

**ESCHERICHIA COLI FAJLARININ MERSİN-  
MEZİTLİ SAHİLİNDEN İZOLASYONU ve  
MEVSİMSEL DEĞİŞİMLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**ŞUAYIP ŞAHİN**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ  
ANA BİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MERSİN  
TEMMUZ – 2015**

**ESCHERICHIA COLI FAJLARININ MERSİN-  
MEZİTLİ SAHİLİNDEN İZOLASYONU ve  
MEVSİMSEL DEĞİŞİMLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**ŞUAYIP ŞAHİN**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ  
ANA BİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Danışman  
Prof. Dr. Mutlu Nisa ÜNALDI CORAL**

**MERSİN  
TEMMUZ – 2015**

**Şuayip ŞAHİN** tarafından Prof. Dr. M. Nisa ÜNALDI CORAL danışmanlığında “*Escherichia coli* Fajlarının Mersin-Mezitli Sahilinden İzolasyonu ve Mevsimsel Değişimlerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. M.Nisa ÜNALDI CORAL

.....  


Doç.Dr. Fatih MATYAR

.....  


Doç.Dr. Gülşen AVCI

.....  


Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 31/07/2015 tarih ve 2015.20...../...807..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Aytaç ÇELİK  
Enstitü Müdürü  


*Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.*

## **ESCHERICHIA COLI FAJLARININ MERSİN-MEZİTLİ SAHİLİNDEN İZOLASYONU VE MEVSİMSEL DEĞİŞİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Şuayıp ŞAHİN**

### **ÖZ**

Denizel ortamlarda virüslerin rollerini anlayabilmek için mevsimsel dağılımlarının ve virüs-konak etkileşimlerinin bilinmesi önemlidir. Bu çalışmada, Mersin Mezitli sahilinden (Halk plajı) alınan deniz suyu örneklerinde *Escherichia coli* bakterisi ve fajlarının mevsimsel dağılımları belirlenmiştir. Deniz suyu örnekleri her ay düzenli olarak steril polipropilen şişelere alınmış, fiziksel ve kimyasal parametre ölçümleri yapıldıktan sonra bakteri ve faj izolasyonu için kullanılmıştır. Bakteri izolatlarının morfolojik kültürel ve biyokimyasal özellikleri tespit edilerek tanımlaması yapılmıştır. Temmuz-Eylül ayları arasında 28-30 °C’lerde seyreden deniz suyu sıcaklığı toplam bakteri, koliform ve *Esherichia coli* sayısının artmasına neden olmaktadır. Lizogenite testinde yüksek sıcaklık ve Mitomycin-C 1 µgr/ml olacak şekilde kullanılmıştır. İzole edilen *Esherichia coli* suşlarının % 44.7’sinin, diğer koliform bakterilerin ise %19.04 oranında temperent faj taşıdığı tespit edilmiştir. Lizogenik bakterilerde yapılan Mitomycin-C uygulamasında bakterilerin %72.5 oranında indüklendiği tespit edilmiştir. Elde edilen bakteriyofajlardan litik özellikte olanların 10 tanesi seçilerek, bu fajlara ilişkin pfu değerleri, plak morfolojileri, patlama büyüklüğü ve büyüme eğrisi çalışmaları yapılmıştır. Patlama büyüklükleri 15-80 arasında değişmektedir. Virüslerin ve bakterilerin epifloresans mikroskopta incelenmesinde DAPI boyası kullanılmıştır. Deniz suyu bakteriler için 0.2 mm, fajlar için ise 0.02 mm por çapına sahip filtreler kullanılarak filtre edilmiş, filtre kağıtları DAPI ile boyanarak epifloresans mikroskopta incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Esherichia coli*, Bakteriyofaj, Litik Faj, Temperent Faj

**Danışman:** Prof.Dr. M. Nisa ÜNALDI CORAL, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

## **THE ISOLATION OF *ESCHERICHIA COLI* PHAGES FROM MERSIN-MEZITLI BEACH AND THE INVESTIGATION OF ITS SEASONAL CHANGES**

**Şuayıp ŞAHİN**

### **ABSTRACT**

In order to understand the role of viruses in marine environments, it's so crucial to recognize their seasonal distributions and virus-host interactions. In this study, in the seawater samples taken from the coast of Mersin Mezitli (from the public beach), *Escherichia coli* bacteria and the seasonal distributions of its phages have been identified. Seawater samples were regularly collected into sterile polypropylene bottles every month and after their physical and chemical parameters had been measured, they were used for isolation of bacteria and phages. The morphological, cultural and biochemical properties of bacterial isolates were found out and their definitions were determined. The seawater temperature approximately at 28-30 °C during July and September leads the total count of bacteria, coliform and *E. coli* to increase. In the lizogenit test, high temperature and Mitomycin-C were used in proportion to 1 ugr/ml. % 44.7 per cent of isolated strains of *Escherichia coli* and other coliform bacteria at a rate of %19.04 were identified to convey temperent phage. In the experiment of Mitomycin-C conducted on lysogenic bacteria, it came out that bacteria were induced at a rate of % 72.5. Out of the resulted bacteriophage, 10 in the properties of lytic were selected and the studies concerning their pfu values, plaque morphology, burst size and growth curves were performed. Brust sizes ranged between 15-80. In the epifluorescence examination of viruses and bacteria, DAPI paint was used. Seawater were filtered by using filters with a per diameter of 0.2 mm for bacteria and of 0.02 for phages, and upon having been painted with DAPI, filter papers were examined in epifluorescence microscope.

**Keywords:** *Escherichia coli*, Bacteriophage, Lytic Phage, Temperent Phage

**Supervisor:** Prof. Dr. M. Nisa ÜNALDI CORAL, Mersin University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Biotechnology

## **TEŞEKKÜR**

Bu tez çalışmamın konusunun belirlenmesinde, planlanmasında hazırlanmasında bilgi, görüş ve önerilerini esirgemeyen, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendirdiğim çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Mutlu Nisa ÜNALDI CORAL'a teşekkür ederim.

Bu çalışma süresince manevi desteklerini her an yanımda hissettiğim çok değerli ailem; Eşim Fatma ŞAHİN'e ve oğlum İhsan Türker ŞAHİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZ</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI</b> .....	<b>5</b>
2.1. BAKTERİYOFAJLAR VE UYGULAMA ALANLARI.....	5
2.1.1. Tıp Alanında Bakteriyofajlar.....	6
2.1.2. Gıda Alanında Bakteriyofajlar.....	7
2.2. FİZİKSEL VE KİMYASAL FAKTÖRLERİN MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNE ETKİSİ.....	8
2.3. ESCHERICHIA COLI FAJLARI.....	10
2.4. VİRÜS SAYIM YÖNTEMLERİ.....	13
2.5 MİKROBİYAL EKOLOJİ.....	16
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>20</b>
3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI.....	20
3.2. FİZİKSEL VE KİMYASAL PARAMETRELER.....	20
3.3. BAKTERİ İZOLASYONU ve TANIMLANMASI.....	21
3.3.1. Nutrient Agar.....	21
3.3.2. Saf Kültür Eldesi.....	22
3.3.3. EMB (Eosin Metilen Blue).....	22

3.3.4. IMViC Testleri .....	23
3.3.4.1. İndol testi.....	23
3.3.4.2. Metil kırmızısı testi .....	23
3.3.4.3. MR-VP besiyeri (Metil kırmızısı, Voges Proskauer Broth).....	23
3.3.4.4. Voges - Proskauer (VP) testi.....	24
3.3.4.5. Sitrat testi .....	24
3.3.4.6. <i>E.coli</i> tanımlaması.....	24
3.3.5. Membran Filtrasyon Yöntemi .....	24
3.3.6. Fluoresan Mikroskopik Yöntemleri .....	25
3.4. FAJ İZOLASYONU VE TANIMLAMASI.....	26
3.4.1. Çift Tabaka Ekim Yöntemi .....	26
3.4.2. Saf Faj Süspansiyonu Eldesi .....	27
3.4.3. Lizogenik Faj İzolasyonu .....	27
3.4.4. Profaj İndüklemesi .....	27
3.4.5. Patlama Büyüklüğü (Burst Size).....	27
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>29</b>
4.1. FİZİKSEL PARAMETRELER.....	29
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>48</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>50</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ.....</b>	<b>58</b>



## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 4.1. Deniz suyu örneklerinin tuzluluk, sıcaklık ve pH değerleri .....	30
Çizelge 4.2. Alınan örneklerdeki toplam bakteri, koliform ve <i>E.coli</i> sayıları verilmiştir .....	35
Çizelge 4.3. <i>Escherichia coli</i> bakterilerinin litik ve temperent faj sayıları.....	36
Çizelge 4.4. <i>Escherichia coli</i> litik fajlarının plak morfolojileri .....	39
Çizelge 4.5. Plak oluşumu gözlenmeyen suşlar için indükleme testi .....	40
Çizelge 4.6. Litik fajların patlama büyüklükleri .....	40

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. pH'ın denenen fajlar üzerine etkisi [Quiberoni vd., 2004].....	9
Şekil 2.2. Bradley sınıflandırması [Soykut, 2007].....	11
Şekil 2.3. Faj temel özellikleri ve sınıflandırması [Ackermann, 2009] .....	12
Şekil 3.1. pH ve Sıcaklık ölçer.....	20
Şekil 3 2. Tuzluluk ölçer (Salinity).....	21
Şekil 4.1. Örnek alma bölgesi.....	29
Şekil 4.2. Örnekleme bölgesi.....	29
Şekil 4.3. Deniz suyu örneklerinin aylık ve pH değerleri .....	31
Şekil 4.4. Deniz suyu örneklerinin aylık NaCl değerleri .....	31
Şekil 4.5. Deniz suyu örneklerinin aylık sıcaklık değerleri .....	32
Şekil 4.6. EMB besi yerinde Metalik reflaksiyon.....	32
Şekil 4.7. İndol testi .....	34
Şekil 4.8. Metil kırmızısı testi.....	xx
Şekil 4.9. <i>Escherichia coli</i> temperent faj plak morfolojisi.....	37
Şekil 4.10. <i>Escherichia coli</i> (E14) litik fajının plak morfolojisi.....	38
Şekil 4.11. <i>Escherichia coli</i> (E32) litik fajının plak morfolojisi.....	38
Şekil 4.12. <i>Escherichia coli</i> (E65) litik fajının plak morfolojisi.....	39
Şekil 4.13. E14 Fajının büyüme eğrisi.....	40
Şekil 4.14. E28 fajının büyüme eğrisi.....	42
Şekil 4.15. E32 fajının büyüme eğrisi.....	43
Şekil 4.16. E33 fajının büyüme eğrisi.....	43
Şekil 4.17. E42 fajının büyüme eğrisi.....	44
Şekil 4.18. E57 fajının büyüme eğrisi.....	44
Şekil 4.19. E65 fajının büyüme eğrisi.....	45
Şekil 4.20. E88 fajının büyüme eğrisi.....	45

Şekil 4.21. E123 fajının büyüme eğrisi..... 46

Şekil 4.22. E146 fajının büyüme eğrisi..... 46

Şekil 4.23. 0,2 µm por çapına sahip filtreden geçirilmiş bakteri örnekleri..... 47



## **SİMGELER ve KISALTMALAR**

***Escherichia coli***: *E.coli*

**UVTK**: Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi

**N**: Azot

**P**: Fosfor

**UV**: Ultraviyole

**C**: Karbon

**MRSA**: Metisilin-Dirençli *Staphylococcus aureus*

**NaCl**: Tuz

**TEM**: Transmisyon elektron mikroskobu

**NTA**: Nano parçacık izleme tabanı

**NS**: NanoSight Limited

**HF**s: Heteroflagellat kamçılılar

**DOM**: Çözünmüş Organik Madde

**POM**: Partikül Organik Madde

**EMB**: Eosin Metilen Blue Agar

**Lact.**: *Lactobacillus delbrueckii*

**chl-a**: Klorofil-a

**PFU**: Plak form ünitesi

## 1. GİRİŞ

Virüsler hücrel bir organizasyon göstermeyen 20-400 nm arasında büyüklüğe sahip, DNA ya da RNA içeren zorunlu hücre içi parazitlerdir. Metabolik faaliyetleri kendi kendilerine gerçekleştiremedikleri için konak bir canlı hücreye ihtiyaç duyarlar. Hücre dışında kapsit adı verilen proteinle çevrili nükleik asit formundadırlar ve bu formlarına virion adı verilir. Konak hücre olarak prokaryotik ya da eukaryotik tüm canlı hücreleri enfekte edebilirler. Viral genomlar çok küçük olduklarından konak hücrenin yapısal ve metabolik bileşenlerine bağımlıdırlar [Akbulut ve Kesentaş, 2013; Gelderblom, 1996].

Virüslerin sınıflandırılması ise iki ana sınıflandırma sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu sistemler Baltimore sınıflandırması ve UVTK Sınıflandırması (Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi) olarak adlandırılır. David Baltimore'un geliştirdiği Baltimore sınıflandırması, virüsleri Romen rakamları ile numaralanmış yedi gruba ayırır ve genom yapılarına ve çoğalma tarzlarına göre yerleştirir. UVTK sınıflandırması ise ek sınıflandırma sistemi ortaya koyar. Virüslerin tür adlandırmalarını yapar ve o türleri de biyolojik sınıflandırmadakine benzer şekilde cins, alt familya, familya ve takımlara yerleştirir [Weinbauer, 2004]. Virüslerin tanımlanmasında nükleik asit tipi (DNA, RNA), nükleik asitin sayısı ve yapısı (tek veya çift iplikli olması, doğrusal ya da halkasal olması), viral genomun polaritesi (pozitif ya da negatif iplikler), nükleokapsitin simetrisi, lipid zarfın bulunup bulunmaması özellikleri değerlendirilir [Yıldırım vd., 2007].

Bakterileri enfekte eden virüsler, 1915'de İngiltere'de Frederich W. Twort ve 1917'de Paris'de Felix d'Herelle tarafından birbirlerinden bağımsız bir şekilde keşfedilmiştir. Bu iki bilim adamı da bakteri kolonilerinin eridiğini gözlemişler ancak buna etken olan faktörün ne olduğunu başlangıçta anlamamışlardır. Felix d'Herelle bu olayı keşfettiğinde bunlara bakteri yiyen anlamında "bakteriyofaj" ismini vermiştir. Bakterileri lize eden bu virüslerin keşfinden hemen sonra, bakteriyel enfeksiyonların mücadelesinde kullanılmaya başlanmıştır. Felix d' Herelle tıp alanında yaptığı virüs çalışmasında dizanteri olmuş bir çocuğun faj tedavi yöntemi ile kurtulmasını sağlamıştır. Ancak virüsler hakkında yeterli bilgi sahibi olunmaması ve kötü tıbbi sonuçlar bu çalışmanın devam etmesini engellemiştir.

Ayrıca antibiyotiklerin keşfiyle beraber bu ilginin kısa sürede azalmasına neden olmuştur [Orlova, 2012]. Son yıllarda yine artan antibiyotik dirençliliğine karşı fajların kullanımı gündeme gelmiştir. Ayrıca son yıllarda bakteri virüsleri zararlı alg patlamalarının ve siyanobakterilerin kontrolü gibi alanlarda da denenmeye başlanmıştır [Wommack ve Colwell, 2000]. Fajlar, doğal ortamlarda bakteri ölümlerinin yaklaşık %20-50'sinden sorumlu tutulmaktadır. Elektron mikroskopunun kullanılmaya başlanmasıyla 1959 yılından bugüne kadar 5568 bakteriyel virüs incelenmiştir [Ackermann, 2007].

Bakteriyofajlar (fajlar), yalnızca canlı bakteri hücreleri içinde çoğalabilirler. Bakterilerle olan ilişkileri sonucunda çoğu zaman bakterilerin parçalanarak erimesine yol açarlar. Bakteriyofajlar genellikle belirli tür veya belirli tip bakterilere karşı özgül ilişki gösterirler [Arda, 2011; Akman, 1983]. Virüslerin ekolojik ve genetik rollerinin anlaşılması için virüs ile konak arasındaki ilişki şeklinin bilinmesi önemlidir. Bakteri virüsleri ve konakları arasındaki ilişki ortamdaki mikrobiyal topluluğun yapısını etkilemektedir. Sucul ortamlardaki besin zinciri ve besin ağı kavramları son yıllarda değişmiştir. Özellikle denizlerde prokaryotların besin zincirindeki yerinin anlaşılması bu kavramının yeniden düzenlenmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Sucul sistemlerde siyanobakteriler birincil üretici olarak karbon fiksasyonuna önemli katkılarda bulunmaktadır. Ayrıca fajlar yüksek protein ve DNA içeriğine sahip olduklarından N ve P döngüsünün önemli bir basamağını oluşturmaktadır [Fuhrman, 1992; Öner, 1996].

Virüsler ve bakteriler ile ilgili ekolojik çalışmaların çoğunluğu bakterilerin ölümü ile sonuçlanan litik enfeksiyonlar üzerine odaklanmıştır. Oysa lizogenik hayat döngüsü gösteren fajlar da ekolojide oldukça önemlidir. Çünkü profaj durumundaki herhangi bir faj çeşitli etkenlerle litik döngüye geçebilmektedir. Şimdiye kadar fajların indüklenmesine UV, sıcaklık, mitomycin-C, hidrojen peroksit, alkilleyici etkenler, 6-azourasil gibi etkenlerin neden olduğu bilinmektedir. Son çalışmalarda kirlilik etkenlerinin de faj indüksiyonuna neden olabileceği gösterilmiştir. Su, sıcaklık, hidrostatik basınç, radyasyon, iyonlar, oksijen, pH, organik materyal ve ulaşılabilir konak gibi çevresel faktörler fajları etkilemektedir. Ortamın kimyasal

yapısı, fajların adsorbsiyonu, replikasyonu veya litik aktivitesi üzerine etkilidir [Weinbauer, 2004].

Mikroorganizmaların tümünde bulunan karbon miktarı yeryüzündeki tüm bitkilerde bulunan karbon miktarına yaklaşık olarak eşittir. Azot ve fosfor miktarı ise tüm bitki canlı kütlelerinde bulunandan 10 kat daha fazladır [Güven vd., 2011].

