gözlenmezken, 8. saatten itibaren yalnızca bakteriyofaj eklenen grupta, 12. saatten itibaren de hem bakteri hem bakteriyofaj eklemesi yapılan grupta daha yüksek LAB sayıları saptanmıştır. Yalnızca *P. fluorescens* suşlarının eklendiği grupta, LAB sayısı diğerlerine göre daha düşük kalmıştır. 24. saate kadar, örnek grupları arasında anlamlı farklar görülürken, 24. saat itibariyle alınan örneklerdeki LAB sayıları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p<0,05$).



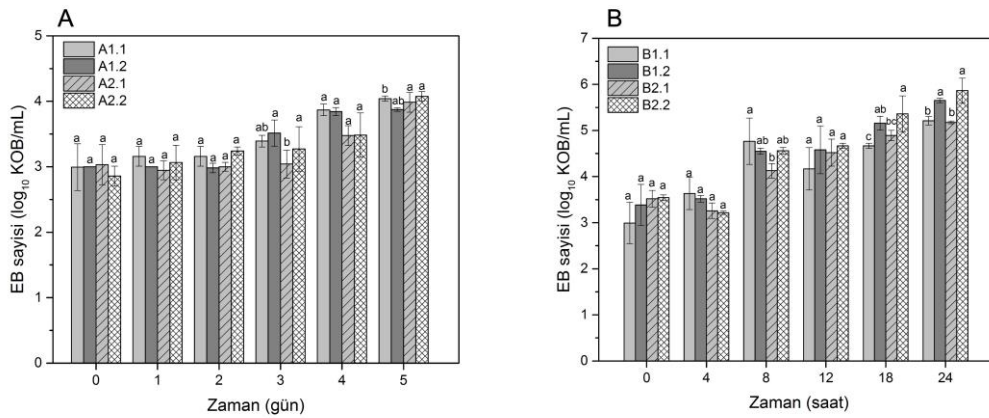
Şekil 4.71. 4°C’de 5 gün (A) ve 25°C’de 24 saat (B) süreyle inkübe edilen çiğ süt örneklerindeki LAB sayıları

Laktik asit bakterileri, çiğ sütte yaygın olarak bulunan bir bakteri grubudur. Sütün fermantasyonunda önemli bir rol oynar, fermente süt ürünlerinde arzu edilen tatların ve dokuların geliştirilmesine katkıda bulunurlar. Laktozu fermente eden bir bakteri grubu olan LAB, pastörizasyondan önce sığır, keçi, koyun ve manda sütünde baskın bir popülasyon olduğu bildirilmektedir. Sütte en yaygın LAB cinsleri arasında *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* ve *Enterococcus* bulunmaktadır [184]. 4°C’de ve 25°C’de yürütülen deneyler sonucunda, genel itibariyle *P. fluorescens* sayısının daha yüksek olduğu gruplarda LAB sayısının daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu durum, besin rekabeti ile açıklanabilmektedir. *Pseudomonas* ve LAB, çiğ sütte bulunan besinler için rekabet etmektedir. Özellikle uzun süreli soğutmalarda, *Pseudomonas* spp. çiğ sütün baskın mikroflorası haline gelmektedir, çünkü bu mikroorganizmalar, çiğ sütteki diğer gruplarla karşılaştırıldığında soğutma sıcaklıklarında çok daha kısa bir jenerasyon

süresine sahiptir [185]. Sonuç olarak, *Pseudomonas* çiğ sütte dominant hale gelmekte ve LAB'yi geride bırakarak bu grubun gelişmesini sınırlayabilmektedir. Literatürde de buna benzer durumlar rapor edilmiş ve besin rekabeti sebebiyle *P. fluorescens*'in *Escherichia coli* O157:H7'nin gelişimini baskıladığı tespit edilmiştir [186]. Bakteriyofaj eklemesi yapılan gruplarda da daha yüksek LAB sayısı elde edilmesi, bu durumu doğrulamıştır. Bakteriyofajların PF sayısını azaltmasını takiben, LAB de ortamda daha baskın hale gelebilmiştir.

4°C'de 5 gün ve 25°C'de 24 saat süreyle inkübe edilen çiğ süt örneklerindeki EB sayıları şekil 4.72'de verilmiştir. 4°C'de elde edilen sonuçlara göre, EB sayısı depolama sonunda A1.1 ve A1.2 gruplarında sırasıyla 1,05 ve 0,87 log-birim artarken; A2.1 ve A2.2 gruplarında sırasıyla 0,95 ve 1,22 log-birim artış göstermiştir. Örnek grupları arasında 0, 1, 2, ve 4. günlerde anlamlı bir fark bulunmazken son gün alınan örneklerde gruplar arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Yalnızca bakteriyofaj eklemesi yapılan grupta (A1.2) EB sayılarının daha düşük olduğu saptanmıştır.

25°C'de gerçekleşen depolamada ise, beklenildiği üzere EB sayıları 4°C'ye göre daha yüksek seyretmiştir. B1.1 ve B1.2 gruplarında 24 saat sonunda EB sayıları sırasıyla 2,22 ve 2,27 log-birimlik artış göstermiştir. Buna karşılık B2.1 ve B2.2 gruplarında sırasıyla 1,66 ve 2,32 log-birimlik artış görülmüştür. 24. saat örneklerinde bakteriyofaj eklemesi yapılan ve yapılmayan gruplar arasında anlamlı fark oluşmuştur ($p<0,05$). Özellikle 12. saat sonrasında bakteriyofaj eklemesi yapılan gruplarda daha yüksek EB sayıları elde edilmiştir.



Şekil 4.72. 4°C'de 5 gün (A) ve 25°C'de 24 saat (B) süreyle inkübe edilen çiğ süt örneklerindeki EB sayıları

Enterobacteriaceae, hem insanların hem de hayvanların bağırsaklarında doğal olarak bulunabilen büyük, heterojen bir Gram-negatif bakteri grubudur ve *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* gibi pek çok cinsi içine almaktadır. Bu cinsler çevrede yaygın olarak bulunmakta ve pek çok yolla sütü kontamine edebilmektedir [187]. *Enterobacteriaceae*, gıda endüstrisinde indikatör organizmalar olarak mikrobiyolojik kalite test edilirken hijyen durumunu değerlendirmek için etkili parametreler olarak kullanılmaktadır [188]. Oda sıcaklığında bakteriyofaj eklemesi yapılan gruplarda EB sayısının daha yüksek çıkmasının bir sebebi, bu gruplarda bakteriyofajların *P. fluorescens* sayısını düşürerek rekabeti azaltması ve bu sıcaklıklarda EB grubuna ait bakterilerin daha rahat şekilde gelişerek sayılarını artırabilmesi olabilir. 4°C’de sürdürülen depolamada ise, bakteriyofaj uygulamasının 4. güne kadar EB sayıları arasında önemli bir fark oluşturmadığı görülmüştür. Bu gruptaki bakterilerin, gıda kaynaklı patojenler de dahil olmak üzere çoğunun mezofilik olması ve dışkı kaynaklı *Enterobacteriaceae*’nın optimum gelişme sıcaklığının 37°C olması sebebiyle bu sıcaklıklarda popülasyonda baskın hale gelememesinin etkili olabileceği düşünülmüştür [189].

Çiğ sütün depolama sürecindeki mikrobiyal değişimleri takip eden diğer çalışmalarda da, bakteri dinamiklerinin farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir. Tek bir farklı suşun varlığının bile mikrobiyal denge üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir. Düşük sıcaklıklar sebebiyle, ilk numunede sayıca hayli düşük olabilen bazı bakteri türlerinin çoğalıp başlangıçta dominant olan türleri ortadan kaldırdığı görülmektedir [190]. Bir başka çalışmada, bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlara paralel olarak 4°C’de depolamanın ilk 48 saati boyunca toplam bakteri sayısı ve psikrotrof mikroorganizmaların sayısı düzenli olarak artarken, mezofilik laktik bakterilerdeki artışın daha sınırlı olduğu görülmüştür. Buna karşın 13-15°C’de yapılan depolamada 24 saatin sonunda mezofilik laktik bakterilerin sayısının psikrotrof grubundan daha yüksek olduğu saptanmıştır [191].

Süt ve süt ürünlerinde bakteriyofaj temelli kontrol stratejileri yoğun olarak çalışılmaktadır. Bakteriyofajlar ve faj kokteylleri pastörize ve UHT süte, farklı tipteki peynirler ve yoğurtlar ile peynir altı suyu ve teleme gibi ara ürünlere uygulanarak çeşitli mikroorganizma gruplarının kontrolü üzerine çalışmalar yürütülmüştür [192–196]. Bu uygulamaların bakterilerin biyokontrolündeki başarısı değişkenlik göstermektedir.

Gıdanın fiziksel yapısı ve kompleks içeriği hem bakteriyofajlar üzerine direkt olarak etki edebilmekte, hem de bakteri-faj etkileşimine etkisi üzerinden dolaylı olarak uygulamanın seyrini değiştirebilmektedir. Süt ile yapılan çalışmalarda genel olarak, çiğ sütteki bakteriyel eliminasyonun UHT ve diğer ısı işlem görmüş sütlere göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Örneğin bir çalışmada çiğ sütte faj uygulaması ile *Staphylococcus aureus* sayısında azalma sağlanamazken 90°C’de ısı işlem görmüş sütte 7,2 log birimlik redüksiyon elde edilmiştir [195]. Bu sonuçlara paralel olarak, mevcut çalışma kapsamında da UHT süt denemelerinde elde edilen bakteriyel redüksiyonun, çiğ süte göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Hem sıvı hem de jel formdaki süt ürünlerinde pastörizasyon, homojenizasyon, uygulama yöntemi, MOI ve depolama koşullarının faj aktivitesinde belirleyici olduğu belirtilmiştir. Genel olarak, sıvı ürünlerde bakterinin eliminasyonunun daha yüksek başarıyla elde edilebildiği ortaya konmuştur. Daha yüksek sertlik ve viskozite değerlerine sahip ürünlerde, bakteri-bakteriyofaj etkileşiminin kısıtlanması sebebiyle aktivitenin kısıtlandığı düşünülmektedir [117]. Bu koşullara ek olarak, sütün kompleks içeriğindeki majör ve minör bileşenlerin de direkt ya da indirekt olarak bakteriyofaj aktivitesine etki ettiği bildirilmiştir. Örneğin süt proteinleri ile bakteriyofajlar arasındaki etkileşimleri konu edinen az sayıda çalışmada, bakteriyofajların özellikle kazein fraksiyonu ile etkileşiminin yüksek düzeyde olduğu, ortam pH’ının ya da homojenizasyon koşullarının değişmesi ile, kazeindeki değişimlere paralel olarak faj geri kazanımının ve afinitesinin de değiştiği ortaya konulmuştur [117,197,198]. Sütteki lipidler ile bakteriyofaj etkileşimi üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, süt yağı globüllerindeki yapısal değişikliklerin bakteriyofajların hem aktivitesini hem de bağlanmasını etkilediğini göstermektedir. Bu çalışmalarda, yağ oranı düşük olan ya da yağsız formülasyonlarda bakteriyel redüksiyonun ve bakteriyofaj geri kazanımının arttığı tespit edilmiştir [117,192,195]. Mevcut tez çalışması kapsamında da, yağsız sütte yağlı süte oranla daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bakteriyofajlar ile sütteki karbonhidratlar arasındaki etkileşim üzerine detaylı çalışmalar bulunmasa da, bakteriyofajların bakteri hücresinde bağlandığı reseptörlere benzer yapıdaki oligosakkaritlerin ya da çeşitli glikoproteinlerin bakteriyofaj bağlanmasına neden olarak faj-bakteri etkileşimini kısıtlayabileceğine yönelik öngörüler bulunmaktadır. Sütte bulunan antikörlerin ya da diğer bazı biyoaktif

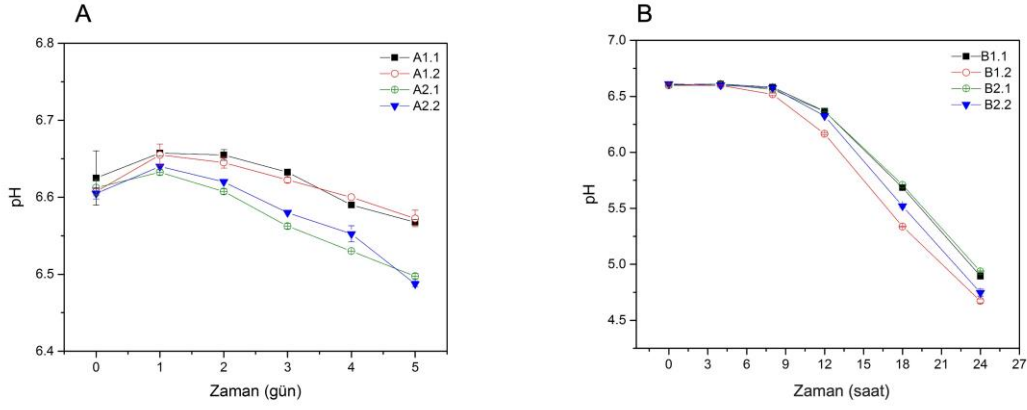
moleküllerin de hem antiviral etkiler hem de faj-bakteri etkileşimini kısıtlama yoluyla bakteriyofajların etkinliğinde kısıtlamalara yol açabileceği bildirilmektedir [117].

Tüm bu sonuçlar, bakteriyofaj çalışmalarında gerçek örnek denemelerinin önemli bir yer tuttuğunu göstermektedir. Çünkü bakteriyofajların aktivitesi ve bakteriyofaj-bakteri etkileşimi içeriksel ve çevresel koşullara göre değişebilmektedir. Bu sebeple oluşturulan bakteriyofaj kokteyllerinin etkinliği hedef ortamlarda test edilmelidir. Bu amaçla çalışma kapsamında izole edilip karakterizasyonları tamamlanan bakteriyofajlardan hazırlanan bakteriyofaj kokteyllinin etkinliği, çiğ süt örneklerinde ve farklı depolama koşullarında izlenmiştir. Literatürde direkt olarak çiğ sütte gerçekleştirilen denemelerin sayısı çok kısıtlıdır. Bu çalışma kapsamında hem bu konudaki eksiklik giderilmiş, hem de çiğ sütteki hedef mikroorganizma grubu dışındaki bakteri gruplarının da sayısı takip edilmiş, böyle bakteriyofaj kokteyllinin etkisini daha kapsamlı olarak değerlendirmek mümkün olmuştur.

