



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ATIK SULARDAN LİTİK BAKTERİYOFAJ  
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Mona KHORSHIDTALAB

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

TRABZON-2016





TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ATIK SULARDAN LİTİK BAKTERİYOFAJ  
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Mona KHORSHIDTALAB

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

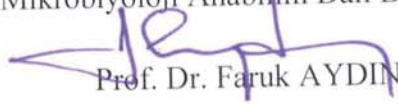
TRABZON-2016

## ONAY

Bu Tez Yüksek Lisans Standartlarına Uygun Bulunmuştur.

Prof. Dr. Faruk AYDIN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

  
Prof. Dr. Faruk AYDIN

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Mona KHORSHIDTALAB'ın hazırladığı “Atık Sulardan litik bakteriyofaj İzolasyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ



Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ



Prof. Dr. İlknur TOSUN



Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU



Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun 04/10/2016 tarih ve 29 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

23/08/2016

Mona KHORSHIDTALAB

## **İthaf**

*Bu tezi, sevgili aileme ithaf ediyorum*



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim her aşamasında büyük desteğini ve anlayışını benden esirgemeyen, bilgi ve önerileri ile bana yol gösteren çok sevdiğim danışman hocam Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ'a, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Faruk AYDIN'a Prof. Dr. İlknur TOSUN, Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA, Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU ve Doç. Dr. Kurtuluş BURUK'a bilimsel destekleri için teşekkür ederim.

Manevi destekleri ile hep yanımda olan Prof. Dr. Ahmet AYAR, Yrd. Doç. Dr. Tuba DİNÇER, Yrd. Doç. Dr. Gülin RENDA ve Öğr. Gör. Mert SANDALCI hocalarıma, Şeyda KONDEL ve Seyran Sakine NAS arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Arkadaşlığı ve bilimsel desteği ile yanımda olan Arş. Gör. İnci DURUKAN ve Arş. Gör. Enis Fuat TÜFEKÇİ'ye sonsuz teşekkürlerimi iletiyorum.

Bölümdeki kıdemli arkadaşlarım Arş. Gör. Ahu REİS, Arş. Gör. Gülşen ULUÇAM ATAY, Arş. Gör. Merve CORA, Sana TABBOUCHE, Mujib Abdulkadir ABDURAHMAN ve Sanaz HAMIDI'ye teşekkür ederim.

Karadeniz Teknik Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalında Prof. Dr. Ümit ÇOBANOĞLU ve Mehmet Ali ÖZDEŞ'e elektron mikroskop çalışmalarımda yardımcı oldukları için sonsuz teşekkürlerimi iletiyorum.

Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne Prof. Dr. Ali O. KILIÇ yönetimindeki TYL-2015-5287 sayılı proje ile bu tezin yapılmasında katkı sağladıkları için teşekkür ederim.

Yüksek Lisans Öğrencisi  
Mona KHORSHIDTALAB

**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
<b>İç Kapak Sayfası</b>	
<b>ONAY</b>	
<b>BEYAN</b>	
<b>İTHAF</b>	
<b>TEŞEKKÜR</b>	
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>vi</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>ix</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>x</b>
<b>KISALTMALAR SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ</b>	<b>xi</b>
<b>1. ÖZET</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY</b>	<b>2</b>
<b>3. GİRİŞ ve AMAÇ</b>	<b>3</b>
<b>4. GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
4.1. Bakteriyofajlar	4
4.1.2. Bakteriyofajların Morfolojik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması	4
4.1.3. Bakteriyofajların Yaşam Siklusu	6
4.1.4. Fajların Moleküler Biyolojisi ve Tıpta Kullanımı	8
4.1.5. Faj Terapi	8
4.2. Bakterilerde Fajlara Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları	9
4.3. Atık Sular	10
4.3.1. Atık Sularda Bulunan Patojen Bakteriler	10
4.3.1.1. <i>Enterobacteriaceae</i> Familyası	10
4.3.1.2. <i>Pseudomonadaceae</i> Familyası	10
4.3.1.3. <i>Moraxellaceae</i> Familyası	11
4.3.1.4. <i>Alcaligenaceae</i> Familyası	11
4.3.2. Atık Sular ve Antibiyotik Direnci	11
<b>5. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>13</b>
5.1. Gereç	13
5.1.1. Kullanılan Cihazlar	13



5.1.2. Kullanılan Malzemeler	13
5.1.3. Kullanılan Kimyasallar	13
5.1.4. Besiyerleri	14
5.2. Yöntem	14
5.2.1. Besiyerlerin Hazırlanması	14
5.2.1.1. Ticari Besiyerlerin Hazırlanması	14
5.2.1.2. Oksidaz Testi	15
5.2.1.3. Oksidasyon-Fermentasyon (OF) Testi	15
5.2.1.4. Indol-Hareket Testinin Hazırlanması	15
5.2.1.5. Simmons Sitrat Testi	15
5.2.1.6. Üreaz Testi	15
5.2.1.7. Metilkırmızısı ve Voges-Proskauer (MR-VP) Testi	16
5.2.1.8. TSI (Triple Sugar Ironagar) Testi	16
5.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması	16
0.5 M EDTA	16
1 M Tris-HCl	16
TE (Tris/EDTA) Buffer	16
Tamponlu Fenol	17
SM Çözeltisi	17
50X TAE	17
Kovacs Reaktifi	17
Metil Kırmızısı Reaktifi	17
% 40'lık KOH Çözeltisi	17
% 5'lık $\alpha$ -Naftol Çözeltisi	18
5.2.3. Atık Su Örneklerinin Toplanması ve Stoklanması	18
5.2.4. Atık Su Örneklerinden Total Aerobik Bakteri Sayımı	18
5.2.5. Atık Su Örneklerinden Bakteri İzolasyonu ve Stoklanması	19
5.2.6. Fajların Atık Sulardan Zenginleştirilmesi ve İzolasyonu	19
5.2.7. Litik Faj Enfeksiyonunun Yapılması	19
5.2.8. Fajların Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Stoklanması	19
5.2.9. Faj Titresinin Belirlenmesi	20

5.2.10. Fajların Konak Spektrumlarının Belirlenmesi	20
5.2.11. Bakteri Suşlarının Tanımlanması ve Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi	20
5.2.11.1. Oksidaz Testi	20
5.2.11.2. Oksidasyon-Fermentasyon (OF) Testi	21
5.2.11.3. Indol-Hareket Testi	21
5.2.11.4. Simmons Sitrat Testi	21
5.2.11.5. Üreaz Testi	21
5.2.11.6. Metil kırmızısı ve Voges-Proskauer (MR-VP) Testi	22
5.2.11.7. TSI (Triple Sugar Iron agar)	22
5.2.12. Fajların Morfolojik Karakterizasyonu	23
5.2.13. Faj DNA İzolasyonu	23
5.2.14. Faj DNA Restriksiyon Enzim Analizi	24
5.2.15. Faj Litik Enfeksiyon Siklusu	24
<b>6. BULGULAR</b>	<b>25</b>
6.1. Atık Su Örneklerinden Total Aerobik Bakteri Sayımı	25
6.2. Atık Su Örneklerinden Bakteri İzolasyonu	25
6.3. Bakteri Suşlarının Tanımlanması, Faj Duyarlılıklarının ve Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi	26
6.4. Litik Faj Enfeksiyonunun Yapılması ve Fajların Saflaştırılması	30
6.5. Fajların Konak Spektrumunun Belirlenmesi	32
6.6. Fajların Morfolojik Karakterizasyonu	37
6.7. Fajlardan DNA İzolasyonu ve Restriksiyon Enzim Analizi	40
6.8. Fajın Litik Enfeksiyon Siklusu	41
<b>7. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>43</b>
<b>8. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>51</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b>	<b>54</b>
<b>10. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>59</b>

**TABLolar DİZİNİ**

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1.</b> Bradley sınıflandırılması	5
<b>Tablo 2.</b> Faj familyaları ve şematik morfojileri	6
<b>Tablo 3.</b> Atık su örneklerindeki total aerobik bakteri sayımı	25
<b>Tablo 4.</b> İzole edilen Gram negatif basillerin biyokimyasal test yöntemleri ile tanımlanmaları ve faj duyarlılıkları	26
<b>Tablo 5.</b> Biyokimyasal testlere göre izole edilen türlerin dağılımı	28
<b>Tablo 6.</b> Fajlara duyarlı bakterlerin otomatize sistemlerle tanımlanmaları ve antibiyotik duyarlılıkları	29
<b>Tablo 7.</b> Fajların çapraz enfeksiyonu ve konak spektrumları	36
<b>Tablo 8.</b> Fajların morfolojik özellikleri	37

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Genel bir yapısı	4
Şekil 2. Bradley sınıflandırmasına göre faj tipleri	5
Şekil 3. Fajların litik ve lizojenik döngüleri	7
Şekil 4. Farklı antropojenik faaliyetler sonucunda antibiyotik dirençli bakterilerin çevreye yayılması	12
Şekil 5. Fajların plak morfolojileri	30
Şekil 6. Damlatma yöntemi ile konakların faj lizatları ile enfekte edilmesi	33
Şekil 7. Fajların TEM görüntüleri	38
Şekil 8. Faj $\phi$ ssn 21 DNA'sının restriksiyon enzim analizi	41
Şekil 9. Faj $\phi$ ssn 21'nin litik enfeksiyon siklusu	42

**KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ****Kısaltmalar**

<b>BHI</b>	Brain Heart Infusion
<b>CFU</b>	Colony Forming Unit
<b>dak</b>	Dakika
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>EMB</b>	Eozin Metilen Blue
<b>EtBr</b>	Etidyum Bromür
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>µg</b>	Mikrogram
<b>µl</b>	Mikrolitre
<b>µm</b>	Mikrometre
<b>M</b>	Molarite
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mg</b>	Miligram
<b>MHB</b>	Mueller Hinton Broth
<b>MOI</b>	Multiplicity of Infection
<b>nm</b>	Nanometre
<b>NaCl</b>	Sodyum Klorür
<b>OD</b>	Optik Dansite
<b>PBS</b>	Fosfat Tampon Solüsyonu
<b>PEG</b>	Polietilen Glikol
<b>PFU</b>	Plaque Forming Units
<b>RE</b>	Restriksiyon Enzimi
<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>rpm</b>	Revolutions Per Minute
<b>SM</b>	Suspension Medium
<b>TE</b>	Tris EDTA
<b>TEM</b>	Transmission Electron Microscope
<b>TSA</b>	Tryptic Soy Agar
<b>TSB</b>	Tryptic Soy Broth

UV	UltraViyole
Φ	Bakteriyofaj
°C	Santigrat derece



## 1. ÖZET

### Atık Sulardan Litik Bakteriyofaj İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Yanlış ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı sonucu günümüzde pek çok patojen bakteri antibiyotiklere dirençli hale gelmiştir. Antibiyotiklerin yetersiz kalması sonucunda son yıllarda alternatif mücadele yöntemleri ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Bu yöntemlerden biri bakterilerin doğal düşmanı olan bakteriyofaj kullanımına yönelik faj terapisi dir. Fajlar etki spektrumu dışında kalan bakterilere etkisiz olduğu için, antibiyotiklerin normal mikrofloraya olan olumsuz etkilerini göstermezler.

Bu çalışmada, Trabzon ilinde iki farklı kaynaktan atık sular toplanarak bakteri izolasyonu yapıldı. İzole edilen bakteriler litik faj izolasyonu için konak hücre olarak kullanıldı. Litik enfeksiyon sonucu plak oluşturan faj lizatları saflaştırıldı ve morfolojik ve konak spektrumu yönünden karakterize edildi. Atık sudan izole edilen bakteriler morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre tanımlandıktan sonra litik fajlara duyarlı olan bakteriler otomotize sistemler ile tanımlandı ve antibiyotik dirençlilikleri belirlendi.

Toplam 14 faj ve 14 faja duyarlı bakteri izole edildi. Bu bakteriler *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae* ve *Alcaligenaceae* familyasına ait olan bazı suşlardır. İzole edilen 14 faj dar ve geniş spekturumlu olarak iki gruptan oluştu. Tüm fajlar geçirimli elektron mikroskobunda (TEM) incelendi ve görüntüledi. Fajlar Bradley Sınıflandırmasına göre A, B ve C tiplerinde sınıflandırıldı. Familya olarak fajlar *Myoviridae*, *Sphoviridae* ve *Podoviridae*'de yer almaktadırlar. Bu fajlardan 21 faj DNA'sı izole edilerek çeşitli restriksiyon enzimler ile kesildi ve bu fajın genom büyüklüğünün yaklaşık 60 kbp olduğu hesaplandı. Bu fajın litik enfeksiyon siklusu incelendi ve hücre başına üretilen faj partikül sayısı (burst size) 20 PFU/mL olarak saptandı.

**Anahtar Sözcükler:** Antibiyotik direnci, bakteri izolasyonu, bakteriyofaj, geçirimli elektron mikroskobu, restriksiyon enzim analizi

## 2. SUMMARY

### Isolation and Characterization of Lytic Bacteriophage from Wastewater

Due to uncontrolled and incorrect use of antibiotics resulted in increase in antibiotic resistance among pathogenic bacteria. Therefore, search for new therapeutic methods has been accelerated in recent years. Bacteriophage therapy have been the focus of research into combating pathogenic bacteria. Bacteriophage possess an advantages over antibiotics, including low probability of developing bacterial resistance, and significantly lower the chance of disrupting commensal microflora as they are specific to their hosts.

In this study, two different sources of the wastewater samples were collected from Trabzon. Bacterial strains were isolated from these samples. These strains were used as host cells for isolation of lytic phages using standard methods. A lytic phage capable of infecting a variety of bacterial strains were isolated and purified. Each purified phages were characterized based on their morphology and host specificity. In addition, those strains of bacteria sensitive to phages were further identified and susceptibility testing was performed using automated systems.

A total of 14 phages and 14 different phage-sensitive bacterial strains member of *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae* ve *Alcaligenaceae* families were isolated. Among the isolated phages some have broad and some have narrow host range. The morphologies of all isolated phages were determined by transmission electron microscopy and they are classified in A, B and C type phages based on Bradley's classification. They are classified as *Myoviridae*, *Sphoviridae* ve *Podoviridae*. The phage DNA of  $\phi$ ssn 21 was extracted and digested with restriction enzymes, and genome size of this phage was determined to be about 60 kbp. The burst size of the phage was calculated to be 20 PFU/mL based on the one step growth curve.

**Key words:** Antibiotic resistance, bacteriophage, isolation of bacteria, transmission electron microscopy, restriction enzyme analysis



### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

Bakteriyofajlar (fajlar) bakterilere özgü ve onları enfekte eden virüslerdir. Yeryüzünde  $10^{32}$  kadar faj olduğu (1) ancak bugüne kadar bunlardan yaklaşık 6000 kadarının karakterize edildiği bildirilmiştir (2). Bu veriler bu alandaki çalışmaların çok yetersiz olduğunu ve milyonlarca fajın izole edilerek tanımlanmayı beklediğini göstermektedir.

Bakteriyofajlar basit genetik ve morfolojik yapıları ile moleküler biyoloji çalışmalarında kolayca manipüle edilebilir olduklarından rekombinant DNA teknolojisi, biyoteknoloji ile enfeksiyon hastalıklarında tedavide amaçlı kullanılmaktadır. Fajlar çoklu antibiyotik direncine sahip bakterilere karşı antibiyotikler yerine alternatif tedavi ajanı (faj terapi) olarak kullanılmaları yanında tarım ve petrol endüstrisinde de biyokontrol ajanı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, fajlar patojen bakterilerin tiplendirilmesinde (faj tiplendirme), DNA ve protein aşılı için taşıyıcı vektör olarak ve birçok protein ve antikorun üretiminde (phage display = faj sunumu) kullanılmaktadır. Bu nedenle yeni fajların izolasyonu ve karakterizasyonu büyük önem arz etmektedir (3).

Yanlış ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı sonucu günümüzde pek çok patojen bakteri antibiyotiklere dirençli hale gelmiştir. Antibiyotiklerin yetersiz kalması hayatı tehdit eden birçok bakteriyel enfeksiyonun tedavisinde zorlukların yaşanmasına neden olarak ciddi bir sağlık tehdidi oluşturmaktadır. Bununla birlikte, yeni antibiyotiklerin üretilmesi bakteriyel direnç gelişimi ile aynı hızda ilerlememektedir. Bu nedenle çoklu antibiyotik dirençli ve hastane enfeksiyonlarından sorumlu patojen bakteriler ile etkili mücadelede kullanılacak alternatif yöntemlerin ortaya konması için yapılan çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır. Bu yöntemlerden biri bakterilerin doğal düşmanı olan faj kullanımına yönelik faj terapisi. Konağa özgü olması nedeniyle konak spektrumu geniş olmamakla birlikte fajlar tedavi amaçlı uygulandığında mikrofloraya etkileri olmadığı için önem kazanmıştır. Antibiyotiklerin aksine yan etki ile sekonder enfeksiyonlara yol açmazlar (4, 5).