*Escherichia coli* (*E.coli*) bakterisi 1885 yılında Theodor Escherich tarafından tanımlanmıştır. *E. coli* boyu eninden daha uzun 2-6 µm, 1-1,5 µm düz bakterilerdir. Gram negatif, bazen fakültatif anaerob, 1-2 mm çapında S tipi koloniler yapan bakterilerdir [Mikrobiyoloji.org, 2014]. Genomik bilgiler temelinde, altı farklı filogenetik gruba (A, B1, B2, C, D, E) ayrılmıştır [Touchon vd., 2009]. İlk zamanlarda hayvan ve insan bağırsak florasında tespit edilen *E.coli*'nin patojenik özelliğe sahip olmadığı kabul edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda bazı serotiplerinin hastalıklara neden olduğunun ortaya çıkması ile potansiyel bir patojen olarak tanımlanmıştır [Chen ve Frankel, 2005]. İnsan ve hayvanlarda patojen olup sindirim ve diğer sistemler için zararlı olan suşları mevcuttur. *E.coli* kommensal, intestinal patojenik ve extraintestinal patojenik suşları olarak sınıflandırılabilir [Johnson ve Thomas, 2000; Dongyou, 2014]. *E.coli* bakterileri bifazik (konağa bağlı ve bağlı olmayan ) özelliğe sahiptirler. *E.coli* türleri çoğalma ve yaşamda kalma şansları da çevresel faktörlerle değişebilmektedir. Örneğin sıcaklık ve sıcaklık rejiminin değişimi *E.coli* varlığını etkileyen bir faktördür. Genellikle sabit sıcaklık değerlerinde hayatta kalma şansı daha yüksek iken sabit bir sıcaklığın ölçülemediği toprak ve su gibi ortamlarda verimli ölçümler yapılamamıştır [Elsas vd., 2011]. Bakterilerde konjugasyon, rekombinasyon, operon kavramları ilk *E. coli* 'de keşfedilmiştir, DNA'nın çoğalması, RNA transkripsiyonu, protein sentezi gibi, moleküler genetiğin çoğu mekanizması, *E.coli* üzerinde yapılan araştırmalarla ortaya çıkarılmıştır. *E. coli*, iyi bilinen genetik yapısı, onun genetik mühendisliği, metabolizma mühendisliği ve protein mühendisliği alanlarında da çalışma yapan bilim adamlarının sürekli başvurduğu canlı haline getirmiştir. Ayrıca hızlı üreme oranı ve kültür ortamında kolay üretilmesi *E. coli*'yi endüstriyel alanlarda dahil bir çok araştırmada vazgeçilmez yapmıştır [Yin vd., 2007]. Mikrobiyoloji alanında

yapılan çalışmalarla kazanılan çoğu Nobel Ödülü *E. coli* 'de yapılan araştırmalara dayanır [Wikipedia, 2014].

*E.coli* kanalizasyon çıkışlarına yakın bulunan yüzme havuzu, göller, şebeke suları ve deniz sularından izole edilebilmeleri mümkün olmuştur. Su içerisinde *E.coli* tespit edilmesi mikrobiyolojik açıdan dışkı kirlenmesi ve sıhhi açıdan su kalitesi ölçütü olarak kullanılabilir. Çünkü *E.coli* dışkı kirlenmesinin evrensel bir göstergesi olarak kabul edilir [Tsen ve Chi, 1988]. Koliform grubu bakterilerin çoğunluğu enfeksiyona neden olmaz ancak ortamda hastalık yapıcı virüs, bakteri, protozoa olabileceğini gösterir.

Araştırmamızda, Mersin-Mezitli sahilinde (Mezitli Halk plajı) koliform grubu bakterilerden olan *E.coli*'ye özgü fajların mevsimsel değişimi hakkında bilgiler edinilecektir. Çeşitli fiziksel ve kimyasal parametrelerin bakteriyofajların sayısal ve yaşam döngüleri üzerine etkisi belirlenecektir Bu çalışma, bu bölgede koliform grubu bakteri fajları ile yapılan ilk çalışma niteliğindedir. İzole edilen *E.coli* bakterilerinin faj profilleri çıkarılmış ve ortamdaki mikrobiyal topluluğun dağılımı hakkında bilgiler edinilmiş olacaktır. Ortamda bulunan fajların enfeksiyon tipleri (lizogenik veya litik) saptanarak, bazı çevresel faktörler açısından değerlendirilmesi yapılacaktır. Özellikle ekolojik açıdan önemli olan bu fajların doğal ortamlardaki bakterilerle ilişkilerini içeren çalışmalar oldukça sınırlıdır. Ülkemizde bu konu ile çalışan araştırmacı sayısının oldukça sınırlı olması konunun önemini daha da artırmaktadır. İzole edilen bakterilerin fajlarının elde edilmesi, saflaştırılması ve kısmi tanımlanması gerçekleştirilecektir. Faj enfeksiyon tiplerinin belirlenmesi ile bakteriler arasındaki ilişki saptanacaktır. Litik ve lizogenik tipte hayat döngüsü geçirenlerin oranları saptanıp ortamdaki mikrobiyal sistemin dinamiği hakkında bilgiler edinilecektir. Ayrıca ortamda bulunan faj ve konak bakterilerin mevsimsel değişimlerinin tespit edilmesiyle, fiziksel ve kimyasal parametrelerle olan ilişkileri değerlendirilecektir.



## 2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

### 2.1. BAKTERİYOFAJLAR VE UYGULAMA ALANLARI

Fajların keşfedilmesi Fredrick Twort ve Felix d'Herelle tarafından 1915-1917 yıllarına dayanmasına rağmen son 50 yılda fajlar moleküler biyolojinin gelişmesiyle, genetik kodun çözülmesi ve DNA identifikasyonu gibi önemli buluşların merkezinde yer aldı. Fajlar gen eylemleri ve biyolojik yapıların temel moleküler mekanizmaları keşfinde kullanıldı. Fajlar son yıllarda, özellikle faj genomu alanında yeni biyokimyasal mekanizmaları açıklayıcıdır. Ayrıca faj gen ürünlerinin kullanımı, enfeksiyon hastalıkları, terapötik maddeler olarak da faj kökenine yeni bakış açıları kazandırılmış. Ayrıca fajların evrimsel geçmişi çok eskilere dayanan bakterilerle, evrimsel geçmişi paylaşmaları doğadaki tüm mikroorganizmalarının genetik çeşitliliğinin depoları olduğu görüşünü de desteklemektedir. Bakteriyofajlar sadece genetik bilgi taşıyan ajanlar değil ayrıca mikrobiyal nüfuz üzerine de önemli etkileri mevcuttur. Mikrobiyal ekolojide fajlar beslenme dalgalanmaları, konak canlı sayıları, konak canlı fizyolojisiyle arasında ki dinamik ilişkileri ve faj popülasyonları olarak ta bahsedilebilir. Buna ek olarak, fajların besin döngüsü, solunum sistemi, biyolojik çeşitlilik, mikrobiyal gıda ağları ve biyokimyasal döngüler üzerindeki güçlü etkisinden de bahsedilebilir. Fajların okyanuslarda enerji transferlerinde önemli rollerinin olması, deniz bakterileri ve fitoplanktonlar üzerine etkilerinin olması fajların doğal ekosistemdeki rolünü de açığa çıkarmaktadır. Bu çalışmalar ışığında fajların neden tarım ve gıda alanında da uygulanmasın sorusu gündeme gelmiş ve araştırmacılar bu alanlarda da incelemelerde bulunmuşlar. Gıda alanında bakteriyel bozulmanın önüne geçilmesi ve tarım alanında da tarım zararlıları olan bakterilerin bertaraf edilmesi üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiş. Fajların tarım ve gıda alanında kullanılmasının araştırılması bilim adamlarını insanda bakteriyel kaynaklı hastalıkların tedavisinde kullanılabilirliğini araştırmaya itmiştir. Fajların terapötik ajan olmaları faj ve faj gen ürünlerinin önümüzdeki yıllarda ilaç endüstrisi ve biyoteknolojik çalışmalarda önemli bir etkiye sahip olacağı düşünülmektedir [Borysowski vd., 2014].

### 2.1.1. Tıp Alanında Bakteriyofajlar

Bakteri hücrelerini özgül olarak eriten yapıların bulunması, fajların bakterilerle savaşta etkili silahlar olarak kullanılabilirliğini düşündürmüştür. Bu amaçla bazı spesifik fajlar üretilmiş ve bu fajlar basilli dizanteri ve kolera başta olmak üzere bir çok hastalığın tedavisinde, kontamine olmuş suların temizlenmesinde uzun yıllar denemişse de pek başarılı sonuçlar elde edilememiştir [Chanishvili, 2012]. Ancak son yıllarda fajların yine özellikle antibiyotiklere direnç geliştirmiş enfeksiyon etkenlerine karşı kullanılmasıyla ilgili çalışmalar başlamış ve bir çok araştırmacı olumlu sonuçlar almıştır [Chan vd., 2012; Chibani-Chennoufi vd., 2004; Lorch, 1999; Biswas vd., 2002; Kudva vd., 1999]

Pek çok antibiyotiğin aksine bakteriyofajlar yalnızca belirli bir bakteri türüne saldırılmaktadır. Bakteriyofajların kuyruk kısımlarında bulunan ve adhesin denilen enzimler, bakterinin yüzeyindeki türe özgü moleküllerle etkileşime girerek faj adsorpsiyonu başlamaktadır. Oysa antibiyotikler, yararlı zararlı ayırt etmeden bakteri gruplarının büyük bir kısmını yok etmekte ve etkileri zamanla azalmaktadır. Fajların alerjiye neden olmamaları, çok az yan etkilerinin olması, üretimlerinin ucuz ve kolay olması gibi özelliklerinden dolayı antibiyotiklere alternatif bir tedavi yöntemi olarak görülmektedir. Bu konuda özellikle Rusya ve Gürcistan'da bazı hastalıklar hatta radyasyona maruz kalmış hastaların bile fajlarla tedavi edildiği bilinmektedir [Coşkun, 2003].

Şahin ve arkadaşları [2013] Dünya Sağlık Örgütü'nün de belirttiği gibi antibiyotiklerin, özellikle MRSA'lar olmak üzere bir ilaca dirençli, enfeksiyon etkenleri üzerindeki etkinlikleri giderek azalmaktadır. Günümüzde antibakteriyel faj tedavi yöntemi klinik olarak önem kazanmaya başlamıştır. Sonuç olarak, çalışmalarında üzerinde durdukları ve  $\phi$  LizAnk olarak adlandırdıkları fajın, fibroblast hücreler üzerinde sitotoksik etkisinin olmaması ve güçlü antibakteriyel etkileri nedeniyle, *S.aureus*'lar tarafından oluşturulan özellikle yüzeysel deri enfeksiyonlarının tedavisinde sorunsuz olarak kullanılabilirliğini göstermişlerdir [Şahin vd., 2013].

## 2.1.2. Gıda Alanında Bakteriyofajlar

Kalkan ve arkadaşları [2010] bakteriyofajların gıdalarda patojen bakterilere karşı kullanılması ve biyokontrol konusunda gelişmeleri üzerine çalışmışlardır. Etkili bir biçimde biyokontrolün sağlanması her patojen türü için bakteriyofajların kontrolü ile konakçı fajın belirlenmesi gerekmiştir. Araştırmacılar *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7, *Listeria* ve *Salmonella* gibi gıda kaynaklı patojen bakteriler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu çalışmaların sonucu olarak gıdalarda kullanılacak faj esaslı ticari ürünlerde imal edilmiştir. Bunun yanı sıra diğer koruyucu maddelerle karşılaştırıldığında fajların kolay elde edilmesi ve üretilmesi düşük maliyetli bir alternatif olarak göze çarpmaktadır [Kalkan vd., 2010].

Seçkin ve Baladuraya [2010] göre gıdaların işlenmesi ve depolanması boyunca fajların antimikrobiyal aktivitesi sınırlıdır; fakat sonuçlar umut vericidir. Çedar peyniri üretiminde *Salmonella* ile kontamine olmuş süte fajların ilave edilmesiyle depolamadan sonra canlı hücrelerin sayısında azalma görülmüştür. Benzer olarak süt ve pıhtı üretimi boyunca *S. aureus* gelişimi fajlarla inhibe edilmekte asitle pıhtılaşmış ve yarı sert peynirlerin depolanması ve olgunlaşması boyunca inhibisyon devam etmektedir. Ayrıca meyvelerde de *Salmonella* fajı analiz edilmiştir. Faj sayısı kavunda stabil kalarak hedef bakteride önemli derecede azalma görülmüştür [Seçkin ve Baladura, 2010].

Lu ve arkadaşları salatalık fermentasyonunda fajların etkisi üzerine çalışmışlardır. Salatalık fermentasyonunda yüksek tuz yoğunluğunun azaltılarak düşük tuz yoğunluğunda fermentasyonlar geliştirmeye çalışmışlar. Çalışmada normal starter kültürler kullanılmış, 90 gün fermentasyon tankından alınan tuzlu su örnekleri DEMAN-Rogosa-Sharpe agar plakalar üzerine dökülmüştür. Rastlantısal olarak faj izolasyonu gerçekleşmesi için 576 laktik asit bakteri izolatu kullanılmıştır. Filtrelenmiş tuzlu sular önemli bir faj kaynağı olarak görev yapmış faj izolatları arasından 57 bağımsız faj izolatu elde edilmiştir. Bakterial izolatların % 10 faj saldırılarına duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Araştırma sonuçlarında en fazla *L. brevis*'in faj saldırılarına maruz kalmış ve bazı fajların bir kaç konak türe etki ettiği tespit edilmiştir. Çalışmada düşük tuz yoğunluklu salatalık fermentasyon ürünleri elde edilebilmesi adına fajların kullanılabilmesi gösterilmiştir [Lu vd., 2012].

Park ve arkadaşları [2000], *Plecoglossus altivelis* balıkları yetiştirme havuzlarından izole ettikleri Myoviridae ve Podoviridae familyalarını temsil eden iki bakteriyofaj kültürünü *Plecoglossus altivelis* balıklarında çalışmıştır. Bakteriyofajların yemle balıklara oral olarak verilmesi sonucu *Plecoglossus altivelis* balıklarında hastalıklara neden olan *Pseudomonas plecoglossicida*'dan kaynaklanan enfeksiyonlara karşı koruma oluşturduğu ve böbreklerde bakteriyel hücrelerin sayılarında hızlı düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar *P. plecoglossicida*'nın neden olduğu hastalıkları kontrol etmek için faj kullanmanın mümkün olabileceğini göstermiştir [Park vd., 2000].

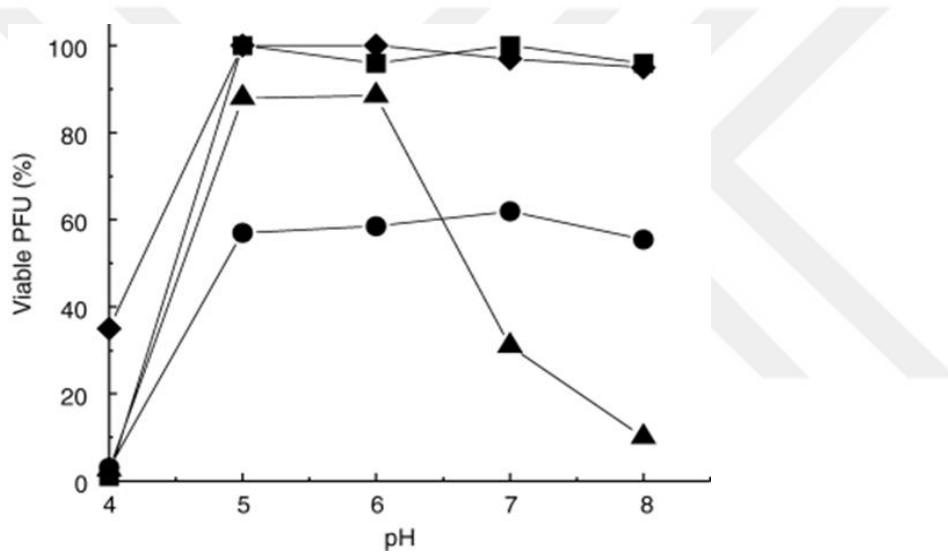
Cox-Foster ve arkadaşları tarafından [2007] ABD 'de milyonlarca bal arısının toplu ölümüyle arıcılık sektörünü tehdit eden sorunun kaynağında IAPV adlı bir virüsün olduğunun ortaya konulması gösterildi. Shotgun dizileme tekniklerinin gelişmesiyle insanlarla bakteriler arasındaki ilişkilerin açığa çıkarılmasında da Metagenomik yaklaşım daha sık kullanılmaya başlanmıştır [Üstek vd., 2011].

## 2.2. FİZİKSEL VE KİMYASAL FAKTÖRLERİN MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNE ETKİSİ

Mikroorganizmaların gelişimini ve aktivitesini belirleyen önemli faktörlerden birisi ortamın pH'ıdır. Bazı mikroorganizmalar pH=4,0' ün altında gelişmekle birlikte büyük bir kısmı en iyi pH=7,0 (6,6-7,5) civarında gelişmektedir. Patojen bakteriler başta olmak üzere, bakteriler minimum 4,5 optimum 6,5-7,5 ve maximum 9,0 pH değerlerinde yaşayabilirler. Bu yönüyle maya ve küflere göre daha seçicidirler. Bunun yanında *E. coli* serotipleri optimum olarak 37 °C'da ve pH 7,2'de üremektedirler [Ekici vd., 2008].

Lerner ve arkadaşları [2003], yaptıkları araştırmada biyolojik sistemlerde pH değerinin, mikroorganizmaların hayatta kalabilmeleri ve çevresel ortamlarda faaliyette bulunabilmeleri açısından önemli bir faktör olduğunu ortaya koymuşlardır. Çoğu mikroorganizmalar distile suda yaşamayı tercih etmemeleri ve bazı bakterilerin asidik ortamları tercih etmeleri ortamın pH'nın üreme üzerine direkt etkili olduğunu göstermektedir [Lerner ve Lerner, 2003].

Quiberon ve arkadaşları [2004], sıcaklığın fajlar üzerine etkisini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada 0, 10, 20, 30, 37, 45 ve 50°C'lik inkübasyon sıcaklıklarının fajların konakçıları üzerine adsorbsiyonlarını etkileyip etkilemediği araştırılmıştır. Fajlardan sadece birinde, inkübasyon sıcaklığı 0'dan 20°C'ye yükseltildiğinde, adsorbsiyon oranının % 77,2'den % 98,2'ye yükseldiği görülmüştür. 30°C'ye çıktığında bu oran % 99'a ulaşmış ve 50°C'de dahi bu değerde kalmıştır. Diğer fajların ise YAB, Ib3 ve LL-H, sıcaklık değişiminden etkilenmedikleri tespit edilmiştir. Benzer pH'ın fajların plak oluşturmaları üzerine etkilerine bakmışlar ve Şekil 2.1'de gösterildiği gibi farklı pH değerlerinin PFU üzerine etkisi gösterilmiştir [Quiberoni vd., 2004].