4.5.2.2 pH ve Titrasyon Asitliği

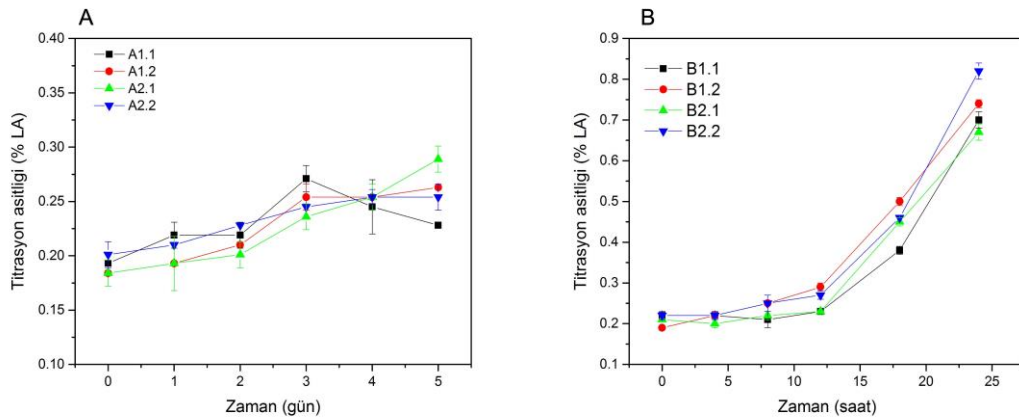
4°C’de 5 gün ve 25 °C’de 24 saat süreyle depolanan çiğ süt örneklerinin pH değerleri Şekil 4.73’te verilmiştir. Bu sonuçlara göre, 4°C’de 5 günlük depolama sonucunda, A1.1 ve A1.2 gruplarının pH değerlerinde sırasıyla 0,06 ve 0,04 birimlik düşüş gözlenirken, A2.1 ve A2.2 gruplarının ikisinde de 0,12 birimlik düşüş gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, depolama sonunda PF inokülasyonu yapılan ve hem PF inokülasyonu hem de bakteriyofaj eklemesi yapılan grupta daha düşük pH değerleri elde edilmiştir.

25°C’de 24 saat süreyle gerçekleştirilen depolama sonucunda B11.1 ve B1.2 gruplarında sırasıyla 1,71 ve 1,93 birimlik pH düşüşü gözlenirken, B2.1 ve B2.2 gruplarında sırasıyla 1,66 ve 1,86 birimlik pH düşüşü gözlenmiştir. Depolama sonunda örneklerin pH değerlerinin 4,67 ile 4,94 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, bakteriyofaj eklemesi yapılan gruplardaki pH değerlerinin diğerlerine kıyasla daha düşük olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.73. 4°C’de 5 gün (A) ve 25°C’de 24 saat süreyle depolanan çiğ süt örneklerinin pH değerleri

4°C’de 5 gün ve 25°C’de 24 saat süreyle depolanan çiğ süt örneklerinin titrasyon asitliği değerleri Şekil 4.74’te verilmiştir. Buna göre 4°C’de gerçekleşen depolama sonucunda A1.1 ve A1.2 gruplarında titrasyon asitliği değeri sırasıyla 0,04 ve 0,08 birim artarken; A2.1 ve A2.2 gruplarında sırasıyla 0,11 ve 0,05 birim artmıştır. 5 günün sonunda en yüksek titrasyon asitliği değeri yalnızca PF inokülasyonu yapılan grupta elde edilmiştir. 25°C’de gerçekleşen depolama sonucunda ise B1.1 ve B1.2 gruplarında titrasyon asitliği değeri sırasıyla 0,48 ve 0,55 birim artarken; B2.1 ve B2.2 gruplarında sırasıyla 0,46 ve 0,60 birim artmıştır.



Şekil 4.74. 4°C’de 5 gün (A) ve 25°C’de 24 saat süreyle depolanan çiğ süt örneklerinin titrasyon asitliği değerleri

Literatürde benzer bir çalışmada farklı sıcaklıklarda depolama sırasında *Pseudomonas fluorescens* inoküle edilmiş çiğ ve sterilize sütte titrasyon asitliği takip edilmiştir. Bu çalışmadaki verilere paralel şekilde, 4°C’de sütte titrasyon asitliğinin bir miktar arttığı ve bu artışın 10°C’de daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durum, artan protein hidrolizinin amino asit miktarını artırması, bunun da biyojenik aminlerin oluşumuna yol açmasıyla açıklanmıştır. Çiğ süt için 10°C’de titrasyon asitliği ile toplam amin seviyeleri arasında anlamlı pozitif korelasyon gözlenmiştir. Buna ek olarak, titrasyon asitliği ile proteolitik aktivite arasında da önemli bir korelasyon gözlenmiştir [199]. Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar, çiğ süte bakteri eklenmesi ve faj kokteyli uygulanması sonucu süütün kompleks mikrobiyal yapısında gerçekleşen dalgalanmalara paralel olarak, pH ve titrasyon asitliği değerlerinde de minimal değişimler oluşabileceğini göstermiştir. Bu durum da, bakteriyofajlarla yürütülen çalışmalarda, gıda üzerindeki etkilerin daha bütüncül ve detaylı bir yaklaşımla incelenmesinin gerekli olduğunu ortaya koymuştur.

4.5.2.3. Briks Değerleri

pH ve titrasyon asitliğine ek olarak çalışma kapsamında, bakteriyofaj kokteyli uygulanan çiğ süt örneklerinin 4°C’deki hem de 25°C’deki Briks değerleri de depolama süresince takip edilmiştir. Briks değerlerindeki değişim aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 4.20. 4°C’de 5 gün boyunca depolanan çiğ süt örneklerinin Briks değerleri

| Örnek | Zaman (gün) | | | | | |
|-------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| A1.1 | 9,63±0,05 ^c | 9,75±0,06 ^b | 9,65±0,06 ^b | 9,68±0,05 ^{bc} | 9,68±0,05 ^{bc} | 9,60±0,00 ^b |
| A1.2 | 9,95±0,06 ^a | 9,83±0,05 ^b | 10,00±0,12 ^a | 9,88±0,15 ^a | 9,80±0,00 ^{ab} | 9,95±0,06 ^a |
| A2.1 | 9,73±0,10 ^{bc} | 9,78±0,15 ^b | 9,80±0,23 ^{ab} | 9,60±0,00 ^c | 9,63±0,21 ^c | 7,75±0,13 ^c |
| A2.2 | 9,83±0,10 ^b | 10,13±0,15 ^a | 9,88±0,15 ^{ab} | 9,75±0,06 ^{ab} | 9,85±0,06 ^a | 9,85±0,17 ^a |

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak gösterilmiş olup, farklı üst simgeler ilgili sütunda farklı örnek gruplarının renk değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bir fark olduğunu göstermektedir.

4°C’de 5 gün boyunca gerçekleştirilen depolama sonucunda, A1.1, A1.2 ve A2.2 gruplarında Briks değerinde ciddi bir değişim gözlenmezken 5. gün itibariyle A2.1 grubunda belirgin bir düşüş gözlenmiştir.

Çizelge 4.21. 25°C’de 24 saat boyunca depolanan çiğ süt örneklerinin Briks değerleri

| Örnek | Zaman (saat) | | | | | |
|-------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | 0 | 4 | 8 | 12 | 18 | 24 |
| B1.1 | 9,75±0,06 ^a | 9,75±0,12 ^b | 9,75±0,06 ^b | 9,80±0,00 ^b | 9,85±0,06 ^b | 9,93±0,13 ^a |
| B1.2 | 9,83±0,43 ^a | 9,90±0,23 ^{ab} | 9,90±0,12 ^a | 9,90±0,12 ^b | 9,88±0,05 ^b | 7,75±0,24 ^b |
| B2.1 | 9,95±0,17 ^a | 10,18±0,26 ^a | 9,73±0,10 ^b | 9,80±0,14 ^b | 10,60±0,12 ^a | 9,78±0,10 ^a |
| B2.2 | 9,85±0,17 ^a | 10,00±0,12 ^a | 9,75±0,06 ^b | 10,15±0,17 ^a | 9,95±0,06 ^b | 7,98±0,95 ^b |

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak gösterilmiş olup, farklı üst simgeler ilgili sütunda farklı örnek gruplarının renk değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bir fark olduğunu göstermektedir.

25°C’de 24 saat boyunca gerçekleştirilen depolama sonucunda, B1.2 ve B2.2 gruplarında 24. saat itibariyle belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Briks değerleri, sütte toplam çözünür kuru maddenin bir göstergesidir ve çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir. Depolama süresi boyunca, sütteki asitlik artışına paralel olarak kazein misel bileşimindeki değişiklikler nedeniyle sütte toplam çözünür kuru maddenin azaldığı belirtilmiştir [200]. Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar da bu durumu desteklemektedir. 4°C’de en yüksek titrasyon asitliği değerlerinin elde edildiği grup olan A2.1’de Briks değerinin diğer gruplardan belirgin şekilde düşük olduğu gözlenmiştir. 25°C’de ise B2.2 ve B1.2 gruplarında daha yüksek titrasyon asitliği değerleri elde edilmiş ve bu gruplarda Briks değerleri diğerlerine göre daha düşük bulunmuştur. Sütün Briks değerinin, kazein miselleri ile de direkt olarak ilişkili olabildiği bildirilmektedir. Yüksek basınç işleminin keçi sütüne etkilerini araştıran bir çalışmada, 200 MPa gibi görece daha düşük basınç uygulamasında kazein misellerinin bozulmasının sütte Briks artışına sebep olabileceği, fakat daha yüksek (400-600 MPa) basınç altında kazein misellerinin dinamik assosiyasyonu ve dissosiyasyonu nedeniyle sütün toplam çözünür katı içeriğinin azalabileceği bildirilmiştir [201–203]. Bunun dışında, süt proteinlerinin çeşitli faktörlerin etkisi altında çözünebilir proteinlere parçalanmasından kaynaklı olarak da Briks değerinin artabileceği bildirilmiştir [204]. Araştırmalar sonucunda, süt asitleşmesine eşlik eden tüm değişikliklerin toplam katı madde içeriğiyle ve bununla bağlantılı olarak

kazein misel bileşimindeki farklılıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir [200]. Sütteki kazein misellerinin, *Pseudomonas fluorescens* tarafından üretilen proteazların (AprX) etkisiyle fizikokimyasal modifikasyonlara uğradığı bilinmektedir. Özellikle α s1-, α s2-, β - ve κ -kazeinlerin hidrolize edilmesi sonucu kazein destabilizasyonu gözlemlenmektedir. *P. fluorescens* proteazını içeren sütlerde depolama boyunca kazein ve protein niteliğinde olmayan azotlu bileşen içeriklerinin ciddi bir artış gösterdiği belirtilmiştir [205]. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda, bu bakterinin sayısının yükseldiği ve enzim üretebilecek seviyelere geldiği süt örneklerinde toplam çözünür kuru madde miktarlarının da değişiklik gösterebileceği ortaya çıkmaktadır.

4.5.2.4. Renk

Tez çalışması kapsamında, bakteriyofaj uygulaması yapılmış ve yapılmamış çiğ süt numunelerinin hem 4°C'deki hem de 25°C'deki renk değerleri de depolama süresince takip edilmiş. İlgili değerler aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Çizelge 4.22. 4°C'de 5 gün boyunca depolanan çiğ süt örneklerinin renk değerleri

| Örnek | Zaman (gün) | | | | | | |
|-------|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| A1.1 | L | 75,48±1,19 ^a | 75,70±0,95 ^a | 75,69±0,93 ^a | 75,33±1,34 ^a | 75,37±1,30 ^a | 75,54±0,92 ^a |
| | a* | -2,69±0,12 ^a | -2,63±0,08 ^a | -2,65±0,09 ^a | -2,65±0,12 ^a | -2,66±0,14 ^a | -2,60±0,09 ^a |
| | b* | -0,77±0,11 ^a | -0,58±0,04 ^a | -0,51±0,04 ^a | -0,41±0,09 ^a | -0,44±0,12 ^b | 0,29±0,03 ^a |
| A1.2 | L | 75,55±1,05 ^a | 75,18±1,50 ^a | 75,50±0,92 ^a | 75,39±1,38 ^a | 75,25±1,12 ^a | 75,61±1,01 ^a |
| | a* | -2,69±0,09 ^a | -2,61±0,12 ^a | -2,61±0,07 ^a | -2,65±0,13 ^a | -2,66±0,12 ^a | -2,62±0,09 ^a |
| | b* | -0,72±0,06 ^a | -0,57±0,02 ^a | -0,43±0,29 ^a | -0,34±0,08 ^a | -0,03±0,06 ^a | 0,28±0,06 ^a |
| A2.1 | L | 75,97±1,23 ^a | 75,80±0,90 ^a | 75,59±0,89 ^a | 75,55±1,46 ^a | 75,35±1,07 ^a | 75,33±1,12 ^a |
| | a* | -2,70±0,13 ^a | -2,62±0,07 ^a | -2,63±0,06 ^a | -2,76±0,15 ^a | -2,72±0,16 ^a | -2,56±0,07 ^a |
| | b* | -0,79±0,08 ^a | -0,55±0,03 ^a | -0,40±0,05 ^a | -0,40±0,08 ^a | -0,13±0,16 ^a | 0,33±0,04 ^a |
| A2.2 | L | 75,77±1,41 ^a | 74,76±2,35 ^a | 75,62±1,07 ^a | 75,18±1,26 ^a | 75,48±1,24 ^a | 75,34±1,00 ^a |
| | a* | -2,76±0,13 ^a | -2,62±0,13 ^a | -2,70±0,12 ^a | -2,68±0,13 ^a | -2,70±0,11 ^a | -2,62±0,08 ^a |
| | b* | -0,71±0,06 ^a | -0,55±0,03 ^a | -0,51±0,07 ^a | -0,36±0,08 ^a | -0,11±0,03 ^a | 0,31±0,02 ^a |