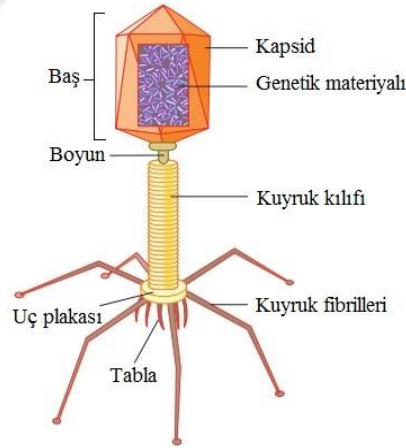
Bu çalışmada, Trabzon ili atık su örneklerinden çoklu antibiyotik direncine sahip patojen Gram negatif bakterileri enfekte eden litik fajların izole edilerek morfolojik ve fonksiyonel olarak karakterize edilmesi ve bunlardan konak spektrumu geniş olan bir fajın morfolojik ve genetik olarak karakterize edilmesi amaçlandı.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Bakteriyofajlar

Bakteriyofajlar veya fajlar bakterileri enfekte eden küçük virüslerdir. Bakteri hücrelerinin metabolizmasını bozarak litik faj durumunda hücrenin parçalanmasına neden olurlar. Fajlar yaklaşık 100 yıl önce, ilk kez İngiliz bakteriyolog Ernest Hankin (1896), Rus bakteriyolog Nikolay Gamaleya (1898) ve İngiliz bakteriyolog Frederick Twort (1915) tarafından tanımlanmış ve antibakteriyal etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Ancak fajın bir virüs olduğunu Pastör Enstitüsünden Felix d'Hérelle (1917) tanımlamış ve bu yapıya bakteri yiyen anlamına gelen bakteriyofaj (bacteria ve phagei, Yunanca) adını vermiştir (1, 6, 7).

Fajlar, diğer virüslerde olduğu gibi DNA veya RNA'dan birini içeren nükleik asit ile bunu çevreleyen protein yapısında kapsidden oluşmuş, infeksiyöz ajanlardır (8). Fajların farklı morfolojik yapıları olmasına rağmen genel yapıları baş, genetik materyal, kuyruk ve kuyruk fibrillerinden oluşur (Şekil 1) (9).

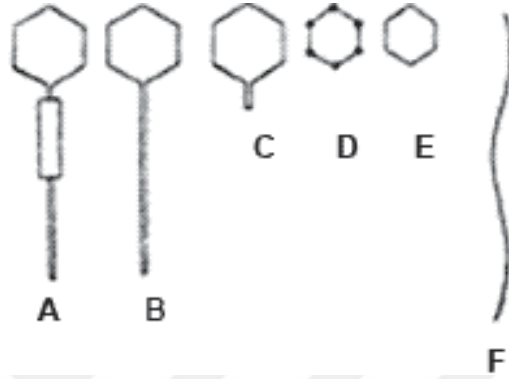


Şekil 1. Genel bir yapısı (Chase'dan, 9)

### 4.1.2. Bakteriyofajların Morfolojik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması

Faj sınıflandırmasının öncülerinden biri olan Avustralya'lı virolog Macfarlane Burnet 1937 yılında fajların farklı büyüklükte ve fizikokimyasal ajanlara karşı direnç farklılıklarına sahip olduklarını göstermiştir. Helmut Ruska 1943'de elektron mikroskobu ile fajların morfolojik çeşitliliğine göre sınıflandırma yapmıştır. Francis Holmes 1948'de virüsleri üç familyada sınıflandırmış ve fajlar *Phagineae* familyasında

yer almıştır. “Provisional Committee on Nomenclature of Viruses” 1965 yılında kuruldu ve daha sonra “International Committee on Taxonomy of Viruses” (ICTV) olarak değişti. Faj sınıflandırması ciddi bir şekilde 1967’de David Bradley tarafından yapıldı ve ICTV tarafından kabul edildi (9). Şekil 2’de görüldüğü gibi Bradley fajları A’den F’ye, altı temel morfolojik tip olarak sınıflandırdı ve her tipin nükleik asit içeriğini belirledi (Tablo 1) (10, 11).



Şekil 2. Bradley sınıflandırmasına göre faj tipleri (Arda’dan, 8)

Tablo 1. Bradley sınıflandırılması

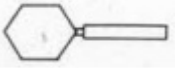
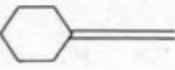
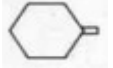







Tip	Fajın morfolojik özelliği*	Nükleik asit**	Örnek**
A	Polihedral baş, kasılabilen kuyruklu	dsDNA, lineer	T2, T4, T6
B	Polihedral baş, uzun ve kasılamayan kuyruklu	dsDNA, lineer	T1, T5, $\lambda$
C	Polihedral baş, kısa kuyruklu	dsDNA, lineer	T3, T7, P22
D	İkozahedral baş, kuyuksuz, büyük kapsomerli	ssDNA, sirküler	$\Phi$ X174, S13
E	İkozahedral baş, kuyuksuz, küçük kapsomerli	ssRNA, lineer	F2R17, Fr, MS2
F	Flamentöz	ssRNA, lineer	FE, fd, M13

\*Fajların morfolojik özellikleri (Alpay’dan, 10); \*\*Genetik materyalleri ve bu özelliklere sahip olan fajlardan örnekler (Soykut’dan, 11). dsDNA: çift iplikli DNA, ssDNA: tek iplikli DNA, ssRNA: tek iplikli RNA.

1959’dan bu yana en az 5360 kuyruklu ve 179 kübik, flamentöz ve poleomorfik faj elektron mikroskopta incelenmiştir. Her yıl yaklaşık 100 yeni faj bulunmaktadır.

Günümüzde yapılan sınıflandırmada on takım ve bir familya yer almaktadır (Tablo 2). Bu sınıflandırma fajların morfolojik ve nükleik asit yapılarını dikkate alınarak yapılmaktadır (2).

**Tablo 2.** Faj familyaları ve şematik morfolojileri (Ackermann'dan, 2)

Şekil	Takım veya Familya	Nükleik asit, ayrıntılar, boyut	Örnek
	<i>Caudovirales</i>	Çift iplikli lineer DNA, zarsız	
	<i>Myoviridae</i>	Kasılabilen kuyruk	T4
	<i>Siphoviridae</i>	Uzun kasılmayan kuyruklu	$\lambda$
	<i>Podoviridae</i>	Kısa kuyruklu	T7
	<i>Microviridae</i>	Tek iplikli sirküler DNA, 27 nm, 12 knoblike kapsomerli	$\phi$ X174
	<i>Corticoviridae</i>	Çift iplikli sirküler DNA, kompleks kapsidli, lipidli, 63 nm	PM2
	<i>Tectiviridae</i>	Çift iplikli lineer DNA, iç lipid veziküllü (inner lipid vesicle), yalancı kuyruk	PRD1
	<i>Leviviridae</i>	Tek iplikli lineer RNA, 23 nm, poliovirüse benzer	MS2
	<i>Cystoviridae</i>	Çift iplikli lineer RNA, segmentli, lipidli zar, 70-80 nm	$\phi$ 6
	<i>Inoviridae</i>	Tek iplikli sirküler DNA, filament veya basil şeklinde, 85-1950 x 7 nm	fd
	<i>Plasmaviridae</i>	Çift iplikli sirküler DNA, lipidli zar, kapsitsiz, 80 nm	MVL2

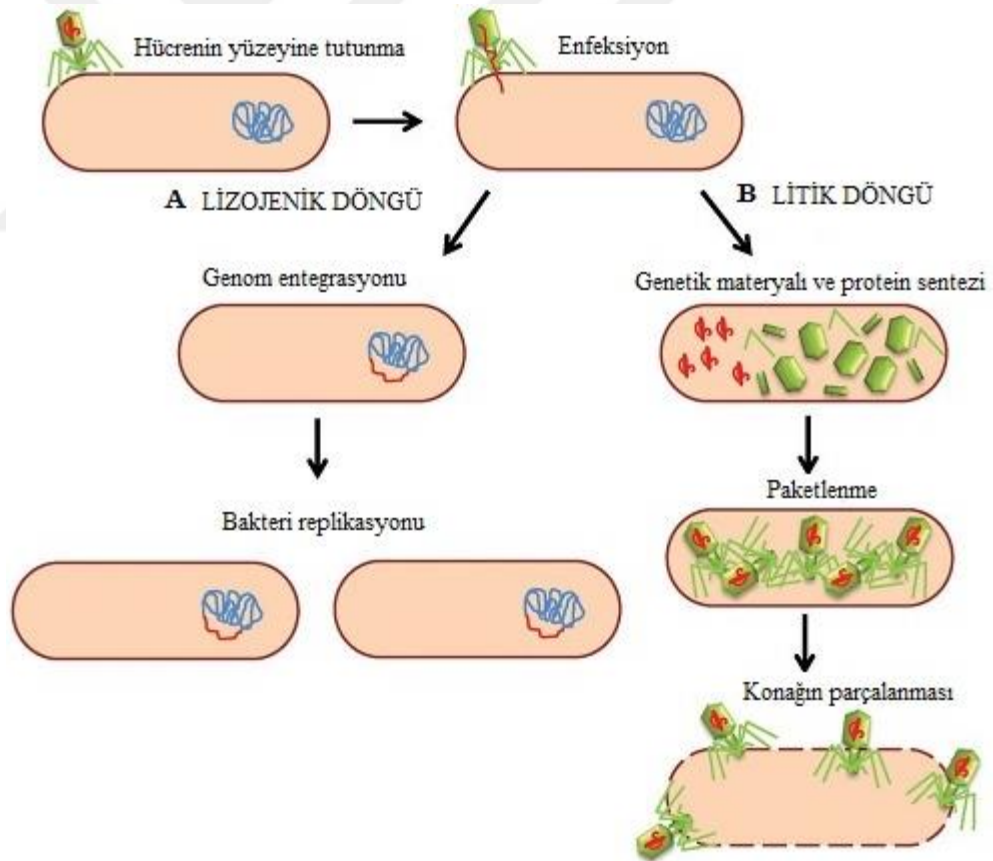
#### 4.1.3. Bakteriyofajların Yaşam Siklusu

Fajların yaşam döngüleri litik ve lizojenik olmak üzere iki gruba ayrılır (şekil 3). Bu yaşam döngülerini *cro* ve *cI* genleri belirler. Fajın lizojenik döngüyü başlatması için *cI* ve litik döngüsünü başlatmak için *cro* gen ürün proteinleri sentezlenmelidir. Her bir

gen bölgelerinin protein sentezi başladığında diğer gen bölgelerinin protein sentezi bloklanır (12).

Litik döngüde, faj nükleik asidini konağa entegre ettikten sonra genetik karakterlerine göre farklı mekanizmalarla genetik materyalini konak sitoplazmasında replike eder. Aynı anda fajın diğer komponentleri sentezlenir ve ardından parçalar birleşerek faj progeni oluşur. Olgunlaşan fajlar konak hücreyi liz ederek hücrenin parçalanmasına neden olurlar ve böylece yeni litik fajlar serbest kalır (8, 11, 13).

Lizojenik döngüde, faj nükleik asitini konağa entegre ettikten sonra konak hücrenin genomuyla birleşir. Böylece konak genomunun her replikasyonunda fajın nükleik asiti de replike olur ve yeni oluşan bakteri hücrelerine transfer olur. Bu durumda profaj oluşur. Profaj DNA'ya hasar veren ajanlara (UV ışığı, antibiyotik, mitomycin C, vs.) maruz kaldığında litik döngü başlar (8, 11, 14).



**Şekil 3.** Fajların litik ve lizojenik döngüleri. A: lizojenik döngüde faj genetik materyalini konağın DNA'sına entegre eder, B: litik döngüde faj replikasyon için gereken kısımlarını konağın sitoplazmasında çoğaltarak profaj oluşturur ve olgunlaşan fajlar konağı lize ederek hücreyi parçalar ve yeni litik faj döngüsü başlar (Domingo-Calap'dan, 15).

#### 4.1.4. Fajların Moleküler Biyolojisi ve Tıpta Kullanımı

Bakteriyofajlar kolayca manipüle edilebilir olduğundan biyoteknoloji, araştırma ve tedavi amaçlı kullanım alanları vardır. Son yıllarda fajların modern biyoteknoloji alanında daha verimli çalışmalara kaynak sağladığı ortaya konmuştur. Çoklu antibiyotik dirençli bakteri türlerine karşı antibiyotik yerine alternatif tedavi olarak önerilmişlerdir (3). Örnek olarak fajlar doğal olarak endolizin enzimine sahipler ve çoklu antibiyotik dirençli bakterilere karşı bu enzimin tedavi amaçlı kullanılması gelecek vaad etmektedir. Endolizin enzimi özellikle Gram pozitif bakterilerde hücre duvarındaki peptidoglikanları hedef alarak düşük dozda güçlü bir bakteriolitik özelliğe sahiptir ve antibiyotiklerle karşılaştırıldığında daha az yan etki gösterdikleri belirtilmiştir (16).

Fajlar bakterilere spesifik oldukları için bakteri identifikasyonunda da kullanılırlar. Bu yöntem, faj tiplendirme olarak bilinir. Böylece patojen bakteri suşların tanımı daha kolay ve daha hızlı gerçekleştirilir. Ayrıca fajlar DNA ve protein aşılı için taşıyıcı olarak ve birçok protein ve antikor üretiminde de kullanılmaktadır (3).

Fajlar tarım ve petrol endüstrisinde biyokontrol ajanı olarak kullanılmaktadır. Örnek olarak şeftali, lahana ve biberlerde, *Xanthomona spruni* patojen bir suştur ve bu suş biyolojik olarak faj ile kontrol edilmektedir (3).

#### 4.1.5. Faj Terapi

Yirminci yüzyılın başında daha antibiyotikler keşfedilmeden önce fajlar bakteriyel enfeksiyonlara karşı kullanılmaktaydı. Félix d'Hérelle (1919), kolera, veba ve şarbon hastalıklarına neden olan bakterilerden fajları izole ederek ilk faj terapisini dizanteri bakterisi üzerine uyguladı (1). Fajları aerosol ve enjeksiyon dozaj formları olarak kullandı (12). Antibiyotiklerin keşfinden sonra faj terapisi batı dünyasında duraklama devrine girdi (1940-1980) ve faj ile ilgili çalışmalar azaldı (17). Ancak, eski Sovyetler Birliği'nde çalışmalara devam edildi. Günümüzde Gürcistan'ın Eliava Enstitüsü faj çalışmaları ve faj terapisi uygulamalarına önderlik etmektedir (3). Dünya Sağlık Örgütü ve birçok ülkenin Sağlık Bakanlığına göre antibiyotik direnci son 20 yılda önemli bir sorun haline gelmiştir. Bu yüzden günümüzde antibakteriyel ajanların alternatifi olma yolunda faj terapisi tekrar önem kazanmaktadır (17).

Faj terapisinde litik döngüye sahip olan fajlar kullanılmaktadır. Faj bakteriyi enfekte eder ve bakteriyi parçalayarak hem bakteri ölümüne neden olur hem de enfeksiyon bölgesinde çoğalarak diğer bakterileri enfekte ederek enfeksiyon kaynağı olan konağı yok eder. Fajlar konaklarına özgüdür ve sadece konak spektrumundaki türleri enfekte ederler. Bu sayede etki spektrumu dışındaki bakterilere karşı zararsız olduğundan antibiyotiklerde görülen normal flora üzerine olumsuz etkiler bu tedavi yönteminde görülmez. Ayrıca, antibiyotik kullanımına bağlı gelişen sekonder enfeksiyon gelişimi de önlenmiş olur. Fajlar enfeksiyon bölgesinde yani bakterilerin bulunduğu bölgede çoğalır ve enfeksiyona neden olan bakteriler ile eş zamanlı üreyerek döngüsüne devam ederler. Böylece sistemik yan etki görülme olasılığı çok düşüktür (16,18).

#### **4.2. Bakterilerde Fajlara Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları**

Bazı bakteriler faj enfeksiyonlarına karşı antiviral mekanizmalar geliştirmektedirler. Bu antiviral mekanizmaların başlıcaları, adsorbsiyonun inhibasyonu, Sie sistemi, restriksiyon-modifikasyon sistemi, CRISPR-Cas sistemi ve abortif enfeksiyon sistemidir.

Adsorbsiyon inhibisyonunda, bakteriler enfeksiyona uğramamak amacıyla hücre duvarında bulunan faj reseptörlerini modifiye ederek değiştirir ve böylece adsorbsiyon aşamasında fajlara karşı direnç gelişir.

Sie sisteminin hedefi fajların genetik materyalinin hücre duvarından girmesini engellemektir. Bakteri hücresinin iç zar kısmında yerleştiği düşünülen proteinler ile fajın genetik materyalinin translokasyonu engellenerek, sitoplazmaya girmesine izin verilmez, böylece faj bakteriyi enfekte edemez.

Birçok bakteri restriksiyon-modifikasyon (R-M) sistemine sahiptir. Bakteriler bu sistemi, hücreyi yabancı DNA parçacıklarına karşı koruma amacıyla yapmaktadır. Fajlar enfeksiyon yaptığında DNA'ları R-M sistemindeki enzimler ile parçalanır veya faj DNA'sı sentezleyince metilasyona uğrar.

Bakteri kromozal geninde düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (CRISPR), bakterinin daha önce karşılaştığı faj veya plazmit kalıntılarından oluşur. Bu DNA segmentleri 21-48 çift bazdan oluşup tekrarlanmayan 26-72 çift baz aralıklar ile bölünmüştür. Bu genlerin biyolojik rolleri ile ilgili birçok hipotez

bulunmaktadır ama son zamanlarda bakterinin yabancı genetik materyallere karşı bir savunma sistemi olarak kabullenmiştir. Tam olarak bu sistemin nasıl antifaj ve antiplasmid olarak çalıştığı belli değildir ve bu konu ile ilgili farklı hipotezler bulunmaktadır. Abortif enfeksiyon sisteminde konak, faj tarafından normal enfeksiyona uğrar fakat bu sistem enfekte edilmiş hücrenin programlı ölüme yol açar böylece fajın çoğalmasını önler (19).

### **4.3. Atık Sular**

Atık suların en önemli canlıları bakterilerdir ve atık su ünitelerinde yaygın olarak bulunurlar. Bakteriler atık suyun ekolojisinde ve arıtımında önemli rol oynarlar.