Şekil 2.1. pH'ın denenen fajlar üzerine etkisi [Quiberoni vd., 2004]

Carmen ve arkadaşları Alboran denizinde yaptıkları çalışmada izole edilen örnekler üzerinde viral topluluğun çeşitliliğini belirleyerek ve özelliklerini tespit etmişlerdir. İzole edilen bakteriler çubuk şeklinde hareketli ve gram negatif özellikteydi. Bakterilerin ortamda NaCl olmadan büyüebilme özellikleri incelenmiş, ayrıca kloroform varlığında bakteriyofaj hassasiyetini araştırmışlardır. DNA içeren türlerin, birkaç bakteriyofaj türü hariç, hassas olmadıklarını göstermişlerdir [Carmen vd.,2002].

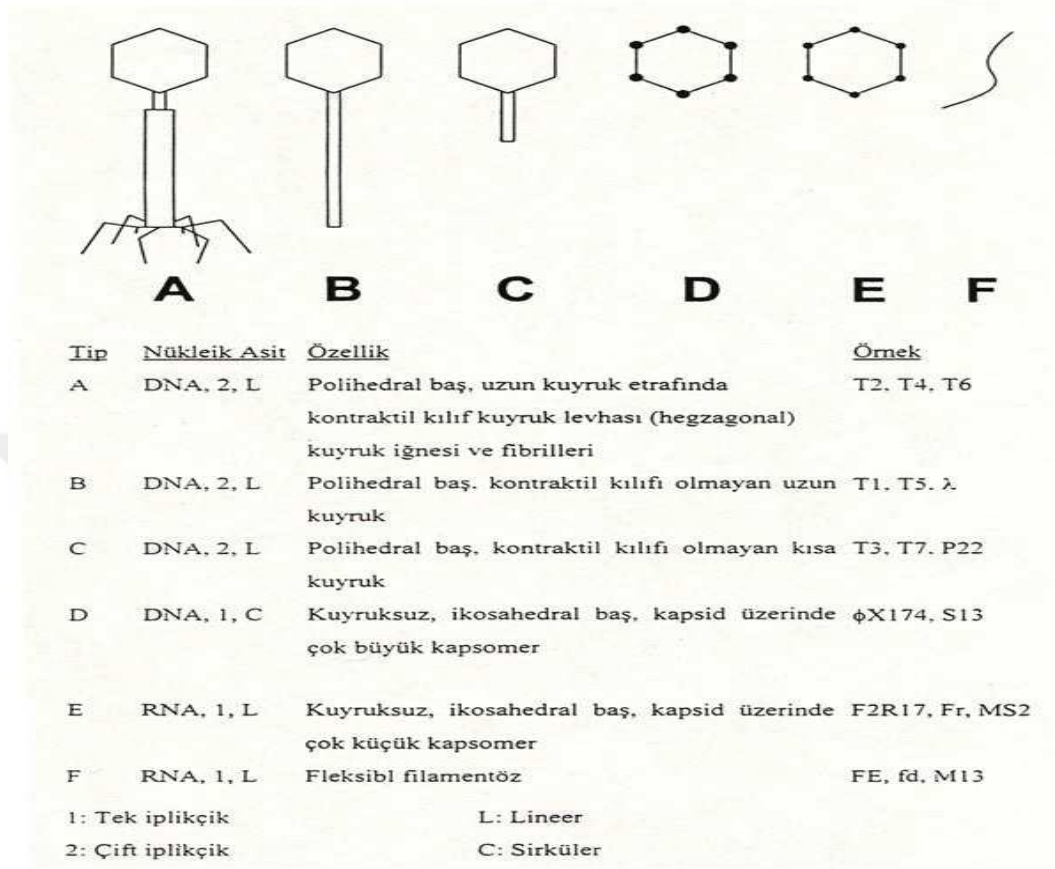
Bouvy ve arkadaşları [2009], gün ışığı ve sıcaklık gibi çevresel faktörlerin virüsler üzerine etkilerini araştırmışlar. Sudaki serbest virüslerin kalıcı gün ışığı ve

sıcaklık etkilerini tespit etmek için ılıman Fransa ve tropik Senegal bölgelerinden tatlı ve deniz suyu örnekleri alınmıştır. 12 saatte bir sabah ve akşam saatlerinde alınan bu örneklerin suyun orijinleri ve enlemi değerlendirmeye katılmadan yapılan çalışmada gece ve gündüz yapılan inkübasyonlarda virüs değerlerinde ciddi bir farklılık tespit edilmemiştir. Yaptıkları çalışmada güçlü radyasyon etkisinin virioplankton parçalarına etki etmediği, aksine, sıcaklığın tüm örneklerde viral canlılığın başlıca belirleyicisi olarak ortaya çıkmıştır. Bu durum sıcaklık anında virüslerin adaptasyon güçlerini artırarak uzun süre hayatta kalmak için evrimsel süreç içerisinde geliştikleri varsayımını ortaya çıkarmıştır [Bouvy, 2009].

### 2.3. ESCHERICHIA COLI FAJLARI

*E. coli* enfekte eden fajlar ayrıntılı olarak çalışılan ilk fajlardandır. *E.coli*'yi sıkça enfekte eden yedi tip faj tespit edilmiştir. Bu fajlar T1, T2, T3, T4 vb. adlandırılmış ve daha sonra yapılan araştırmalarda tiplendirilen T2, T4, T6 fajlarının kafa, kuyruk ve fibrillerinin birbirine benzediği tespit edilmiştir. Benzer şekilde olan bu fajlar daha sonraları T-çift fajları olarak adlandırılmıştır. Diğer virüslerde karşılaşılan durumlar *E.coli*'yi enfekte eden fajlarda da gözlemlenmiştir. Fajlar tek yada çift sarmallı DNA yada RNA bulundurlar ve genom yapıları lineer yada dairesel olabilir. *E.coli* fajları genetik materyallerini çoğaltabilmek için konak canlıya ihtiyaç duyarlar. Farklı kaynaklarda *E.coli*'yi enfekte eden fajlar olarak farklı gruplandırmalarda mevcuttur. T4, Lambda, P1, M13 şeklinde de adlandırılmış ve bu grup fajların hepsi *E.coli*'yi enfekte edebilmektedir. Tüm fajlarda kodlanmış proteinlerin oluşan bir kapsid bir kromozomu vardır. T4 ve P1 fajları ise çift sarmallı DNA genomuna sahiptir ve bu genom bir kapsitle sarılmıştır. P1 fajı 90 kb küçük bir faj iken T4 172 kb bir fajdır. T4 fajı kapsidi uzunlamasına ikosahedron yapısına sahip olup çok ayrıntılı bir kuyruk yapısına da sahiptir. P1 kapsidi ikosahedraldir, bir kılıf, bir taban plakası ve kuyruk fibrilleri olan bir kuyruğa sahiptir. Lambda fajı ise 48,5 kb'lik bir doğrusal çift sarmallı DNA genomunu, bir kapsidi ve bir kuyruğu içerir. M13 fajı kodlanmış proteinler ile çevrili 6407 nükleotidlik bir dairesel tek zincirli DNA genomunu içermektedir. M13 fajı ipliksi bir faj olarak bilinmektedir.

Bradley ve arkadaşları *E. coli* fajlarının sınıflandırmasında Şekil 2.2’de ki gibi kafa, kuyruk ve kuyruk fibrilleri özelliklerini kullanmışlardır.



Şekil 2.2. Bradley sınıflandırması [Soykut, 2007].

Ackerman ise *E.coli* fajlarını Şekil 2.3.’deki gibi kuyruklu, kübik simetrlili ve filamentöz fajlar olarak sınıflandırmıştır [Soykut ve Tunail, 2009].

Morfoloji	Nükleik Asit	Takım ve Familyalar	Cins	Örnek	Üye Sayısı	Özellikleri
Kuyruklu	DNA, ds, L	Caudovirales	15		4950	
		Myoviridae	6	T4	1243	Kontraktıl
		Siphoviridae	6	$\lambda$	3011	Kuyruk
		Podoviridae	3	T7	696	Uzun Kuyruk Kısa Kuyruk
Polihedral	DNA, ss, C ds, C, T ds, L RNA, ss, L ds, L, S	Microviridae	4	$\Phi$ X17	40	
		Corticoviridae	1	4	3?	Lipid İçeren
		Tectiviridae	1	PM2	18	Kompleks
		Leviviridae	2	PRD1	39	Kapsid
		Cystoviridae	1	MS2 $\Phi$ 6	1	Lipoprotein Kaplı Kapsid
Filamentöz	DNA, ss, C ds, L ds, L	Inoviridae	2	fd	57	Lipid Zarf Uzun veya
		Lipothrixviridae	1	TTV1	6?	Kısa Filament
		Rudiviridae	1	SIRV 1	2	Lipid Zarf TMV Benzeri Yapı
Pleomorfik	DNA, ds, C, T ds, C, T	Plasmaviridae	1	L2	6	Kapsid Yok,
		Fuselloviridae	1	SSV1	8?	Lipid Zarf Kapsid Yok, Limon Formlu

ds: çift sarmal    C: sirküler    S: parçalı  
ss: tek sarmal    L: lineer    T: süper helikal

Şekil 2.3. Faj temel özellikleri ve sınıflandırması [Ackermann, 2009]

T-Çift fajlarından olan *E.coli* fajı T4 1940'lı yıllarda incelenmeye başlanmış ve moleküler biyolojinin önemli bir köşe taşı olmuştur. Teknolojik ilerlemeler sayesinde şimdi moleküler biyologlar karmaşık model yapıları ökaryotlarla da çalışma imkanı bulmuşlar. Genomik popüler bir dal olunca bakteri ve fajlarda çalışma olanağı sağladı. *E. coli* üriner ve gastrointestinal enfeksiyonlara neden olan çok yönlü bir patojen olduğu için *E.coli* fajları tıp alanında da önemli araştırma sahası oluşturmuş, bilgi edinme adına çalışmalar yapılmış [Zuber vd., 2007]. *E.coli* enfeksiyonuna karşı kullanılacak faj ailesi şüphesiz T4 ailesi koli fajlarıdır. T4 Fajları *E.coli* fajları arasında en karmaşık yapıya sahip fajlardır. Kuyruk fiberleri ve konak canlıyı tanıma özelliğine sahip sensörleriyle konağını tanıma ve tutunma görevini yerine getirir. Kuyruk ayrıca faj DNA sını konak sitoplazmasına taşımayı sağlayan kanal görevini de üstlenir [Leimana vd., 2003]. T4 fajı en iyi karakterize faj olması ayrıca bu fajların memeli bağırsaklarında doğal bir bileşen olması, dışkı ve kanalizasyondan kolayca izole edilebilmesi faj terapide kullanılmasını

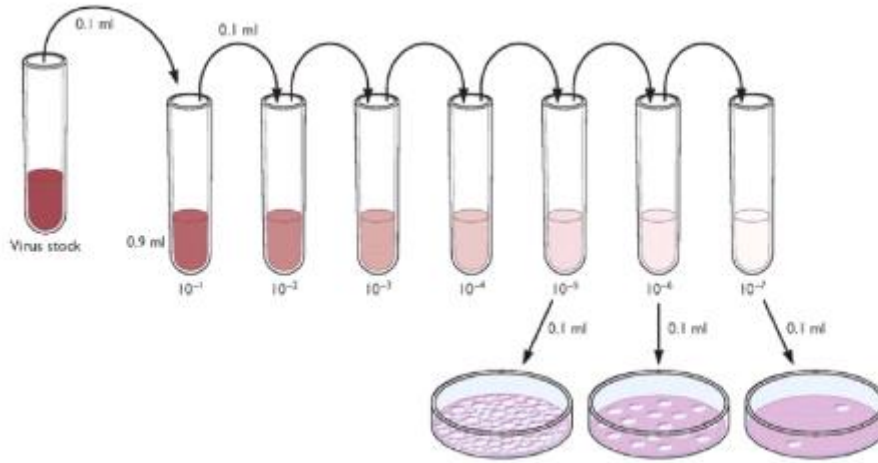


kolaylaştırıyor. *E.coli* fajlarının kanalizasyon ve dışkıdan izole edilmesi bağırsak florasında *E.coli* fiziksel yada fizyolojik faj enfeksiyonuna karşı korunaklı olduğu tespit edilmiş [Chibani-Chennoufi vd., 2004].

Mikroorganizmalar arasında gen klonlamasında bir çok aracı moleküllerden (vektör) yararlanılmaktadır. Vektör olarak *E.coli*'yi enfekte eden (M13, lambda vb.) fajlar sıkça kullanılmaktadır. Tek iplikcikli filamentöz fajlardan olan *E. coli* M13 fajı, lambda fajı kadar olmasa bile, yabancı genlerin aktarılmasında denenmiştir [Arda, 2000].

#### 2.4. VİRÜS SAYIM YÖNTEMLERİ

F.d'Herelle' nin 1917 yılında uyguladığı yöntem günümüze kadar küçük değişikliklerle korunmuştur. Geleneksel anlamda faj deneyi, litik bir faj ve bu fajın litik aktivitesine izin veren konak bir bakteri ve ortama salınan serbest fajlardan oluşur. Faj sayılarının belirlenmesinde geleneksel ve modern anlamda yöntemler bulunmaktadır. Bulaşıcı virüs sayısının saptanması için yaygın bir şekilde kullanılan yaklaşım plak deneyidir. Bu deney bakteriyofaj titrelerinin hesaplanması için kullanılan bir yöntemdir. Renato Dulbecco prosedüre birkaç yenilik getirmiştir. Hayvan virolojisi de dahil çok farklı virüs titrelerinin belirlenmesi için bu yöntem kullanılmaya başlanmıştır. Virüs sayılarının hesaplanması klasik yöntemde petride oluşan plakların sayılmasıyla gerçekleştirilir. Plakların sayılması sırasında petri kaplarının büyüklüğüne dikkat edilmesi gerekmektedir. Plak deneyi sayım yöntemi gerçekleştirilirken petride oluşan plak sayıları göz önünde bulundurulur. Bu sayımda genellikle 10-100 plak oluşturan kaplar kullanılmaktadır (Şekil 2.4.). Yöntemde araştırmacılar 100 plak bulunduran petripleri kullanmışlar ve hesaplama sırasında (+,-) % 10'luk hata payı eklemişlerdir. Virüs plaklarının titresi gerçekleştirilen dilüsyona göre de farklılık oluşturmaktadır [Racaniello 2009].



Şekil 2.4. Faj plak deneyi [Racaniello, 2009]

Çift tabaka ekim yöntemi uygulanarak gerçekleştirilen bu yöntemde, konak bakterileri faj olmayan bölgelerde çoğalmalarına devam eder. Faj olan yerlerde litik aktivite sonucu plak oluşumu gözlenmektedir. Faj sayısı PFU/ml olarak değerlendirilmektedir. Litik aktivitenin gözlemlendiği faj formlarında bu yöntem uygulanabilmektedir. lizogenik yaşam formuna sahip fajın plak oluşturması ilk aşamada mümkün olmayacağı için bu yöntem gözle görüle bilen plak oluşumlarında kullanılabilir.

Geleneksel yöntemlerden sonra günümüzde faj sayılarının belirlenmesi için farklı yöntemlerde kullanılmaktadır. Transmisyon elektron mikroskopu (TEM) kullanılarak gerçekleştirilen sayım yöntemi, epifloresans mikroskopu kullanılarak gerçekleştirilen sayma yöntemi, bu yöntemler DNA florokrom boyama yöntemiyle gerçekleştirilmektedir. Fajların bu yöntemlerle sayılmasında da zorluklarla karşılaşmıştır. Epifloresans mikroskopu kullanılarak gerçekleştirilen yöntemde arka planda farklı floresans noktaları oluşması gerçek faj sayısının belirlenmesinde karşılaşılan zorluklardandır. Yine TEM kullanılarak gerçekleştirilecek yöntemin ise ekipmanlarının çok pahalı olması bu yöntemin normal laboratuvar ortamında kullanılmasını mümkün kılmamaktadır.

Son olarak iki yeni yöntem faj konsantrasyonlarının tespiti için önerilmiştir. Kantitatif gerçek zamanlı PCR yöntemi, bu yöntem sonucu yaklaşık 4 saat içerisinde

vermektedir. Nanoparçacık izleme tabanlı (NTA), NanoSight Limited (NS) teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilen yöntemde süspansiyon içerisindeki nanotaniciklerin tespiti için kullanılmıştır. NS yöntemi ise sonuçları daha hızlı bir şekilde elde edilmesini sağlamıştır yaklaşık 5 dk içerisinde sonuçlara ulaşılmaktadır.

NTA-tabanlı yaklaşım berrak bir sıvı içinde nanopartiküllerin doğrudan, gerçek zamanlı görselleştirmesi için lazer ışıklı optik mikroskopi kullanılarak hesaplanmıştır. Nanotaniciklerin analizi bu yöntemle gerçekleştirilmiştir. [Anderson, vd., 2011]. PA yönteminin uygulanması son zamanlarda geliştirilen yöntemlere nazaran daha uzun sürede sonuçlanmaktadır. Yaklaşık 18 saat, bunun yanında diğer yöntemlere göre daha ucuz olması laboratuvarlarda tercih edilmesini sağlamıştır.

Genel korelasyondan PA kullanıldıktan sonra diğer testlerin uygulanması sonuca ulaşma açısından daha yararlı olabilmektedir.

Bettarel ve arkadaşları [2000] ve Lang ve arkadaşlarına [2009] göre virüs varlığının tespit edilmesi ve sayılmasında TEM kullanılmış, fakat yüksek büyütme sonucu hatalı sonuçlara ulaşılmıştır. Daha sonra epifloresan mikroskopu ve akışkan hücre sayımı kullanılarak daha doğru sonuçlara ulaşılmıştır. Epifloresans mikroskopunun kullanılmaya başlanması ile çeşitli (SYBR –GOLD, SYBR GRN vb.). floroklor boyaları kullanılmıştır ssDNA yapısına girişi kolay olan bu boyalar sayesinde virüs sayımı daha kolay elde edilmektedir [Bettarel vd., 2000; Lang vd., 2009].

Forterre ve arkadaşlarına [2013] göre DNA virüslerinin sayısının tespit edilmesinde kullanılan floresan mikroskopunun zorluklarla da karşılaşması olmuş floresan noktası oluşturabilecek yapılar zar türevi kesecikler, gen transfer ajanları, ölü hücre atıkları vb. DNA virüsleri ile karıştırılmasına neden olmuştur [Forterre vd., 2013].