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak gösterilmiş olup, farklı üst simgeler ilgili sütunda farklı örnek gruplarının renk değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.23. 25°C’de 24 saat boyunca depolanan çiğ süt örneklerinin renk değerleri

| Örnek | Zaman (saat) | | | | | | |
|-------|--------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 0 | 4 | 8 | 12 | 18 | 24 | |
| B1.1 | <i>L</i> | 76,11±0.83 ^a | 76,47±1,27 ^a | 76,51±1,05 ^a | 76,64±1,40 ^a | 76,91±1,18 ^a | 77,74±1,40 ^a |
| | <i>a</i> * | -2,71±0.08 ^a | -2,66±0,11 ^a | -2,64±0,09 ^a | -2,62±0,13 ^a | -2,56±0,08 ^a | -2,41±0,08 ^a |
| | <i>b</i> * | -0,77±0.04 ^a | -0,56±0,04 ^a | -0,52±0,04 ^a | -0,43±0,09 ^a | -0,24±0,12 ^b | 0,28±0,03 ^{ab} |
| B1.2 | <i>L</i> | 76,09±0.92 ^a | 75,73±0,92 ^a | 75,84±1,24 ^a | 75,96±1,31 ^a | 76,31±1,05 ^a | 76,73±1,52 ^a |
| | <i>a</i> * | -2,73±0.10 ^a | -2,77±0,09 ^a | -2,80±0,12 ^a | -2,85±0,13 ^a | -2,78±0,09 ^a | -2,31±0,04 ^a |
| | <i>b</i> * | -0,72±0.06 ^a | -0,57±0,02 ^a | -0,43±0,29 ^a | -0,34±0,08 ^a | -0,03±0,06 ^a | 0,28±0,06 ^a |
| B2.1 | <i>L</i> | 76,00±1.02 ^a | 76,28±1,39 ^a | 75,92±1,16 ^a | 76,04±1,41 ^a | 76,39±1,16 ^a | 77,20±1,29 ^a |
| | <i>a</i> * | -2,74±0.10 ^a | -2,70±0,12 ^a | -2,71±0,11 ^a | -2,75±0,11 ^a | -2,74±0,09 ^a | -2,52±0,11 ^a |
| | <i>b</i> * | -0,67±0.08 ^a | -0,76±0,03 ^a | -0,77±0,05 ^a | -0,75±0,08 ^a | -0,13±0,16 ^a | 0,24±0,04 ^b |
| B2.2 | <i>L</i> | 76,28±1.16 ^a | 75,52±1,24 ^a | 74,74±1,76 ^a | 74,97±1.83 ^a | 76,34±1,08 ^a | 77,52±1,00 ^a |
| | <i>a</i> * | -2,73±0.10 ^a | -2,69±0,11 ^a | -2,69±0,13 ^a | -2,76±0.11 ^a | -2,79±0,09 ^a | -2,38±0,10 ^a |
| | <i>b</i> * | -0,72±0,04 ^a | -0,74±0,08 ^a | -0,76±0,03 ^a | -0,77±0,03 ^a | -0,74±0,03 ^a | 0,36±0,02 ^{ab} |

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak gösterilmiş olup, farklı üst simgeler ilgili sütunda farklı örnek gruplarının renk değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bir fark olduğunu göstermektedir.

Bakteriyofaj uygulamalarında, bakteriyofajların gıdaların çeşitli özellikleri üzerindeki etkilerini incelemek de çok önemlidir. Tez çalışması kapsamında, hem 4°C’de 5 gün, hem de 25°C’de 24 saat boyunca depolama sürecinde bakteriyofaj uygulanmış çiğ süt örneklerinin renk bakımından uygulanmayan kontrol gruplarına göre önemli bir farklılık saptanmamıştır. Önceki çalışmalar da bakteriyofajların gıdaların organoleptik özellikleri üzerinde olumsuz etkilerinin olmadığını göstermiştir [206,207]. Bakteriyofajlar bu açıdan, sütün renk değerlerinde belirgin değişimlerin görülmesine neden olan bazı diğer antimikrobiyal uygulamaların önüne geçmektedir [208]. Bu bağlamda, çalışma kapsamında kullanılan bakteriyofajların, sütün tüketici tarafından kabul edilebilirliğinde rol oynayacak özelliklerini olumsuz etkilemeden mikrobiyal kaliteyi korumada kullanım potansiyeline sahip olduğu saptanmıştır.

5. YORUM

Patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmalar, tüketici sağlığı, ürün kalitesi, raf ömrü ve gıda işletmelerinin itibarı gibi konularda önemli riskler oluşturmaktadır. Uygun hijyen uygulamaları, sıcaklık kontrolü ve kimyasal temelli koruma teknikleri gibi kontrol önlemleri, bu riskleri azaltmak ve gıda ürünlerinin güvenliğini sağlamak için uygulansa da bu bakterilerin neden olduğu sorunların önüne tamamen geçebilmek mümkün olmamakta, bu alanda alternatif kontrol yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Buna ek olarak, son yıllarda tüketicilerin de çevreyi ve insan sağlığını etkileyecek kimyasal ve koruyucuları içermeyen ürün talepleri giderek artmaktadır. Son yıllarda bakteriyofajlar ve faj terapi kavramı da bu arayışlara cevap veren önemli bir alternatif olarak ortaya çıkmış, fajların her alanda kullanımı ve piyasaya sürülen faj ürünlerinin sayısı büyük artış göstermiştir. Bu tez çalışması kapsamında, mevcut ihtiyaca yönelik olarak, çiğ sütte önemli etkileri olan patojen *Salmonella* ve bozulma etmeni *Pseudomonas fluorescens* bakterilerinin biyokontrolü amacıyla bakteriyofajların kullanılabilirliğinin ortaya konması amaçlanmıştır. Bu amaçla başta yerel *Pseudomonas fluorescens* kompleks suşları olmak üzere *Pseudomonas putida* ile *Pseudomonas fragi* suşları ve bu suşlara etkili bakteriyofajlar izole ve karakterize edilmiş, daha önceki çalışmalar kapsamında izole edilmiş olan *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium bakteriyofajlarının ayrıntılı karakterizasyonu tamamlanmıştır. Bakteriyofaj ile biyokontrol uygulamalarında yerel bir bakteriyofaj koleksiyonunun oluşturulması, bu bakteriyofajların etkili olduğu bakteri grubuna ulaşmayı kolaylaştırmaktadır. Dolayısıyla bu çalışma ile ülkemize özgü *Pseudomonas fluorescens* ve *Salmonella* bakteriyofajlarının bulunduğu yeni bir koleksiyon oluşturulmuştur. Gıda sektöründe kullanılan ticari bakteriyofaj miksları arasında süt ve süt ürünlerinde psikrotrof bakterilerin eliminasyonuna yönelik bir ürün bulunmadığı görülmektedir. Söz konusu çalışma kapsamında biyokontrol ajanı olarak tanımlanacak bakteriyofaj kokteyllerinin oluşturulması ve etkinliklerinin ortaya konmasıyla, ticari bir ürün tasarısının ilk adımları da atılmıştır. Buna ek olarak, yerel suşlar kullanılarak izole edilen bakteriyofajlar arasında tüm genom analizi ile daha önce tanımlanmamış yeni bir bakteriyofaj bulunması durumu literatüre önemli bir katkı sağlamıştır. Ayrıca çalışılan bakteriyofajlarda antibiyotik direnç geni ve/veya virülens gen bulunmaması, bu bakteriyofajların sanayide rahatlıkla kullanılabileceğini göstermiştir.

Bakteriyofaj ve bakteri arasındaki etkileşimleri anlamak, faj tabanlı biyokontrol uygulamalarında önemli bir konudur. Laboratuvar ortamında optimum koşullar sağlanarak deneyler yapıldığından bakteriyofaj-bakteri etkileşimi maksimuma çıkarılmaktadır. Ancak farklı bakteriyofaj uygulamalarında gerçek ortam söz konusu olduğunda bu etkileşim aynı şekilde ve aynı hızda gerçekleşmemektedir. Sıcaklık, pH ve iyon dağılımı gibi çevresel faktörler bakteriyofaj-bakteri etkileşimini önemli ölçüde etkilemektedir. Ayrıca gıda güvenliği çerçevesinde yürütülen faj uygulamalarında bakteriyofaj-bakteri etkileşimi, gıdanın kimyasal bileşimine (karbonhidrat, protein ve yağ yapısı gibi) ve fiziksel özelliklerine (sıcaklık, pH gibi) bağlı olarak değişmektedir. Bu bileşenler bazen bu etkileşimi olumsuz etkilerken bazen de bakteriyofaj stabilitesini artırarak uygulamaları olumlu yönde etkilemektedir. Bu nedenle bakteriyofaj uygulamalarında etkinliği maksimum seviyede tutabilmek için bu etkileşimin çevresel faktörlerden nasıl etkilendiğinin araştırılması gerekmektedir. Buna ek olarak, bakteriyofajların çiğ sütün mikrobiyotasına ve fizikokimyasal özelliklerine etkisinin de daha detaylı incelenebilmesi amacıyla çalışmalar yürütülmesi, uygulamaların tüm boyutlarıyla ortaya konabilmesi adına önemlidir. Böylece bakteriyofajların gıdalarda maksimum verimle çalışması için gereken optimum koşullar belirlenebilecek ve fajların gıda sektöründe daha etkin kullanılmasının önü açılacaktır. Bu çalışma kapsamında hem farklı yağ içeriklerine sahip UHT sütlerde, hem de çiğ sütte farklı sıcaklık koşullarında faj etkinlik denemeleri gerçekleştirilerek süt içeriğinin ve çevresel özelliklerin faj aktivitesi üzerindeki etkisi takip edilmiş ve literatürü destekleyen sonuçlar elde edilmiştir. Buna ek olarak, bakteriyofajların gıdada yalnızca hedef mikroorganizma grubu üzerine etkilerini araştıran çalışmaların aksine, bu tez çalışmasıyla faj uygulamasını takiben çiğ sütteki dominant grupların değişimi de izlenmiştir. Aynı zamanda sütün fiziksel ve kimyasal yapısındaki değişimler de tespit edilerek, bakteriyofaj etkisine dair daha kapsamlı bir tablo ortaya konulmuştur.

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar, izole edilerek karakterizasyon aşamaları tamamlanmış bakteriyofajların hem UHT hem de çiğ sütte *Salmonella* ve *Pseudomonas fluorescens* suşlarının biyokontrolü için önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Ülkemizin faj terapi konusunda söz sahibi olması ve global olarak giderek büyüyen bu pazarda kendine bir yer edinebilmesi için özellikleri bilinen ve çok çeşitli kaynaklardan izole edilip farklı karakteristikler gösteren bir bakteriyofaj koleksiyonuna sahip olabilmesi kritik önem teşkil etmektedir. Söz konusu çalışma ile bu

anlamda önemli kazanımlar elde edilmiş, ülkemizdeki bakteriyofaj ve faj terapi uygulamaları ile ilgili var olan bilgi birikimine katkı sağlanmıştır. Bakteriyofajların gıda endüstrisinde daha yaygın kullanılmasıyla ve gıdanın hem mikrobiyal, hem de fiziksel ve kimyasal yapısına etkilerinin çok daha detaylı bir şekilde araştırılmasıyla birlikte bakterilerle mücadelede daha etkili, daha çevreci ve ekonomik yaklaşımların geliştirilebileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] P.C. Pereira, Milk nutritional composition and its role in human health, *Nutrition*. 30 (2014) 619–627.
- [2] Food and Agriculture Organization of the United Nations, *Dairy Market Review: Emerging trends and outlook 2022*, Rome, 2022.
- [3] Ulusal Süt Konseyi, 2021 Süt Raporu Dünya ve Türkiye’deki Süt Sektör İstatistikleri, Ankara, 2022. <https://ulusalsutkonseyi.org.tr/2021-sut-raporu-3927/>.
- [4] J.-H. Oh, M.-K. Park, Recent trends in Salmonella outbreaks and emerging technology for biocontrol of Salmonella using phages in foods: a review, *J. Microbiol. Biotechnol.* 27 (2017) 2075–2088.
- [5] K. Wessels, D. Rip, P. Gouws, Salmonella in chicken meat: Consumption, outbreaks, characteristics, current control methods and the potential of bacteriophage use, *Foods*. 10 (2021) 1742.
- [6] H.-M. Chen, Y. Wang, L.-H. Su, C.-H. Chiu, Nontyphoid Salmonella infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy, *Pediatr. Neonatol.* 54 (2013) 147–152.
- [7] J. Pławińska-Czarnak, K. Wódz, M. Kizerwetter-Świda, J. Bogdan, P. Kwieciński, T. Nowak, Z. Strzałkowska, K. Anusz, Multi-Drug Resistance to Salmonella spp. When Isolated from Raw Meat Products, *Antibiotics*. 11 (2022) 876.
- [8] E.F.S. Authority, E.C. for D.P. and Control, The European Union One Health 2021 Zoonoses Report, *EFSA J.* 20 (2022) e07666.
- [9] E.F.S. Authority, E.C. for D.P. and Control, The European Union one health 2020 zoonoses report, *EFSA J.* 19 (2021) e06971.
- [10] U. Samarasekera, Salmonella Typhimurium outbreak linked to chocolate, *Lancet Infect. Dis.* 22 (2022) 947.
- [11] K.-M. Lee, M. Runyon, T.J. Herrman, R. Phillips, J. Hsieh, Review of Salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety, *Food Control*. 47 (2015) 264–276.
- [12] D. VT Nair, K. Venkitanarayanan, A. Kollanoor Johny, Antibiotic-resistant Salmonella in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control, *Foods*. 7 (2018) 167.
- [13] C. de W Blackburn, P.J. McClure, *Foodborne pathogens: hazards, risk analysis and control*, Elsevier, 2009.
- [14] D. Samaržija, Š. Zamberlin, T. Pogačić, Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality, *Mljekarstvo*. 62 (2012) 77–95.
- [15] G.B. de Oliveira, L. Favarin, R.H. Luchese, D. McIntosh, Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know?, *Brazilian J. Microbiol.* 46 (2015) 313–

321.