Atık su florasında birçok bakteri familyaları bulunmaktadır. Bu bakteriler atık su ekolojisindeki rollerine göre asetojenik bakteriler, denitrifikasyon yapan bakteriler, koliformlar, patojen bakteriler gibi sınıflandırılırlar. Günlük yaşamda çok sayıda, kanalizasyon sistemlerinden ve çevresel kaynaklardan, patojen bakteriler atık sulara karışmaktadır. Bu patojen bakterilerin çoğu, *Enterobacteriaceae* familyasından oluşmaktadır (20).

#### **4.3.1. Atık Sularda Bulunan Patojen Bakteriler**

##### **4.3.1.1. *Enterobacteriaceae* Familyası**

*Enterobacteriaceae* familyası çok yaygın olmakla birlikte, doğada, sularda, toprakta, insanların ve hayvanların bağırsaklarında mikroflora olarak bulunmaktadır. Bu familya üyeleri Gram negatif, fakültatif anaerob basil veya kokobasil, hareketli veya hareketsiz, spor oluşturmeyen, katalaz pozitif ve oksidaz negatiflerdir. *Enterobacteriaceae* familyasının çeşitli türleri, çok önemli hastane enfeksiyonlarına yol açar ve klinik olarak bütün hastane enfeksiyonu izolatlarının %50'sini ve bütün Gram negatif izolatların %80'ini kapsarlar. Bu familyada hastalık yapan bakteriler ya zorunlu patojen ya da fırsatçı patojendir. Zorunlu patojenlerden, *Salmonella typhi* (tifo etkeni), *Shigella dysenteriae* (dizantere etkeni), *Yersinia pestis* (veba etkeni), fırsatçı patojenler ise *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* sayılabilir (21).

##### **4.3.1.2. *Pseudomonadaceae* Familyası**

*Pseudomonadaceae* familyası daha çok çevresel farklı yerleşimleri olan Gram negatif basillerdir. Bu familyadaki cinslerin başlıcaları *Azomonas*, *Azotobacter*,



*Cellvibrio* ve *Pseudomonas*'dır. Bu familyada klinik önem taşıyan *Pseudomonas* cinsidir. *Pseudomonas* türleri sporsuz, aerob bazen anaerob olarak da üreyebilirler. Bugüne kadar 160 *Pseudomonas* türü tanımlanmıştır. Bunlardan sadece 12 tür insanda fırsatçı patojenidir. Klinik önem taşıyan *P. aeruginosa* kulak, yanık, solunum, idrar yolu ve hastane enfeksiyonlarına neden olmaktadır (22).

#### **4.3.1.3. Moraxellaceae Familyası**

*Moraxellaceae* familyasının önemli cinsleri *Acinetobacter* ve *Moraxella*'dır. *Acinetobacter* cinsleri aerobik, Gram negatif kokobasil, oksidaz negatif, hareketsizdir. İnsan derisinde normal floradır. Doğada ve hastanede yaygın bir şekilde bulunmaktadır. İnsan örneklerinde ikinci en sık izole edilen nonfermentatif bakteridir. Klinik önem taşıyan türü *A. baumannii*'dir. Yoğun bakımda yatan hastalarda sindirim sistemi enfeksiyonları ve pnömoniye neden olmaktadır.

*Moraxella* cinsleri Gram negatif kokobasil, genellikle çift bazen de zincirli, oksidaz pozitif, hareketsizdirler. İnsan deri, mukoza membranı ve bazı türleri solunum yolu florasıdır. *M.catarrhalis* sinüzit, orta kulak iltahı, bronşit ve pnömoniye neden olur (22).

#### **4.3.1.4. Alcaligenaceae Familyası**

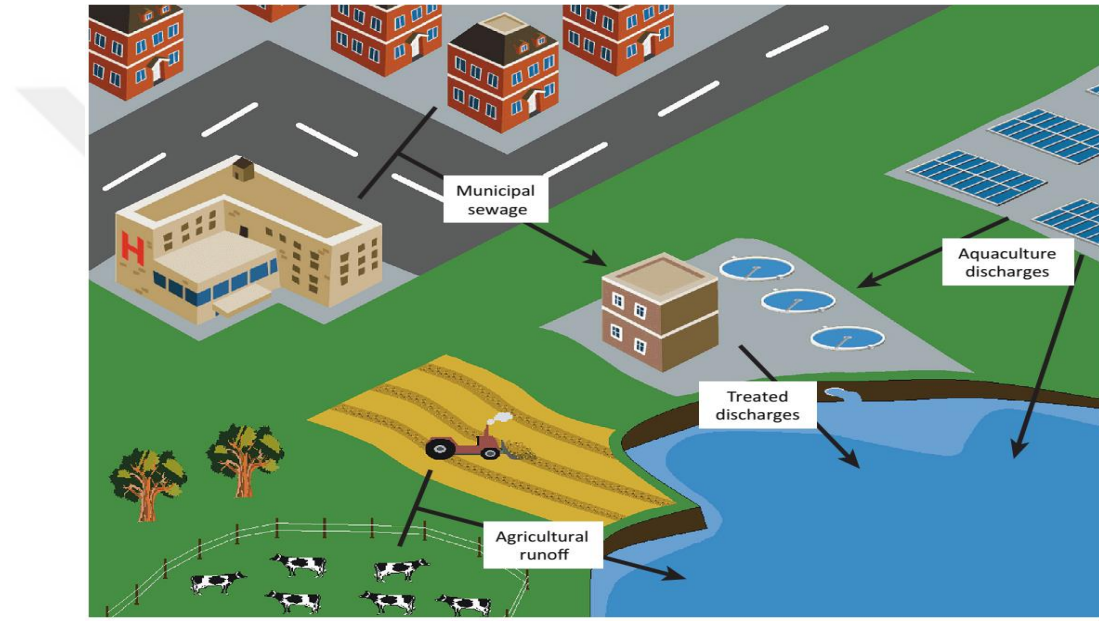
Bu familyadaki bakteriler daha çok su ve toprakta bulunmaktadır. Gram negatif basıl veya kokobasil, nonfermentatif bakterilerdir. Bu familyada bulunan cinsler (*Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Brackiella*, *Kerstesia*, *Oligella*, *Pelistega*, *Pigmentiphaga*, *Taylorella*) daha çok kistik fibrozis hastalarında solunum yolu enfeksiyonlarından izole edilmiştir. Bu familyada klinik önem taşıyan *Bordetella pertussis* boğmacanın etkenidir. Boğmaca insandan insana solunum yolu ile yüksek derecede bulaşıcıdır. Boğmacanın aşı programı olmayan ülkelerdeki çocuklarda 200 000 ila 400 000 ölüme neden olmaktadır. *Achromobacter xylosoxidans* immün yetmezliği olan hastalarda, hastane ortamında lokal veya sistemik enfeksiyonuna oldukça sık neden olan bir etkenidir (21, 22).

#### **4.3.2. Atık Sular ve Antibiyotik Direnci**

Antibiyotiklerin bulunması ve geliştirilmesi 20. yüzyılın en önemli başarılarından biridir fakat kısa bir süre sonra antibiyotiklere karşı bakterilerde direnç gelişmesi ve gün

geçtikçe çoklu antibiyotik dirençli bakterilerin artması, dünya üzerinde ciddi bir sağlık problemi oluşturmaktadır.

Antibiyotik direncin ortaya çıkması ve artışında en önemli nedenlerden biri antropojenik faaliyetlerdir. Antibiyotiklerin yanlış ve bilinçsizce insan ve hayvan sağlığında, hayvancılık, tarım ve sanayide kullanımı, su kaynaklarına ve atık sulara karışmasına, çevreye patojen ve antibiyotik dirençli bakterilerin yayılmasına neden olmuştur (Şekil 4). Böylece yayılan bakteriler sulu ortamlarda antibiyotik direnci taşıyan genetik elemanlarını birbirlerine transfer edebilirler (23).



**Şekil 4.** Farklı antropojenik faaliyetler sonucunda antibiyotik dirençli bakterilerin çevreye yayılması (Marti'den, 23)

## **5. GEREÇ ve YÖNTEM**

### **5.1. Gereç**

#### **5.1.1. Kullanılan Cihazlar**

Çalışmada kullanılan cihazlar başlıca 37°C'lik etüv (Memmert BM 600, Almanya), biyogüvenlik kabini (Class II Safety Cabinet, Powtech, Türkiye), biyogüvenlik kabini (Clean Air, Hollanda), 4°C buzdolabı (Profilo), -20°C derin dondurucu (Bosch, Almanya), UV spektrofotometre (Eppendorf, ABD), -80°C derin dondurucu (New Brunswick Scientific mod U570 premium, Thermo, ABD), pastör fırını (Nüve, Türkiye), vorteks (Isolab), dikey model otoklav (Kermanlar, Türkiye), çalkalayıcı su banyosu (Memmert GFL 1086, Almanya), çalkalayıcı inkübatör (N-biotek, G. Kore), pH metre (Hanna, Romanya), manyetik karıştırıcı (Stuart, Türkiye), mikrodalga fırın (Beko, Türkiye), buz makinesi (Scotsman AF 80, İtalya), terazi (KERN & SOHN GmbH, Almanya), hassas terazi (Sartorius Laboratory, Almanya), deiyonize su cihazı (Barnstead, Türkiye), bunzen beki, santrifüj (BECKMAN COULTER, ABD), santrifüj (Eppendorf, Almanya), santrifüj (Sigma, Almanya), elektroforez tankı (OWL electrophoresis system, ABD), UV illüminatör (UUP, ABD), MALDI-TOF (Microflex™, BRUKER, Almanya), Phoenix™ 100 (Becton Dickinson Diagnostic instrument systems, Sparks, Md, ABD), JEM-1010 transmission elektron mikroskobu (JEOL, ABD), mikroskop (Olympus, Filipin) cihazları kullanıldı.

#### **5.1.2. Kullanılan Malzemeler**

Eppendorf tüpleri, etanol, cam tüpleri, balon joje, erlenmayer, eldiven, petri plakları, pipet ucu (10 µL, 100 µL, 1000 µL), otomatik pipet (10 µL, 20 µL, 100 µL, 1000 µL), çok kanallı otomatik pipet (100 µL), 0.20 µm'lik filtre, 0.45 µm'lik filtre, deney tüpleri, mezür, cam pipet, pipetman (Isolab, Almanya), 250-1000 mL'lik mezür, parafilm, test tüp standı, lam, grid (FCF100-Cu, Electron Microscopy Sciences, ABD) ve Oak Ridge tüpleri gibi sarf malzemeler kullanıldı.

#### **5.1.3. Kullanılan Kimyasallar**

Sodyum hidroksit (NaOH), Etidyum bromür, Magnezyum sülfat (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), Jelatin, Bromtimol mavisi, Dipotasyum fosfat, Beef extract, Pancreatic pepton, Kloroform, Fenol, Izoamil alkol, Tris, Muller Hinton broth, Triple Sugar Iron agar, N,

N, N', N'-tetra-metil-p-fenilen diamin dihidroklorid (Merck, Almanya), Urea, Simmons Citrate agar, Lactose, DNaz I, RNAaz A, Mineral oil (sigma-aldrich, ABD), Agarose, EDTA, Phenol red (Quantum, ABD), Sodium chloride (NaCl), Glycerol (Riedel-de Haen, Hollanda), Yeast Extract, LB agar, LB broth, Tryptone Soya agar, Tryptone Soya broth, Tryptone, Muller Hinton agar (Lab M, İngiltere), Tris-HCl (AppliChem, ABD), PEG-8000, 1 kb DNA marker (Thermo fisher scientific, ABD), Pepton, Glukoz, Dextrose, Potasyum hidroksid, PBS (Oxoid, İngiltere), Agar (Bioife, İtalya), Uranil asetat (Electron microscopy sciences, ABD), gram boyama seti (GBL, Türkiye), 100bp DNA marker (Biomatik, ABD), *Ava* I, *Eco* RI, *Nco* I, (Biolab, ABD), *Hind* III (Gibco BRL, ABD), *BstE* II (Promega, ABD) ve *Pst* I (Fermantas, ABD) firmalarından temin edildi.

#### **5.1.4. Besiyerleri**

Çalışmada bakterilerin ve fajların üretilmesinde, Tryptic Soy agar (TSA), Tryptic Soy broth (TSB), Tryptic Soy yumuşak agar (% 0.6 w/v), Luria Bertani (LB) agar, LB Broth, LB yumuşak agar (% 0.6 w/v) ve Muller Hinton broth (MHB) besiyerleri kullanıldı.

Bakterilerin biyokimyasal yöntemler ile identifikasyonu amacıyla Triple Sugar Iron agar (TSI), IMVIC (Indole, methyl red, Voges-Proskauer ve Simmons Citrat) testi, Urease broth, oksidasyon-fermentasyon (OF) testi ve hareket test besiyerleri kullanıldı.

## **5.2. Yöntem**

### **5.2.1. Besiyerlerin Hazırlanması**

#### **5.2.1.1. Ticari Besiyerlerin Hazırlanması**

Tüm ticari besiyerleri üretici firmaların talimatına göre cam şişelerde veya erlenmayerde hazırlandı, 1.2 atm ve 121°C'de 30 dak otoklavlanarak sterilize edildi.

Agar besiyerleri otoklav işlemi bittikten sonra 55°C'lik su banyosunda soğutuldu ve steril petri plaklarına yaklaşık 25 mL dokuldu. Stoklanması gereken besiyerleri 4°C buzdolabında saklandı. Sıvı besiyerleri ise otoklavdan sonra oda sıcaklığındaki dolapta saklandı.

### **5.2.1.2. Oksidaz Testi**

N, N, N', N'-tetra-metil-p-fenilen diamin dihidrokloridin son konsantrasyonu %1'lik olacak şekilde steril distile suda çözüldü, alüminyum folyo sarılmış enjeksiyona aktarıldı ve kullanılına kadar 4°C buzdolabında saklandı (24).

### **5.2.1.3. Oksidasyon-Fermentasyon (OF) Testi**

Glukozdan %10'luk distile suda çözelti hazırlandı ve 0.20 µm filtreden geçirildi. Ayrıca bir cam şişede 2 g pepton, 5 g sodyum klorid, 0.03 g bromtimol mavisi, 3 g agar, 0.3 g dipotasyum fosfat ilave edildi, 1000 mL'ye tamamlandı, karıştırıcıda ısıtılarak karıştırıldı ve pH'sı 7.1'e ayarlandı. Ardından 1.2 atm ve 121°C'de 30 dak otoklavlanarak sterilize edildi. Otoklavdan sonra 55°C'lik su banyosunda soğutuldu ve son konsantrasyon %1 olacak şekilde glukoz ilave edildi. Karıştırdıktan sonra 3 mL olacak şekilde tüplere dağıtıldı ve kullanılına kadar 4°C buzdolabında saklandı (24).

### **5.2.1.4. Indol-Hareket Testinin Hazırlanması**

Cam şişede 2 g tripton, 0.5 g NaCl ve 0.3 g agar aktarıldı, distile su ile 100 mL tamamlandı ve ısıtılarak karıştırıldıktan sonra pH'sı 7.2'ye ayarlandı ve otoklavlanarak sterilize edildi. Otoklavdan sonra 55°C'lik su banyosunda soğutuldu ve 3 mL olacak şekilde tüplere dağıtılarak kullanılıncaya kadar 4°C buzdolabında saklandı (24).

### **5.2.1.5. Simmons Sitrat Testi**

Firma talimatına göre cam şişede hazırlanarak sterilize edildi. Otoklav işlemi bittikten sonra 55°C'lik su banyosunda soğutuldu, 4 mL olacak şekilde tüplerde dağıtıldı ve yarı yatık pozisyonda katılaşına kadar beklenildi. Kullanılıncaya kadar 4°C buzdolabında saklandı (24).

### **5.2.1.6. Üreaz Testi**

Fenol kırmızısının suda %1'lik stok çözeltisi hazırlandı. Cam şişede 1 g pepton, 5g NaCl, 2 g monopotasyum fosfat, 1 g glukoz, 20 g üre, 1.2 mL %1'lik fenol kırmızısı 100 mL distile suda çözüldü ve pH'sı 6.8'e ayarlandı. Sonra aseptik şartlarda 0.20 µm filtreden geçirildi. Ardından steril distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan besiyeri 1 mL olacak şekilde steril ependorf tüplerde dağıtıldı kullanılıncaya kadar 4°C buzdolabında saklandı (24).

### **5.2.1.7. Metil Kırmızısı ve Voges-Proskauer (MR-VP) Testi**

Cam şişeye 1.4 g pepton, 1 g dipotasyum fosfat ilave edildi, pH'sı 6.9'a ayarlandı ve distile su ile hacim 180 mL 'ye tamamlandıktan sonra otoklavlanarak sterilize edildi. Otoklavdan sonra 55°C'lik su banyosunda soğutuldu ve son konsantrasyon %1 olacak şekilde filtreden geçirilmiş glukoz ilave edilerek son hacim 200 mL'e tamamlandı. Hazırlanan besiyeri 1 mL olacak şekilde steril ependorf tüplerde dağıtıldı ve kullanılıncaya kadar 4°C buzdolabında saklandı (24).

### **5.2.1.8. TSI (Triple Sugar Iron agar) Testi**

Firma talimatına göre cam şişede hazırlandı, otoklavda sterilize edildi, su banyosunda soğutuldu ve 4 mL olacak şekilde tüplerde dağıtılarak yarı yatık pozisyonda katılaşıncaya kadar beklenildi. Ardından kullanılıncaya kadar 4°C buzdolabına saklandı (24).