Suttle ve Fuhrman, epifloresan mikroskopuyla aquatik ve sediment örneklerinden virüs partiküllerinin sayımı için SYBR Green I boyası ve YO-Pro boyası kullanmışlardır. Benzer şekilde Lunau ve arkadaşları epifloresan mikroskopu ile sediment ve bulanık ortamlardan bakteri sayımı için SYBR Green I boyası kullanarak yeni bir metot geliştirmişlerdir [Suttle ve Fuhrman, 2010].

## 2.5. MİKROBİYAL EKOLOJİ

Murray ve arkadaşlarını [1994] mikrobiyal döngünün tanımlanmasından sonra mikroorganizmalar ile planktonik canlıların etkileşimleri önemli araştırma konusu olmuştur. Yakın zamana kadar planktonların mikrobiyal döngüde bakteriyel üretimle etkileşiminden bahsedilirken şimdilerde virüslerin mikrobiyal döngüde çok daha etkili olduğu görüşü savunulmaktadır. Yapılan çalışmalarda mikrobiyal döngüye bakteriyel üretimin büyüme ve geri dönüşümünün virüs varken nasıl işlediğini mesoplankton ve zooplankton aktivitelerinin virüs varlığında ve yokluğunda hangi değerlerde seyrettiğini açıklamaya çalışmışlardır. Örneğin virüs varlığında mesoplankton ve zooplankton değerleri % 10-30 arasında iken virüs yokluğunda % 5-15 arasında seyretmiştir. Böylece mesoplanktonik ortamda bakteriyofajların deniz üretimini önemli ölçüde etkilediği kanısına varılmıştır [Murray ve Eldridge, 1994].

Tuomi ve Kuuppo [1999] Baltık denizinin Finlandiya körfezi korunaklı bölgesinde yaptıkları deneyde inorganik besin ilavesi N, P ve C denenmiştir. Karbon kaynağı olarak ta sukroz ilavesi yapılmış. Eklenen maddeler N ve P fitoplankton sayısını artırırken sukroz eklenmesi ise bakteriyel üretimi artırmıştır. Gözlemlerde bakteriyel, viral ve nanoflagellat oranlarının bolluğuna dikkat çekilmiş, bakteri bolluğu ve enfekte olmuş bakteri bolluğu da dikkat çekilen noktalar arasında olmuş. Ayrıca bu çalışmada viral lizinin neden olduğu bakteriyel ölüm ve bozulma oranları, enfekte olan bakteri oranlarına bakılarak öğrenilmeye çalışılmıştır [Tuomi ve Kuuppo, 1999].

Jiang ve arkadaşları Mamala körfezinde, denizel temperent faj-konak sistemlerinin karakterizasyonu ile ilgili yapmış oldukları çalışmada lizogenik bakterilerin oldukça yoğun olduklarını ve bunların mikrobiyal genetik farklılıklara ve mikrobiyal kompozisyona önemli katkılarının olduğunu göstermişlerdir [Jiang, Kellogg ve Paul 1998]

Paul ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ise denizel ortamlarda lizogeniyi indükleyen çevresel ve insan kaynaklı etkenlerin olduğunu göstermişlerdir [Paul vd., 1997]

Fuhrman'a [1999] göre virüsler yeryüzündeki en kalabalık topluluklardandır. Virüsler için denizdeki mikrobiyal ajanlar tanımlaması yapılmakta ve virüsler için küresel biyojeokimyasal döngüler ve mikrobiyal topluluk ekolojisinde önemli rol oynadıkları kabul edilmektedir. Virüslerin tüm canlıları enfekte edebilme yetenekleri besin döngüsü, bakteri ve algal toplulukların dağılımı ve biyoçeşitliliğini etkilemeleri, genetik aktarımda görev almaları önemini ortaya çıkarmaktadır. Yeni oluşturulan floresans ve moleküler teknikler bu değerlendirmelerin ölçülmesinde önemli adımlar atılmasına imkân sağlamaktadır [Fuhrman, 1999]. Şimdiye kadar fajlarla ilgili yapılan çalışmalar, tıp alanında bakteri tiplendirilmesi, endüstriyel alanı (fermentasyon ürünlerinden verimin artırılması için) ve moleküler biyoloji çalışmalarını (klonlama, ekspresyon ve enzimleri) kapsamaktadır. Ancak ekolojik açıdan önemli olan bu fajların doğal ortamlardaki bakterilerle ilişkilerini içeren çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Williamson ve arkadaşlarının [2002] yaptıkları çalışmada Florida Tampa körfezinde lizogenik fajların mevsimsel değişimlerini araştırmışlar. Fajlar üzerine çevresel ve biyolojik faktörlerin direk veya indirek etkisinin varlığını tespit etmişlerdir [Williamson vd., 2002].

Maurice ve arkadaşlarının bir yıl boyunca kuzey göllerinde yaptıkları çalışmada fajların mikrobiyal döngüsünün mevsimsel olarak nasıl değiştiği hipotezi üzerine çalışmışlardır. Kuzey göllerinin tercih edilmesi bu göllerin 4-5 aylık buzul döneminin olması, güçlü mevsimsel değişimlerin gözlemlenmesi bu değişimlerle beraber fizyolojik metabolik aktivitelerin dalgalı olması, hipotezin verimli olmasında önemli etken oluşturmuştur. Kışın buz örtüsünün hakim olduğu göllerde viral ve bakteriyel değişimleri, özellikle bakteriyel toplulukta olumsuz etkiler gözlenmiştir. Ötrofik göllerde düşük metabolik bakteriyel aktivite, hasarlı hücrelerin yüksek oranda olmaları lizojenik faaliyetlerin en üst düzeyde olduğu döneme denk gelmektedir. Olumsuz koşullarda konak bakterilerin virüsler için bir sığınak oldukları anlamı çıkarılmıştır [Maurice vd., 2010].

Saura ve arkadaşlarının [2011] Blanes körfezinde virüslerin heterotrofik kamçılılar (HFs) üzerine etkilerini araştırmışlar Nisan 2006 ve Şubat 2007 tarihleri arasında alınan örneklerle inceleme gerçekleştirmişler. Her deneme için 5

mikronmetre süzölmüş deniz suyu örnekleri alınmış bu örnekler aktif virüsler ve ısı ile inhibe edilerek pasifleştirilmiş virüslerle hazırlanmış. Değişikliklerin ölçülmesi için 48 saat boyunca inkübasyona bırakılan örnekler incelendiğinde aktif virüslerin HF oranları inaktif virüslerin oranlarına göre daha fazla tespit edilmiştir. Bu sonuçlar virüslerin doğrudan protistleri parçalaması olabileceği gibi dolaylı olarak bakterilerin lizisi ile HF popülasyonunu etkilemiş olabileceğini göstermiş. Sonuçlar ayrıca virüs, bakteri ve HF etkileşimlerinin önemli oldukları göstermektedir [Saura vd., 2011].

Karel ve arkadaşlarının yaptığı deneyde örnekler Meksika körfezinden alınmış. Virüs ve bakterilerin mikrobiyal döngüye etkileri sianococcus üzerinde yapılan araştırmayla ortaya çıkarılmaya çalışılmış. Örnekler Meksika körfezinden 0,2 mikro metrelik süzölme ile virüsler muhafaza edilmiş; diğer örnekte ise ultra süzölme ile virüssüz deniz suları oluşturulmuş. Alınan sonuçlarda bakteri, virüs ve üretici bir hücrelilerin olduğu ortamlarda sianococcusların üreyebildikleri gösterilmiş. Bu bulgu heterotrofik bakterilerin viral lizilenmesi ile fitoplankton büyümesini ve ekosistem ölçekli karbon üretimini nasıl etkilediğini göstermektedir [Karel, 2011].

Kang ve arkadaşları [2013] deniz bakterilerini enfekte eden fajların izolasyonu ve karakterizasyonunda metagenomik çalışmışlardır [Kang vd., 2013].

Son on yılda yapılan çalışmalar deniz ekosistemleri ve mikrobiyal toplulukların önemini göstermiştir. Mikrobiyal topluluğun (çözünmüş organik karbon (DOM), partikül organik madde (POM), inorganik besinler için mevcut kaynakların değerlendirilmesi ve doğrudan viral ve mikrobiyal sayım yoluyla viral ve bakteriyel toplulukların kapsamlı bir açıklama getirilmeye çalışılmıştır. Viral ve bakteriyel topluluk karakterizasyonu için kullanılan, özellikle metagenomik dizileme teknikleri, ancak son yıllarda kurulmuştur ve hala iyileştirme sürmektedir. Burada sunulan yöntemler sucul ekosistemlerde viral ve mikrobiyal dinamikleri kapsamlı bir değerlendirme oluşturmak için bir araç sağlayacaktır [Haas vd., 2014].

Roosinck ve arkadaşlarının son dönemlerde fajlar üzerine yapılan araştırmalarında fajların indüklenmesine Uv, sıcaklık, mitomycin-C, hidrojen peroksit, alkilleyici etkenler, 6-azourasil gibi etkenlerin sebep olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmalarda kirlilik etkenlerinin de faj indüksiyonuna neden olabileceği anlaşılmıştır. Ayrıca araştırmalara göre mutualist yaşam formlarında olduğu gibi bazı virüslerin lizojenik formda olması konakları ile uyum sağlayarak uzun süre yaşam sürmelerini sağlayabilmiştir [Roossinck, 2011]. Yine Lerner ve arkadaşlarına göre virüsler artık konak DNA'sı replike oldukça viral DNA' da replike olmaktadır. Profaj durumundaki DNA' nın tekrar indüklenebilmesi çeşitli faktörlere bağlıdır [ Lerner vd., 2003] bu faktörlerin Uv, Sıcaklık, Mitomycin-C .vb. olduklarından bahsedilmiştir.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Deniz suyu örnekleri Eylül 2013 Ağustos 2014 tarihleri arasında her ay Mersin-Mezitli sahilinde (Halk plajı) 36°44'26.60" K. ve 34°36'30.11"D matematiksel konumundan steril 50 ml'lik polipropilen şişelere alınmıştır. Buz üzerinde laboratuvara getirilen su örnekleri bakteriyofaj ve bakteri izolasyonunda kullanılmıştır.

#### 3.2. FİZİKSEL VE KİMYASAL PARAMETRELER

Örnek alımı sırasında Wissenschaftlich (pH 315 i/set 2 A10-1012) marka taşınabilir pH metre kullanılarak (Bknz. Şekil 3.1.) su sıcaklığı ve pH değeri ölçülmüş, tuzluluk (salinity) için ise Eutech EcoScanhand-held TDS6+ marka (Bknz. Şekil 3.2.) kullanılarak tuzluluk değerleri ppm düzeyinde belirlenmiştir.



Şekil 3.1. pH ve Sıcaklık Ölçer





Şekil 3.2. Tuzluluk ölçer (Salinity)

### 3.3. BAKTERİ İZOLASYONU ve TANIMLANMASI

Laboratuvar ortamına getirilen deniz suyu örnekleri membran filtrasyon tekniği kullanılarak filtre edilmiştir. Bakteri izolasyonu için 0.2 µm por çapına sahip Anodisc 25 (catno: 6809-6022) filtreleri kullanılmıştır. 20 ml deniz suyu aseptik koşullarda filtre edildikten sonra filtre kağıdı Nutrient agar besiyerine bırakılmıştır. Filtrasyon işlemi 3 tekrar şeklinde uygulanmış, 30°C’de 24 saatlik inkübasyondan sonra oluşan koloniler sayılmıştır. Tek koloniler Nutrient Agar ile hazırlanmış yatık agar besiyerlerine ekilmiş, 24 saat 35 °C’de inkübe edilmiştir. Üreyen suşlar bakteri tanımlaması için stoklarda buzdolabında bekletilmiştir.

#### 3.3.1. Nutrient Agar

İçeriği pepton 5 gr, et özütü 3 gr ve agar 12 gr olan dehidre besi yeri (Merck 1.05450.0500) 20,0 gr/L olacak şekilde distile su içerisinde eritilmiş, stok amaçlı hazırlananlar için tüplere yaklaşık 10–15 ml kadar dağıtılmıştır. Tüplere

dağıtıldıktan sonra 121 °C 1 atm basınç altında otoklavda 15 dakika steril edilen besiyerlerine bir yükselti koyarak yatık bir şekilde donması beklenmiştir.

İzolasyon ve çift tabaka ekimler için ise besiyeri önceden steril edilerek 50-60°C' ye kadar soğuması beklenmiş ve aseptik koşullarda, 170 °C'de 1 saat steril edilmiş olan petri kutularına yaklaşık 20 ml olacak şekilde dökülmüştür [Halkman ve Sağdaş, 2011].

### 3.3.2. Saf Kültür Eldesi

Filtrasyondan sonra filtre kağıdı besiyeri üzerine yatırılmış ve inkübasyona bırakılmıştır. Üreyen ve tek düşen koloniler saf kültür olarak alınmıştır. İkinci kez saflaştırmak için tek koloni ekim yöntemi kullanılmıştır. Inkübasyonu takiben elde edilecek kültürden tüpteki eğik katı besiyerine tekrar ekim yapılarak inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen saf kültürlerin tekrar kullanılmaları amacıyla stokları oluşturulmuş, bu stoklar +4°C'de eğik katı besiyerlerinde saklanmıştır [Karaçetin vd., 2011].

### 3.3.3. EMB (Eosin Metilen Blue)

Dehidre Hazırlanan dehidre besiyeri 36,0 g/L ölçülerinde olacak şekilde damıtılmış su içinde ısıtılarak eritilmiştir. Besiyeri, otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Besiyeri 45-50 °C'ye soğuduğunda steril petri kutularına dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızımsı-kahve, menekşe-kahverenginde ve 25 °C'da pH'sı 7,1±0,2 olmalıdır. Genellikle koliform grup bakteri sayımında ve *E. coli* tanımlanmasında kullanılmaktadır. 35-37 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda menekşe renkli ve yansıyan ışıkla yeşilimsi metalik parlak şekilde görülen koloniler *E. coli* 'nin varlığını göstermektedir. Sürme ve yayma ekim teknikleri kullanılarak Metalik parlaklığın izlenebilmesi mümkün olabilmektedir [mikrobiyoloji.org, 2014].

### 3.3.4. IMViC Testleri

#### 3.3.4.1. İndol testi

İndol testi, triptofanaz enziminin varlığını tespit etmektedir. Bu enzime sahip bakteriler triptofandan zengin besiyerlerinde ürerken triptofanı hidrolize eder ve yıkım ürünlerinden biri olan indolün açığa çıkmasını sağlarlar. Bu test, açığa çıkan indolün bazı aldehitlerle birleştiğinde renkli bir bileşik oluşturması prensibine dayanır. İndolün oluşup oluşmadığı ortama katılan reaktifin içindeki aldehit ile birleşerek pembe/kırmızı renklerin meydana gelmesiyle anlaşılabilir. İndol testi için yaygın iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlar spot (hızlı) test ve geleneksel test olup, spot testte indol doğrudan triptofandan zengin besiyerinde üreyen koloniden saptanır. Geleneksel tüp testinde ise; tüplerin bir gece inkübasyona bırakılması gerekmektedir. Bu yöntemle zayıf indol üretimi olan bakterilerin tanımlanması bile mümkün olabilmektedir. Çalışmamızda spot indol testi kullanılmıştır. Whatman (no:1) filtre kağıdı üzerine 1-2 damla spot indol çözeltisi (remel R21245) damlatılır. Taze bakteri kültürü filtre kağıdına bırakılarak 1-3 dakika beklenir. Mavi renk oluşumu testin pozitif sonuç verdiğini gösterir [thsk.saglik.gov.tr, 2015].

#### 3.3.4.2. Metil kırmızısı testi

Metil kırmızısı testi, besiyerinde bakterilerin glukozu fermente ederek organik asit oluşturması ve besiyerinin pH'ını düşürmesi esasına dayanmaktadır. Bu test için Clark Lups veya MR-VP besiyeri kullanılır. Test için taze bakteri kültüründen MR-VP besiyerine ekim yapılır. Kültür 1-7 gün inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra 3-5 damla metil kırmızısı indikatörü damlatılarak kırmızı renk oluşumu gözlenir. Kırmızı renk oluşumu sonucun pozitif, sarı renk oluşumu ise sonucun negatif olduğunu gösterir [Barry vd., 1970].

#### 3.3.4.3. MR-VP besiyeri (Metil kırmızısı, Voger proskauer broth)

Metil kırmızısı ve Voger-Proskauer testleri için MR-VP besiyeri kullanılmıştır. İçeriği; Peptone from meat 7,0 g/L; D(+) Glucose 5,0 g/L; Phosphate buffer 5,0 g/L. Dehidre besiyeri, 17,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilip,

standart deney tüplerine 5'er ml olarak dağıtılır ve otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak, sarımsı-kahve renktedir ve 25 °C' de pH' sı  $6,9 \pm 0,2$ 'dir [sigma-aldrich.com, 2014].

#### 3.3.4.4. Voges - Proskauer (VP) testi

Bazı bakteriler, Glikozu parçalayan bazı bakteriler nötral bir ürün olan asetil metil karbinolu oluştururlar. Ayrıca Glikozun fermentasyonu sonucu acetoin ve bunun bir nötral redüksiyon ürünü olan 2,3 -butanediol' da  $CH_3.CHOH.CH_3$ , meydana gelmektedir.. VP testi için taze kültürden MR-VP besiyerine ekim yapılır. 1-7 gün inkübasyon süresinden sonra 6 damla Barrit'sreagent A (Fluka 29333) ve 2 damla Barrit'sreagent B (Fluka 39442) çözeltisinden damlatılır. 30 saniye ile 1 dakika arası yavaşça çalkalanır. Tüpler 10-15 dakika bekletilir. Pembe renk oluşması testin pozitif sonuç verdiği göstergesidir [Milli Eğitim Bakanlığı, 2013].

#### 3.3.4.5. Sitrat testi

Sitratı kullanabilme yeteneği karbon kaynağı olarak sodyum sitrat ve azot kaynağı olarak amonyum fosfat içeren bir besiyerinde alkali yan ürünlerin oluşumunun besiyerindeki indikatör boya yardımıyla saptanmasıyla anlaşılır. Simmon'un sitrat besiyerine ekilen bakteri suşları 35 °C'de 24-48 saat bekletilir. İndikatör kullanılmışsa renk değişimine göre sonuçlar değerlendirilir. İndikatör kullanmadan da gözle görülür bakteri üremesi, sonucun pozitif olduğunu gösterir.