- [16] S.G. Machado, F.L. da Silva, D.M.S. Bazzolli, M. Heyndrickx, P.M. de A. Costa, M.C.D. Vanetti, *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as predominant spoilers in cold raw milk, *J. Food Sci.* 80 (2015) M1842–M1849.
- [17] M. Brasca, M. Decimo, S. Morandi, S.G. Machado, F. Baglinière, M.C.D. Vanetti, Psychrotrophic bacteria, (2017).
- [18] M. von Neubeck, C. Baur, M. Krewinkel, M. Stoeckel, B. Kranz, T. Stressler, L. Fischer, J. Hinrichs, S. Scherer, M. Wenning, Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential, *Int. J. Food Microbiol.* 211 (2015) 57–65.
- [19] L. Meng, Y. Zhang, H. Liu, S. Zhao, J. Wang, N. Zheng, Characterization of *Pseudomonas* spp. and associated proteolytic properties in raw milk stored at low temperatures, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 2158.
- [20] T. Sørhaug, L. Stepaniak, Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects, *Trends Food Sci. Technol.* 8 (1997) 35–41.
- [21] S.G. Machado, F. Baglinière, S. Marchand, E. Van Coillie, M.C.D. Vanetti, J. De Block, M. Heyndrickx, The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 302.
- [22] L.P.M. Langeveld, F. Cuperus, The relation between temperature and growth rate in pasteurized milk of different types of bacteria which are important to the deterioration of that milk., *Netherlands Milk Dairy J.* 34 (1980) 106–125.
- [23] D.D. MUIR, The shelf-life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products, *Int. J. Dairy Technol.* 49 (1996) 24–32.
- [24] N. Datta, H.C. Deeth, Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk, *LWT-Food Sci. Technol.* 36 (2003) 173–182.
- [25] S.G. Anema, Age gelation, sedimentation, and creaming in UHT milk: A review, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 18 (2019) 140–166.
- [26] S. Dube, Age gelation within UHT milk, (2018).
- [27] Z. Hu, X.-C. Meng, F. Liu, Isolation and characterisation of lytic bacteriophages against *Pseudomonas* spp., a novel biological intervention for preventing spoilage of raw milk, *Int. Dairy J.* 55 (2016) 72–78.
- [28] S. Arslan, A. Eyi, F. Özdemir, Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses, *J. Dairy Sci.* 94 (2011) 5851–5856.
- [29] N.A. Andreani, M.E. Martino, L. Fasolato, L. Carraro, F. Montemurro, R. Mioni, P. Bordin, B. Cardazzo, Tracking the blue: a MLST approach to characterise the *Pseudomonas fluorescens* group, *Food Microbiol.* 39 (2014) 116–126.
- [30] V. De Jonghe, A. Coorevits, K. Van Hoorde, W. Messens, A. Van Landschoot, P.

- De Vos, M. Heyndrickx, Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 460–470.
- [31] N.A. Andreani, L. Carraro, L. Fasolato, S. Balzan, R. Lucchini, E. Novelli, B. Cardazzo, Characterisation of the thermostable protease AprX in strains of *Pseudomonas fluorescens* and impact on the shelf-life of dairy products: Preliminary results, *Ital. J. Food Saf.* 5 (2016).
- [32] L. Quintieri, L. Caputo, M. Brasca, F. Fanelli, Recent Advances in the Mechanisms and Regulation of QS in Dairy Spoilage by *Pseudomonas* spp., *Foods.* 10 (2021) 3088.
- [33] D. Zhang, S. Li, J. Palmer, K.H. Teh, S. Leow, S. Flint, The relationship between numbers of *Pseudomonas* bacteria in milk used to manufacture UHT milk and the effect on product quality, *Int. Dairy J.* 105 (2020) 104687.
- [34] D. Sinkel, H. Khouryieh, J.K. Daday, M. Stone, C. Shen, Knowledge and implementation of Good Agricultural Practices among Kentucky fresh produce farmers, *Food Prot. Trends.* 38 (2018) 111–121.
- [35] K. Ropkins, A.J. Beck, Evaluation of worldwide approaches to the use of HACCP to control food safety, *Trends Food Sci. Technol.* 11 (2000) 10–21.
- [36] C.A.F. De Oliveira, A.G. Da Cruz, P. Tavolaro, C.H. Corassin, Food Safety: Good manufacturing practices (GMP), sanitation standard operating procedures (SSOP), hazard analysis and critical control point (HACCP), in: *Antimicrob. Food Packag.*, Elsevier, 2016: pp. 129–139.
- [37] J.A. Troller, *Sanitation in food processing*, Academic Press, 2012.
- [38] M. Van Schothorst, M.H. Zwietering, T. Ross, R.L. Buchanan, M.B. Cole, Relating microbiological criteria to food safety objectives and performance objectives, *Food Control.* 20 (2009) 967–979.
- [39] M.M. Aung, Y.S. Chang, Temperature management for the quality assurance of a perishable food supply chain, *Food Control.* 40 (2014) 198–207.
- [40] E.C. do Nascimento, M.C. Sabino, L. da Roza Corguinha, B.N. Targino, C.C. Lange, C.L. de Oliveira Pinto, P. de Faria Pinto, P.M.P. Vidigal, A.S. Sant’Ana, H.M. Hungaro, Lytic bacteriophages UFJF_PfDIW6 and UFJF_PfSW6 prevent *Pseudomonas fluorescens* growth in vitro and the proteolytic-caused spoilage of raw milk during chilled storage, *Food Microbiol.* 101 (2022) 103892.
- [41] P. Munsch-Alatossava, O. Gursoy, T. Alatossava, Potential of nitrogen gas (N₂) to control psychrotrophs and mesophiles in raw milk, *Microbiol. Res.* 165 (2010) 122–132.
- [42] R. Gervilla, X. Felipe, V. Ferragut, B. Guamis, Effect of high hydrostatic pressure on *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* strains in ovine milk, *J. Dairy Sci.* 80 (1997) 2297–2303.

- [43] S. Kang, F. Kong, X. Shi, H. Han, M. Li, B. Guan, M. Yang, X. Cao, D. Tao, Y. Zheng, Antibacterial activity and mechanism of lactobionic acid against *Pseudomonas fluorescens* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its application on whole milk, *Food Control*. 108 (2020) 106876.
- [44] F. Pedonese, F. Fratini, L. Pistelli, F.M. Porta, P. Di Ciccio, R. Fischetti, B. Turchi, R. Nuvoloni, Antimicrobial activity of four essential oils against pigmenting *Pseudomonas fluorescens* and biofilmproducing *Staphylococcus aureus* of dairy origin, *Ital. J. Food Saf.* 6 (2017).
- [45] F. Guo, Q. Chen, Q. Liang, M. Zhang, W. Chen, H. Chen, Y. Yun, Q. Zhong, W. Chen, Antimicrobial activity and proposed action mechanism of linalool against *Pseudomonas fluorescens*, *Front. Microbiol.* 12 (2021) 562094.
- [46] A.M.I. Montone, M. Papaianni, F. Malvano, F. Capuano, R. Capparelli, D. Albanese, Lactoferrin, quercetin, and hydroxyapatite act synergistically against *Pseudomonas fluorescens*, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 9247.
- [47] R. Roila, R. Branciarri, D. Ranucci, R. Ortenzi, S. Urbani, M. Servili, A. Valiani, Antimicrobial activity of olive mill wastewater extract against *Pseudomonas fluorescens* isolated from mozzarella cheese, *Ital. J. Food Saf.* 5 (2016).
- [48] M. Sitohy, S. Mahgoub, A. Osman, Controlling psychrotrophic bacteria in raw buffalo milk preserved at 4 C with esterified legume proteins, *LWT-Food Sci. Technol.* 44 (2011) 1697–1702.
- [49] W.J. Lyon, J.K. Sethi, B.A. Glatz, Inhibition of psychrotrophic organisms by propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii*, *J. Dairy Sci.* 76 (1993) 1506–1513.
- [50] E.P. Black, A.L. Kelly, G.F. Fitzgerald, The combined effect of high pressure and nisin on inactivation of microorganisms in milk, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 6 (2005) 286–292.
- [51] A.L.D. de Alcântara, S.R. Bruzaroski, L.L. Luiz, C.H.B. de Souza, R.C. Poli-Frederico, R. Fagnani, E.H.W. de Santana, Antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* against *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* from raw milk, *J. Food Process. Preserv.* 43 (2019) e14082.
- [52] R.A. Ombarak, H. Mahrous, H. Hussien, Antibacterial activity of lactobacilli strains isolated from Laban Rayeb “Egyptian traditional fermented milk” against *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli* in vitro, *J. Curr. Vet. Res.* 1 (2019) 105–111.
- [53] S. Chang, A.R. Han, J.I. Reyes-De-Corcuera, J.R. Powers, D. Kang, Evaluation of steam pasteurization in controlling *Salmonella* serotype Enteritidis on raw almond surfaces, *Lett. Appl. Microbiol.* 50 (2010) 393–398.
- [54] B. Marcos, T. Aymerich, M. Garriga, Evaluation of high pressure processing as an additional hurdle to control *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in low-acid fermented sausages, *J. Food Sci.* 70 (2005) m339–m344.

- [55] C. Hertwig, A. Leslie, N. Meneses, K. Reineke, C. Rauh, O. Schlüter, Inactivation of *Salmonella* Enteritidis PT30 on the surface of unpeeled almonds by cold plasma, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 44 (2017) 242–248.
- [56] D. Ziuzina, S. Patil, P.J. Cullen, K.M. Keener, P. Bourke, Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce, *Food Microbiol.* 42 (2014) 109–116.
- [57] A.M. Adam, B. Yadav, A. Prasad, B. Gautam, Y. Tsui, M.S. Roopesh, *Salmonella* inactivation and rapid cooling of fresh cut apples by plasma integrated low-pressure cooling, *Food Res. Int.* 147 (2021) 110464.
- [58] A. Prasad, M. Gänzle, M.S. Roopesh, Inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella* using 365 and 395 nm high intensity pulsed light emitting diodes, *Foods.* 8 (2019) 679.
- [59] A. Calle, M. Fernandez, B. Montoya, M. Schmidt, J. Thompson, UV-C LED Irradiation Reduces *Salmonella* on Chicken and Food Contact Surfaces, *Foods.* 10 (2021) 1459.
- [60] M.H.F. Spoto, C.R. Gallo, A.R. Alcarde, M.S. do A. Gurgel, L. Blumer, J.M.M. Walder, R.E. Domarco, Gamma irradiation in the control of pathogenic bacteria in refrigerated ground chicken meat, *Sci. Agric.* 57 (2000) 389–394.
- [61] J.F.B. de São José, A.M. Ramos, M.C.D. Vanetti, N.J. de Andrade, Inactivation of *Salmonella* Enteritidis on cherry tomatoes by ultrasound, lactic acid, detergent, and silver nanoparticles, *Can. J. Microbiol.* 67 (2021) 259–270.
- [62] M. Zia, S. Gul, J. Akhtar, I. ul Haq, B.H. Abbasi, A. Hussain, S. Naz, M.F. Chaudhary, Green synthesis of silver nanoparticles from grape and tomato juices and evaluation of biological activities, *IET Nanobiotechnology.* 11 (2017) 193–199.
- [63] M.C. Erickson, J.-Y. Liao, A.S. Payton, P.W. Cook, K. Adhikari, S. Wang, J. Bautista, J.C.D. Pérez, Efficacy of acetic acid or chitosan for reducing the prevalence of *Salmonella*-and *Escherichia coli* O157: H7-contaminated leafy green plants in field systems, *J. Food Prot.* 82 (2019) 854–861.
- [64] D.O. Ukuku, Effect of sanitizing treatments on removal of bacteria from cantaloupe surface, and re-contamination with *Salmonella*, *Food Microbiol.* 23 (2006) 289–293.
- [65] N. Kondo, M. Murata, K. Isshiki, Efficiency of sodium hypochlorite, fumaric acid, and mild heat in killing native microflora and *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium DT104, and *Staphylococcus aureus* attached to fresh-cut lettuce, *J. Food Prot.* 69 (2006) 323–329.
- [66] S.-Y. Lee, M. Costello, D.-H. Kang, Efficacy of chlorine dioxide gas as a sanitizer of lettuce leaves, *J. Food Prot.* 67 (2004) 1371–1376.