## **5.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması**

### **0.5 M EDTA:**

Ticari etilendiamintetraasetik asitten (EDTA) 73.05 g tartıldı (MW: 292.2 g/mol) 500 mL distile su ile tamamlandı. Manyetik çalkalayıcının üstünde berrak solüsyon elde etmek için NaOH peleti ilave edildi ve çalkalandı. Solüsyonun pH'si 8.0'e ayarlandı ve otoklavlanarak sterilize edildi. Otoklavdan sonra oda sıcaklığındaki dolapta saklandı (25).

### **1 M Tris-HCl:**

Ticari Tris-HCl'den 78.8 g tartıldı (MW:157.60 g/mol) distile su ile 500 mL'e tamamlandı. Solüsyonun pH'si HCl ile 7.5'e ayarlandı ve otoklavlanarak sterilize edildi. Otoklavdan sonra oda sıcaklığındaki dolapta muhafaza edildi (25).

### **TE (Tris/EDTA) Buffer:**

Stok Tris-HCl (1 M) solüsyonundan son konsantrasyonu 10 mM Tris-HCl olacak şekilde (5 mL) alındı. Stok EDTA (0.5 M) solüsyonundan son konsantrasyonu 1 mM EDTA olacak şekilde (1 mL) alındı. Ardından distile su ile (494 mL) 500 mL'ye tamamlandı. Çalışmalarda kullanılıncaya kadar oda sıcaklığındaki dolapta saklandı (25).

**Tamponlu Fenol:**

Kristal fenol 65°C’de eriyene kadar su banyosunda bırakıldı. Eridikten sonra eşit hacimde 10X TE, sıvı fenole ilave edildi ardından iyice çalkalandı ve iki faz oluşana kadar oda sıcaklığında beklendi. Üstteki oluşan faz atıldı ve yeniden bir önceki aşama tekrarlandı. Sonra eşit hacimde 1X TE (pH 8), sıvı fenole ilave edildi ardından iyice çalkalandı ve iki faz oluşana kadar oda sıcaklığında beklendi. Üstteki oluşan faz atıldı ve yeniden bir önceki aşama tekrarlandı. Son aşamada az miktarda 1X TE tabakası, sıvı fenol üzerinde bırakılarak 4°C buzdolabına saklandı (26).

**SM Çözeltisi:**

Faj tamponu hazırlamak için 5.8 g NaCl, 2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 50 mL 1M Tris.HCl (pH: 7.5) ve 5 mL % 2 jelatin çözeltisi, 1000 mL distile su içerisinde çözüldü ve otoklavlanarak sterilize edildi. Otoklavdan sonra oda sıcaklığındaki dolapta saklandı (27).

**50X TAE:**

Bir miktar distile suda 242 g Tris (MW: 121.1 g./mol) çözüldü ardından stok EDTA’dan (0.5 M) 100 mL, asetik asitten 57.1 mL üstüne ilave edildi. Son olarak hacim 1000 mL’ye tamamlandı (25).

**Kovacs Reaktifi:**

İndol testi için kullanılan kovacs reaktifi hazırlamak için 10 mL %36’lık HCl, 90 mL distile suya ilave edildi. Ardından 5 g p-dimetil-amino-benzaldehit eklendi ve çözüldü. Reaktif hazırlandıktan sonra 4°C ’de karanlıkta muhafaza edildi (24).

**Metil Kırmızısı Reaktifi:**

Koyu renkli bir cam şişede, 0.1 g metil kırmızısı 300 mL etil alkolde çözüldü ardından 200 mL distile su ilave edildi. Kullanılincaya kadar 4°C’de saklandı (24).

**% 40’lık KOH Çözeltisi:**

Çeker ocağın altında cam şişe, su-buz banyosu içinde iken 40 g KHO 100 mL’ye tamamlandı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi (24).

### **% 5'lık $\alpha$ -Naftol Çözeltisi:**

Koyu renkli bir cam şişede 5 g  $\alpha$ -Naftol 100 mL etil alkol içinde çözüldü ve kullanılıncaya kadar 4°C'de saklandı (24).

### **5.2.3. Atık Su Örneklerinin Toplanması ve Stoklanması**

Atık su örnekleri Haziran 2015'de Trabzon ilinin iki ayrı noktasından toplandı. Birinci örnek Pazarkapı Atık Su Ön Arıtma Tesisi, ikincisi ise Kemerkaya Mahallesi Maraş Caddesi Bahar Sokağı logar kapağında alındı. Pazarkapı Atık Su Deşarj Merkezinin Ortahisar Belediyesine ait birleştirilmiş ham kanalizasyon suyu ile yüzey suları, mutfak, endüstriyel ve oto yıkama sularını, Maraş Caddesi ve Bahar Sokak logarı da benzer şekilde ham kanalizasyon suyu, yüzey suları, mutfak, endüstriyel ve oto yıkama sularını içerdiği belirtildi.

Birinci örnekleme için kova bir ip ile ön arıtmanın birinci aşamasında toplanan atık suya batırılarak tek aşamada toplandı. Ardından toplanan atık su iki steril 1 L'lik etiketlenmiş polietilenli kaplara aktarıldı. Her kaba yaklaşık 800 mL hacminde atık su dolduruldu, kapağı sıkıca kapatıldı, %70 alkol ile silindi ve içinde buz bataryaları bulunan bir taşıma kabında laboratuvara taşındı.

İkinci örnekleme 1 metre derinlikteki logar kapağında saplı sürahi yardımı ile alındı. Ardından toplanan atık su iki steril 1 L'lik etiketlenmiş polietilenli kaplara aktarıldı. Her kaba yaklaşık 800 mL hacminde atık su dolduruldu, kapağı sıkıca kapatıldı, %70 alkol ile silindi ve laboratuvara taşındı.

Örnekler toplandıktan sonra ilk işlem olarak atık sulardan saklama yapıldı. Bu işlem için her bir atık su örneğinden 20 mL alınarak 50 mL falkon tüplerine dağıtıldı ve % 15 gliserol içinde -80°C'de stoklandı.

### **5.2.4. Atık Su Örneklerinden Total Aerobik Bakteri Sayımı**

Her bir atıksu örneğinden seri dilüsyonlar hazırlandı. Bu işlem için 9 mL steril PBS 15 mL'lik falkonlara aktarıldı. Sonra birinci tüpe 1 mL atık su ilave edildi ve vortex yapıldı, böylece  $10^{-1}$  dilüsyon hazırlandı. Bu yöntem ile  $10^{-7}$ 'ye kadar dilüsyonlar hazırlandı ve  $10^{-3}$ - $10^{-7}$  dilüsyonlardan ikişer adet TSA, EMB ve PCA besiyerlerine yayma ekim yöntemi ile ekim yapıldı. Kültürler 37°C'de 24 ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. Koloni sayımı 24. ve 48. saatte yapıldı (28).



### **5.2.5. Atık Su Örneklerinden Bakteri İzolasyonu ve Stoklanması**

Total aerobik bakteri sayımı yapılan agarlarda oluşan ve birbirinden farklı koloni morfolojisine sahip koloniler steril öze yardımı ile seçildi ve agar besiyerlerine tek koloni elde edilecek şekilde ekim yapıldı.

Saflaştırılan bakterilerden bir koloni 5 mL sıvı besiyerine alınarak (TSB, LB broth) bir gece çalkalayıcı su banyosunda 120 rpm'de üretildi. Sıvı besiyerinde üreyen bakteriler % 15 gliserol ile ikişer tüp olacak şekilde -80°C'de stoklandı.

### **5.2.6. Fajların Atık Sulardan Zenginleştirilmesi ve İzolasyonu**

Atık su örneklerindeki fajların zenginleştirilmesi amacıyla 125 mL atık su örneği 125 mL 2X sıvı besiyeri (TSB, LB broth) ile karıştırılarak 37°C'de 24 saat 150 rpm'de çalkalanarak su banyosunda inkübe edildi. Zenginleştirilen örnekler 2 defa 10 000 rpm'de 10 dakika çöktürülerek, supernatantı önce 0.45 µm ardından 0.20 µm filtreden geçirildi ve 4°C'de saklandı (29).

### **5.2.7. Litik Faj Enfeksiyonunun Yapılması**

Sıvı kültürde üretilen logaritmik fazın başında olan konak bakterilerden ( $OD_{600}=0.4$ ) 100 µL alındı ve 50°C'ye soğutulmuş yarı-katı agara (% 0.6) ilave edildi ve LB ve TSA agar bulunan plakların yüzeyine yayıldı. Agarın donmasını takiben 5 µL faj lizatı agar yüzeyine damlatıldı ve kuruması beklendi. Kültürler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı (30).

### **5.2.8. Fajların Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Stoklanması**

Saf faj elde etmek için, gözlenen litik plaklar öze ile petriden ayrıştırıldı ve faj tampon solüsyonuna [SM buffer; 100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 50 mM Tris-Cl (1M, pH 7.5), % 0.002 jelatin] aktarıldı. Bu amaçla tam plak enfeksiyonu yapıldı. Böylece sıvı kültürde üretilen konak bakteriler logaritmik fazın başında iken ( $OD_{600}=0.4$ ) 100 µL alındı ve 50°C'ye soğutulmuş yumuşak agara (% 0.6) ilave edildi. Ardından 100 µL faj lizatından alındı ve karışıma ilave edildi, vortex yapıldı ve temel agar (LB agar, TSA) plaklara dağıtıldı ve donması beklenildi. Ardından 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde duyarlı konaklar enfekte edilerek faj plaklarının oluşması sağlandı. Agar yüzeyinde faj plakları gözlenen agar plaklara 3 mL SM buffer ilave edildi ve orbital çalkalayıcıda 120 dak çalkalanarak fajların yumuşak agardan

ayrılmaları sağlandı. Agar yüzeyindeki sıvı ve yumuşak agar steril bir drigalski spatülü ile kazınarak 50 mL'lik falkon tüplere aktarıldı. Tüpler 10 000 rpm'de 10 dak santrifüj edildikten sonra supernatant önce 0.45 µm'lik sonra 0.22 µm'lik filtreden geçirildi. İzole edilen fajlar kullanılmaya kadar 4°C'de saklandı (30, 31).

Saflaştırılan faj lizatları % 50 gliserol ile karıştırıldı ve her birinden ikişer tüp -80°C'de stoklandı (32).

### **5.2.9. Faj Titresinin Belirlenmesi**

Faj lizatının titresinin belirlenmesi için damlatma yöntemi uygulandı. Bu amaçla faj lizatlarının SM buffer'de seri dilüsyonları hazırlandı. Faj lizatından 5 µL alındı ve bakteri içeren çift tabakalı besiyerinin yumuşak agar yüzeyine damlatıldı ve kuruması beklenildi. Ardından 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Oluşan faj plakları sayılarak mililitredeki faj partikül sayısı [plaque forming unit/ mililitre (PFU/mL)= agar besiyerindeki plak sayısı/ ekilen faj miktarı x dilüsyon miktarı] hesaplandı (30).

### **5.2.10. Fajların Konak Spektrumlarının Belirlenmesi**

İzole edilen fajların konak spektrumu belirlenmesi amacıyla, izole edilen faj lizatları duyarlı bakterilerin üzerine damlatıldı. Bu amaçla uygulanan yöntem 5.2.7. bölümde anlatılan şekilde yapıldı.

### **5.2.11. Bakteri Suşlarının Tanımlanması ve Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi**

Bakteriler izole edildikten sonra Gram reaksiyonu belirlendi. Böylece Gram negatif basiller manuel olarak biyokimyasal testler ile tanımlandı. Ayrıca çalışmada faj duyarlı bakteri suşlarının tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları saptanması Farabi Hastanesi Mikrobiyoloji Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'nda yapıldı. Bu amaçla bakterilerin tanımlanması MALDI-TOF cihazı ve antibiyotik duyarlılıkların profillerinin belirlenmesi için Phoenix™ 100 cihazında yapıldı.

#### **5.2.11.1. Oksidaz Testi**

Bu amaçla bir parça filtre kağıdının üstünde %1'lik kovaks ayraç damlatıldı. Kürdan yardımıyla bakteriden bir koloni alındı ve filtre kağıdına sürüldü. On saniye içerisinde kolonilerin temas ettiği noktada mor-mavi renk oluşumu oksidaz testi pozitif olarak kabul edildi.

Bu testin kontrolü olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (oksidaz pozitif) ve *Escherichia coli* ATCC 25922 (oksidaz negatif) kullanıldı (24).

#### **5.2.11.2. Oksidasyon-Fermentasyon (OF) Testi**

Gram negatif bakterilerin glukozu oksidasyon veya fermentasyon yoluyla kullanıp kullanmadığı incelenir. Bu testin yapılması için OF besiyerinden 2 tüp olması gerekir. Her iki tüpe öze yardımıyla hedeflenen bakteriden tüpün dibine kadar ekim yapıldı. Ardından fermentasyonu gerçekleştirmek amacıyla bir tüpün besiyerin üstüne yaklaşık 1 cm steril mineral yağ koyuldu. Tüpler 37°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı. Eğer tüplerde besiyerinin rengi sarıya dönüşürse pozitif olarak kabul edildi. Bu testin kontrolü olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 (oksidatif), *E. coli* ATCC 25922 (fermentatif) ve *Acinetobacter lwoffii* (nonoksidatif) kullanıldı (24).

#### **5.2.11.3. Indol-Hareket Testi**

Gram negatif basiller indolü triptofanaz enzimi aracılığıyla triptofana dönüştürürler. Aynı anda hedef bakterinin hareketli olup olmadığı incelenir. Tüpte hazırlanmış besiyerine öze yardımıyla dikey biçimde dibe kadar ekim yapıldı, ardından tüpler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra tüp incelendi, eğer bulanıklık varsa hareket pozitif, sadece öze yolunda üreme varsa hareket negatif olarak karar verildi. Hareket testi incelendikten sonra indol testi incelendi. Tüpün kenarından 0.5 mL kovacs reaktifi ilave edildi. Kırmızı halka oluşursa sonuç pozitif, oluşmazsa negatif olarak saptandı. Bu teste pozitif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922, negatif kontrol olarak *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 kullanıldı (24).

#### **5.2.11.4. Simmons Sitrat Testi**

Bu teste karbon (enerji) kaynağı olarak sadece sitrat mevcuttur. Bakterilerin sitrat kullanma yeteneği ölçülür. Hazırlanmış besiyerlerin üstünde çizgi ekim yapıldı ve 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Besiyerinin rengi yeşilden maviye değişirse pozitif olarak kabul edildi. Bu teste negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922, pozitif kontrol olarak *K. pneumoniae* ATCC 13883 kullanıldı (24).

#### **5.2.11.5. Üreaz Testi**

Bu testte bakterilerin üreyi, üreaz enzimi aracılığıyla hidroliz etme yeteneği belirlenir. Ependorf tüplerinde hazırlanmış testlere öze yardımıyla taze kültürden ekim

yapıldı ve 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Besiyerinin rengi pembeye dönüştüğünde pozitif, sarı kalırsa negatif olarak belirlendi. Bu teste negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922, pozitif kontrol olarak *Proteus mirabilis* ATCC 12453 kullanıldı (24).

#### **5.2.11.6. Metil Kırmızısı ve Voges-Proskauer (MR-VP) Testi**

MR-VP testleri, glukoz metabolizması temelinde testler olduğu için aynı besiyeri kullanılarak gerçekleştirilir. Genellikle bu testlerin sonuçları birbirine zıt oldukları için sadece bir test yapılabilir.

Glukoz fosfatlı besiyerine ekilen bakteri eğer glukozu kullanırsa fermentasyon son ürünleri olarak karışık asit meydana gelir bu nedenle inkübasyon sonunda metil kırmızısı damlatıldığında besiyerinin rengi kırmızıya dönüşür yani pozitif olarak kabul edilir.

Glukoz fosfatlı besiyerine ekilen bakteri eğer glukozu kullanırsa fermentasyon sonucunda asetil metil karbonil oluşursa inkübasyon sonunda %5'lik alfa-naftol ve %40'luk KOH ilavesinde besiyerinin rengi kırmızıya dönüşür yani pozitif olarak kabul edilir.

Ependorf tüplerinde hazırlanmış testlere her bakteri için 2 test yapıldı. Öze yardımıyla taze kültürden ekim yapıldı ve 48 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 2 damla metil kırmızısı MR testine ilave edildi renk değişikliği görüldüğünde pozitif olarak kabul edildi. VP testi ise 6 damla % 5'lik alfa-naftol ardından 2 damla % 40'luk KOH damlatıldı, 30 dak içinde yüzeyde kırmızı-pembe oluşursa pozitif olarak kabul edildi. Bu deneyde *E. coli* ATCC 25922 MR-VP sonucu pozitif-negatif, *K. pneumoniae* ATCC 13883 MR-VP sonucu negatif-pozitif olduğu için kontrol amaçlı kullanıldı (24).

#### **5.2.11.7. TSI (Triple Sugar Iron agar)**

Gram negatif bakterilerin ilk tanımlama aşamalarından biridir. Bu besiyerinde bakteriler şekerlerin kullanma özelliğini, gaz ve H<sub>2</sub>S oluşumu göstermektedir. Hazırlanmış besiyerine öze yardımıyla taban ve dip kısmına ekim yapıldı ve 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüpler incelendi.

Asit (A) oluşumunda besiyeri sarı renge dönüşür, alkali (K) olursa besiyeri kırmızı renge dönüşür, H<sub>2</sub>S üretimi olursa siyah renk oluşur, gaz üretimi olursa agarda hava kabarcıkları gözlenir. Kontrol amaçlı *E. coli* ATCC 25922 A/A, gaz pozitif, H<sub>2</sub>S negatiftir; *P. aeruginosa* ATCC 27853 K/K, gaz negatif, H<sub>2</sub>S negatif; *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 K/A gaz pozitif H<sub>2</sub>S pozitif olarak kullanıldı (24).