#### 3.3.4.6. *E.coli* tanımlaması

EMB agarda metalik reflaksiyon veren koliform grubu bakterilerden *E.coli* tanımlaması yapmak için IMVIC biyokimyasal testleri yapılır. Bu test sonucunda Indol testi (+), Metil kırmızısı testi (+), Voger-Proskauer testi (-) ve Sitrat testi (-) olarak değerlendirilen suşlar *E.coli* olarak tanımlanır.

#### 3.3.5. Membran Filtrasyon Yöntemi

Membran filtrasyon tekniği, parçacık ve mikroorganizmaların çeşitli çaplarda filtre kullanılarak filtrenin yüzeyinde tutunulmasını sağlayan fiziksel bir işlemdir. Bakterilerde 0,2 µm ve virüslerde 0,02 µm çapında filtre kullanılır. Membran filtrasyon tekniği kısaca, analiz edilecek örneğin, içerdiği mikroorganizmanın büyüklüğünden daha küçük gözeneklere sahip membran filtre üzerinden vakum aracılığıyla süzülmesidir. Bu şekilde örneklerin içerdiği mikroorganizmalar filtre üzerinde tutulmuş olur. Süzülme işleminin gerçekleştirildiği membran filtre uygun besiyeri üzerine arada hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilerek, uygun sıcaklıktaki inkübatöre, filtre kısmı yukarıda kalacak şekilde yerleştirilir. Petri kutusu 37 C° 24 saat inkübasyondan sonra inkübatörden alınarak oluşan koloniler sayılması sağlanmıştır. Virüsler için 0.02 µm por çapına sahip membran filtre kullanılmıştır. Deniz suyu örneği vakum altında filtreden geçirilerek fajların filtrede kalması sağlanmıştır. Filtre kağıdı daha sonraki mikroskop uygulamaları için saklanmıştır [Halkman, 2008].

### 3.3.6. Fluoresant Mikroskopi Yöntemleri

Kısa dalgalı ışıklara maruz bırakılan çeşitli maddeler uzun dalgalı floresans ışığı yayarlar. Bu özellik, mikroskopik analizlerde kullanılmaktadır. Normal ışık mikroskobu teknikleri ile görüntülenemeyen bu objelerin, özel boyama maddeleri ile boyanarak (DAPI, FITC, YO-PRO, SYBR-GREEN, Rhodamine vb.) boyayı absorbe etmesi prensibine dayanır. Boyalı preparat üzerine boyandığı maddenin yansıma yapabileceği uygun dalga boyunda ışık gönderilir. Yansıtımlı ışık (Reflectedlight) prensibine dayanır [Morikawa ve Yanagida, 1981].

Bu çalışmada DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride-SigmaAldrich D9542) boyası kullanılmıştır. DAPI'nin 1 mg/ml'lik çözeltisi filtre edilmiş deniz suyu örneklerine direk uygulanmıştır. Filtre kağıdı üzerine 100 µL damlatılarak 10 dakika karanlık ortamda bekletilmiş ve epifloresan mikroskopta (Olympos BX51 marka) incelenmiştir.

### 3.4. FAJ İZOLASYONU VE TANIMLAMASI

Fajların izolasyonunda, deniz suyu örneklerinden saf kültür olarak izole edilen bakteri suşları konak olarak kullanılmıştır. Deniz suyundan 100 ml'lik nutrient broth'a ekim yapılarak 24 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresinden sonra 10 ml (1/10 oranında) kültür üzerine kloroform eklenir. 15 dakika dinlendirildikten sonra süspansiyon bakteri filtresinden geçirilir. Süzüntü karışık faj süspansiyonu olarak saklanır. Kloroform muamelesinden sonra süzüntü 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek de bakteriler uzaklaştırılabilir.

Daha önce deniz suyundan konak bakteri olarak izole edilmiş suşların taze kültüründen 2 ml'lik nutrient broth'a 100 µl inoküle edilir. 2 saat inkübasyondan sonra üzerine karışık faj süspansiyonundan 100 µl eklenir. 1-1,5 saat inkübe edildikten sonra çift tabaka ekim yöntemi ile ekim yapılır. İnkübasyondan sonra plak oluşumuna göre saf faj süspansiyonu elde etme aşamasına geçilir.

#### 3.4.1. Çift Tabaka Ekim Yöntemi

Çift tabaka ekim yönteminde petride önceden hazırlanmış besiyerinin üzerine bakteri ve faj karıştırılmış top agar dökülmesiyle uygulanan bir yöntemdir. Yöntemde 24 saatlik taze bakteri kültüründen 100 µl, 2 ml nutrient broth'a inoküle edilir. 2 saat inkübasyondan sonra 100 µl faj süspansiyonundan eklenir. 1-1.5 saat inkübe edildikten sonra eritilmiş ve yaklaşık 45 C'ye soğutulmuş top agarla karıştırılarak önceden hazırlanmış petrideki besiyeri üzerine dökülür. 24 saat 35 C'de inkübe ettikten sonra oluşan plaklar faj bulunan bölgelerdir.

Plak sayılarının titresini hesaplamak için aşağıdaki formülü kullanabiliriz.

$$\frac{\text{PFU}}{\text{ml}} = \frac{\text{plak sayısı}}{dxv} \quad (3.1)$$

d=dilüsyon

v=seyreltilmiş virüsün hacmi

[amrita.vlab.co.in, 2015].

#### 3.4.2. Saf Faj Süspansiyonu Eldesi

Saf faj süspansiyonu elde etmek için plaklar kesilip çıkarılır ve taze konak kültürüne eklenir. İnkübasyondan sonra santrifüj edilerek veya bakteri filtresinden geçirilerek saf faj süspansiyonu elde edilir. Süspansiyon SM besiyerinde buzdolabında saklanır [Gürgün ve Halkman, 1990].

#### 3.4.3. Lizogenik Faj İzolasyonu

Lizogenik bakteri iki yolla elde edilir. Çift tabaka ekim yöntemi ile elde edilmiş bulanık plaklardan lizogenik bakterilerin elde edilmesi; Bulanık olan alandan öze ile alınan bakteriler çoğaltılarak indüklemeye testi yapılır. İndüklemeye sonucunda plak oluşumunun gözlenmesi lizogenik bakteri olduğunun göstergesidir. Çift tabaka ekim yöntemi sonucunda herhangi bir plak oluşumu gözlenmeyen suşlarda da profaj indüklemeye yapılır. İndüklemeye sonucunda plak oluşumu gözlenirse suşun lizogenik bir bakteri olduğu tespit edilir.

#### 3.4.4. Profaj İndüklemesi

Profaj durumunda bulunan temperent fajların indüklenmesi için çeşitli kimyasal maddeler kullanılır. Bu çalışmada indüklemeye ajanı olarak Mitomycin-C kullanılmıştır. 24 saatlik bakteri kültüründen 2 ml'lik nutrient broth'a 100 µl ekim yapılarak 2 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Üzerine son konsantrasyon 0.4 µgr/ml olacak şekilde Mitomycin-C eklenerek 2 saat inkübasyona devam edilmiştir. Süre sonunda çift tabaka ekim yöntemi kullanılarak petrilere ekim yapılmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası plak oluşumu sonucun pozitif olduğunu göstermektedir.

#### 3.4.5. Patlama Büyüklüğü (Burst Size)

İzole edilen litik bakterilerin patlama büyüklükleri başlangıç ve bitiş bakteri ve faj sayıları arasındaki fark belirlenerek hesaplanır [Sunny vd., 1998].

$$B = \Delta V / | \Delta B | = V_e - V_0 / | B_e - B_0 | \quad (3.2)$$

B= Patlama büyüklüğü

$\Delta V$ = Viral sayıdaki değişim

$\Delta B$ = Bakteri sayısındaki değişim

$V_e$ = Deney sonundaki virüs sayısı

$V_0$ = Başlangıç virüs sayısı

$B_e$ = Deney sonundaki bakteri sayısı

$B_0$ = Başlangıçtaki bakteri sayısı



## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. FİZİKSEL PARAMETRELER

Deniz suyu örnekleri Mersin-Mezitli sahilinde (Halk plajı)  $36^{\circ}44'26.60''$  K. ve  $34^{\circ}36'30.11''$ D konumundan alınmıştır (Şekil 4.1.ve Şekil 4.2.). Her ay düzenli olarak aynı bölgeden alınan deniz suyu örneklerinin, örnekleme tarihleri, elde edilen fiziksel ve kimyasal bazı özellikleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Örnek alma bölgesi

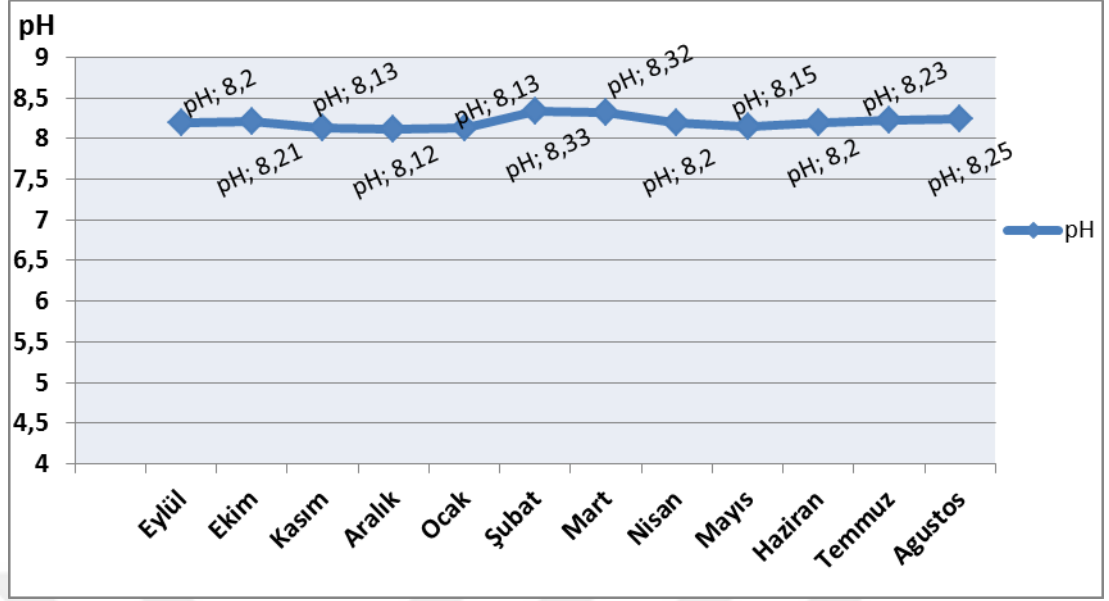


Şekil 4.2. Örnek alma bölgesi

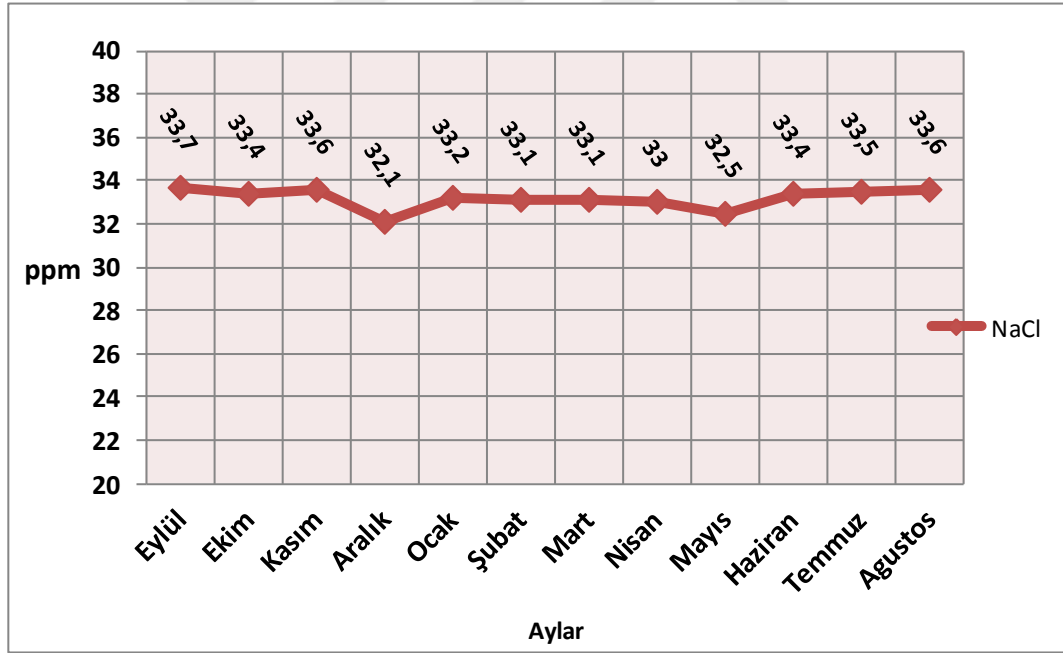
Çizelge 4.1. Deniz suyu örneklerinin tuzluluk, sıcaklık ve pH değerleri

Örnekleme tarihi	Sıcaklık (° C)	Tuzluluk (ppt)	pH
17.09.2013	26,5	33,7	8,20
08.10.2013	25	33,4	8,21
05.11.2013	21,4	33,6	8,13
01.12.2013	19,4	32,1	8,12
15.01.2014	16,4	33,2	8,13
27.02.2014	17,5	33,1	8,33
10.03.2014	17,8	33,1	8,32
05.04.2014	19	33,0	8,20
25.05.2014	26,5	32,5	8,15
19.06.2014	28,5	33,4	8,2
05.07.2014	29,3	33,5	8,23
08.08.2014	30,1	33,6	8,25

Aylara göre pH, tuzluluk ve sıcaklık değişimlerini gösteren grafikte, pH ve tuzluluk değerlerinin fazla değişmediği, sıcaklık değerinin ise Aralık ve Nisan ayları arasında 20 °C'nin altına düştüğü görülmektedir. Sıcaklık bakteri üremesini etkileyen önemli fiziksel faktörlerdendir. Özellikle Temmuz-Ağustos-Eylül aylarında 28-30 °C'lerde seyreden deniz suyu sıcaklığı toplam bakteri, koliform ve *E. coli* sayısının artmasına neden olmaktadır (Bknz. Şekil 4.3, Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.).



Şekil 4.3. Deniz suyu örneklerinin aylık ve pH değerleri



Şekil 4.4. Deniz suyu örneklerinin aylık NaCl değerleri



Şekil 4.5. Deniz suyu örneklerinin aylık sıcaklık değerleri

Akdeniz, 2.5 milyon km<sup>2</sup> bir alan kaplamakta olup, Cebelitarık Boğazı ile Atlas Okyanusu'ndan; Süveyş Kanalı ile de Kızıldeniz'den ayrılır.

Akdeniz'in tuzluluk oranı % 33-38 (binde 38) arasında olup tuz oranı fazla olan denizler grubunda değerlendirilir. Denizlerin tuzluluk oranları kıyılarda ve açıklarda farklılık gösterebildiği gibi, yıllık bakıldığında aylara göre de farklılık gösterebilir. Hava sıcaklığının yüksek olduğu yaz aylarında suyun buharlaşması tuzluluğu artırırken, ırmak, dere, akarsu gibi tatlı su kaynaklarının bulunması tuzluluğu azaltmaktadır. Çalışma bölgesindeki tuzluluk oranında önemli yükseliş ve düşüş tespit edilmemiştir.

Canon ve arkadaşlarının güney Caroline'de yaptıkları çalışmada, farklı bölgelerden alınan su örneklerinde düşük akım hızı, orta akım hızı ve yüksek akım hızı ve tuzlu bataklık nehir ağzı gibi farklı özellikteki ortamları denemişlerdir. Yaptıkları çalışmada T4 Bakteriyofajları ve bakteriyel popülasyonun varlığını araştırmışlardır. Bakteriyofaj varlığının tespit edilmesinde düşük su sıcaklığından ziyade yüksek oksijen konsantrasyonuna etkili olduğunu savunmuşlardır. Yine çalışmalarında litik aktivitenin varlığı ve patlama büyüklüğünü su içerisindeki oksijen ve konak *E.coli* varlığının bolluğuna bağlı olarak etkilendiğini göstermişlerdir. Haliç ağzından

aldıkları örneklerde ise T4 bakteriyofaj varlığını yağış miktarına bağlı olarak fekal kontaminasyon ve besin bolluğuna bağlı bakteri artışı olabileceğini göstermişlerdir. Diğer sitelerden alınan örneklerde ise yüksek akış hızına bağlı olarak T4 Bakteriyofajların bakterilere adsorbsiyonun engellendiğini böylece litik aktivitenin ve patlama büyüklüğünün kısıtlı olduğunu göstermişlerdir [Cannon vd., 2013].

Çalışmamızda, deniz suyu örneği laboratuvara getirildikten sonra ilk olarak bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Toplam bakterileri elde etmek için filtrasyon yöntemi kullanılmış, filtre kağıdı nutrient agar besiyeri üzerine yerleştirilmiştir. İnkübasyondan sonra tek koloni şeklinde üremiş olan suşlardan bakteri stokları hazırlanmıştır. 2013 Eylül ve 2014 Ağustos tarihleri arasında her ay izole edilen örneklerden toplamda 164 bakteri suşu ayırt edilmiş ve ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere stok kültür halinde saklanmıştır.

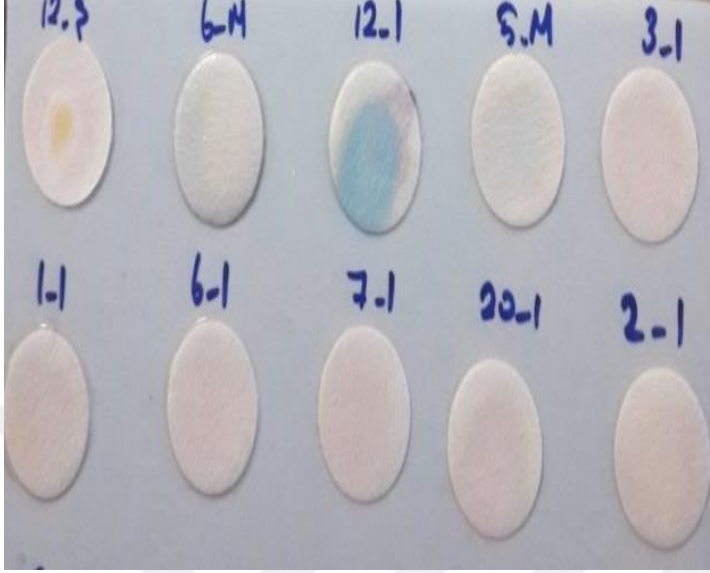
Bakterilerin tanımlanmasında, koliform grubu bakterileri ayırt edebilmek için EMB besiyeri kullanılmıştır. Metalik reflaksiyon veren suşlar, *E.coli* tanımlaması için belirlenmiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. EMB besiyerinde metalik reflaksiyon

*E.coli* tanımlaması için IMVIC biyokimyasal testleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre değerlendirme yapılarak *E.coli* suşları belirlenmiştir. İndol (+), Metil kırmızısı (+), Vogler-Proskauer (-) ve Sitrat testi (-) sonuç veren suşlar *E.coli*

olarak tanımlanmıştır. Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.'de biyokimyasal test sonuçları görülmektedir.