- [67] A. Menconi, S. Shivaramaiah, G.R. Huff, O. Prado, J.E. Morales, N.R. Pumford, M. Morgan, A. Wolfenden, L.R. Bielke, B.M. Hargis, Effect of different concentrations of acetic, citric, and propionic acid dipping solutions on bacterial contamination of raw chicken skin, *Poult. Sci.* 92 (2013) 2216–2220.
- [68] M. Friedman, P.R. Henika, C.E. Levin, R.E. Mandrell, Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* in apple juice, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 6042–6048.
- [69] N. Mortazavi, J. Aliakbarlu, Antibacterial effects of ultrasound, cinnamon essential oil, and their combination against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* in milk, *J. Food Sci.* 84 (2019) 3700–3706.
- [70] B. Amrutha, K. Sundar, P.H. Shetty, Spice oil nanoemulsions: Potential natural inhibitors against pathogenic *E. coli* and *Salmonella* spp. from fresh fruits and vegetables, *LWT-Food Sci. Technol.* 79 (2017) 152–159.
- [71] J.S. Eom, J. Song, H.S. Choi, Protective effects of a novel probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* JSA22 from traditional fermented soybean food against infection by *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *J. Microbiol. Biotechnol.* 25 (2015) 479–491.
- [72] N.C. Gómez, J.M.P. Ramiro, B.X. V Quecan, B.D.G. de Melo Franco, Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation, *Front. Microbiol.* (2016) 863.
- [73] H. El-Sharkawy, A. Tahoun, A.M. Rizk, T. Suzuki, W. Elmonir, E. Nassef, M. Shukry, M.O. Germoush, F. Farrag, M. Bin-Jumah, Evaluation of *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* probiotics as alternative therapy for *Salmonella typhimurium* infection in broiler chickens, *Animals.* 10 (2020) 1023.
- [74] Z. Wang, X. Zhao, The application and research progress of bacteriophages in food safety, *J. Appl. Microbiol.* 133 (2022) 2137–2147.
- [75] S. Sharma, S. Chatterjee, S. Datta, R. Prasad, D. Dubey, R.K. Prasad, M.G. Vairale, Bacteriophages and its applications: an overview, *Folia Microbiol. (Praha).* (2016) 1–39. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0471-x>.
- [76] M. Breitbart, Marine viruses: truth or dare, *Ann. Rev. Mar. Sci.* 4 (2012) 425–448.
- [77] K.E. Williamson, M. Radosevich, K.E. Wommack, Abundance and diversity of viruses in six Delaware soils, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 3119–3125.
- [78] Y. Jin, W. Li, H. Zhang, X. Ba, Z. Li, J. Zhou, The Post-Antibiotic Era: A New Dawn for Bacteriophages, *Biology (Basel).* 12 (2023) 681.
- [79] J. Maniloff, Bacteriophages, in: ELS, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2012. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000773.pub3>.
- [80] Z. Hobbs, S.T. Abedon, Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with ‘Lytic or lysogenic,’ *FEMS Microbiol. Lett.* 363

- (2016).
- [81] D. Turner, A.N. Shkoporov, C. Lood, A.D. Millard, B.E. Dutilh, P. Alfenas-Zerbini, L.J. van Zyl, R.K. Aziz, H.M. Oksanen, M.M. Poranen, Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee, *Arch. Virol.* 168 (2023) 74.
- [82] E. Hankin, L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera, *Ann Inst Pasteur.* 10 (1896) 511.
- [83] N. Chanishvili, Phage therapy—history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches, *Adv. Virus Res.* 83 (2012) 3–40.
- [84] S. Sharma, S. Chatterjee, S. Datta, R. Prasad, D. Dubey, R.K. Prasad, M.G. Vairale, Bacteriophages and its applications: an overview, *Folia Microbiol. (Praha).* 62 (2017) 17–55.
- [85] F.W. Twort, An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses, *Acta Kravsi.* (1961).
- [86] M.F. d'Herelle, Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques, *Acta Kravsi.* (1961).
- [87] F.L. Gordillo Altamirano, J.J. Barr, Phage therapy in the postantibiotic era, *Clin. Microbiol. Rev.* 32 (2019) e00066-18.
- [88] A. Dublanchet, S. Bourne, The epic of phage therapy, *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 18 (2007) 15–18.
- [89] M.D. Eaton, S. Bayne-Jones, Bacteriophage therapy: review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections, *J. Am. Med. Assoc.* 103 (1934) 1769–1776.
- [90] A.P. KRUEGER, E.J. Scribner, The bacteriophage: its nature and its therapeutic use, *J. Am. Med. Assoc.* 116 (1941) 2269–2277.
- [91] W.C. Summers, History of phage research and phage therapy, *Phages Their Role Bact. Pathog. Biotechnol.* (2005) 1–17.
- [92] W.C. Summers, BACTERIOPHAGE THERAPY, *SGM ARv2 GJB Annu. Rev. Microbiol.* 1705 (2001) 437–51. <http://people.ibest.uidaho.edu/~etop/vgp/plasmidHistory/papers/BacteriophageTherapy-Summers2001.pdf> (accessed June 8, 2017).
- [93] E. Kutter, D. De Vos, G. Gvasalia, Z. Alavidze, L. Gogokhia, S. Kuhl, S.T. Abedon, Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11 (2010) 69–86.
- [94] A. Sulakvelidze, Z. Alavidze, J.G. Morris, Bacteriophage therapy, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 649–659.
- [95] S. Slopek, B. Weber-Dabrowska, M. Dabrowski, A. Kucharewicz-Krukowska, Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years

- 1981-1986., *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 35 (1987) 569.
- [96] S.T. Abedon, S.J. Kuhl, B.G. Blasdel, E.M. Kutter, Phage treatment of human infections, *Bacteriophage*. 1 (2011) 66–85. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>.
- [97] H.W. Smith, M.B. Huggins, K.M. Shaw, The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages, *Microbiology*. 133 (1987) 1111–1126.
- [98] A. Wright, C.H. Hawkins, E.E. Änggård, D.R. Harper, A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy, *Clin. Otolaryngol*. 34 (2009) 349–357.
- [99] P. Jault, T. Leclerc, S. Jennes, J.P. Pirnay, Y.-A. Que, G. Resch, A.F. Rousseau, F. Ravat, H. Carsin, R. Le Floch, Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial, *Lancet Infect. Dis*. 19 (2019) 35–45.
- [100] R.T. Schooley, B. Biswas, J.J. Gill, A. Hernandez-Morales, J. Lancaster, L. Lessor, J.J. Barr, S.L. Reed, F. Rohwer, S. Benler, Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection, *Antimicrob. Agents Chemother*. 61 (2017) e00954-17.
- [101] S.M. Sillankorva, H. Oliveira, J. Azeredo, Bacteriophages and their role in food safety, *Int. J. Microbiol*. 2012 (2012). <https://doi.org/10.1155/2012/863945>.
- [102] D. Gutiérrez, L. Rodríguez-Rubio, B. Martínez, A. Rodríguez, P. García, Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry, *Front. Microbiol*. 7 (2016) 825.
- [103] E.K. Tayyarcan, Biocontrol of foodborne pathogenic bacteria by using the combination of phage therapy and phytotherapy, Hacettepe University, 2017.
- [104] L. Fernández, S. Escobedo, D. Gutiérrez, S. Portilla, B. Martínez, P. García, A. Rodríguez, Bacteriophages in the dairy environment: From enemies to allies, *Antibiotics*. 6 (2017) 27.
- [105] Z. Moye, J. Woolston, A. Sulakvelidze, Bacteriophage applications for food production and processing, *Viruses*. 10 (2018) 205.
- [106] J.N. Housby, N.H. Mann, Phage therapy, *Drug Discov. Today*. 14 (2009) 536–540. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.03.006>.
- [107] M.K. Mirzaei, A.S. Nilsson, Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy, *PLoS One*. 10 (2015) e0118557.
- [108] S. Sillankorva, P. Neubauer, J. Azeredo, Isolation and characterization of a T7-like lytic phage for *Pseudomonas fluorescens*, *BMC Biotechnol*. 8 (2008) 80.

- [109] Y. Xiang, S. Wang, J. Li, Y. Wei, Q. Zhang, L. Lin, X. Ji, Isolation and characterization of two lytic cold-active bacteriophages infecting *Pseudomonas fluorescens* from the Napahai plateau wetland, *Can. J. Microbiol.* 64 (2017) 183–190.
- [110] A. Radhakrishnan, M. Ananthasubramanian, Characterization and lytic activity of *Pseudomonas fluorescens* phages from sewage, *Brazilian J. Microbiol.* 43 (2012) 356–362.
- [111] E.F. Boyd, Bacteriophage-encoded bacterial virulence factors and phage–pathogenicity island interactions, in: *Adv. Virus Res.*, Elsevier, 2012: pp. 91–118.
- [112] P.L. Wagner, M.K. Waldor, Bacteriophage control of bacterial virulence, *Infect. Immun.* 70 (2002) 3985–3993.
- [113] E.F. Boyd, H. Brüßow, Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved, *TRENDS Microbiol.* 10 (2002) 521–529.
- [114] R. Shannon, D.R. Radford, S. Balamurugan, Impacts of food matrix on bacteriophage and endolysin antimicrobial efficacy and performance, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60 (2020) 1631–1640.
- [115] J.J. Gill, P.M. Sabour, K.E. Leslie, M.W. Griffiths, Bovine whey proteins inhibit the interaction of *Staphylococcus aureus* and bacteriophage K, *J. Appl. Microbiol.* 101 (2006) 377–386.
- [116] M.C. Garcia-Anaya, D.R. Sepúlveda, C. Rios-Velasco, P.B. Zamudio-Flores, A. Romo-Chacón, C.H. Acosta-Muniz, Stability of listerial bacteriophage A511 in bovine milk fat globules, *Int. Dairy J.* 103 (2020) 104627.
- [117] M.C. García-Anaya, D.R. Sepulveda, A.I. Sáenz-Mendoza, C. Rios-Velasco, P.B. Zamudio-Flores, C.H. Acosta-Muñiz, Phages as biocontrol agents in dairy products, *Trends Food Sci. Technol.* 95 (2020) 10–20.
- [118] A.S. Abdelsattar, A. Safwat, R. Nofal, A. Elsayed, S. Makky, A. El-Shibiny, Isolation and characterization of bacteriophage ZCSE6 against *Salmonella* spp.: phage application in milk, *Biologics.* 1 (2021) 164–176.
- [119] R.R. Al-Hindi, M.G. Alharbi, I. Alotibi, S.A. Azhari, K.M. Algothmi, A. Esmael, Application of a novel lytic Jerseyvirus phage LPSent1 for the biological control of the multidrug-resistant *Salmonella* Enteritidis in foods, *Front. Microbiol.* 14 (2023).
- [120] S. Guenther, O. Herzig, L. Fieseler, J. Klumpp, M.J. Loessner, Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2, *Int. J. Food Microbiol.* 154 (2012) 66–72.
- [121] P. Zinno, C. Devirgiliis, D. Ercolini, D. Ongeng, G. Mauriello, Bacteriophage P22 to challenge *Salmonella* in foods, *Int. J. Food Microbiol.* 191 (2014) 69–74.
- [122] M. Islam, Y. Zhou, L. Liang, I. Nime, K. Liu, T. Yan, X. Wang, J. Li, Application

- of a phage cocktail for control of Salmonella in foods and reducing biofilms, *Viruses*. 11 (2019) 841.
- [123] W. Phongtang, G.-P. Choi, E. Chukeatirote, J. Ahn, Bacteriophage control of Salmonella Typhimurium in milk, *Food Sci. Biotechnol.* 28 (2019) 297–301.
- [124] R. Modi, Y. Hirvi, A. Hill, M.W. Griffiths, Effect of phage on survival of Salmonella enteritidis during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk, *J. Food Prot.* 64 (2001) 927–933.
- [125] M. Li, X. Chen, Y. Ma, Z. Li, Q. Zhao, Complete genome sequence of PFP1, a novel T7-like Pseudomonas fluorescens bacteriophage, *Arch. Virol.* 163 (2018) 3423–3426.
- [126] E.M. Adriaenssens, W. Mattheus, A. Cornelissen, O. Shaburova, V.N. Krylov, A.M. Kropinski, R. Lavigne, Complete genome sequence of the giant Pseudomonas phage Lu11, (2012).
- [127] A. Cornelissen, P.-J. Ceysens, V.N. Krylov, J.-P. Noben, G. Volckaert, R. Lavigne, Identification of EPS-degrading activity within the tail spikes of the novel Pseudomonas putida phage AF, *Virology*. 434 (2012) 251–256.
- [128] A.S. Glukhov, A.I. Krutilina, M.G. Shlyapnikov, K. Severinov, D. Lavyshev, V. V Kochetkov, J.W. McGrath, C. De Leeuwe, O. V Shaburova, V.N. Krylov, Genomic analysis of Pseudomonas putida phage tf with localized single-strand DNA interruptions, *PLoS One*. 7 (2012) e51163.
- [129] D.J. Magill, V.N. Krylov, O. V Shaburova, J.W. McGrath, C.C.R. Allen, J.P. Quinn, L.A. Kulakov, Pf16 and phiPMW: Expanding the realm of Pseudomonas putida bacteriophages, *PLoS One*. 12 (2017) e0184307.
- [130] D.E. Ellis, P.A. Whitman, R.T. Marshall, Effects of homologous bacteriophage on growth of Pseudomonas fragi WY in milk, *Appl. Microbiol.* 25 (1973) 24–25.
- [131] A. Valero-Rello, Diversity, specificity and molecular evolution of the lytic arsenal of Pseudomonas phages: in silico perspective, *Environ. Microbiol.* 21 (2019) 4136–4150.
- [132] S. Sillankorva, P. Neubauer, J. Azeredo, Pseudomonas fluorescens biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A, *Bmc Biotechnol.* 8 (2008) 79.
- [133] S. Sillankorva, R. Oliveira, M.J. Vieira, I. Sutherland, J. Azeredo, Pseudomonas fluorescens infection by bacteriophage Φ S1: the influence of temperature, host growth phase and media, *FEMS Microbiol. Lett.* 241 (2004) 13–20.
- [134] E.K. Tayyarcı, Gıda Kaynaklı Patojen Bakterilerin Biyokontrolünde Faj Terapi Ve Fitoterapinin Birlikte Kullanımı, (2017).
- [135] I. Cakir, L. Cakmakci, Et tavuklarının körbarsak florasında yer alan laktobasillerin proteolitik aktiviteleri ve organik asit oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi, *J. Agric. Sci.* 4 (1998) 53–58.

- [136] E. Acar-Soykut, Identification and classification of virulent bacteriophages of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* based on their replication parameters, capsid protein profiles and restriction endonuclease analysis, Ankara University, 2007.
- [137] A. Wieser, L. Schneider, J. Jung, S. Schubert, MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (2012) 965–974.
- [138] E. Acar Soykut, *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* virulent fajlarının replikasyon parametreleri, kapsid protein profilleri ve restriksiyon endonükleaz analizleri esas alınarak tanımlanmaları ve sınıflandırılmaları, Ankara Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Gıda Müh. Ana Bilim Dalı Doktora Tezi. 176 (2007).
- [139] E. Acar-Soykut, STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS 231-X10 FAJININ KISMİ GENOMİK KARAKTERİZASYONU, *GIDA.* 42 (2017) 136–144.
- [140] Y. Xie, L. Wahab, J. Gill, Development and validation of a microtiter plate-based assay for determination of bacteriophage host range and virulence, *Viruses.* 10 (2018) 189.
- [141] P. Hyman, Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth, *Pharmaceuticals.* 12 (2019) 35.
- [142] J.E. Olsen, M.N. Skov, E.J. Threlfall, D.J. Brown, Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing, *J. Med. Microbiol.* 40 (1994) 15–22.
- [143] S.B. Santos, E. Fernandes, C.M. Carvalho, S. Sillankorva, V.N. Krylov, E.A. Pleteneva, O. V Shaburova, A. Nicolau, E.C. Ferreira, J. Azeredo, Selection and characterization of a multivalent *Salmonella* phage and its production in a nonpathogenic *Escherichia coli* strain, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 7338–7342.
- [144] S. Sillankorva, E. Pleteneva, O. Shaburova, S. Santos, C. Carvalho, J. Azeredo, V. Krylov, *Salmonella* Enteritidis bacteriophage candidates for phage therapy of poultry, *J. Appl. Microbiol.* 108 (2010) 1175–1186.
- [145] A.I.M. Switt, R.H. Orsi, H.C. den Bakker, K. Vongkamjan, C. Altier, M. Wiedmann, Genomic characterization provides new insight into *Salmonella* phage diversity, *BMC Genomics.* 14 (2013) 481.
- [146] J. Heras, C. Domínguez, E. Mata, V. Pascual, C. Lozano, C. Torres, M. Zarazaga, GelJ—a tool for analyzing DNA fingerprint gel images, *BMC Bioinformatics.* 16 (2015) 1–8.
- [147] B. Hofer, M. Ruge, B. Dreiseikelmann, The superinfection exclusion gene (*sieA*) of bacteriophage P22: identification and overexpression of the gene and localization of the gene product., *J. Bacteriol.* 177 (1995) 3080–3086.