### 5.2.12. Fajların Morfolojik Karakterizasyonu

Damlatma yöntemi ile oluşturulan faj plağı 30 µL SM bufferde çözüldü. Hazırlanan süspansiyondan 5 µL alınarak karbon kaplı formvar film gridine damlatıldı, iki dakika bekletildi ve süre sonunda filtre kağıdı ile toplandı. Sonra iki defa 5 µL enjeksiyon suyu ile 1 dak yıkandı ve ekstra su filtre kağıdı ile toplandı. Son olarak 10 µL, % 2'lik üranil asetat (pH 4-4.5) ile üç dak boyandı ve kurutuldu. Hazırlanan preparat 60 000-80 000 büyütmede, KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji bölümünde bulunan JEOL JEM-1010 geçirimli elektron mikroskobunda (TEM) görüntülendi ve fotoğrafı çekildi (31).

### 5.2.13. Faj DNA İzolasyonu

Yüksek titrasyon ( $\approx 10^9$ ) faj lizati hazırlandıktan sonra 500 µL bir ependorfa aktarıldı. Ardından 5 µL DNAaz ve 10 µL RNAaz ilave edildi ve 37°C'de 30 dak inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 12 000 rpm'de 5 dak santrifüj edildi. Supernatant yeni bir ependorfa aktarıldı. Süpernatantın üstüne eşit miktarda fenol.kloroform.izoamilalkol (25:24:1) ilave edildi. Ependorf 5 dak yavaşça alt-üst edildi. Süre sonunda 12 000 rpm'de 5 dak santrifüj edildi. Üstte oluşan tabaka yeni bir ependorfa aktarıldı, eşit miktarda kloroform izoamilalkol (24:1) ilave edildi ve yavaşça alt-üst edildikten sonra 5 dak oda sıcaklığında bırakıldı, ardından aynı koşullarda santrifüj edildi. Üst tabaka şeffaf olana kadar bu aşama tekrarlandı. Sonra iki kat hacimde % 96 alkol süpernatanta ilave edildi ve yine aynı koşullarda santrifüj edildi. Pelet üzerine eşit miktarda % 70 alkol ilave edildi, ardından 60°C etüvde 15 dak kurumaya bırakıldı. Son olarak 200 µL TE buffer ilave edildi. İzole edilen DNA % 0.8 agaroz jelde 50 voltta yürütüldü ve UV illüminatöründe görüntülendi (10, 25).

#### 5.2.14. Faj DNA Restriksiyon Enzim Analizi

İzole edilen DNA'ların büyüklüğünü saptamak için restriksiyon enzim analizi yapıldı. Bu çalışmada *AvaI*, *EcoRI*, *HindIII*, *BstEII*, *NcoI* ve *PstI* enzimleri kullanıldı. Toplam reaksiyon hacmi 10 µL'ye ayarlandı. Bu amaçla enzim, enzime özel buffer, DNA ve reaksiyonu tamamlama amacıyla deiyonize su kullanıldı. Buz ortamında sırayla DNA, su, 1 µL enzime özel buffer ve 0.5 µL enzim ilave edildi. Karışım hazırlandıktan sonra birkaç saniye santrifüj edilerek kesim için bir saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 2 µL yükleme tamponu ilave edildi ve 60°C'de 10 dak beklendi. Ardından % 1.5 agaroz jelde 2 saat 50 voltta yürütüldü ve UV altında görüntülendi (33).

#### 5.2.15. Faj Litik Enfeksiyon Siklusu

Faj üremesinin izlenmesi, litik faj sentezi ve bu siklus sonucu meydana gelen faj sayısı (burst size) analizinde tek basamaklı üreme (one step growth curve) kullanıldı. Bu amaçla bir gecelik sıvı bakteri kültüründen 100 µL alındı, 5 mL MHB besiyerine ilave edildi ve log fazın başına gelene kadar beklenildi. Enfeksiyon sıklığı (Multiplicity of Infection= MOI) faj/bakteri oranı 0.1 olacak şekilde hazırlandı. Faj ve bakteri karışımı son hacim 1 mL olacak şekilde hazırlandı ve 15 dak inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda absorbe olmayan fajları uzaklaştırma amacıyla 5 000 rpm'de 5 dak santrifüj edildi. Pelet 1 mL MHB'ta çözüldü, vortexlendi ve 9 mL MHB besiyerine aktarıldı. İnkübasyon 180 rpm'de 37°C'de çalkalayıcı inkübasyonda gerçekleştirildi. Bu aşama dahil her 15 dakikada bir 100 µL bakteri-faj karışımından alındı, SM bufferde seri dilüsyonlar yapıldı ve çift tabakalı agar yöntemi ile ekim gerçekleştirildi. Petri plakları 18 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda oluşan faj plakları sayıldı ve her zaman biriminde, faj titrasyonu PFU/mL cinsinden hesaplandı.

Sonuçlar bir grafik üzerinde yerleştirildi ve fajın çoğalma siklusu grafiğe çizildi, burst size belirlemek için bir enfeksiyon siklusu sonucu oluşan faj sayısı enfeksiyon siklusu başındaki faj miktarına bölünerek elde edildi (13).

## 6. BULGULAR

### 6.1. Atık Su Örneklerinden Total Aerobik Bakteri Sayımı

Atık sular dâseri dilüsyonlar hazırlanarak EMB, TSA ve PCA besiyerlerine yayma ekimler yapılarak 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Koloni sayımı 24. ve 48. saate yapıldı. Koloni sayısı için 25-250 arası olan kültürler değerlendirildi (Tablo 3). Örnek 1 Pazarkapı, Atık Su Desarj Merkezi’nden (Ortahisar Belediyesine ait birleştirilmiş ham kanalizasyon suyu, yüzey suları, mutfak, endüstriyel, oto yıkama, vs.) örnek iki ise Maraş Caddesi ve Bahar Sokak, logar suyundan (ham kanalizasyon suyu, yüzey suları, mutfak, endüstriyel, oto yıkama, vs.) toplandı.

**Tablo 3.** Atık su örneklerindeki total aerobik bakteri sayımı

Besiyeri ve örnekler	Bakteri sayısı (CFU/mL)	
EMB	24. saat	48. saat
Örnek 1*	3.3 x10 <sup>6</sup>	SKÇ
Örnek 2**	2.7 x10 <sup>6</sup>	3.4 x10 <sup>6</sup>
TSA		
Örnek 1*	3.9 x10 <sup>6</sup>	4.4 x10 <sup>6</sup>
Örnek 2**	7.8 x10 <sup>6</sup>	8.7x10 <sup>6</sup>
PCA		
Örnek 1*	Y	7.4 x10 <sup>6</sup>
Örnek 2**	Y	1.3 x10 <sup>6</sup>

\*Örnek 1; Pazarkapı Atık Su Desarj Merkezi, \*\*Örnek 2; Maraş Caddesi ve Bahar Sokak logari SKÇ; sayılmayacak kadar çok, Y;sayım yapılmadı.

### 6.2. Atık Su Örneklerinden Bakteri İzolasyonu

Göz kararıyla birbirinden farklı koloni morfolojisine sahip olan koloniler seçildi, saflaştırıldı ve Gram boyaması yapıldı. Toplam 86 bakteri izole edildi. Bunlardan 68 tanesi Gram negatif basil olarak tanımlandı. İzole edilen bakteriler 3 mL LB sıvı besiyerinde bir gece 37°C’de 24 saat inkübasyon süresi sonunda %15 gliserol içinde ile -80°C’de saklandı.

### 6.3. Bakteri Suşlarının Tanımlanması, Faj Duyarlılıklarının ve Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

İzole edilen 68 Gram negatif basil, konvansiyonel yöntemler ile tanımlandı ve gruplandırıldı (Tablo 5). Hazırlanan lizatlar kullanılarak damlatma yöntemi ile Gram negatif bakteriler ile enfeksiyon yapıldı (Tablo 4). Faj enfeksiyonlarına duyarlı bakteri suşlarının tanımlanması otomatize MALDI-TOF cihazı ile yapıldı ve antibiyotik duyarlılıkları Phoenix™ 100 cihazı ile saptandı (Tablo 6).

**Tablo 4.** İzole edilen Gram negatif basillerin biyokimyasal test yöntemleri ile tanımlanmaları ve faj duyarlılıkları

Suş Sıra No	Suş Kodu	Morfoloji	Oksidaz	Laktöz	Oksidasyon Fermentasyon	Hareket	İndol	Sitrat	Üreaz	MR	VP	Glukoz	Laktöz/Sukroz	H <sub>2</sub> S	Gaz	Geçici Tanımlama	Faj Duyarlığı
1	TATE 15	Basil	+	Y	O	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+
2	TATE 27	Basil	+	Y	O	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+
3	SSN 25	Basil	+	Y	O	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-		-
4	SSN 26	Basil	+	Y	O	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-		-
5	TATE 20	Basil	+	Y	O	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-		+
6	TATE 25	Basil	+	Y	O	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-		-
7	TATE 01	Basil	+	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
8	MA-1-04	Basil	+	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
9	TATE 12	Basil	+	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
10	TATE 13	Basil	+	Y	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas spp.</i>	+
11	TATE 10	Basil	+	Y	O	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-		-
12	MA-1-01	Basil	+	Y	O	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-		-
13	SSN 10	Basil	+	Y	O	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-		-
14	TATE 11	Basil	+	Y	O	-	-	+	-	Y	Y	+	-	-	-		-
15	TATE 18	Basil	+	Y	O	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-		-
16	TATE 14	Basil	+	Y	O	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-		-
17	SSN 05	Basil	+	Y	O	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-		-
18	TATE 23	Basil	+	Y	O	-	-	+	±	-	-	+	-	-	-		+
19	TATE 28	Basil	+	Y	O	-	-	+	±	-	-	+	-	-	-		+
20	TATE 22	Basil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
21	TATE 26	Basil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	-
22	MA-2-05	Basil	-	-	-	-	Y	Y	-	Y	Y	-	-	-	-		-
23	TATE 30	Basil	-	-	-	-	-	+	-	+	Y	-	-	-	-		-
24	MA-1-03	Basil	-	-	Y	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-		-
25	MA-1-07	Basil	-	-	Y	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	<i>Acinetobacter baumannii, EO-5</i>	-
26	MA-1-08	Basil	-	-	Y	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-		-



**Tablo 4.** (Devam) İzole edilen Gram negatif basillerin biyokimyasal test yöntemleri ile tanımlanmaları ve faj duyarlılıkları

27	SSN 12	Kokobasil	-	+	O	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
28	SSN 15	Basil	+	Y	OF	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
29	SSN 17	Basil	+	Y	OF	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
30	MA-2-03	Basil	+	Y	OF	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
31	MA-1-02	Basil	+	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	TATE 06	Basil	+	Y	O	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
33	TATE 07	Kokobasil	+	Y	OF	-	+	-	-	±	-	+	-	-	-	-	-	-	-
34	TATE 16	Basil	+	Y	OF	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	SSN 04	Kokobasil	+	Y	OF	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
36	SSN 11	Kokobasil	-	+	OF	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
37	TATE 29	Kokobasil	-	+	OF	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
38	SSN 24	Basil	-	+	Y	-	+	-	-	Y	-	+	+	-	-	-	-	-	-
39	SSN 07	Kokobasil	-	+	Y	-	+	+	+	Y	+	+	+	+	+	+	+	+	-
40	SSN 18	Basil	-	+	Y	-	-	-	-	Y	-	+	+	-	-	-	-	-	-
41	SSN 03	Basil	-	+	OF	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
42	TATE 19	Basil	-	+	OF	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
43	SSN 16	Basil	-	+	OF	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
44	SSN 14	Basil	-	+	F	+	-	+	-	Y	-	+	+	-	-	-	-	-	+
45	MA-2-10	Basil	-	±	Y	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
46	SSN 13	Basil	-	+	F	+	-	+	+	Y	+	+	+	-	-	-	-	-	+
47	SSN 19	Kokobasil	-	-	O	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
48	TATE 8	Kokobasil	-	-	Y	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
49	SSN 23	Kokobasil	-	-	Y	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
50	SSN 09	Kokobasil	-	-	Y	+	-	-	+	Y	+	+	-	-	-	-	-	-	+
51	TATE 04	Kokobasil	-	-	Y	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
52	MA-2-08	Kokobasil	-	-	Y	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
53	TATE 03	Basil	-	+	Y	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
54	SSN 21	Basil	-	-	OF	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
55	SSN 06	Basil	-	+	Y	+	+	-	-	Y	-	+	+	-	-	-	-	-	+
56	SSN 22	Basil	-	+	OF	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
57	MA-2-02	Basil	-	+	Y	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
58	TATE 02	Basil	+	Y	-	-	-	+	-	Y	Y	-	-	-	-	-	-	-	-
59	TATE 05	Basil	+	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
60	MA-1-05	Basil	+	Y	-	-	-	-	-	Y	Y	-	-	-	-	-	-	-	-
61	TATE21	Basil	-	+	OF	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
62	MA-1-06	Basil	-	+	OF	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
63	MA-2-01	Basil	-	+	OF	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
64	TATE 17	Basil	+	Y	OF	-	-	+	-	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-
65	TATE 24	Basil	+	Y	OF	-	-	+	-	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-
66	SSN 20	Kokobasil	-	-	Y	-	-	+	+	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	TATE 31	Kokobasil	-	±	-	+	-	+	Y	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
68	SSN 01	Kokobasil	-	+	Y	+	-	+	-	Y	-	+	+	-	-	-	-	-	+

-; negatif, +; pozitif, ±;değişken, O; oksidatif, F; fermentative, OF; oksidatif-fermentatif, Y;yapılmadı

**Tablo 5.** Biyokimyasal testlere göre izole edilen türlerin dağılımı

<b>Sıra</b>	<b>İzole edilen Cinsler</b>	<b>İzolat sayısı</b>
<b>1</b>	<i>Pseudomonas</i> spp.	19
<b>2</b>	<i>Acinetobacter</i> spp.	8
<b>3</b>	<i>Aeromonas</i> spp.	8
<b>4</b>	<i>Klebsiella</i> spp.	6
<b>5</b>	<i>Enterobacter</i> spp.	5
<b>6</b>	<i>Proteus</i> spp.	4
<b>7</b>	<i>Serratia</i> spp.	4
<b>8</b>	<i>Escherichia</i> spp.	3
<b>9</b>	<i>Neisseria</i> spp.	3
<b>10</b>	<i>Providencia</i> spp.	3
<b>11</b>	<i>Pasteurella</i> spp.	2
<b>12</b>	<i>Bordetella</i> spp.	1
<b>13</b>	<i>Citrobacter</i> spp.	1
<b>14</b>	<i>Salmonella</i> spp.	1
<b>Toplam bakteri sayısı</b>		<b>68</b>

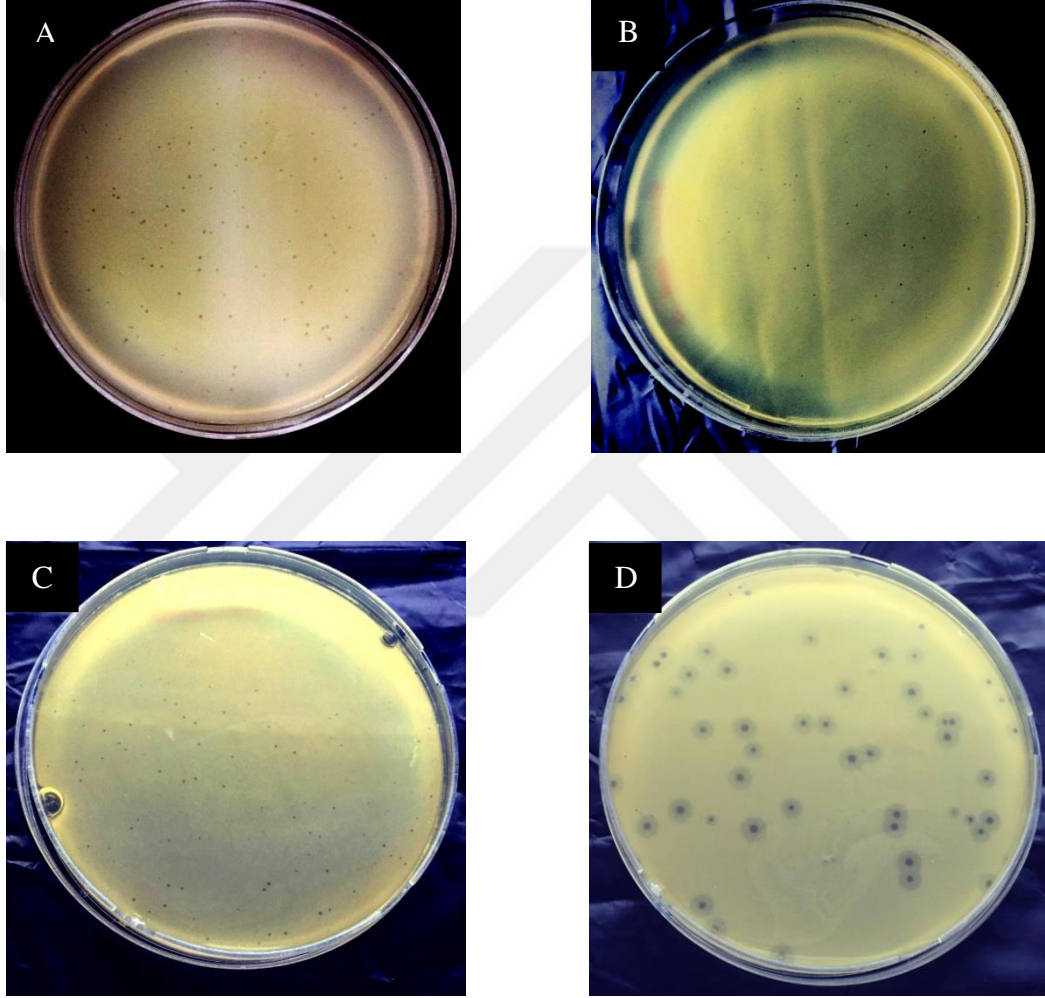
**Tablo 6.** Fajlara duyarlı bakterilerin otomatize sistemlerle tanımlanmaları ve antibiyotik duyarlılıkları