Şekil 4.7. İndol testi



Şekil 4.8. Metil Kırmızısı testi

Çizelge 4.2. Alınan örneklerdeki toplam bakteri, koliform ve *E.coli* sayıları verilmiştir

Örnekleme tarihi	Toplam bakteri sayısı (10 <sup>8</sup> )	<i>Escherichia coli</i> sayısı (10 <sup>5</sup> )	Diğer koliform sayısı (10 <sup>6</sup> )
17.09.2013	25	5	40
08.10.2013	30	5	30
05.11.2013	20	2	30
01.12.2013	4	5	40
15.01.2014	8	2	30
27.02.2014	10	5	30
10.03.2014	8	6	65
05.04.2014	8	50	80
25.05.2014	8	68	200
19.06.2014	18	86	250
05.07.2014	26	180	300
08.08.2014	48	220	400

Faj izolasyonu için, fajları zenginleştirme amaçlı deniz suyu örnekleri nutrient broth besiyerinde 1 gece inkübe edilmiştir. Filtrasyondan sonra elde edilen süzüntü karışık faj süspansiyonu olarak saklanmıştır. İzolatlar ile karışık faj süspansiyonu top agar yöntemi ile enfeksiyona bırakılmış litik ve temperent fajlar belirlenmiştir. Bulanık plak oluşumu lizojenik bakteri izolasyonunda kullanılmıştır

Virüslerin lizojenik yaşam formuna geçişi ortamdaki besin durumu ve enfeksiyon çokluğuna göre de değişmektedir. Örneğin ortamda besin kıtlığı ve enfeksiyon değerlerinin yüksek olması virüslerin lizojenik formda kalmasını teşvik etmektedir. Böylece projaj durumunda kalan fajlar DNA' nın her replikasyonunda çoğalma fırsatı bulacaklardır [Prescott vd., 1993].

Jiang ve arkadaşlarının Mamala körfezinde yaptıkları çalışmada 4 farklı tip bulanık plak elde etmişlerdir. Bunlardan ikisi temperent faj özelliği gösteren tipik bulanık şekildedir. Dot blot hidridizasyon ve prob kullanılarak konak hücre DNA sında faj DNA'sı tespit edilerek temperent faj olduğu gösterilmiştir [Jiang vd., 1998]. Çizelge 4.3'de elde edilen *E. coli* bakterilerinin litik ve temperent faj sayıları verilmiştir.

Çizelge 4.3. *Escherichia coli* bakterilerinin litik ve temperentfaj sayıları

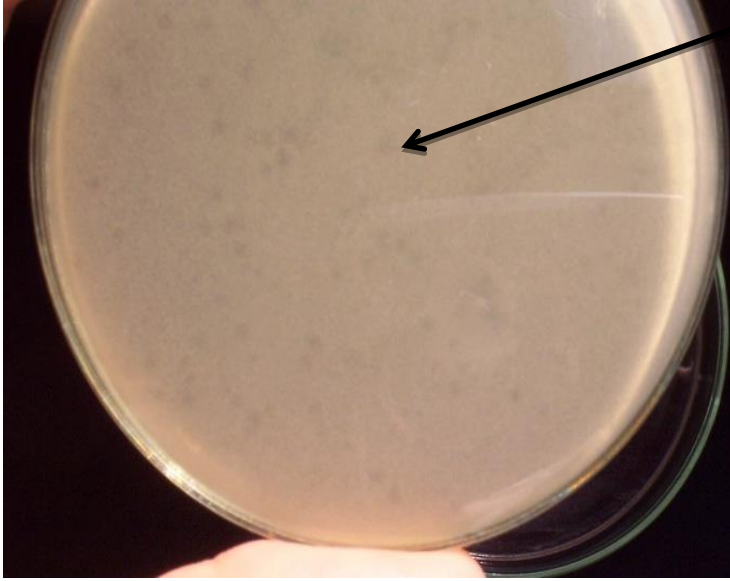
Örnekleme tarihi	<i>Esherichia coli</i>	Litik faj	Lizogenik faj
17.09.2013	5	-	-
08.10.2013	5	-	-
05.11.2013	2	-	-
01.12.2013	5	-	1
15.01.2014	2	-	-
27.02.2014	5	-	-
10.03.2014	6	1	1
05.04.2014	50	12	14
25.05.2014	68	18	20
19.06.2014	86	25	36
05.07.2014	180	48	53
08.08.2014	220	68	93

Freifelder [1987] bakteriyofajların % 90'ından fazlasının temperent özellikte olduğunu savunmaktadır [Freifelder, 1987]. Fuhrman'a [1999] göre virüsler yeryüzündeki en kalabalık topluluklardandır. Virüsler için denizdeki mikrobiyal ajanlar tanımlaması yapılmakta ve virüsler için küresel biyojeokimyasal döngüler ve mikrobiyal topluluk ekolojisinde önemli rol oynadıkları kabul edilmektedir. Virüslerin tüm canlıları enfekte edebilme yetenekleri besin döngüsü, bakteri ve algal



toplulukların dağılımı ve biyoçeşitliliğini etkilemeleri, genetik aktarımda görev almaları önemini ortaya çıkarmaktadır [Fuhrman, 1999]. Miller ve Ripp [1998] *Pseudomonas aeruginosa* ve bunların bakteriyofajlarıyla yapmış olduğu model sistemde viral kökenli gen transferinin tatlı su mikrobiyal popülasyonlarında gerçekleştirildiğini göstermiştir [Miller, ve Ripp, 1998] Williamson ve arkadaşlarının [2002] yaptığı çalışmada Mitomycin-C ile muamele edilen örneklerde % 22 oranında lizogeni tespit edilmiştir. Lizogenik bakteriler deniz ortamındaki bakteriyel kominitenin önemli bir parçası olup ani sıcaklık değişimi gibi çevresel faktörlerden etkilenirler [Williamson vd., 2002]

*E.coli* litik fajlarından rastgele seçilen 10 tanesinin plak morfolojileri ve faj titreleri belirlenmiş ve Çizelge 4.4'de verilmiştir. Şekil 4.10., Şekil 4.11. ve Şekil 4.12'de litik faj plakları görülmektedir.



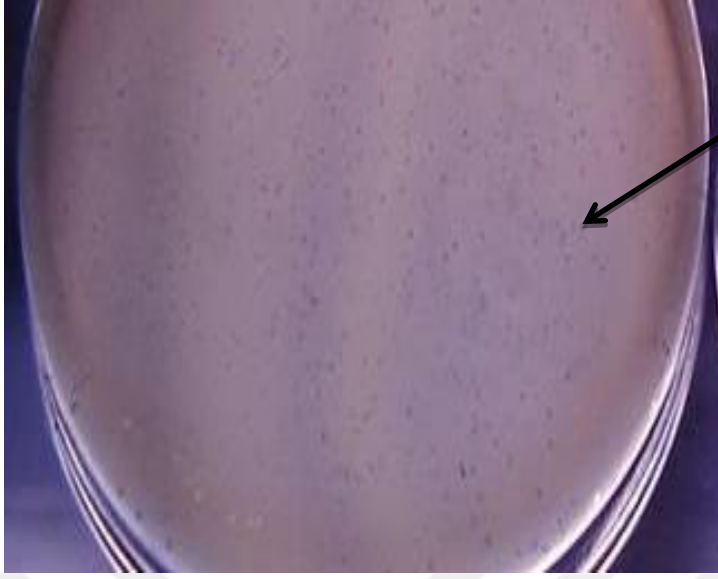
Şekil 4.9. *Escherichia coli* temperent faj plak morfolojisi



Şekil 4.10. *Escherichia coli* (E14) litik fajının plak morfolojisi



Şekil 4.11. *Escherichia coli* (E32) litik fajının plak morfolojisi



Şekil 4.12. *Escherichia coli* (E65) litik fajının plak morfolojisi

Çizelge 4.4. *Escherichia coli* litik fajlarının plak morfolojileri

İzolat	Plak morfolojisi	Fajtitresi (pfu ml <sup>-1</sup> )
E14	İğne başı büyüklüğünde	3.4 x 10 <sup>4</sup>
E28	1 mm çaplı şeffaf	4.7 x 10 <sup>5</sup>
E32	İğne başı büyüklüğünde	3 x 10 <sup>5</sup>
E33	İğne başı büyüklüğünde	5.5 x 10 <sup>6</sup>
E42	1.2 mm çaplı şeffaf	6.2 x 10 <sup>6</sup>
E57	1 mm çaplı şeffaf	7,1 x 10 <sup>4</sup>
E65	1 mm çaplı şeffaf	5.4 x 10 <sup>5</sup>
E88	İğne başı büyüklüğünde	6 x10 <sup>5</sup>
E123	1 mm çaplı şeffaf	7,3 x10 <sup>5</sup>
E146	1 mm çaplı şeffaf	5,2 x10 <sup>5</sup>

Lizogenik olarak tanımlanan ve karışık faj süspansiyonuyla enfekte edildiğinde plak oluşumu gözlenmeyen suşlar için indükleme testi yapılmıştır.

İndükleme için Mitomycin-C ve sıcaklık kullanılmıştır. Çizelge 4.5.'de bu oranlar verilmiştir.

Fayard ve arkadaşlarının streptokok bakterilerinde temperent fajlarla yaptıkları çalışmada, 120 streptokok bakteri suşu kullanılmış bu suşlardan 12 tanesinin lizojenik bakteri suşu olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da faj indüklemesi için mitomycin-C'yi kullanmışlardır. Temperent fajlarda profaj, mitomisin-C, UV, sıcaklık gibi indikatörlerden sonra elde edilebilmektedir [Fayard vd., 1993].

Çizelge 4.5 Plak oluşumu gözlenmeyen suşlar için indükleme testi

İndükleme faktörü	Denenen suş sayısı	İndüklenmiş suş sayısı	% oranı
Mitomycin-C	62	45	72,5
Sıcaklık	62	38	61,2

Litik fajlar arasından seçilen E14, E28, E32, E33, E42, E57, E65, E88, E123 ve E146 numaralı örneklerin patlama büyüklükleri tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu örneklerin büyüme eğrileri belirlenmiştir. Seçilen örneklerin patlama büyüklükleri Çizelge 4.6.'de verilmiştir. Örneklere ait büyüme eğrisi grafikleri de verilmiştir (Bknz. Şekil 4.13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22)

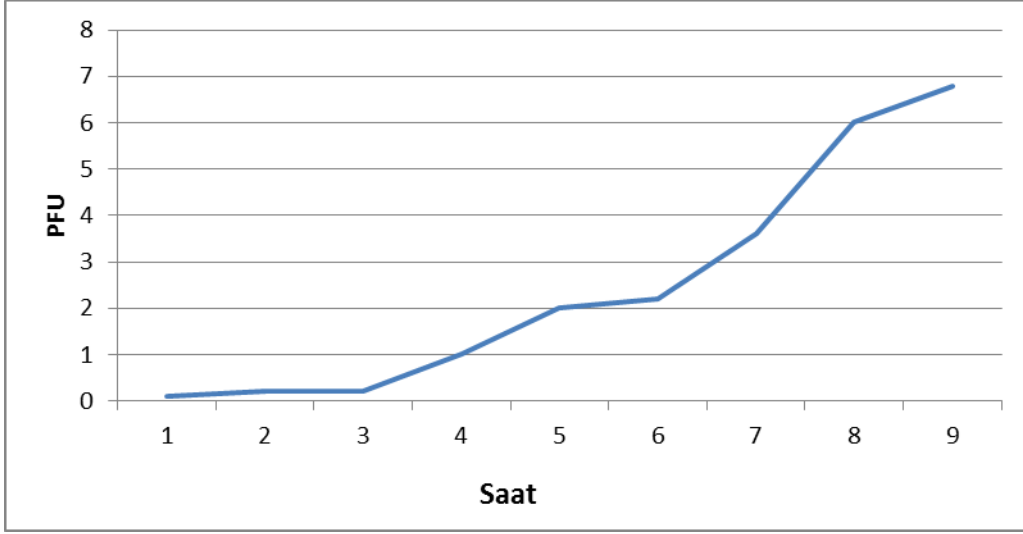
Çizelge 4.6. Litik fajların patlama büyüklükleri

Suşlar	Patlama büyüklüğü
E14	16
E28	24
E32	19
E33	39

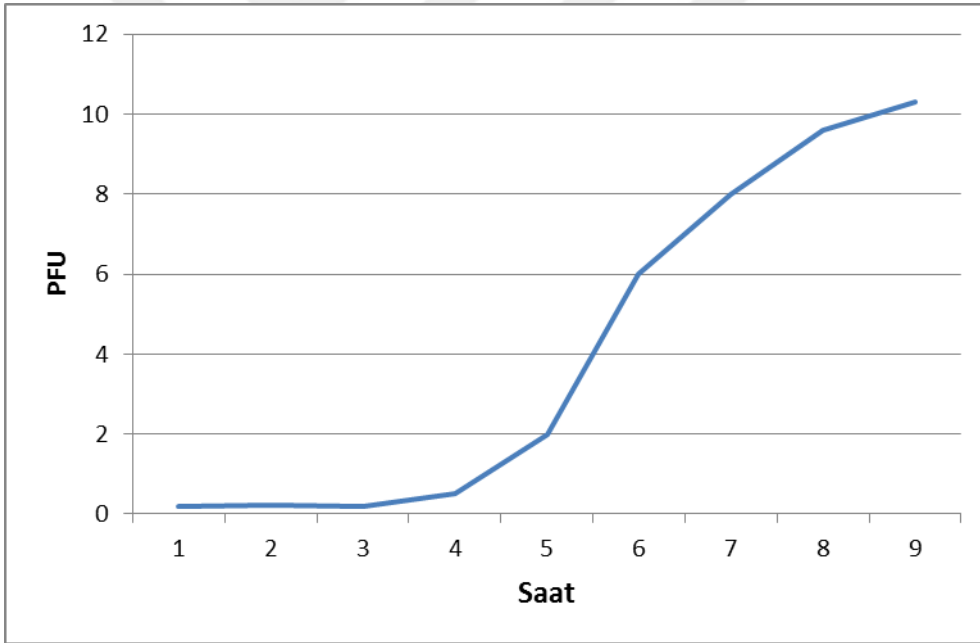
Çizelge 4.7. (Devamı) Litik fajların patlama büyüklükleri

Suşlar	Patlama Büyüklüğü
E42	17
E57	58
E65	32
E88	78
E123	25
E146	77

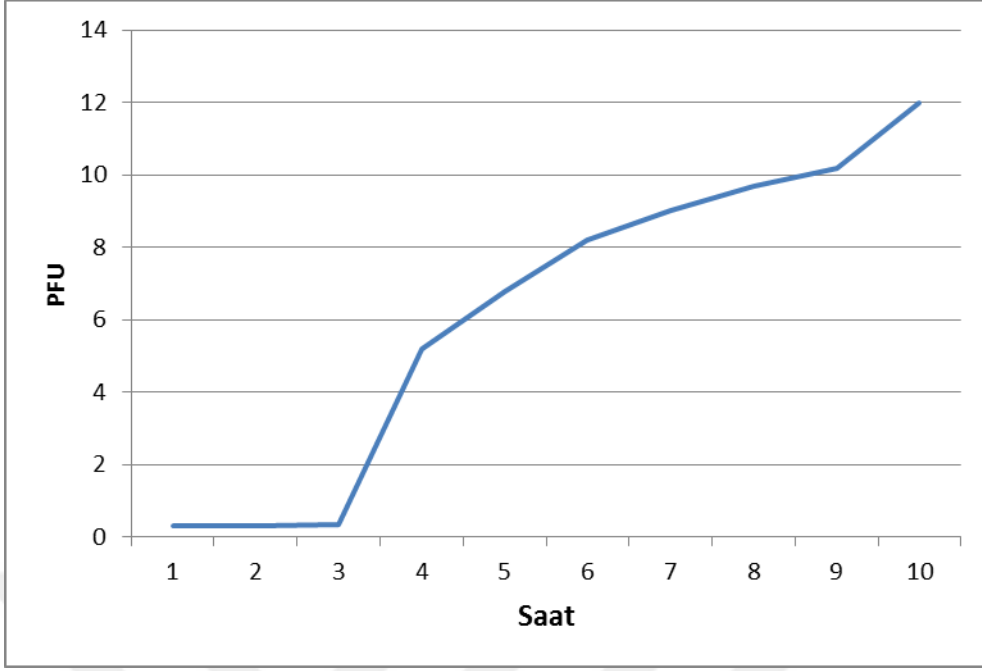
Bakteriofajlarda patlama büyüklüğünün fiziksel ve kimyasal faktörlerden nasıl etkilendiği üzerine bir çok araştırmacı çalışma yapmıştır. Bu konuda yapılan ilk çalışmalardan olan Ellis ve Delbrück [1939] yaptıkları çalışmada, çoklu infeksiyon durumunda fajların latent dönemi, artış dönemi ve patlama büyüklüğünün nasıl değiştiğini araştırmışlar. Çoklu infeksiyon durumunda faj sayısının fazla olması latent dönem süresinde kayda değer bir artışa neden olmamıştır. Çalışmalarında patlama büyüklüğünün değerinde de fazla bir artış gözlemlenmemiştir. Yine aynı araştırmacılar patlama büyüklüğünün inkübasyon sıcaklığına bağlı olarak nasıl değiştiğini incelemişler, araştırmalarında patlama büyüklüğünün sıcaklıktan fazla etkilenmezken, sıcaklık azalmasının sadece latent dönemin süresinin uzattığını tespit etmişlerdir [Ellis ve Delbrück, 1939].