- [148] C. Vander Byl, A.M. Kropinski, Sequence of the Genome of Salmonella Bacteriophage P22, *J. Bacteriol.* 182 (2000) 6472–6481.
- [149] A.B. Oppenheim, S.L. Adhya, A new look at bacteriophage λ genetic networks, *J. Bacteriol.* 189 (2007) 298–304.
- [150] E.R. Signer, On the control of lysogeny in phage λ , *Virology.* 40 (1970) 624–633.
- [151] C.E. James, K.N. Stanley, H.E. Allison, H.J. Flint, C.S. Stewart, R.J. Sharp, J.R. Saunders, A.J. McCarthy, Lytic and Lysogenic Infection of Diverse *Escherichia coli* and *Shigella* Strains with a Verocytotoxigenic Bacteriophage, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 4335–4337.
- [152] C. Huang, S.M. Virk, J. Shi, Y. Zhou, S.P. Willias, M.K. Morsy, H.E. Abdelnabby, J. Liu, X. Wang, J. Li, Isolation, characterization, and application of bacteriophage LPSE1 against *Salmonella enterica* in ready to eat (RTE) foods, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 1046.
- [153] A.M. Kropinski, Measurement of the rate of attachment of bacteriophage to cells, in: *Bacteriophages*, Springer, 2009: pp. 151–155.
- [154] P. Manohar, C. Stalsby Lundborg, A.J. Tamhankar, R. Nachimuthu, Therapeutic Characterization and Efficacy of Bacteriophage Cocktails Infecting *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* species, *Front. Microbiol.* 10 (2019) 574.
- [155] W. Horwitz, *Official methods of analysis*, Association of Official Analytical Chemists Washington, DC, 1975.
- [156] A.O. Osman, S.A. Mahgoub, M.Z. SitoHy, Preservative action of 11S (glycinin) and 7S (β -conglycinin) soy globulin on bovine raw milk stored either at 4 or 25 C, *J. Dairy Res.* 80 (2013) 174–183.
- [157] M.C. Espeche, M. Pellegrino, I. Frola, A. Larriestra, C. Bogni, M.E.F. Nader-Macías, Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis, *Anaerobe.* 18 (2012) 103–109.
- [158] J.E. Olsen, M. Skov, Genomic lineage of *Salmonella enterica* serovar Dublin, *Vet. Microbiol.* 40 (1994) 271–282.
- [159] A.M. Thanki, N. Brown, A.D. Millard, M.R.J. Clokie, Genomic characterization of jumbo *Salmonella* phages that effectively target United Kingdom pig-associated *Salmonella* serotypes, *Front. Microbiol.* 10 (2019) 1491.
- [160] A.I.M. Switt, H.C. den Bakker, K. Vongkamjan, K. Hoelzer, L.D. Warnick, K.J. Cummings, M. Wiedmann, *Salmonella* bacteriophage diversity reflects host diversity on dairy farms, *Food Microbiol.* 36 (2013) 275–285.
- [161] H.-W. Ackermann, *Salmonella* phages examined in the electron microscope, *Salmonella Methods Protoc.* (2007) 213–234.
- [162] M.S. Islam, Y. Hu, M.F.R. Mizan, T. Yan, I. Nime, Y. Zhou, J. Li, Characterization

- of Salmonella phage LPST153 that effectively targets most prevalent Salmonella serovars, *Microorganisms*. 8 (2020) 1089.
- [163] C. Huang, J. Shi, W. Ma, Z. Li, J. Wang, J. Li, X. Wang, Isolation, characterization, and application of a novel specific Salmonella bacteriophage in different food matrices, *Food Res. Int.* 111 (2018) 631–641.
- [164] Y. Shang, Q. Sun, H. Chen, Q. Wu, M. Chen, S. Yang, M. Du, F. Zha, Q. Ye, J. Zhang, Isolation and Characterization of a Novel Salmonella Phage vB_SalP_TR2, *Front. Microbiol.* 12 (2021) 1452.
- [165] N.K. El-DougDoug, S. Cucic, A.G. Abdelhamid, L. Brovko, A.M. Kropinski, M.W. Griffiths, H. Anany, Control of Salmonella Newport on cherry tomato using a cocktail of lytic bacteriophages, *Int. J. Food Microbiol.* 293 (2019) 60–71.
- [166] J.A. Narvhus, O.N. Bækkelund, E.M. Tidemann, H.M. Østlie, R.K. Abrahamsen, Isolates of *Pseudomonas* spp. from cold-stored raw milk show variation in proteolytic and lipolytic properties, *Int. Dairy J.* 123 (2021) 105049.
- [167] S. Marchand, K. Heylen, W. Messens, K. Coudijzer, P. De Vos, K. Dewettinck, L. Herman, J. De Block, M. Heyndrickx, Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples, *Environ. Microbiol.* 11 (2009) 467–482.
- [168] L. Caldera, L. v Franzetti, E. Van Coillie, P. De Vos, P. Stragier, J. De Block, M. Heyndrickx, Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods, *Food Microbiol.* 54 (2016) 142–153.
- [169] W.-J. Sun, C.-F. Liu, L. Yu, F.-J. Cui, Q. Zhou, S.-L. Yu, L. Sun, A novel bacteriophage KSL-1 of 2-Keto-gluconic acid producer *Pseudomonas fluorescens* K1005: isolation, characterization and its remedial action, *BMC Microbiol.* 12 (2012) 1–8.
- [170] M.E.S. Lopez, M.M.D. Carvalho, D.M. Gouvêa, L.S. Batalha, I.O. Neves, R.C.S. Mendonça, Isolation and characterization of lytic bacteriophages as an alternative to prevent *Pseudomonas* spp. in poultry industry, *MOJ Food Process. Technol.* 1 (2015) 18.
- [171] S. Jagdale, S. Ahiwale, M. Gajbhiye, B. Kapadnis, Green approach to phytopathogen: Characterization of lytic bacteriophages of *Pseudomonas* sp., an etiology of the bacterial blight of pomegranate, *Microbiol. Res.* 228 (2019) 126300.
- [172] C. Tanaka, K. Yamada, H. Takeuchi, Y. Inokuchi, A. Kashiwagi, T. Toba, A lytic bacteriophage for controlling *Pseudomonas lactis* in raw cow's milk, *Appl. Environ. Microbiol.* 84 (2018) e00111-18.
- [173] N. Storey, M. Rabiey, B.W. Neuman, R.W. Jackson, G. Mulley, Genomic Characterisation of Mushroom Pathogenic *Pseudomonads* and Their Interaction

with Bacteriophages, *Viruses*. 12 (2020) 1286.

- [174] M.R. Eller, R.L. Salgado, P.M.P. Vidigal, M.P. Alves, R.S. Dias, L.L. de Oliveira, C.C. da Silva, A.F. de Carvalho, S.O. De Paula, Complete genome sequence of the *Pseudomonas fluorescens* bacteriophage UFV-P2, *Genome Announc.* 1 (2013) e00006-12.
- [175] K. Qin, X. Ji, C. Zhang, Y. Ding, A. Kuang, S. Zhang, Q. Zhang, L. Lin, Y. Wei, Isolation and characterization of wetland VSW-3, a novel lytic cold-active bacteriophage of *Pseudomonas fluorescens*, *Can. J. Microbiol.* 63 (2016) 110–118.
- [176] E.K. Tayyarcan, S. Evran, P.A. Akin, E.A. Soykut, I.H. Boyaci, The use of bacteriophage cocktails to reduce *Salmonella* Enteritidis in hummus, *LWT*. 154 (2022) 112848.
- [177] E. Jończyk, M. Kłak, R. Międzybrodzki, A. Górski, The influence of external factors on bacteriophages, *Folia Microbiol. (Praha)*. 56 (2011) 191–200.
- [178] J.M. Whichard, N. Sriranganathan, F.W. Pierson, Suppression of *Salmonella* growth by wild-type and large-plaque variants of bacteriophage Felix O1 in liquid culture and on chicken frankfurters, *J. Food Prot.* 66 (2003) 220–225.
- [179] J. Ye, M. Kostrzynska, K. Dunfield, K. Warriner, Control of *Salmonella* on sprouting mung bean and alfalfa seeds by using a biocontrol preparation based on antagonistic bacteria and lytic bacteriophages, *J. Food Prot.* 73 (2010) 9–17.
- [180] A. Esmael, E. Azab, A.A. Gobouri, M.A. Nasr-Eldin, M. Moustafa, S.A. Mohamed, O.A.M. Badr, A.M. Abdelatty, Isolation and characterization of two lytic bacteriophages infecting a multi-drug resistant *Salmonella* Typhimurium and their efficacy to combat salmonellosis in ready-to-use foods, *Microorganisms*. 9 (2021) 423.
- [181] S.T. Abedon, Lysis from without, *Bacteriophage*. 1 (2011) 46–49.
- [182] N. Imklin, R. Nasanit, Characterization of *Salmonella* bacteriophages and their potential use in dishwashing materials, *J. Appl. Microbiol.* (2020).
- [183] M.C. García-Anaya, D.R. Sepúlveda, C. Rios-Velasco, P.B. Zamudio-Flores, A.I. Sáenz-Mendoza, C.H. Acosta-Muñiz, The role of food compounds and emerging technologies on phage stability, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 64 (2020) 102436.
- [184] L. Quigley, O. O’Sullivan, C. Stanton, T.P. Beresford, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, P.D. Cotter, The complex microbiota of raw milk, *FEMS Microbiol. Rev.* 37 (2013) 664–698.
- [185] L. Wang, B.M. Jayarao, Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas fluorescens* isolated from bulk tank milk, *J. Dairy Sci.* 84 (2001) 1421–1429.
- [186] R.C. McKellar, Role of nutrient limitation in the competition between *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli* O157: H7, *J. Food Prot.* 70 (2007)

1739–1743.

- [187] A.M.K. Sobeih, I. AL-Hawary, E. Khalifa, N. Ebied, Prevalence of Enterobacteriaceae in raw milk and some dairy products, *Kafrelsheikh Vet. Med. J.* 18 (2020) 9–13.
- [188] C.-M. Cheng, M.P. Doyle, J.B. Luchansky, Identification of *Pseudomonas fluorescens* strains isolated from raw pork and chicken that produce siderophores antagonistic towards foodborne pathogens, *J. Food Prot.* 58 (1995) 1340–1344.
- [189] K.G. Mladenović, M.Ž. Grujović, M. Kiš, S. Furmeg, V.J. Tkalec, O.D. Stefanović, S.D. Kocić-Tanackov, Enterobacteriaceae in food safety with an emphasis on raw milk and meat, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2021) 1–13.
- [190] V. Lafarge, J.-C. Ogier, V. Girard, V. Maladen, J.-Y. Leveau, A. Gruss, A. Delacroix-Buchet, Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 5644–5650.
- [191] M. Malacarne, A. Summer, P. Franceschi, P. Formaggioni, M. Pecorari, G. Panari, P. Vecchia, S. Sandri, E. Fossa, C. Scotti, Effects of storage conditions on physico-chemical characteristics, salt equilibria, processing properties and microbial development of raw milk, *Int. Dairy J.* 29 (2013) 36–41.
- [192] P. García, C. Madera, B. Martinez, A. Rodríguez, J.E. Suarez, Prevalence of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potential as biocontrol agents, *J. Dairy Sci.* 92 (2009) 3019–3026.
- [193] E.N.G. Silva, A.C.L. Figueiredo, F.A. Miranda, R.C. de C. Almeida, Control of *Listeria monocytogenes* growth in soft cheeses by bacteriophage P100, *Brazilian J. Microbiol.* 45 (2014) 11–16.
- [194] N. Soffer, J. Woolston, M. Li, C. Das, A. Sulakvelidze, Bacteriophage preparation lytic for *Shigella* significantly reduces *Shigella sonnei* contamination in various foods, *PLoS One.* 12 (2017) e0175256.
- [195] S. O’flaherty, A. Coffey, W.J. Meaney, G.F. Fitzgerald, R.P. Ross, Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk, *Lett. Appl. Microbiol.* 41 (2005) 274–279.
- [196] L. El Haddad, J.-P. Roy, G.E. Khalil, D. St-Gelais, C.P. Champagne, S. Labrie, S. Moineau, Efficacy of two *Staphylococcus aureus* phage cocktails in cheese production, *Int. J. Food Microbiol.* 217 (2016) 7–13.
- [197] M.C. García-Anaya, D.R. Sepulveda, C. Rios-Velasco, P.B. Zamudio-Flores, C.H. Acosta-Muñiz, Effect of homogenization on binding-affinity of bacteriophage A511 in bovine milk fractions, *J. Food Eng.* 244 (2019) 73–79.
- [198] J.M. Erskine, Adsorption of lactic streptococcal bacteriophage by milk proteins, *J. Dairy Sci.* 53 (1970) 861–864.
- [199] M.B.A. Gloria, P.R.L. Saraiva, J.C.S. RIGUEIRA, S.C.C. Brandao, Bioactive amines changes in raw and sterilised milk inoculated with *Pseudomonas*