Suş Kodu	Tür	Test Edilen Antibiyotikler																	
		Amikacin	Amoxicillin/ Clavulanic Acid	Ampicillin	Aztreonam	Cefepime	Ceftazidime	Ceftaxone	Cefuroxime- Sodium	Ciprofloxacin	Colistin	Ertapenem	Gentamicin	Imipenem	Meropenem	Netilmicin	Piperacilin	Piperacillin/ Tazobactam	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol
SSN 03	<i>Enterobacter asburiae</i>	S	R	R	S	S	S	S	Y	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SSN 09	<i>Enterobacter asburiae</i>	S	R	R	S	S	S	Y	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S
SSN 21	<i>Enterobacter cloacae</i>	S	R	R	S	S	S	Y	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SSN 11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TATE 29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SSN 12	<i>Acinetobacter pittii</i>	S	Y	Y	Y	S	I	Y	Y	S	Y	S	S	S	S	Y	S	S	Y
SSN 14	<i>Citrobacter youngae</i>	S	R	R	S	S	S	Y	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SSN 16	<i>Citrobacter freundii</i>	S	R	R	S	S	S	Y	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TATE 19	<i>Citrobacter freundii</i>	S	R	R	S	S	S	Y	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
SSN 22	<i>Escherichia coli</i>	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R
TATE 13	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	I	Y	Y	R	R	S	Y	R	S	Y	R	S	S	R	S	S	S	Y
TATE 20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	Y	Y	I	S	S	Y	S	S	Y	S	S	S	S	S	S	S	Y
TATE 27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	Y	Y	I	S	S	Y	S	S	Y	S	S	S	S	S	S	S	Y
TATE 28	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	Y	Y	I	S	S	Y	S	S	Y	S	S	S	S	S	S	S	Y

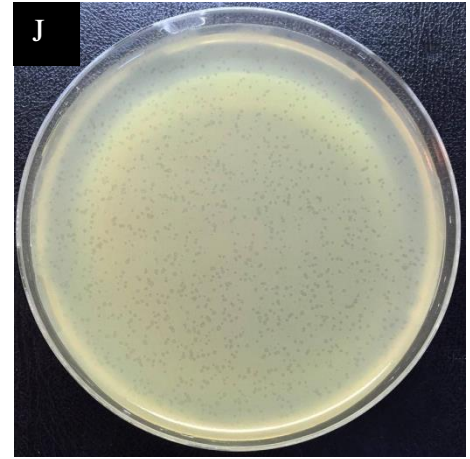
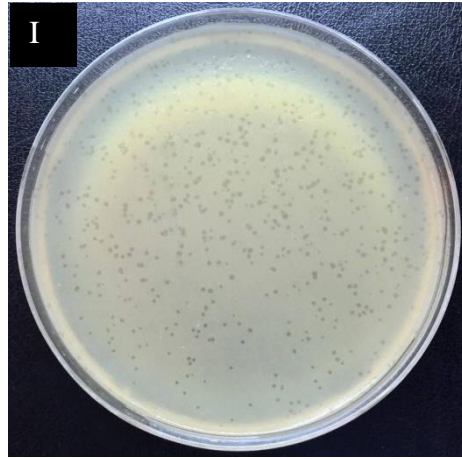
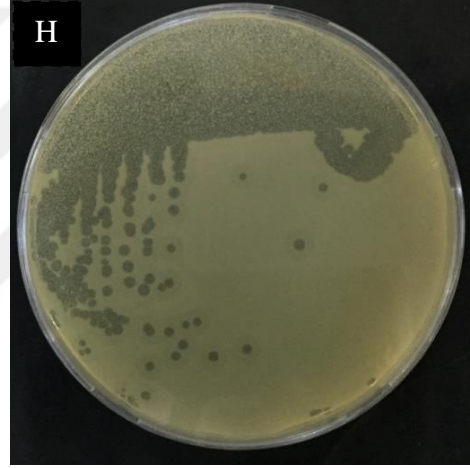
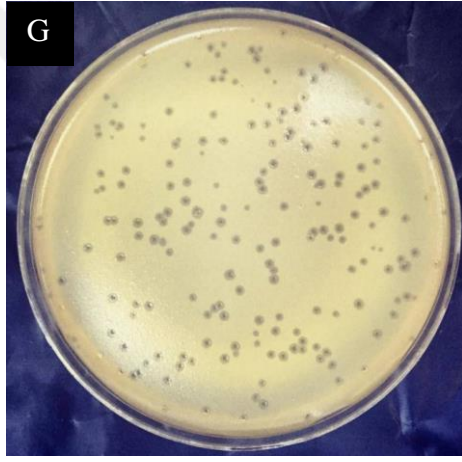
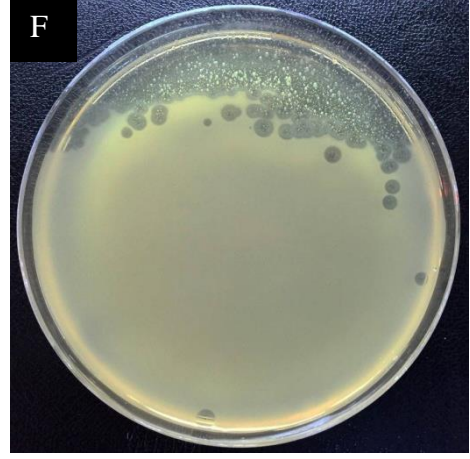
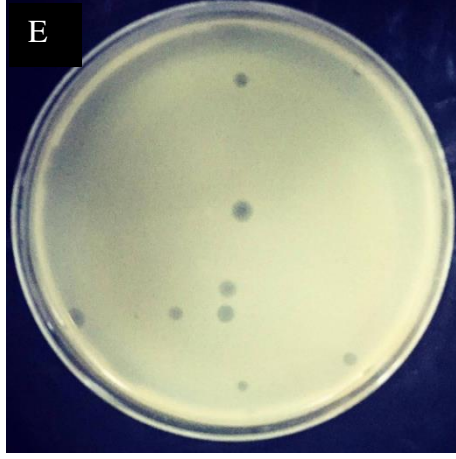
S; duyarlı (sensitive), R; dirençli (Resistant), I; ortaduyarlı (Intermediate), Y; test yapılmadı.

#### 6.4. Litik Faj Enfeksiyonunun Yapılması ve Fajların Saflaştırılması

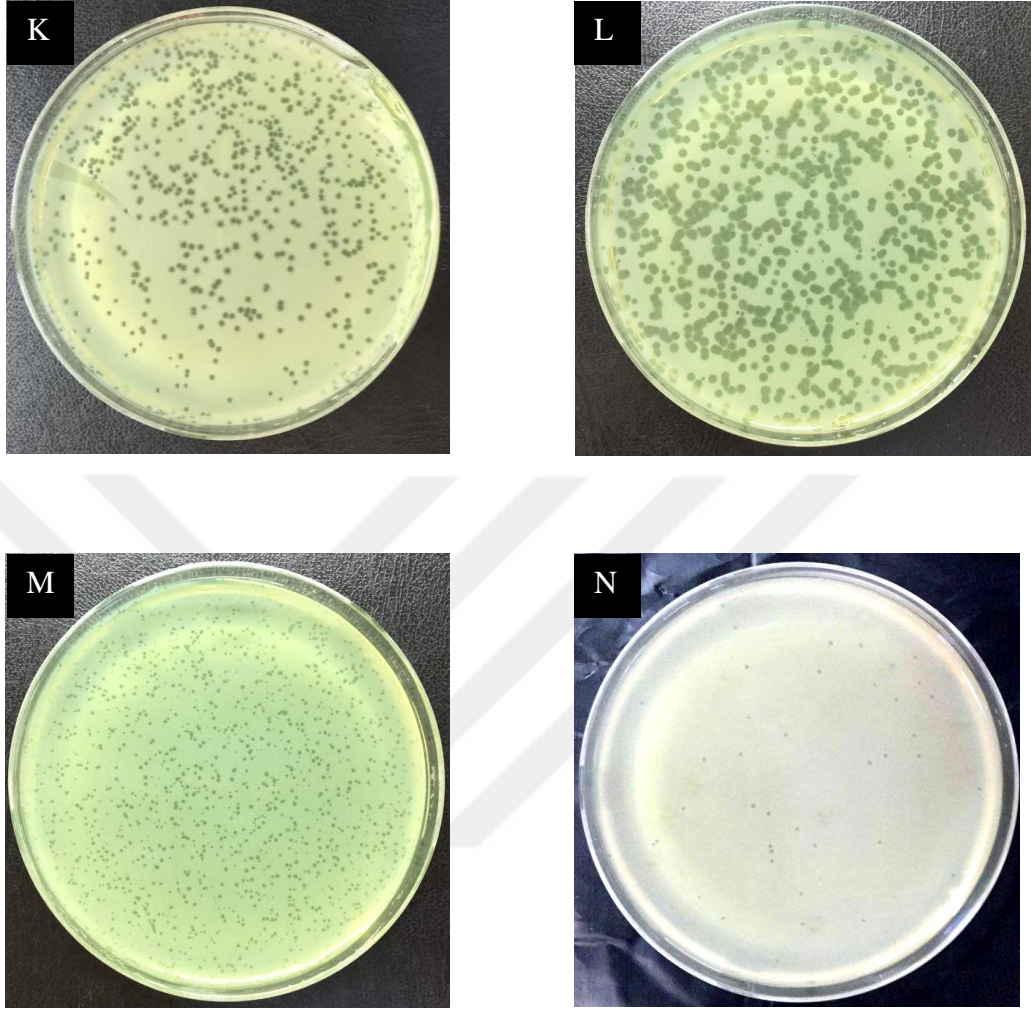
Faja duyarlı bakteriler saptandıktan sonra saf faj elde etmek için lizattan seri dilüsyon hazırlanarak tam plak enfeksiyonu yapıldı. Gözlenen farklı litik plaklar öze ile petriden ayrıştırıldı ve tekrar enfeksiyon yapıldı. Enfekte edilen 14 bakteri fajlara duyarlı olarak saptandı ve 14 faj izole edildi (Şekil 5). Faj lizatları 4°C'de saklandı.



Şekil 5. Fajların plak morfolojileri. A;  $\phi$ ssn 03, B;  $\phi$ ssn 09-a, C;  $\phi$ ssn 11, D;  $\phi$ ssn 12-a.



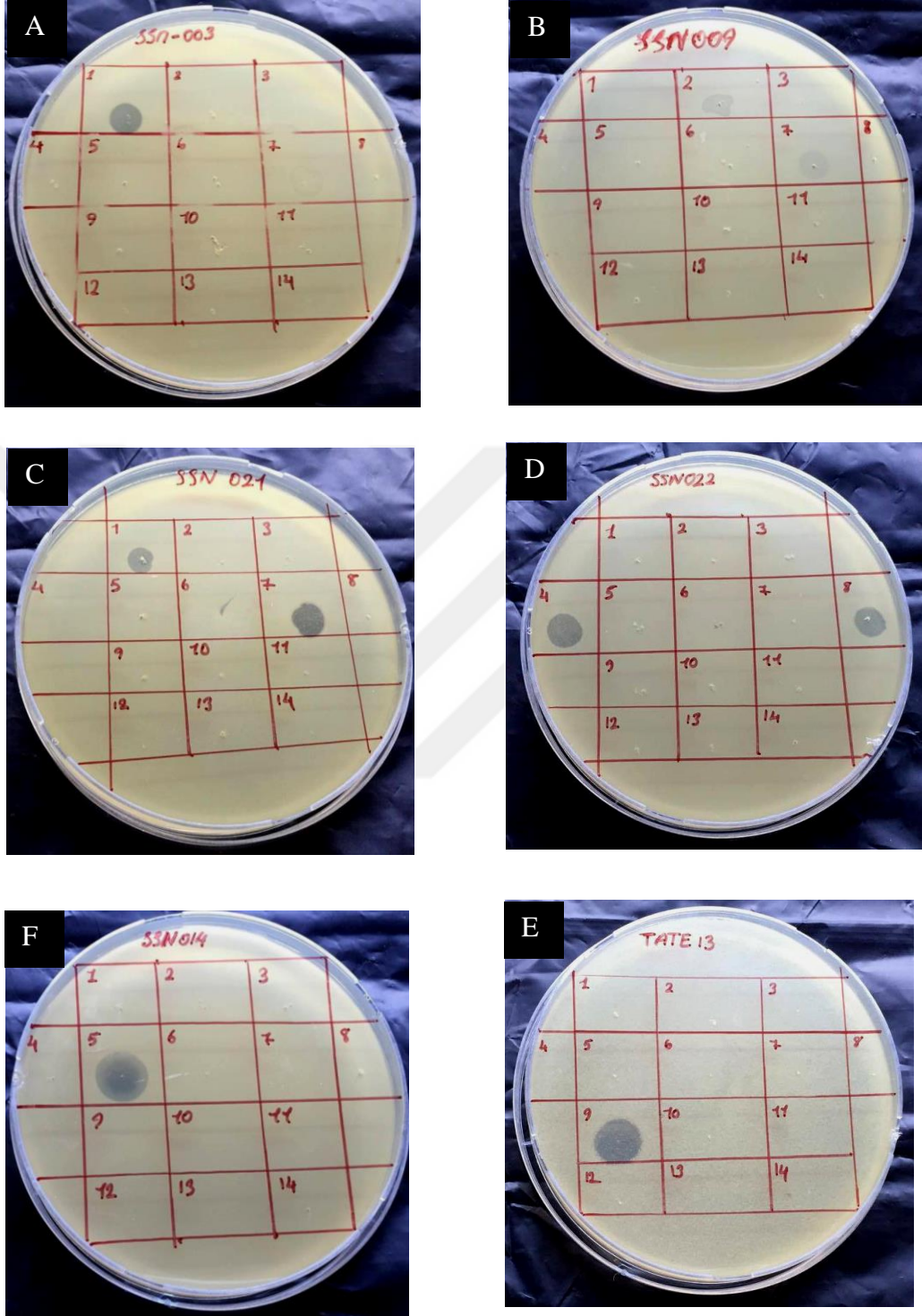
**Şekil 5.** (Devam) Fajların plak morfolojileri. E;  $\phi$ ssn 14-a, F;  $\phi$ ssn 16-a, G;  $\phi$ ssn 21, H;  $\phi$ ssn 22-a, I;  $\phi$ tate 13, J;  $\phi$ tate 19-a.



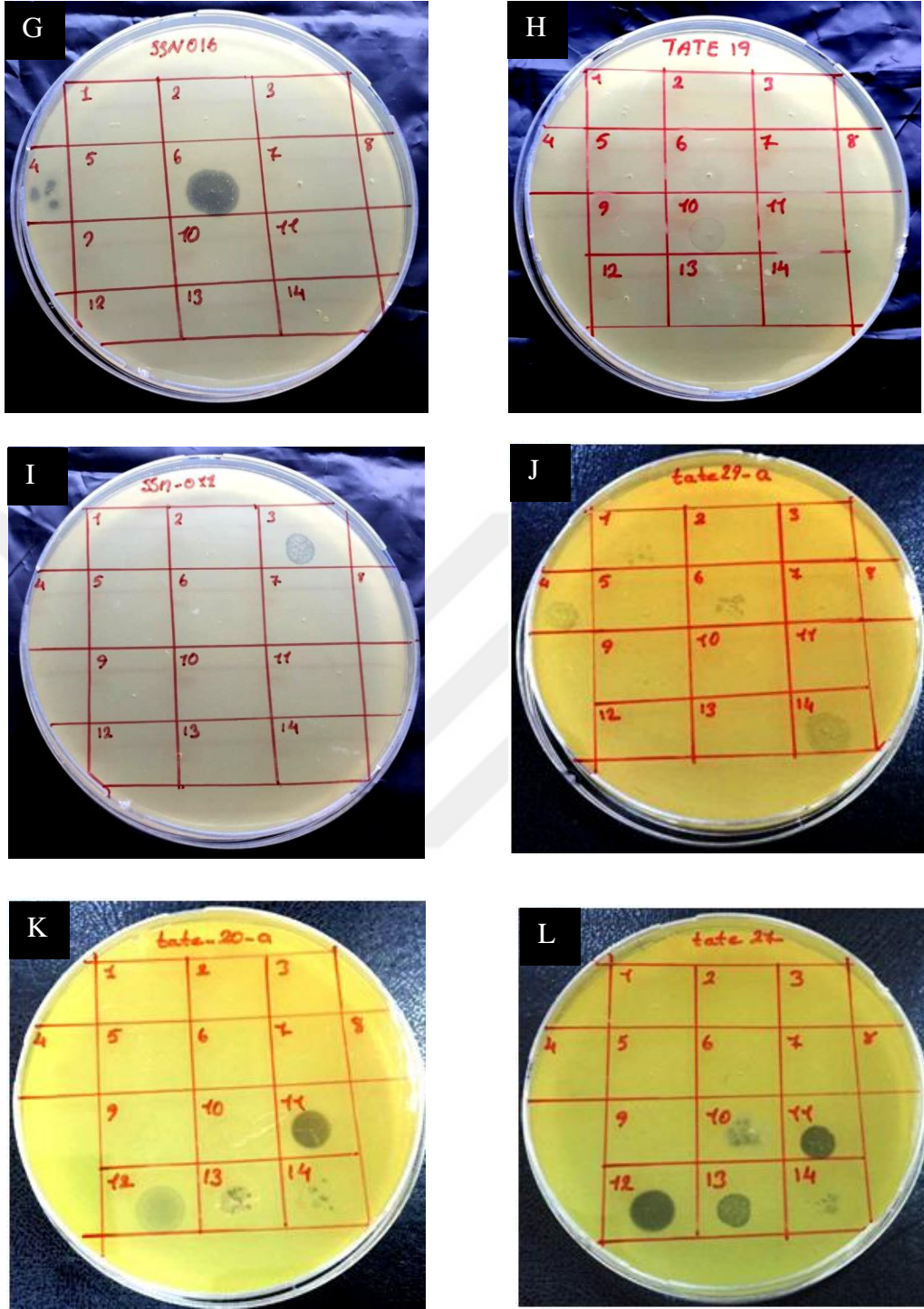
**Şekil 5.** (Devam) Fajların plak morfolojileri. K;  $\phi$ tate 20-a, L;  $\phi$ tate 27-a, M;  $\phi$ tate 28-a, N;  $\phi$ tate 29-a.