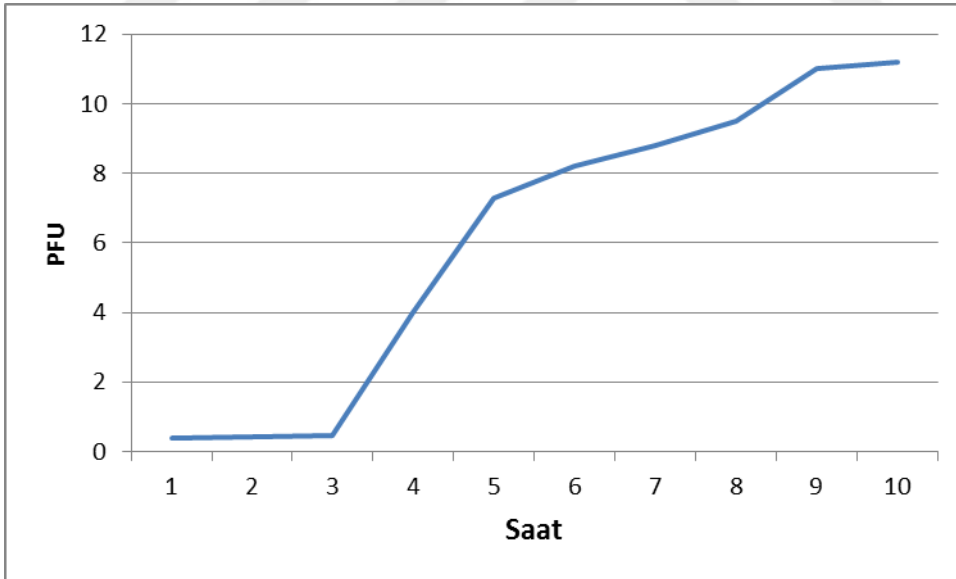
Şekil 4.13. E14 fajının büyüme eğrisi



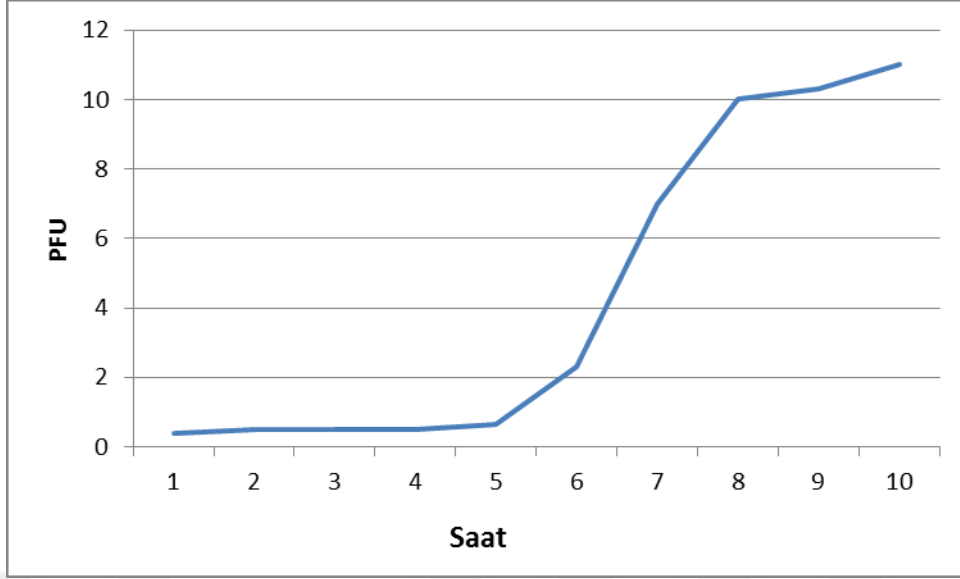
Şekil 4.14. E28 fajının büyüme eğrisi



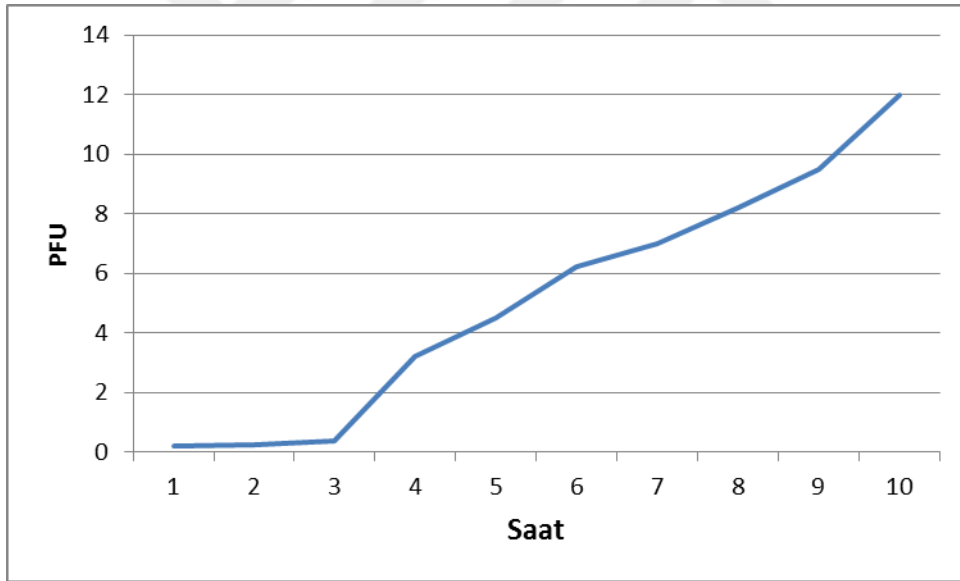
Şekil 4.15. E32 fajının büyüme eğrisi



Şekil 4.16. E33 fajının büyüme eğrisi

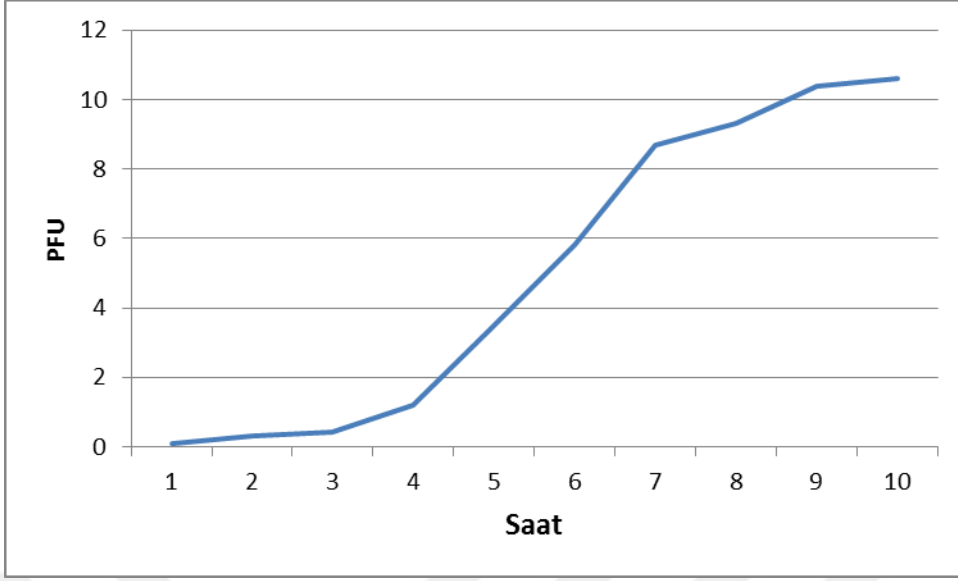


Şekil 4.17. E42 fajının büyüme eğrisi

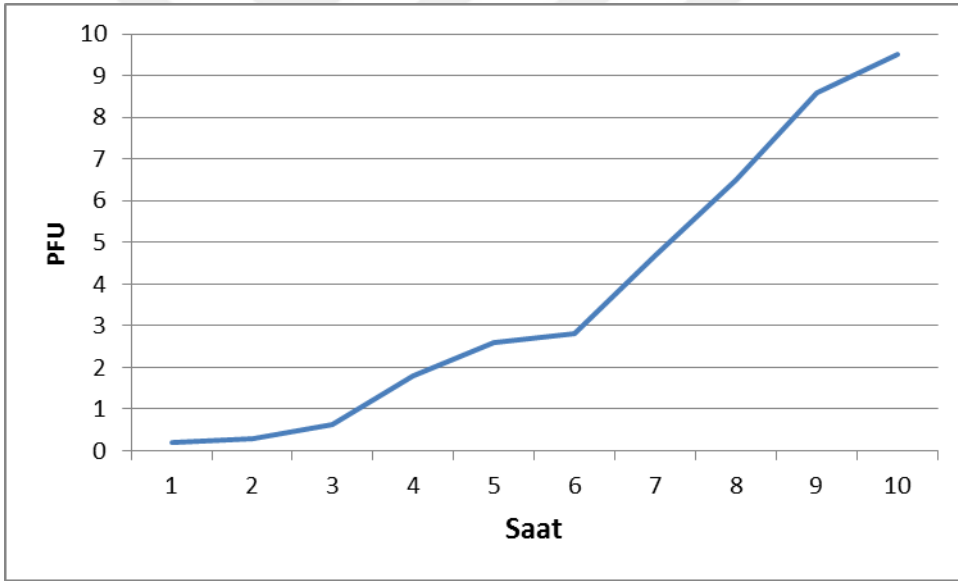


Şekil 4.18. E57 fajının büyüme eğrisi

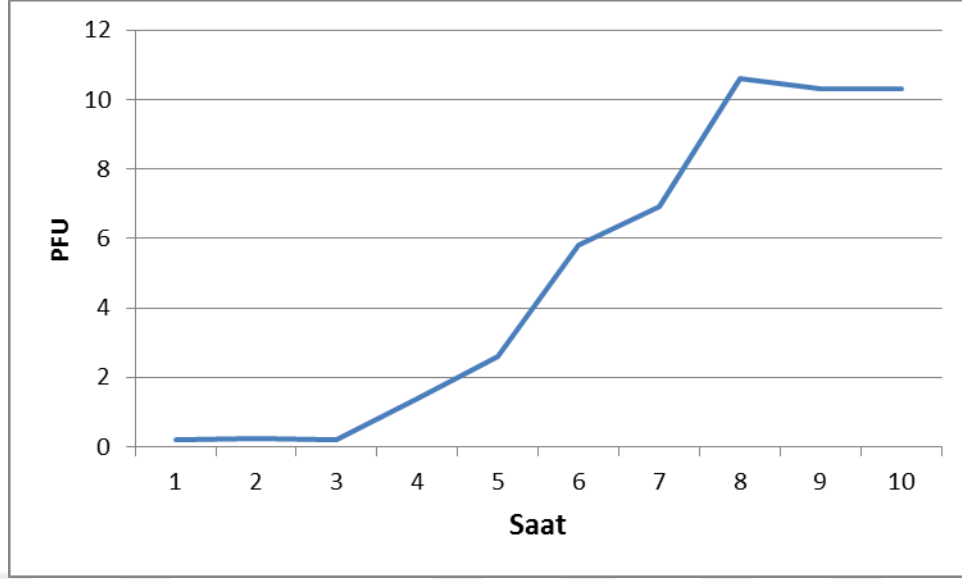




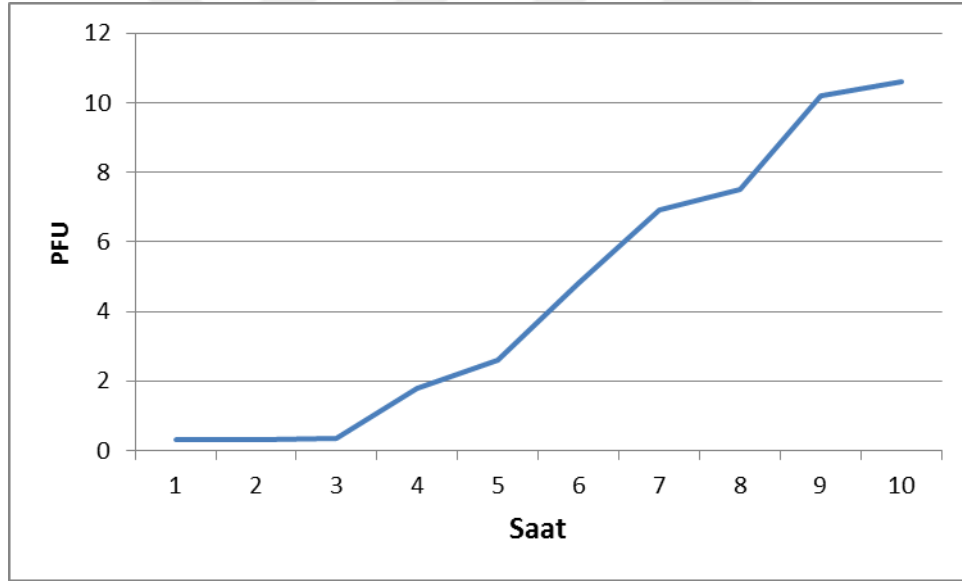
Şekil 4.19. E65 fajının büyüme eğrisi



Şekil 4.20. E88 fajının büyüme eğrisi



Şekil 4.21. E123 fajının büyüme eğrisi

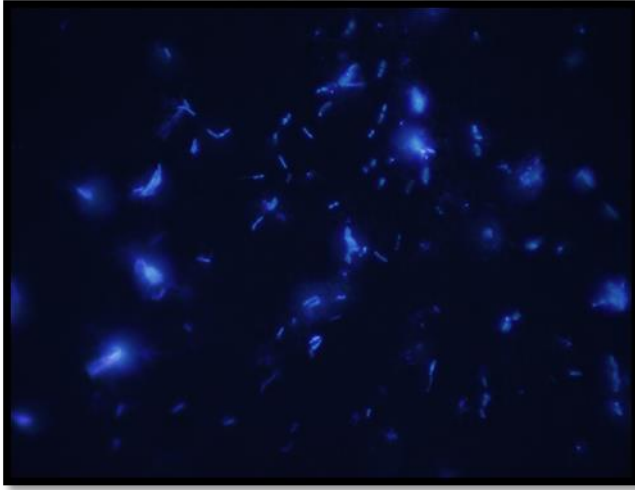


Şekil 4.22. E146 fajının büyüme eğrisi

Litik fajlarla yapılan büyüme eğrisi çalışmalarında fajların latent dönemleri 50-200 dakika arasında değişmektedir. Kaynaklardaki veriler fajların latent periotları 50-60 dk arasında değişebildiğini ancak, optimum sıcaklığın altındaki derecelerde 170-120 dk kadar yükselebildiğini göstermektedir. Yaptığımız çalışmada latent periyodunun uzun olduğu gözlenenlerin ortamdaki bakteri konsantrasyonu ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. Çünkü ortam sıcaklığı, besin miktarı, pH gibi

etkenler eşdeğer tutulmuştur. Borsheim [1993], yaptığı çalışmada, kültüre alınmış 52 deniz fajının patlama büyüklüğünü ortalama 185 olarak belirlemiş ve patlama büyüklüklerinin 5 ile 610 aralığında olduğunu göstermiştir [Borsheim, 1993].

Epifloresan mikroskobu çalışmalarında deniz suyu örnekleri bakteri ve virüs filtrelerinden geçirildikten sonra DAPI ile boyanmış ve mikroskopta incelenmiştir. Şekil 4.23.'de 0,2 µm por çapına sahip filtreden geçirilmiş örnek görülmektedir. Virüsler bu por çapından geçebildikleri için sadece bakteriler görülmektedir. 0,02 µm por çapına sahip filtre ile doğrudan deniz suyu örnekleri süzülmesi için florasan noktalarının oluştuğu gözlenmiştir. Ancak bu noktaların bakteriyofaj virüslerine ait olup olmadıkları belirlenmediği için VDC sayımı yapılmamıştır.



Şekil 4. 23. 0,2 µm por çapına sahip filtreden geçirilmiş bakteri örnekleri

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada da Mersin ili Mezitli semti halk plajından alınan deniz suyu örneklerinde *E.coli* fajı taraması yapılmıştır. Tuzluluk, sıcaklık ve pH etkenlerine göre litik ve lizogenik faj dağılımları belirlenmiştir. Test edilen etkenlerden tuzluluk oranı ve pH değerleri alınan bölgede aylara göre ciddi değişiklik göstermemiştir. Ancak sıcaklık değerinin artması veya düşmesi şeklindeki değişiklikler lizogenik faj oranını etkilemiştir.

Örnekleme bölgesi Mersin-Mezitli sahili halk plajı olarak belirlenmiştir. Bu bölgede bahar ve yaz aylarında halk denize girmekte olup koliform ve *E.coli* tespit edilmesi kanalizasyon kökenli karışımın göstergesi olup halk sağlığı açısından önemlidir. Bakteri sayıları özellikle deniz suyu sıcaklığının yükseldiği yaz aylarında artmaktadır. Buna paralel olarak bakteriyofaj sayısında ortamda enfekte edilebilecek konak olduğundan artmaktadır. Ayrıca profaj durumundaki fajlar çeşitli etkenlerle indüklenebilmektedir. Uv, Sıcaklık, Mitomycin-C gibi etkenler profaj durumundaki temperent fajın litik döngüye geçmesine neden olurlar deniz suyu sıcaklığının arttığı yaz aylarında litik hayat döngüsüne geçiş oranı artmaktadır.

Sucul ortamlarda bakteri ve virüslerin dinamiğini etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır. Örneğin, ortamdaki tuz konsantrasyonu bakteriyofajların konak hücre üzerine tutunması için gereklidir. Akdeniz'in tuzluluk oranı % 0,33- 0,38 arasında olup örnekleme bölgesindeki tuzluluk oranı % 0,33 civarında seyretmektedir ve aylara göre ciddi değişim göstermemiştir. Tuzluluğun düşük olmasının nedeni bu bölgeden Mezitli deresinin denize açılmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Sucul ortamlarda virüslerin rolünü anlamak için lizogenik dağılımın bilinmesi önemlidir. Mikrobiyal ekoloji çalışmaları son zamanlarda bakteri popülasyonlarının % 30 ila % 72 kadarının virüslerden kaynaklı olarak öldüğü bilinmektedir. Virüsler mikrobiyal kominitenin dinamik üyeleridir. Öyle ki prokaryotik popülasyonlarda aylık, haftalık hatta saatlik değişimlere neden olurlar. Fajların % 90'nın temperent özellikte olduğu düşünülmektedir. Özellikle sucul ortamlarda litik fajlardan ziyade temperent fajlar daha yaygındır [Jiang ve John

1994]. Yeni virüs partiküllerinin ortamda görülmesi lizogenik bakterilerin indüklenmesiyle gerçekleşmektedir.

*E.coli* ile ilgili yapılan çalışmalarda lizogen durumdaki bakterilerin daha hızlı ürediğini ve lizogen olmayanlara göre avantaj sağladıkları görülmüştür. Williamson ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada viral konsantrasyon kış aylarında en düşük yaz aylarında ise en yüksek olarak belirlenmiştir. Fotosentez yapan bakterilere ait virüslerle ilgili çalışmalar ekolojik açıdan birincil üretici basamağında olan siyanobakterileri kapsadığı için önemlidir. siyanobakterileri kapsadığı için önemlidir.