- fluorescens stored at different temperatures, *Int. J. Dairy Technol.* 64 (2011) 45–51.
- [200] E. Gastaldi, A. Lagaude, S. Marchesseau, B.T. De La Fuente, Acid milk gel formation as affected by total solids content, *J. Food Sci.* 62 (1997) 671–687.
- [201] M.F. Razali, S. Narayanan, N.A. Md. Hazmi, N.N. Abdul Karim Shah, S.M. Mustapa Kamal, N.A. Mohd Fauzi, A. Sulaiman, Minimal processing for goat milk preservation: Effect of high-pressure processing on its quality, *J. Food Process. Preserv.* 45 (2021) e15590.
- [202] T. Huppertz, C.G. De Kruif, Disruption and reassociation of casein micelles under high pressure: Influence of milk serum composition and casein micelle concentration, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 5903–5909.
- [203] R. Gebhardt, W. Doster, U. Kulozik, Pressure-induced dissociation of casein micelles: size distribution and effect of temperature, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 38 (2005) 1209–1214.
- [204] U. Bajwa, S. Mittal, Quality characteristics of no added sugar ready to drink milk supplemented with mango pulp, *J. Food Sci. Technol.* 52 (2015) 2112–2120.
- [205] F. Baglinière, A. Matéos, G. Tanguy, J. Jardin, V. Briard-Bion, F. Rousseau, B. Robert, E. Beaucher, J.L. Gaillard, C. Amiel, Proteolysis of ultra high temperature-treated casein micelles by AprX enzyme from *Pseudomonas fluorescens* F induces their destabilisation, *Int. Dairy J.* 31 (2013) 55–61.
- [206] M.N. Perera, T. Abuladze, M. Li, J. Woolston, A. Sulakvelidze, Bacteriophage cocktail significantly reduces or eliminates *Listeria monocytogenes* contamination on lettuce, apples, cheese, smoked salmon and frozen foods, *Food Microbiol.* 52 (2015) 42–48.
- [207] Y. Guo, J. Li, M.S. Islam, T. Yan, Y. Zhou, L. Liang, I.F. Connerton, K. Deng, J. Li, Application of a novel phage vB_SalS-LPSTLL for the biological control of *Salmonella* in foods, *Food Res. Int.* 147 (2021) 110492.
- [208] M. Fitriyanti, G. Narsimhan, Synergistic effect of low power ultrasonication on antimicrobial activity of cecropin P1 against *E. coli* in food systems, *LWT.* 96 (2018) 175–181.

EKLER

EK 1 – Çizelgeler

EK-1. Çizelge 1. P22-1 bakteriyofaj genomunda bulunan proteinler

| İsim | Minimum | Maksimum | Uzunluk | Yön |
|---------------------------------|---------|----------|---------|---------|
| terminase small subunit | 43962 | 44435 | 474 | reverse |
| putative lysozyme | 43535 | 44074 | 540 | reverse |
| terminase large subunit | 42086 | 43531 | 1446 | reverse |
| portal protein | 39969 | 42107 | 2139 | reverse |
| hypothetical protein | 39718 | 39969 | 252 | reverse |
| head scaffolding protein | 38727 | 39728 | 1002 | reverse |
| major head protein | 37759 | 38712 | 954 | reverse |
| hypothetical protein | 37388 | 37570 | 183 | reverse |
| virion structural protein | 36755 | 37384 | 630 | reverse |
| hypothetical protein | 36556 | 36750 | 195 | reverse |
| hypothetical protein | 36324 | 36575 | 252 | reverse |
| tail protein | 35699 | 36334 | 636 | reverse |
| virion structural protein | 34147 | 35691 | 1545 | reverse |
| hypothetical protein | 33434 | 34147 | 714 | reverse |
| hypothetical protein | 33003 | 33437 | 435 | reverse |

| | | | | | |
|---------------------|------------|-------|-------|------|---------|
| putative | particle | 32696 | 33022 | 327 | reverse |
| protein | | | | | |
| putative | particle | 32077 | 32607 | 531 | reverse |
| protein | | | | | |
| virion | structural | 31676 | 32080 | 405 | reverse |
| protein | | | | | |
| virion | structural | 29959 | 31674 | 1716 | reverse |
| protein | | | | | |
| virion | structural | 26779 | 29952 | 3174 | reverse |
| protein | | | | | |
| virion | structural | 25881 | 26768 | 888 | reverse |
| protein | | | | | |
| hypothetical | | 25525 | 25881 | 357 | reverse |
| protein | | | | | |
| hypothetical | | 25190 | 25396 | 207 | forward |
| protein | | | | | |
| hypothetical | | 24216 | 24971 | 756 | forward |
| protein | | | | | |
| endonuclease | | 23888 | 24250 | 363 | forward |
| hypothetical | | 22984 | 23982 | 999 | forward |
| protein | | | | | |
| exonuclease | | 22125 | 23009 | 885 | forward |
| hypothetical | | 21751 | 22128 | 378 | forward |
| protein | | | | | |
| hypothetical | | 21473 | 21733 | 261 | forward |
| protein | | | | | |
| endolysin; inhibits | | 21006 | 21473 | 468 | forward |
| RNA polymerase | | | | | |
| hypothetical | | 20432 | 21028 | 597 | forward |
| protein | | | | | |
| DNA polymerase I | | 18725 | 20365 | 1641 | forward |
| hypothetical | | 18496 | 18717 | 222 | forward |
| protein | | | | | |
| tail length | tape | 18099 | 18527 | 429 | forward |
| measure | protein | | | | |
| membrane protein | | 17827 | 18060 | 234 | forward |

| | | | | |
|----------------------------------------------------------------|-------|-------|------|---------|
| holin | 17588 | 17845 | 258 | forward |
| hypothetical protein | 17364 | 17567 | 204 | forward |
| hypothetical protein | 17121 | 17351 | 231 | forward |
| hypothetical protein | 16646 | 16957 | 312 | forward |
| DNA polymerase exonuclease subunit | 16138 | 16689 | 552 | forward |
| DNA primase/helicase | 14445 | 16199 | 1755 | forward |
| hypothetical protein | 14189 | 14485 | 297 | forward |
| gamma-glutamyl cyclotransferase | 13794 | 14189 | 396 | forward |
| ribosomal protein S6 glutaminyl transferase | 12926 | 13801 | 876 | forward |
| hypothetical protein | 12570 | 12788 | 219 | forward |
| L-glutamine-D- fructose-6- phosphate aminotransferase | 11098 | 12567 | 1470 | forward |
| amidoligase enzyme | 9913 | 11067 | 1155 | forward |
| Hypothetical protein | 9377 | 9937 | 561 | forward |
| COOH.NH2 ligase | 8583 | 9380 | 798 | forward |
| Hypothetical protein | 7693 | 8571 | 879 | forward |
| Hypothetical protein | 6877 | 7689 | 813 | forward |
| hypothetical protein | 6541 | 6753 | 213 | forward |

| | | | | |
|-------------------------|------|------|-----|---------|
| hypothetical protein | 6062 | 6400 | 339 | forward |
| putative transposase | 5060 | 5890 | 831 | forward |
| hypothetical protein | 4712 | 4903 | 192 | forward |
| hypothetical protein | 4224 | 4628 | 405 | forward |
| hypothetical protein | 4031 | 4243 | 213 | forward |
| hypothetical protein | 3792 | 4031 | 240 | forward |
| hypothetical protein | 3466 | 3795 | 330 | forward |
| hypothetical protein | 3279 | 3479 | 201 | forward |
| hypothetical protein | 2546 | 2776 | 231 | forward |
| hypothetical protein | 1709 | 2077 | 369 | forward |
| hypothetical protein | 1351 | 1836 | 486 | forward |
| hypothetical protein | 980 | 1321 | 342 | forward |

EK-1. Çizelge 2. L23.2 ve UFV-P2 bakteriyofaj genomları tarafından kodlanan proteinler

| Ad | Sekans Adı | Tip | Min. | Maks. | Uzunluk | Yön |
|---------------------------------------|-----------------------|------------|-------------|--------------|----------------|------------|
| source Pseudomonas phage UFV-P2 | JX863101 | source | 1 | 45516 | 45516 | forward |
| HNH endonuclease CDS | JX863101 | CDS | 10667 | 11071 | 405 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 6159 | 6374 | 216 | forward |

| | | | | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|-----|-------|-------|------|---------|
| ATP-grasp enzyme CDS | JX863101 | CDS | 12906 | 13781 | 876 | forward |
| ORF 26 (frame 3) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 12906 | 13781 | 876 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 2365 | 2556 | 192 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 8965 | 9525 | 561 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 24307 | 25062 | 756 | forward |
| ORF 7 (frame 1) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 24307 | 25062 | 756 | forward |
| phage particle protein CDS | JX863101 | CDS | 32503 | 33447 | 945 | reverse |
| ORF 39 (frame 1) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 32504 | 33448 | 945 | reverse |
| ORF 3 (frame 1) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 13729 | 14169 | 441 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 25059 | 25184 | 126 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 25628 | 25834 | 207 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 23078 | 24073 | 996 | forward |
| ORF 16 (frame 2) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 23078 | 24073 | 996 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 4060 | 4458 | 399 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 16931 | 17068 | 138 | forward |
| terminase small subunit CDS | JX863101 | CDS | 44371 | 44844 | 474 | reverse |
| ORF 32 (frame 1) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 44372 | 44845 | 474 | reverse |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 21139 | 21495 | 357 | forward |
| portal protein CDS | JX863101 | CDS | 40378 | 42468 | 2091 | reverse |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 18630 | 18764 | 135 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 2553 | 2687 | 135 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 21887 | 22222 | 336 | forward |

| | | | | | | |
|------------------------------|-----------------------------|-----|-------|-------|------|---------|
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 17095 | 17325 | 231 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 2898 | 3020 | 123 | forward |
| lysozyme CDS | JX863101 | CDS | 43944 | 44450 | 507 | reverse |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 25963 | 26319 | 357 | reverse |
| phage structural protein CDS | JX863101 | CDS | 32102 | 32506 | 405 | reverse |
| ORF 56 (frame 3) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 32103 | 32507 | 405 | reverse |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 33428 | 33862 | 435 | reverse |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 17814 | 18032 | 219 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 25455 | 25631 | 177 | forward |
| DNA polymerase part I CDS | JX863101 | CDS | 16151 | 16666 | 516 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 36975 | 37169 | 195 | reverse |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 6021 | 6149 | 129 | forward |
| ORF 4 (frame 1) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 14320 | 16176 | 1857 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 1501 | 1983 | 483 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 18433 | 18627 | 195 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 6441 | 7289 | 849 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 8171 | 8968 | 798 | forward |
| ORF 10 (frame 2) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 8171 | 8968 | 798 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 40127 | 40378 | 252 | reverse |
| scaffolding protein CDS | JX863101 | CDS | 39151 | 40137 | 987 | reverse |
| ORF 34 (frame 1) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 39152 | 40138 | 987 | reverse |
| terminase large subunit CDS | JX863101 | CDS | 42495 | 43940 | 1446 | reverse |

| | | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------|-----|-------|-------|------|---------|
| ORF 48 (frame 2) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 42496 | 43941 | 1446 | reverse |
| phage structural protein CDS | JX863101 | CDS | 30388 | 32100 | 1713 | reverse |
| ORF 40 (frame 1) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 30389 | 32101 | 1713 | reverse |
| phage particle protein CDS | JX863101 | CDS | 34569 | 36110 | 1542 | reverse |
| ORF 49 (frame 2) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 34570 | 36111 | 1542 | reverse |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 7296 | 8159 | 864 | forward |
| ORF 24 (frame 3) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 7296 | 8159 | 864 | forward |
| phage structural protein CDS | JX863101 | CDS | 27219 | 30382 | 3164 | reverse |
| ORF 57 (frame 3) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 27219 | 30383 | 3165 | reverse |
| phage structural protein CDS | JX863101 | CDS | 26321 | 27208 | 888 | reverse |
| ORF 41 (frame 1) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 26321 | 27208 | 888 | reverse |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 33859 | 34569 | 711 | reverse |
| major capsid protein CDS | JX863101 | CDS | 38179 | 39132 | 954 | reverse |
| ORF 35 (frame 1) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 38180 | 39133 | 954 | reverse |
| phage structural protein CDS | JX863101 | CDS | 37174 | 37803 | 630 | reverse |
| ORF 36 (frame 1) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 37175 | 37804 | 630 | reverse |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 4539 | 4736 | 198 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 3368 | 3568 | 201 | forward |

| | | | | | | |
|--------------------------------|-----------------------------|-----|-------|-------|------|---------|
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 3555 | 3869 | 315 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 3021 | 3275 | 255 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 5727 | 6017 | 291 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 3869 | 4063 | 195 | forward |
| DNA primase/helicase CDS | JX863101 | CDS | 14425 | 16176 | 1752 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 14169 | 14465 | 297 | forward |
| tail fiber protein CDS | JX863101 | CDS | 36118 | 36753 | 636 | reverse |
| ORF 37 (frame 1) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 36119 | 36754 | 636 | reverse |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 2677 | 2898 | 222 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 18069 | 18263 | 195 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 2046 | 2216 | 171 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 2231 | 2368 | 138 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 12547 | 12765 | 219 | forward |
| amidoligase CDS | JX863101 | CDS | 9501 | 10658 | 1158 | forward |
| ORF 25 (frame 3) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 9501 | 10658 | 1158 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 13774 | 14169 | 396 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 20472 | 21068 | 597 | forward |
| ORF 28 (frame 3) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 20472 | 21068 | 597 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 1205 | 1483 | 279 | forward |
| glutamine amidotransferase CDS | JX863101 | CDS | 11084 | 12544 | 1461 | forward |
| ORF 12 (frame 2) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 11084 | 12544 | 1461 | forward |