### 6.5. Fajların Konak Spektrumunun Belirlenmesi

Fajlar saflaştırıldıktan sonra elde edilen lizatlar ile her bir konağa 5  $\mu$ L lizattan damlatıldı. Litik enfeksiyona duyarlı olan ve faj lizatı damlatılan alanlarda inhibisyon zonu oluşturan konaklar saptanarak fajların konak spektrumları saptandı (Şekil 6). Fajların konak spektrumları Tablo 7’de özetlenmiştir.

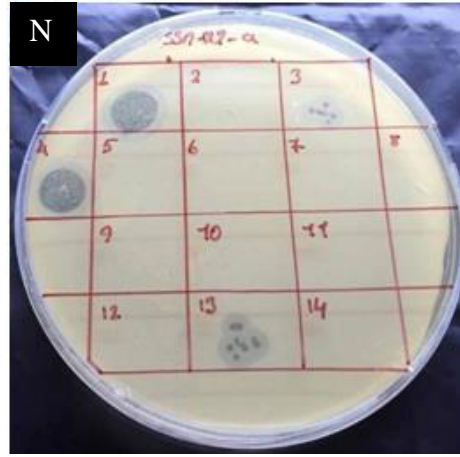
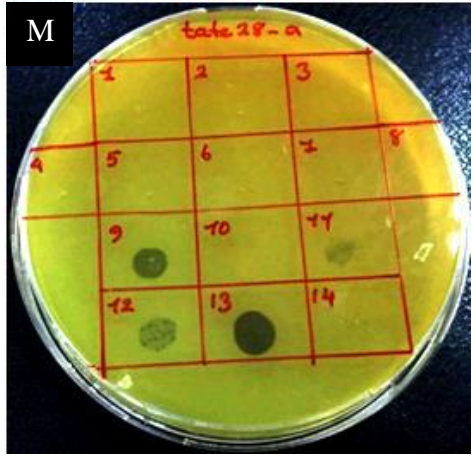


**Şekil 6.** Damlatma yöntemi ile konakların faj lizatları ile enfekte edilmesi. A; *E. asburiae* SSN 03, B; *E. asburiae* SSN 09, C; *E. cloacae* SSN 21, D; *E. coli* SSN 22, E; *A. xylooxidans* TATE 13, F; *C. youngae* SSN 14, 1;  $\phi$ ssn 03, 2;  $\phi$ ssn 09-a, 3;  $\phi$ ssn 11, 4;  $\phi$ ssn 12-a, 5;  $\phi$ ssn 14-a, 6;  $\phi$ ssn 16-a, 7;  $\phi$ ssn 21, 8;  $\phi$ ssn 22-a, 9;  $\phi$ tate 13, 10;  $\phi$ tate 19-a, 11;  $\phi$ tate 20-a, 12;  $\phi$ tate 27-a, 13;  $\phi$ tate 28-a, 14;  $\phi$ tate 29-a.



**Şekil 6.** (Devam) Damlatma yöntemi ile konakların faj lizatları ile enfekte edilmesi. G; *C. freundii* SSN 16, H; *C. freundii* SSN 19, I; *K. pneumoniae* SSN 11, J; *K. pneumoniae* TATE 29, K; *P. aeruginosa* TATE 20, L; *P. aeruginosa* TATE 27, 1;  $\phi$ ssn 03, 2;  $\phi$ ssn 09-a, 3;  $\phi$ ssn 11, 4;  $\phi$ ssn 12-a, 5;  $\phi$ ssn 14-a, 6;  $\phi$ ssn 16-a, 7;  $\phi$ ssn 21, 8;  $\phi$ ssn 22-a, 9;  $\phi$ tate 13, 10;  $\phi$ tate 19-a, 11;  $\phi$ tate 20-a, 12;  $\phi$ tate 27-a, 13;  $\phi$ tate 28-a, 14;  $\phi$ tate 29-a.





**Şekil 6.** (Devam) Damlatma yöntemi ile konakların faj lizatları ile enfekte edilmesi. M; *P. aeruginosa* TATE 28, N; *A. pittii* SSN 12, 1;  $\phi$ ssn 03, 2;  $\phi$ ssn 09-a, 3;  $\phi$ ssn 11, 4;  $\phi$ ssn 12-a, 5;  $\phi$ ssn 14-a, 6;  $\phi$ ssn 16-a, 7;  $\phi$ ssn 21, 8;  $\phi$ ssn 22-a, 9;  $\phi$ tate 13, 10;  $\phi$ tate 19-a, 11;  $\phi$ tate 20-a, 12;  $\phi$ tate 27-a, 13;  $\phi$ tate 28-a, 14;  $\phi$ tate 29-a.

**Tablo 7.** Fajların çapraz enfeksiyonu ve konak spektrumları

	<i>Enterobacter asburiae</i> SSN 03	<i>Enterobacter asburiae</i> SSN 09	<i>Enterobacter cloacae</i> SSN 21	<i>Klebsiella pneumoniae</i> SSN 11	<i>Klebsiella pneumoniae</i> TATE 29	<i>Acinetobacter pittii</i> SSN 12	<i>Citrobacter youngae</i> SSN 14	<i>Citrobacter freundii</i> SSN 16	<i>Citrobacter freundii</i> TATE 19	<i>Escherichia coli</i> SSN 22	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> TATE 13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TATE 20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TATE 27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TATE 28	Fajın enfekte ettiği konak sayısı
Faj															
φssn 03	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	4
φssn 09-a	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
φssn 11	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2
φssn 12-a	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	4
φssn 14-a	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
φssn 16-a	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	3
φssn 21	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
φssn 22-a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1
φtate 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	2
φtate 19-a	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	2
φtate 20-a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	4
φtate 27-a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	3
φtate 28-a	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	4
φtate 29-a	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	2
Faj duyarlı bakteri sayısı	1	2	2	1	4	4	1	2	2	2	1	3	5	4	

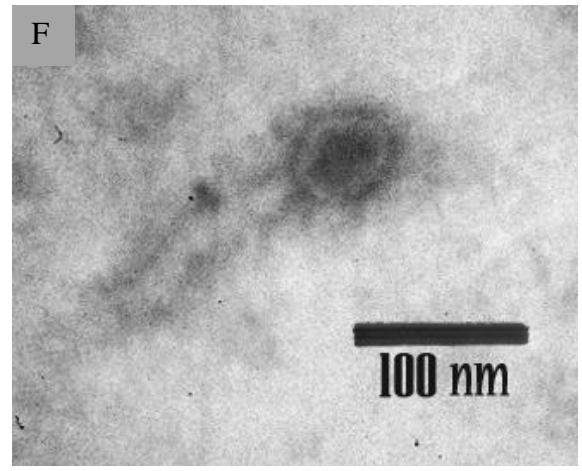
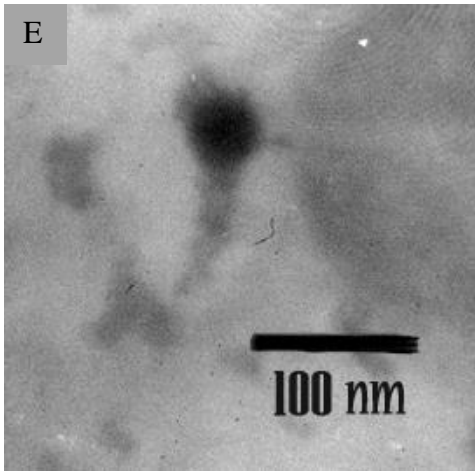
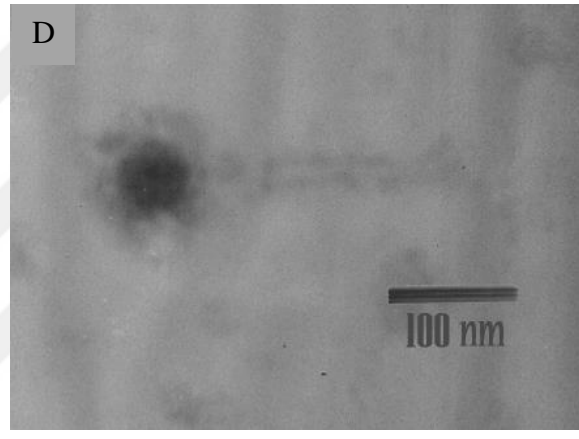
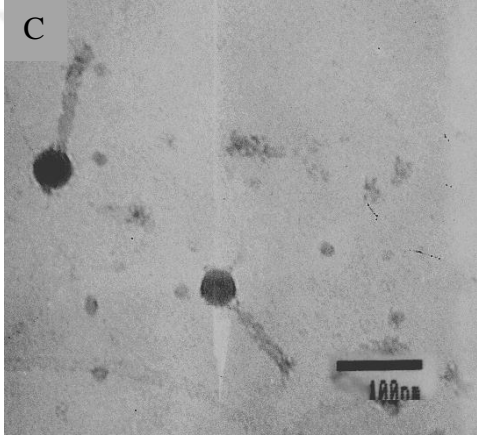
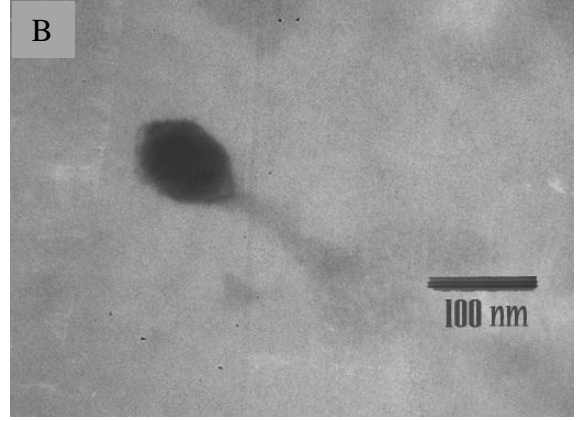
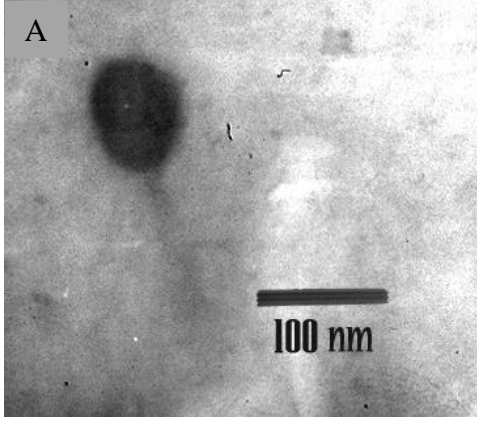
-; inhibisyon zonu yok, +; inhibisyon zonu var

## 6.6. Fajların Morfolojik Karakterizasyonu

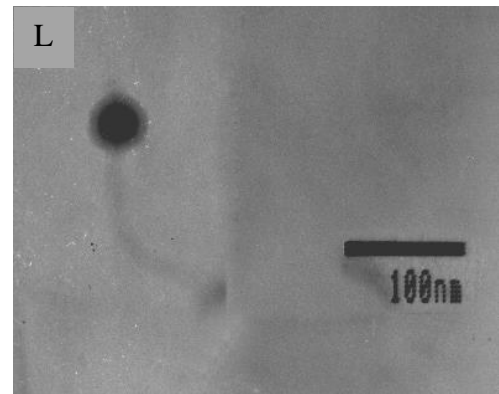
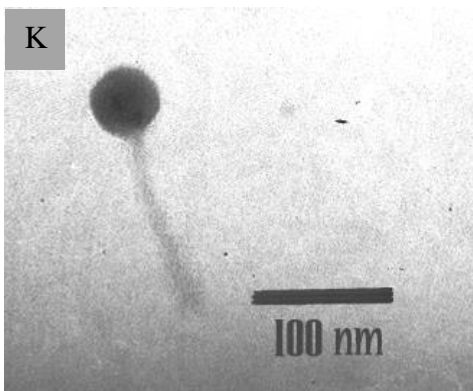
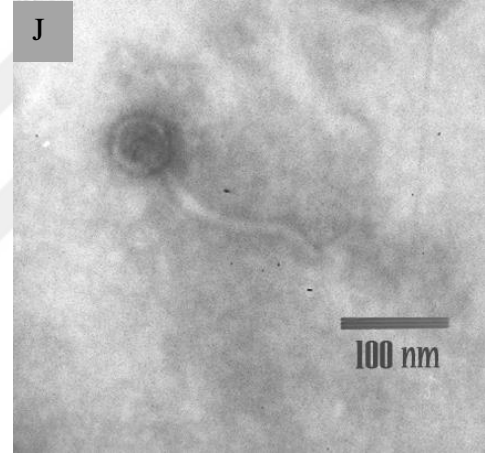
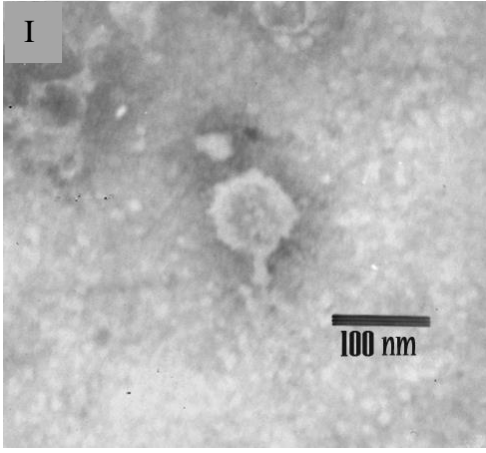
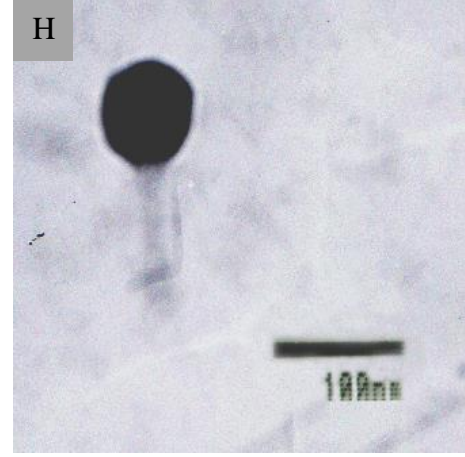
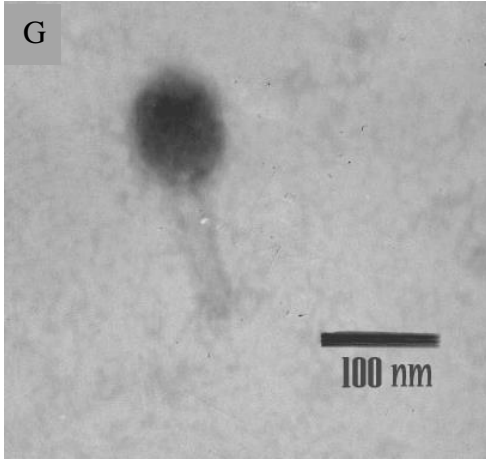
Fajlardan tam plak enfeksiyonu yaparak plak morfolojisi incelendi. Ayrıca fajlar morfolojik özelliklerine göre sınıflandırılmak amacıyla geçirimli elektron mikroskopunda (TEM) görüntülendi (Tablo 8 ve Şekil 7).