Virüslerin sayımında kullanılan çeşitli yöntemler vardır. Direk ve indirek yoldan sayım yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları görülmektedir. Örneğin direk sayım genellikle Pfu sayısının normalden daha yüksek çıkmasına neden olmaktadır. Elektron mikroskopunun kullanıldığı yöntemlerde ise hazırlık aşamasında ki her bir uygulama faj kayıplarına neden olmaktadır. Son yıllarda kullanılan epiflorasan mikroskobu çalışmalarında virüs partikülleri gözlemlenmekte ve sayım yapılabilmektedir. Bu yöntemde DAPI, SYBR GREEN boyası gibi florasan boyalar kullanılmaktadır. Bu yöntemde dezavantajı her bir noktanın virüs olarak sayılmasıdır. Oysa ortamdaki nükleik asit kalıntılarına boya bağlanabilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Ackermann, HW. "5500 Phages examined in the electron microscope", Archives of Virology, 227-43, 152(2): (2007).
- Akbulut, N. ve H. Kesentaş. "Genel Mikrobiyoloji Ders Notları" Ege Üniversitesi Süt Teknolojisi Bölümü, 19 Haziran 2013. <http://agr.ege.edu.tr/sutteknolojisi/detay.php?SayfaID=121> (19.06.2013)
- Akman, M. "Bakteri Genetiği", Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sivas, .560 s., (1983).
- amrita.vlab.co.in. "Bacteriophage Plaque Assay for Phage Titer", <http://amrita.vlab.co.in/?sub=3&brch=76&sim=719&cnt=1> (01.01.2015)
- Anderson, B., Rashid MH., Pastemack,G., Revazishvili, T.,Dean, T.,Senecal, A.,Sulakvelidze, A., "Enumeration of bacteriophage particles: Comparative analysis of the traditional plaque assay and real-time QPCR- and nanosight-based assays."US National Library of Medicine National Institutes of Health, 1(2): 86-93, (2011)
- Arda, Mustafa. "Temel Mikrobiyoloji Klonlamada Kullanılan Başlıca Vektörler", 46.(9). Medisan Yayın Serisi, Ankara,568 s., (2000).
- Barry, A.L., Bernsohn, K.L., Adams, A.P., ve Thrupp, L.D., "Improved 18-Hour Methyl Red Test" Applied Microbiology, 20(6): 866-870. (1970).
- Bettarel, Y., Telesphore, SN., Christian, A., ve Henri, L., "A Comparison of Methods for Counting Viruses in Aquatic Systems" Appl Environ Microbiol, 66(6): 2283–2289,.(2000).
- Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R.K., ve Bandyopadhyay, U., " Biological activities and medicinal properties of neem" Current Science 82(11): 1336-1345, (2002).
- Borysowski, J., Ryszard, M., ve Andrzej, G., "Phage Therapy: Current Research and Applications. Medical University of Warsaw Wrocław:, 430 s.,(2014).
- Bouvy, Yvan Bettarel Thierry Bouvier Marc. "Viral persistence in water as evaluated from a tropical/temperate cross-incubation." Oxford Journals, 81(16): 909-916, (2009).

- Cannon, Joseph F., Nicholas A Thurn, ve Paul E Richardson.” The effects of salinity, pH, temperature, and dissolved oxygen on sensitivity of PCR identification of T4 bacteriophage” *Journal Of The South Carolina Academy Of Science*, 11(2): 17 s., (2013).
- Carmen, M. D.,Alonso, J.,R.,ve Juan J.,“Characterization of marine bacteriophages isolated from the Alboran Sea Western Mediterranean” *Journal Of Plankton Research- Oxford Journal*, 24(10): 1079-1087, (2002).
- Chan, B.K., ve S.T. Abedon. “Phage therapy pharmacolgy: phage coctayls.” *Adv. APPL. Microbiol.*, 78(1): 1-23, (2012)
- Chanishvili, N., “A Literature Review of the Practical Application of Bacteriophage Research”. Nova Science Publishers, Tbilisi, 292 s. (2012).
- Chen, H.D, ve Frankel, G., “Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis” *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1): 83-98, (2005)
- Chennouf, C., Bruttin, A., Dillmann, M. ve Brüßow. H. “Phage-Host Interaction: an Ecological Perspective” *J. of Bacteriol.* 186 (12): 3677-3686, (2004)
- Chibani-Chennoufi, S , Sidoti,J., Bruttin,A., Kutter,E., Sarker, S., ve Brüßow, H., “In Vitro and In Vivo Bacteriolytic Activities of *Escherichia coli* Phages:Implications for Phage Therapy” *American Society for Microbiology* 48(7): 2558–2569, (2004).
- Coşkun, M.Y.,”BAKTERİYOFAJ TEDAVİSİ” *BİLİM ve TEKNİK*, 82-85, (2003)
- Dongyou, L., "Manual of Security Sensitive Microbes and Toxins". CRC Press, Boca Raton, 884 s. (2014).
- Ellis, E.L., ve Delbrück, M., “THE GROWTH OF BACTERIOPHAGE” *J Gen Physiol* 22(3): 365-389, (1939).
- Ekici, Lütfiye, TELLİ, R., ve YETİM, H., “Gıda Kaynaklı Enfeksiyon ve İntoksikasyon Bakterileri-I.” *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 1(2): 29-42, (2008).
- Fayadr, B., Moritz, H., ve Jean-Pierre, A., “Interactions of temperate bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* with lysogenic indicators affect phage DNA restriction patterns and host ranges” *Journal of Dairy Research*, 60(03): 385-399, (1993).

- Forterre, P., Soler, N., Kurupovic, M., Marguet, E., ve Ackermann, H.W., “Fake virus particles generated by fluorescence microscopy” *Trends Microbiol.*, 21(1): 1-5, (2013)
- Freifelder, D., “Molecular biology: a comprehensive introduction to prokaryotes and eukaryotes” Jones and Bartlett Publishers Inc, Boston, p 668-700, (1987)
- Fuhrman, J.A., “Bacterioplankton roles in cycling of organic matter: the microbial food web In: Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea.” Plenum Press, New York, 361-383 s., (1992).
- Fuhrman, J.A., “Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects” *Nature International weekly journal of science*, 10(1038): 541-548, (1999).
- Haas, A.F., Knowles, b., Lim, Y.W., McDole, S., Kelly, L.W., Hatay, M., Rohwe, F., “Unraveling the Unseen Players in the Ocean - A Field Guide to Water Chemistry and Marine Microbiology” *Journal of Visualized Experiments*, 5(93): 1-16, (2014).
- Gelderblom, H.R., “Structure and Classification of Viruses” *Medical Microbiology*, (Editör: BARON, S.). Galveston: University of Texas Medical Branch, Galveston, 1278 s., (1996).
- Gürgün, V., ve Halkman, A.K., “Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri”, *Gıda Teknolojisi Derneği Yayın*, Ankara, 520 s., (1990).
- Güven, K., Kıvanç, M., Demirel, R.M., Mutlu, B., ve Yılmaz, M. “Genel Mikrobiyoloji” 2<sup>nd</sup> ed ( Editör: Kıymet, G.) *Anadolu Üniversitesi Yayını*, Eskişehir, 1961(3): 274 s., (2011).
- Halkman, A.K. “Gıda Mikrobiyolojisi II Ders Notları”. *Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi yayınları*, Ankara, 310 s., (2013).
- Halkman, A.K., ve Sağdaş, Ö.E., *MİKROBİYOLOJİ EL KİTABI*, Orlab Laboratuvar Market ve Merck İlaç Ecza ve Kimya A.Ş., Ankara, 234 s. (2011).
- Van Elsas, J.D., Semenov, A.V., Costa, R., ve Trevors, J.T., “Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects.” *The ISME Journal Multidisciplinary Journal of microbial ecology* , 5(2): 173-83. (2011).
- Jiang, S.C, Kellogg, C.A., ve Paul, J.H., “Characterization of Marine Temperate Phage-Host Systems Isolated from Mamala Bay, Oahu, Hawaii.” *App. and Environ. Microbiol.* 64(2): 535-542, (1998).



- Jiang, S.C., ve Paul J.H., “Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of lysogeny/ bacteriocinogeny in the marine environment” *Marine Ecology Progress Series*, 104(1): 163-172, (1994).
- Johnson, J.R., ve Thomas, A.R., “Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC.” *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5): 1753-1754, (2000).
- Kang, I., Hyun-Myung, o., Kang, D., ve Jhan-Cheon C., “Genome of a SAR116 bacteriophages shows the prevalence of this phage type in the oceans” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(30): 12343-12348, (2013).
- Kalkan, S, Ünal, E., ve Erginkaya, Z., “Bio-control of Some Food-Borne Pathogenic Bacteria by Bacteriophage.” *Journal of Food Science and Engineering*,(1): 237-244, (2011).
- Karaçetin, E., Mihçioğur, H., Ömür G., ve Taner A., “ÇM 208 ÇEVRE MİKROBİYOLOJİSİ LABORATUVAR KİTAPÇIĞI” <http://cevre.erciyes.edu.tr/sayfa/91/cevre-mikrobiyolojisi-laboratuari.html>, (09.10.2014)
- Karel, S., Weinbauer M.G., Bonilla-Findji O., Chan A.M., Dolan, J.R., Steven M. S., Stewen, W.W., Suttle C.A., “*Synechococcus* growth in the ocean may depend on the lysis of heterotrophic bacteria” *Journal of Plankton Research*, 33(10): 1465-1476, (2011).
- Kudva, I. T., Jelacic, S, Tarr, P., Youderian,P., ve Hodve, C.J., “Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-specific bacteriophage” *Applied and Environ. Microbiol.*, 65(9): 3767-3773, (1999).
- Orlova, E.V., «Bacteriophages and Their Structural Organisation” (Editör: Kurtböke, İ.) *Birckbeck Universty Of London Published by InTech, Rijeka, Croatia*, 3-30, (2012).
- Leimana, P.G., Kanamarua, S., Mesyanzhinov, V.V., Arisaka, F., ve Rossmanna, M.G., “Structure and morphogenesis of bacteriophage T4.” *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(11): 2356-2370,(2003).
- Lang, A.S., M.L. Rise, A.I. Culley, ve G.F. Steward. « RNA viruses in the sea.» *FEMS Microbiol.* , 2009: 295-323.
- Lerner , K.L., Narins, B., Lerner, B.W. *World of Microbiology and Immunology.* Thomson Gale : Printed in the United States of America, 699 s. (2003).

- Lorch, A. «“Bacteriophages: An alternative to antibiotics?”» *Biotechnology and Development Monitor Australasian Biotechnology*, 9(5): 265-269,(1999)
- Lu, Z., Pérez-Díaz, I.M., Hayes, J. S., ve Breidt, F., “Bacteriophage Ecology in a Commercial Cucumber Fermentation.” *Appl Environ Microbiol*, 78(24): 8571–8578. (2012)
- Maurice , CF., Bouvier,T., Comte, J., , Guillemette, F., ve Del Giorgio, PA., “Seasonal variations of phage life strategies and bacterial physiological states in three northern temperate lakes” *Environ Microbiol.*, 12(3): 628-641, (2010).
- Mikrobiyoloji.org. ”Escherichia coli“ <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/944105010.pdf>. (15.09.2015)
- Mikrobiyoloji.org. “Eosin Methylen-blue Lactose Sucrose (EMB) Agar” <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAAAF6AA849816B2EF0BBCA143CEDA19C8> (04.11.2014)
- Miller, R.V, ve Ripp, S, “Dynamics of the pseudolysogenic response in slowly growing cells of *Pseudomonas aeruginosa*.” *Microbiology*.144(8): 2225-2232, (1998).
- Milli Eğitim Bakanlığı. “*Laboratuvar Hizmetleri Alanı Çerçeve Öğretim Planı*“ [http://mebk12.meb.gov.tr/meb\\_iys\\_dosyalar/06/25/749162/dosyalar/2013\\_01/03062326\\_laboratuvarcerceveprogram.pdf](http://mebk12.meb.gov.tr/meb_iys_dosyalar/06/25/749162/dosyalar/2013_01/03062326_laboratuvarcerceveprogram.pdf) (25.06.2013).
- Morikawa, Y., ve Yanagida M., “Visualization of Individual DNA Molecules in Solution by Light Microscopy: DAPI Staining Method” *The Journal of Biochemistry*, 89(2): 693-696, (1981).
- Murray, A.G., ve Eldridge, P.M., “Marine viral ecology: incorporation of bacteriophage into the microbial planktonic food web paradigm” *Journal of Plankton Research*, 16(6): 627-641, (1994).
- Öner, M., “Genel Mikrobiyoloji”. Ege Üniversitesi Basım Evi, İzmir, 380 s., (1996).
- Park, S.C., Shimamura, I., ve Nakai, T., Fukunaga, M.,Mori, KI., “Isolation of Bacteriophages Specific to a Fish Pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a Candidate for Disease Control” *AEM Applied and Environmental Microbiology*, 66(4): 1416-1422, (2000).
- Paul , J.H, Rose, J.B., Jiang, S.C ., ve London, P.X., “Coliphage and indigenous phage in Mamala Bay, Oahu, Hawaii” *App. and Environ. Microbiol.* 63(1): 133–138, (1997).

Prescott, L.M, Harley, J.P., ve Klein, D.A., “The Viruses: Bacteriophages”. 2.nd (Editör:.Brown, C.B.,) Publishers, Dubuque, Iowa, (1993).

Racaniello, V., “*Detecting viruses: the plaque assay*.” virology blog about viruses and viral disease, <http://www.virology.ws/2009/07/06/detecting-viruses-the-plaque-assay/> (06.07.2009)

Roossinck, M.J. “The Good viruses: Viral mutualistic symbiosis” Nature Reviews.Microbiyology, 9(1): 99-108, (2011)

Saura, A., Massana R., Boras, J., Forn, I., Gemma, V., ve Doloros Vauque, D. “Effect of viruses on marine stramenopile (MAST) communities in an oligotrophic coastal marine system” Journal of Plankton Research, 33(11): 1709-1718, (2011).

Seçkin, A.K., ve Baladura, E., «GIDALARIN MUHAFAZASINDA BAKTERİYOSİN VE BAKTERİYOFAJ UYGULAMALARI.» Manisa : Celal Bayar Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, (25.11.2010.)

sigma-aldrich.com. “Methyl Red Voges Proskauer Broth ,MR VP Broth; Buffered Glucose Broth; Glucose Phosphate Broth” <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Fluka/Datash eet/39484dat.pdf> .(11.11.2014)

Sunny, C, Jiang, C., Kellogg, A., Christina, ve John,H.P., “Characterization of Marine Temperate Phage-Host Systems Isolated from Mamala Bay, Oahu, Hawaii .”Applied and Environmental Microbiology , 64(3):1998: 535-542.

Suttle, C.A, ve Fuhrman, J.A., “Enumeration of virus particles in aquatic or sediment samples by epifluorescence microscopy” “ Manual of Aquatic Viral Ecology, DOI , 2010: 145.

Soykut, A.E., ve Tunail, N.,”TERMOFİLİK FAJ TAKSONOMİSİ” *GIDA*, 34(4): 251-258, (2009).

Şahin, F., Karasartova, D., Özsan, T.M., Gerçeker, D., ve Mehmet Kıyan, M., “Klinik MRSA İzolatlarından Elde Edilen Yeni Bir Litik Bakteriyofajın Tanımlanması ve Antibakteriyel Etkisinin Değerlendirilmesi” *MİKROBİYOLOJİ BÜLTENİ*, 47(1): 27-34, (2013).

thsk.saglik.gov.tr. “Bakteriyoloji Test Prosedürleri”Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı. mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr. (15.01.2015)

- Touchon, M., , Hoede, C., ve Denamur, E., “Organised Genome Dynamics in the *Escherichia coli* Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths.” *PLoS Genetics*, <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1000344>, (23.01.2009)
- Tsen, H.Y., Lin, C.K., ve Chi, W.R. “Development and use of 16S rRNA gene targeted PCR primers for the” *Applied and Environmental Microbiology*, 85(3): 554-560, (1998).
- Tuomi, P., ve Kuuppo, P., “Viral lysis and grazing loss of bacteria in nutrient- and carbon-manipulated brackish water enclosures.” *Oxford Journals*, 21(5): 923-937, (1999).
- Üstek, D., Abacı, N., Sırma, S., ve Çakiris A., “Yeni Nesil DNA Dizileme” *DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ DERGİSİDİR*, 1(1): 11-18. (2011).
- Quiberoni, A. Guglielmotti, D. Binetti, A. ve Reinheimer, J. “Characterization of three *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* phages and the physicochemical analysis of phage adsorption.”, *Journal of Applied Microbiology*, 96(2): 340-351, (2004).
- Weinbauer, M.G., . “Ecology of prokaryotic viruses.” *FEMS Microbiology Reviews* ,28(2): 127-181, (2004).
- Wikipedia. “*Escherichia coli*”. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Escherichia>, 08.08.2014
- Williamson, S.J., Houchin, L.A., McDaniel, L. and Paul, J.H. “Seasonal variation in lysogeny as depicted by prophage induction in Tampa Bay, Florida” *Appl. Environ. Microbiol.* 68(9): 4307–4314, (2002).
- Wommack, K.E., ve Rita R.C., “Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems.” *Microbiology and Molecular Biology*, 64(1): 69-114, (2000).
- Yıldırım, A., F. Bardakçı, M. Karataş, ve B. Tanyoloaç. *Moleküler Biyoloji*. Nobel Yayın Evi, Ankara, 469-517, (2007).
- Yin, J., Li, G., ve Ren, X., Herrler, G., “Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes.” *Journal of Biotechnology*, 127(3): 335-347. (2007).
- Zuber, S., Ngom-Bru, C., Barretto, C., Bruttin, A. Bruüssow, H., ve Denou, E., “Genome Analysis of Phage JS98 Defines a Fourth Major Subgroup of T4-

Like Phages in Escherichia coli.” Journal Of Bacteriology,, 189(22): 8206-8214, (2007).



## ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

**Adı Soyadı:** Şuayıp ŞAHİN

**Doğum Tarihi:**01.10.1981

**Öğrenim Durumu:** Yüksek lisans

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Fen bilimleri	Kanber Demir Lisesi	1996-2000
Lisans	Biyoloji	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	2001-2006
Yüksek Lisans	Biyoteknoloji	Mersin Üniversitesi	2012-2015

**(Varsa) Görevler:**

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Biyolog	Etlik İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi	2011-2012
Uzman	Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu	2012-.....

## ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)