| | | | | | | |
|----------------------------|-----------------------------|-----|-------|-------|------|---------|
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 18263 | 18433 | 171 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 17336 | 17539 | 204 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 4884 | 5714 | 831 | forward |
| ORF 27 (frame 3) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 18882 | 20405 | 1524 | forward |
| ORF 9 (frame 2) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 1070 | 1483 | 414 | forward |
| endonuclease CDS | JX863101 | CDS | 23874 | 24341 | 468 | forward |
| ORF 47 (frame 2) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 43945 | 44478 | 534 | reverse |
| ORF 11 (frame 2) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 10553 | 11071 | 519 | forward |
| ORF 2 (frame 1) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 8941 | 9525 | 585 | forward |
| ORF 22 (frame 3) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 4866 | 5714 | 849 | forward |
| ORF 5 (frame 1) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 21037 | 21495 | 459 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 12805 | 12909 | 105 | forward |
| ORF 38 (frame 1) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 33860 | 34624 | 765 | reverse |
| ORF 6 (frame 1) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 22258 | 23103 | 846 | forward |
| ORF 1 (frame 1) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 1447 | 1983 | 537 | forward |
| DNA polymerase part II CDS | JX863101 | CDS | 18765 | 20405 | 1641 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 16669 | 16920 | 252 | forward |
| putative holin CDS | JX863101 | CDS | 17536 | 17817 | 282 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 25255 | 25458 | 204 | forward |

| | | | | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|------------|-------|-------|------|---------|
| 5'-3' exonuclease CDS | JX863101 | CDS | 22219 | 23103 | 885 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 21525 | 21755 | 231 | forward |
| regulatory | JX863101 | regulatory | 44878 | 44906 | 29 | reverse |
| regulatory | JX863101 | regulatory | 4436 | 4464 | 29 | forward |
| ORF 14 (frame 2) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 16112 | 16666 | 555 | forward |
| hypothetical protein CDS | JX863101 | CDS | 37807 | 38127 | 321 | reverse |
| ORF 29 (frame 3) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 23781 | 24341 | 561 | forward |
| ORF 55 (frame 3) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 33429 | 33926 | 498 | reverse |
| ORF 53 (frame 2) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 2116 | 2523 | 408 | reverse |
| ORF 33 (frame 1) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 40379 | 42517 | 2139 | reverse |
| ORF 64 (frame 3) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 2361 | 2792 | 432 | reverse |
| ORF 23 (frame 3) | L23.2_ JX863101e gore | ORF | 6375 | 7289 | 915 | forward |

EK 1-Çizelge 3. L12.3 bakteriyofajının olası ORF bölgeleri ve kodladıkları proteinler

| İsim | Tür | Minimum | Maksimum | Uzunluk | Yön |
|-----------------------------|-----|---------|----------|---------|---------|
| hypothetical protein CDS | CDS | 39097 | 39225 | 129 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 38245 | 38421 | 177 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 37943 | 38179 | 237 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 37423 | 37698 | 276 | reverse |
| ORF 9 (frame 1) | ORF | 37399 | 37920 | 522 | forward |
| hypothetical protein CDS | CDS | 37110 | 37436 | 327 | reverse |

| | | | | | |
|-----------------------------------------------------|-----|-------|-------|------|---------|
| ORF 36 (frame 2) | ORF | 36511 | 37041 | 531 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 36511 | 37041 | 531 | reverse |
| ORF 28 (frame 1) | ORF | 35807 | 36631 | 825 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 35807 | 36514 | 708 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 35428 | 35805 | 378 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 35054 | 35428 | 375 | reverse |
| ORF 44 (frame 3) | ORF | 32268 | 34856 | 2589 | reverse |
| 1 2 CDS | CDS | 32268 | 34922 | 2655 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 31960 | 32259 | 300 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 31666 | 31896 | 231 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 31400 | 31657 | 258 | reverse |
| ORF 29 (frame 1) | ORF | 30416 | 31399 | 984 | reverse |
| DNA ligase CDS | CDS | 30416 | 31399 | 984 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 30240 | 30350 | 111 | reverse |
| ORF 7 (frame 1) | ORF | 29497 | 30168 | 672 | forward |
| hypothetical protein CDS | CDS | 29494 | 30177 | 684 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 29357 | 29497 | 141 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 29179 | 29364 | 186 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 28823 | 29182 | 360 | reverse |
| Single-stranded DNA-binding protein gp2.5 CDS | CDS | 28054 | 28749 | 696 | reverse |
| 3 2 CDS | CDS | 27616 | 28053 | 438 | reverse |

| | | | | | |
|-----------------------------------------------|-----|-------|-------|------|---------|
| ORF 6 (frame 1) | ORF | 27217 | 28863 | 1647 | forward |
| N-acetylmuramoyl- L-alanine amidase CDS | CDS | 27145 | 27606 | 462 | reverse |
| ORF 30 (frame 1) | ORF | 26471 | 27034 | 564 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 26471 | 27034 | 564 | reverse |
| ORF 45 (frame 3) | ORF | 24768 | 26459 | 1692 | reverse |
| 4 2 CDS | CDS | 24768 | 26459 | 1692 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 24547 | 24765 | 219 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 24045 | 24488 | 444 | reverse |
| ORF 31 (frame 1) | ORF | 21920 | 24064 | 2145 | reverse |
| 5 2 CDS | CDS | 21920 | 24058 | 2139 | reverse |
| ORF 39 (frame 2) | ORF | 21601 | 21918 | 318 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 21601 | 21918 | 318 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 21389 | 21598 | 210 | reverse |
| ORF 46 (frame 3) | ORF | 20481 | 21392 | 912 | reverse |
| 6 2 CDS | CDS | 20481 | 21392 | 912 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 20108 | 20374 | 267 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 19831 | 20121 | 291 | reverse |
| ORF 13 (frame 2) | ORF | 19504 | 19821 | 318 | forward |
| hypothetical protein CDS | CDS | 19504 | 19821 | 318 | reverse |
| ORF 40 (frame 2) | ORF | 17884 | 19491 | 1608 | reverse |
| 8 2 CDS | CDS | 17884 | 19491 | 1608 | reverse |
| ORF 32 (frame 1) | ORF | 16907 | 17818 | 912 | reverse |
| 9 2 CDS | CDS | 16907 | 17818 | 912 | reverse |
| ORF 41 (frame 2) | ORF | 15793 | 16818 | 1026 | reverse |
| Minor capsid protein 10B CDS | CDS | 15793 | 16818 | 1026 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 15521 | 15751 | 231 | reverse |

| | | | | | |
|-------------------------------------|-----|-------|-------|------|---------|
| ORF 11 (frame 2) | ORF | 14885 | 15448 | 564 | forward |
| Tail tubular protein gp11 CDS | CDS | 14867 | 15454 | 588 | reverse |
| ORF 42 (frame 2) | ORF | 12436 | 14857 | 2422 | reverse |
| Tail tubular protein gp12 CDS | CDS | 12436 | 14856 | 2421 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 11969 | 12406 | 438 | reverse |
| ORF 34 (frame 1) | ORF | 11399 | 11956 | 558 | reverse |
| Internal virion protein gp14 CDS | CDS | 11399 | 11956 | 558 | reverse |
| ORF 47 (frame 3) | ORF | 9195 | 11390 | 2196 | reverse |
| Internal virion protein gp15 CDS | CDS | 9195 | 11390 | 2196 | reverse |
| ORF 48 (frame 3) | ORF | 5181 | 9173 | 3993 | reverse |
| Internal virion protein gp16 CDS | CDS | 5181 | 9173 | 3993 | reverse |
| ORF 49 (frame 3) | ORF | 3468 | 5120 | 1653 | reverse |
| Tail fiber protein CDS | CDS | 3468 | 5120 | 1653 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 3255 | 3458 | 204 | reverse |
| Terminase small subunit gp18 CDS | CDS | 3005 | 3262 | 258 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 2568 | 3005 | 438 | reverse |
| ORF 43 (frame 2) | ORF | 811 | 2517 | 1707 | reverse |
| Terminase large subunit gp19 CDS | CDS | 811 | 2571 | 1761 | reverse |
| hypothetical protein CDS | CDS | 421 | 594 | 174 | reverse |

EK-1. Çizelge 4. *EcoRI* kesimine göre bakteriyofajların benzerlik indeksleri

| | P41.3 | P41.2 | L12.1 | P22.1 | P22.2 | P22.3 | L21.1 | L21.2 | L21.3 | PF.1 | PF.2 | PP.1 | L23.1 | L23.2 | L23.3 | L23.4 | A11.1 | A11.3 |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| P41.3 | 1,00 | 0,50 | 0,40 | 0,15 | 0,50 | 0,31 | 0,00 | 0,36 | 0,40 | 0,40 | 0,31 | 0,40 | 0,50 | 0,50 | 0,31 | 0,31 | 0,50 | 0,50 |
| P41.2 | 0,50 | 1,00 | 0,46 | 0,18 | 0,43 | 0,36 | 0,00 | 0,44 | 0,31 | 0,46 | 0,55 | 0,44 | 0,43 | 0,43 | 0,55 | 0,36 | 0,43 | 0,43 |
| L12.1 | 0,40 | 0,46 | 1,00 | 0,29 | 0,47 | 0,57 | 0,00 | 0,33 | 0,25 | 0,50 | 0,71 | 0,57 | 0,82 | 0,59 | 0,43 | 0,71 | 0,35 | 0,47 |
| P22.1 | 0,15 | 0,18 | 0,29 | 1,00 | 0,27 | 0,33 | 0,00 | 0,20 | 0,14 | 0,14 | 0,33 | 0,21 | 0,27 | 0,40 | 0,17 | 0,33 | 0,13 | 0,13 |
| P22.2 | 0,50 | 0,43 | 0,47 | 0,27 | 1,00 | 0,40 | 0,00 | 0,46 | 0,35 | 0,59 | 0,40 | 0,64 | 0,67 | 0,78 | 0,27 | 0,40 | 0,44 | 0,44 |
| P22.3 | 0,31 | 0,36 | 0,57 | 0,33 | 0,40 | 1,00 | 0,00 | 0,40 | 0,14 | 0,43 | 0,67 | 0,32 | 0,53 | 0,40 | 0,33 | 0,50 | 0,40 | 0,27 |
| L21.1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,00 | 0,00 | 0,18 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| L21.2 | 0,36 | 0,44 | 0,33 | 0,20 | 0,46 | 0,40 | 0,00 | 1,00 | 0,17 | 0,33 | 0,40 | 0,35 | 0,31 | 0,31 | 0,40 | 0,40 | 0,31 | 0,31 |
| L21.3 | 0,40 | 0,31 | 0,25 | 0,14 | 0,35 | 0,14 | 0,18 | 0,17 | 1,00 | 0,25 | 0,14 | 0,29 | 0,35 | 0,35 | 0,14 | 0,14 | 0,35 | 0,35 |
| PF.1 | 0,40 | 0,46 | 0,50 | 0,14 | 0,59 | 0,43 | 0,00 | 0,33 | 0,25 | 1,00 | 0,57 | 0,29 | 0,35 | 0,59 | 0,43 | 0,29 | 0,24 | 0,24 |
| PF.2 | 0,31 | 0,55 | 0,71 | 0,33 | 0,40 | 0,67 | 0,00 | 0,40 | 0,14 | 0,57 | 1,00 | 0,21 | 0,67 | 0,40 | 0,67 | 0,67 | 0,27 | 0,27 |
| PP.1 | 0,40 | 0,44 | 0,57 | 0,21 | 0,64 | 0,32 | 0,00 | 0,35 | 0,29 | 0,29 | 0,21 | 1,00 | 0,64 | 0,45 | 0,21 | 0,53 | 0,36 | 0,45 |
| L23.1 | 0,50 | 0,43 | 0,82 | 0,27 | 0,67 | 0,53 | 0,00 | 0,31 | 0,35 | 0,35 | 0,67 | 0,64 | 1,00 | 0,67 | 0,40 | 0,80 | 0,44 | 0,56 |
| L23.2 | 0,50 | 0,43 | 0,59 | 0,40 | 0,78 | 0,40 | 0,00 | 0,31 | 0,35 | 0,59 | 0,40 | 0,45 | 0,67 | 1,00 | 0,40 | 0,27 | 0,44 | 0,44 |
| L23.3 | 0,31 | 0,55 | 0,43 | 0,17 | 0,27 | 0,33 | 0,00 | 0,40 | 0,14 | 0,43 | 0,67 | 0,21 | 0,40 | 0,40 | 1,00 | 0,50 | 0,40 | 0,40 |
| L23.4 | 0,31 | 0,36 | 0,71 | 0,33 | 0,40 | 0,50 | 0,00 | 0,40 | 0,14 | 0,29 | 0,67 | 0,53 | 0,80 | 0,27 | 0,50 | 1,00 | 0,27 | 0,40 |
| A11.1 | 0,50 | 0,43 | 0,35 | 0,13 | 0,44 | 0,40 | 0,00 | 0,31 | 0,35 | 0,24 | 0,27 | 0,36 | 0,44 | 0,44 | 0,40 | 0,27 | 1,00 | 0,78 |
| A11.3 | 0,50 | 0,43 | 0,47 | 0,13 | 0,44 | 0,27 | 0,00 | 0,31 | 0,35 | 0,24 | 0,27 | 0,45 | 0,56 | 0,44 | 0,40 | 0,40 | 0,78 | 1,00 |

EK 2- Tezden Türetilmiş Yayınlar

- **E,K, Tayyarcan**, S, Evran, P,A, Akin, E,A, Soykut, I,H, Boyaci, The use of bacteriophage cocktails to reduce *Salmonella* Enteritidis in hummus, LWT, 154 (2022) 112848,
- S, Evran, **E,K, Tayyarcan**, E, Acar-Soykut, I,H, Boyaci, Applications of Bacteriophage Cocktails to Reduce *Salmonella* Contamination in Poultry Farms, Food Environ, Virol, (n,d.) 1–9,

EK 3 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

- **Tayyarcan, E.K.**, Evran, S., Acar Soykut, E., Boyaci, I.H, “Isolation, characterization and application of phages for biocontrol of *Pseudomonas fluorescens* in milk”, Viruses of Microbes 2022: The Latest Conquests, Temmuz 18-22, 2022, Guimarães, Portekiz, (Poster)

EK 4 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu

Şablona uygun olarak hazırlanan “Orjinallik Raporu”nun imzalı hali bu bölümde verilmelidir,