**Tablo 8.** Fajların morfolojik özellikleri

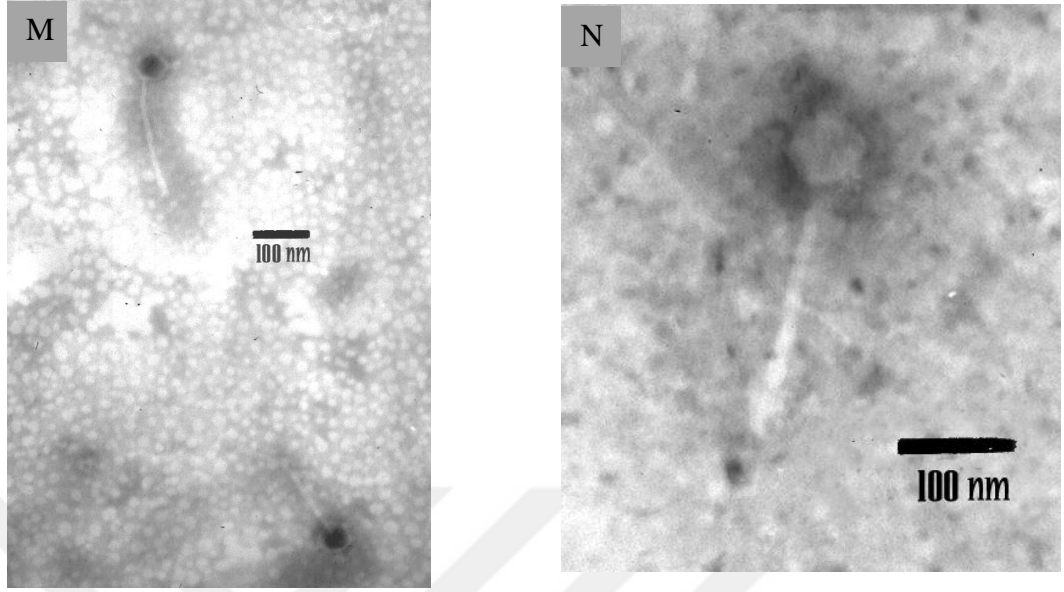
Faj Adı	Familya	Bradley Sınıfı	Baş Büyüklüğü (nm)	Kuyruk Uzunluğu (nm)
φssn 03	<i>Siphoviridae</i>	B	59 x 118	112
φssn 09-a	<i>Siphoviridae</i>	B	67 x 100	73
φssn 11	<i>Siphoviridae</i>	B	53 x 53	170
φssn 12-a	<i>Siphoviridae</i>	B	36 x 45	118
φssn 14-a	<i>Siphoviridae</i>	B	43 x 43	76
φssn 16-a	<i>Myoviridae</i>	A	69 x 100	100
φssn 21	<i>Myoviridae</i>	A	100 x 117	133
φssn 22-a	<i>Siphoviridae</i>	B	57 x 57	228
φtate 13	<i>Siphoviridae</i>	B	50 x 50	95
φtate 19-a	<i>Podoviridae</i>	C	92 x 84	31
φtate 20-a	<i>Siphoviridae</i>	B	50 x 50	128
φtate 27-a	<i>Siphoviridae</i>	B	50 x 50	168
φtate 28-a	<i>Siphoviridae</i>	B	58 x 64	186
φtate 29-a	<i>Siphoviridae</i>	B	69 x 69	223



**Şekil 7.** Fajların TEM görüntüleri. A;  $\phi$ ssn 03, B;  $\phi$ ssn 09-a, C;  $\phi$ ssn 12-a, D;  $\phi$ ssn 11, E;  $\phi$ ssn 14-a, F;  $\phi$ tate 13.



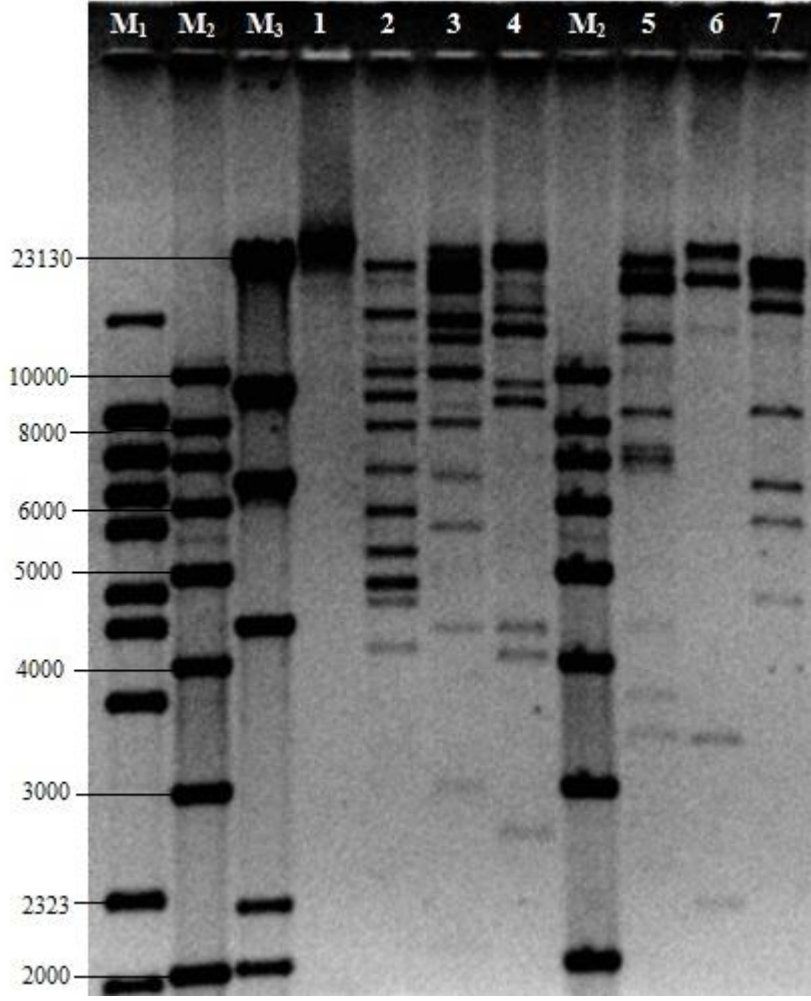
**Şekil 7.** (Devam) Fajların TEM görüntüleri. G;  $\phi$ ssn 16-a, H;  $\phi$ ssn 21, I;  $\phi$ tate 19-a, J;  $\phi$ tate 28-a, K;  $\phi$ tate 20-a, L;  $\phi$ tate 27-a.



Şekil 7. (Devam) Fajların TEM görüntüleri. M;  $\phi$ ssn 22-a, N;  $\phi$ tate 29-a.

### 6.7. Fajlardan DNA İzolasyonu ve Restriksiyon Enzim Analizi

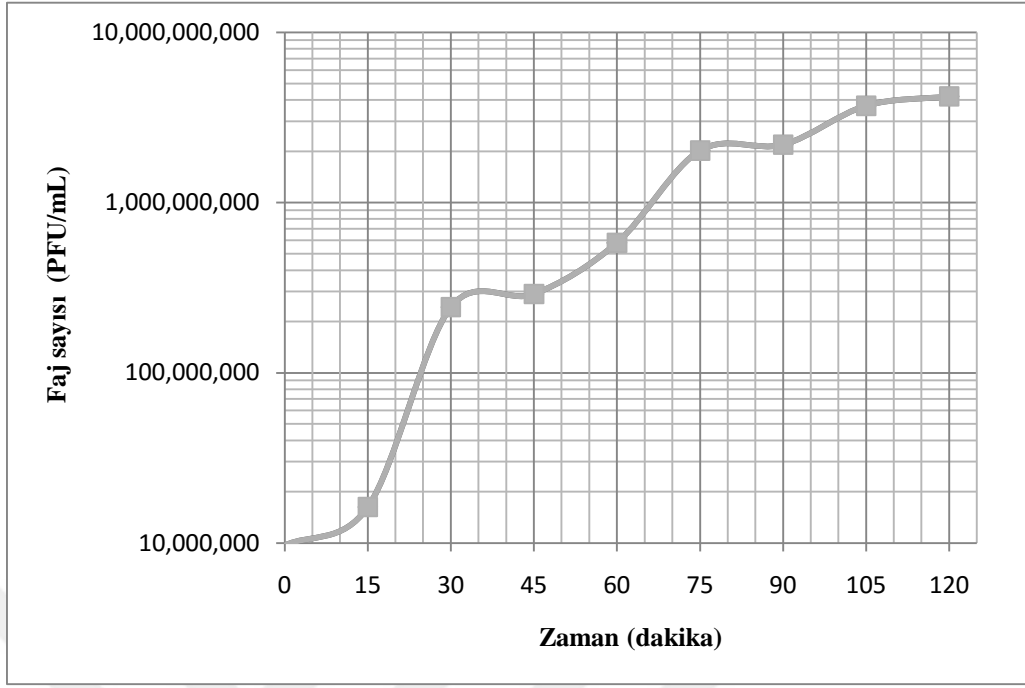
Faj lizatlarından, yüksek titrasyon lizat hazırlandıktan sonra fenol-kloroform yöntemi ile DNA izole edildi. İzole edilen DNA'lar çeşitli restriksiyon enzimi ile reaksiyona bırakıldı fakat konak hücrelerde DNA modifikasyonu yüksek olduğu için izole edilen DNA'lar kesilmedi. Bu sorunu çözebilmek için *E. coli* laboratuvar suşları 14 faj lizatı ile enfekte edildi. Sonuç olarak sadece *E. coli* C600, Faj  $\phi$ ssn 21'ya duyarlı saptandı. Bu suş ile yeniden enfeksiyon yapılarak yüksek titre faj lizatı hazırlandı ve bu lizattan DNA izole edildi. İzole edilen DNA, *AvaI*, *BstEII*, *EcoRI*, *HindIII*, *NcoI* ve *PstI* enzimleri ile kesildi. Marker olarak Lambda *HindIII*, Lambda *BstEII*, GelPilot 1kb ladder kullanıldı. Kesilen fragmanlar DNA markerleri ile karşılaştırarak DNA büyüklüğü yaklaşık 60 kilo baz çifti olarak saptandı (Şekil 8).



**Şekil 8.** Faj  $\phi$ ssn 21 DNA'sının restriksiyon enzim analizi. M<sub>1</sub>; Lamda *BstEII* marker, M<sub>2</sub>; GelPilot 1kb ladder marker, M<sub>3</sub>; Lambda *HindIII* marker, 1; kesilmemiş DNA, 2; *HindIII*, 3; *AvaI*, 4; *PstI*, 5; *EcoRI*, 6; *BstEII*, 7; *NcoI*.

### 6.8. Fajın Litik Enfeksiyon Siklusu

Faj  $\phi$ ssn 21'nin litik enfeksiyon siklusu incelendiğinde fajın absorpsiyon için gerekli zaman 10 dak (latent periyot), yükselme periyodu (burst time) 30 dak ve hücre başına üretilen faj partikül sayısı (burst size) 20PFU/mL olarak hesaplandı (Şekil 9).



Şekil 9. Faj φssn 21'nin litik enfeksiyon siklusu



## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Antibiyotiklerin keşfinden sonra faj terapisi ile ilgili çalışmalar azalmıştır. Yine de bu konuyla ilgili çalışmalar Sovyetler Birliği'nde devam etmiş ve günümüzde de Gürcistan'da varlığını devam ettirmektedir. Antibiyotiklerin keşfinden kısa bir süre sonra antibiyotiklere karşı dirençli bakteriler ortaya çıkmıştır. Bu nedenle dirençli bakterilere karşı yeni alternatif mücadele yöntemlerinin ortaya konulması önem arz etmektedir. Antibiyotiklerin keşfi sonrası geri plana atılan faj terapisi yeni yöntemler ve teknoloji ile birlikte yeniden gündeme gelmiş ve böylelikle faj çalışmaları ile ilgili araştırmalar artmaya başlamıştır (6, 34). Bu tez çalışmasında atık sulardan faj izolasyonu ve izole edilen fajların karakterize edilmesi amaçlandı. Böylece bir faj koleksiyonu oluşturarak ileri çalışmalara temel oluşturması esas alınmıştır.

Atık sular dinamik bir ekolojiye sahip oldukları için, litik fajların ve konaklarının izole edilebileceği en iyi kaynaklardır. Bu şekilde konak ile faj eş zamanlı izole edilmesi mümkün olmaktadır. Bu tez çalışmasında Haziran 2015 Trabzon ili, Pazarkapı Atık Su Ön Arıtma Tesisi ve Kemer kaya Mahallesi Maraş Caddesi Bahar Sokağı logar kapağından alınan örneklerden bakteri ve faj izolasyonu gerçekleştirildi. Atık sulardan bakteri izolasyonu ve total aerobik bakteri sayımı için üç farklı besiyeri (LB agar, EMB agar ve PCA) kullanıldı. İzole edilen bakteriler koloni morfolojisi ve Gram reaksiyonu yönünden incelendi. Çalışmaya sadece Gram negatif bakteriler dahil edildi. Gram negatif bakterilerin tanımlanmasında Bergey's bakteri tanımlama klavuzu esas alınarak biyokimyasal testler uygulandı (Bkz Tablo 4). Böylece 14 farklı cins (*Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Escherichia* spp., *Neisseria* spp., *Providencia* spp., *Pasteurella* spp., *Bordetella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp.) tespit edildi. *Pseudomonas* cinsi çevresel farklı yerleşimleri olan Gram negatif basil olduğu için en çok izole edilen bakteri oldu.

Bu tez çalışması bakteriyofaj izolasyonu odaklı olduğu için faja duyarlı olan bakteriler ayrıldı. Bu çalışmada toplam 14 faja duyarlı bakteri izole edildi. İzole edilen faja duyarlı bakterilerin tanımlanması Farabi Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarında otomatize MALDI-TOF cihazı ile yapıldı ve antibiyotik duyarlılıkları Phoenix™ 100 cihazı ile saptandı. *P. aeruginosa* türünden üç farklı suş, *E. asburiae*, *C. freundii* ve

*K. pneumonia* türlerinden iki farklı suş, *E. cloacae*, *A. pittii*, *C. youngae*, *E. coli*, *A. xylosoxidans* türlerinden ise tek bir suş izole edildi ve her birinin farklı faj duyarlılıkları tespit edildi. Konakların dirençlilik profilleri incelendiğinde; *P. aeruginosa* 12 antibiyotikten sadece aztreonama orta duyarlı, *K. pneumonia* 18 antibiyotikten sadece ampicilline dirençli, *A. xylosoxidans* 12 antibiyotikten sadece amikasin orta duyarlı iken aztreonam, cefepime, ciprofloxacın, gentamicin ve netilmicine dirençli, *A. pittii* 10 antibiyotikten sadece ceftazidime orta duyarlı, *E. coli* 18 antibiyotikten amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, piperacillin, piperacillin/tazobactam, trimethoprim/sulfamethoxazol dirençli, *Citrobacter* türü 17 antibiyotikten amoxicillin/clavulanic acid ve ampicilline dirençli iken *C. freundii* TATE 19 suşunun piperacilline de dirençli olduğu saptandı. *Enterobacter* türü 17 antibiyotikten amoxicillin/ clavulanic acid ve ampicilline dirençli fakat *E. asburiae* SSN 09 suşunun ek olarak piperacilline dirençli ve netilmicine orta duyarlı olduğu bulundu. Sundar ve ark.'ları (35) atık sulardan *E. coli*, *Salmonella typhi*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella sp.* ve *Shigella sp.* bakterilerini izole etmiş ve bu bakterilere karşı da özgün faj izole etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise atık sudan Tan ve ark.'ları (36) *E. coli* enfekte eden 8 farklı faj izole etmişlerdir. Beaudoin ve ark.'ları (29) atık sulardan izole ettikleri 12 Gram negatif basilden sadece bir tanesinin, izole ettikleri faja duyarlı olduğunu gözlemlemişlerdir. Faja duyarlı bu bakteriyi tanımlayarak *C. freundii* olduğunu belirlemişlerdir. Kumari ve ark.'ları (37) atık sulardan, *P. aeruginosa* PAO suşuna karşı 5 farklı faj izole etmişlerdir. He ve ark.'ları (38) hastane atık suyundan, *E. coli*, *C. freundii*, *E. cloacae* ve *Shigella sp.* suşlarına karşı faj izole etmişlerdir. Bu fajları *Salmonella* fajı ile karıştırarak *Enterobacteriaceae* ailesinin bakterilerini faj typing yöntemi ile tanımlamada kullanmışlardır.

Dar spektrumlu fajlar hedef bakterileri fazla olmadığından faj terapisi için uygun değildirler. Aynı türde veya birkaç cins bakteriyi enfekte eden fajlar, faj terapisi için hazırlanan faj kokteyli için daha uygundur (39). Bu tez çalışmasında izole edilen fajların konak spektrumunun belirlenmesi amacıyla faj lizatları ile izole edilen bakterilerle damlatma yöntemi ile enfeksiyon yapıldı.

Faj φssn 09-a, φssn 14-a ve φssn 22-a dar spektrumlu faj olarak saptandı ve sadece bir bakteri suşunu enfekte ettikleri tespit edildi. Bu fajlar sırasıyla *E. asburiae* SSN 09, *C. youngae* SSN 14 ve *E. coli* SSN 22 suşlarını enfekte etmişlerdir.

İki konağa enfekte edebilen fajlar ise, *K. pneumonia* SSN 11 ve *A. pittii* SSN 12 suşlarını enfekte eden φssn 11, *A. xylosoxidans* TATE 13 ve *P. aeruginosa* TATE 28 suşlarını enfekte eden φtate 13, *C. freundii* TATE 19 ve *P. aeruginosa* TATE 27 suşlarını enfekte eden φtate 19-a ve *K. pneumonia* TATE 29 ve *P. aeruginosa* TATE 27 suşlarını enfekte eden φtate 29-a fajları olarak belirlendi.

Üç konağa enfekte edebilen fajların ise, φssn 16-a, *K. pneumonia* TATE 29, *C. freundii* SSN 16 ve *C. freundii* TATE 19 suşlarını; φssn 21, *E. coli* C600, *E. cloacae* SSN 21 ve *E. asburiae* SSN 09 suşlarını ve φtate 27-a'nın üç *P. aeruginosa* türünü enfekte eden fajlar olduğu belirlendi.

Faj φssn 03, φssn 12-a, φtate 20-a ve φtate 28-a fajlarının geniş spektrumlu fajlar olduğu saptandı. Her biri 4 farklı konağı enfekte etmektedir. Faj φssn 03 *E. asburiae* SSN 03, *E. cloacae* SSN 21, *K. pneumonia* TATE 29 ve *A. pittii* SSN 12 suşlarını, φssn 12-a, *K. pneumonia* TATE 29, *A. pittii* SSN 12, *C. freundii* SSN 16 ve *E. coli* SSN 22 suşlarını enfekte etmektedir. Faj φtate 20-a ise *K. pneumonia* TATE 29 ve üç farklı *P. aeruginosa* suşlarını enfekte etmektedir. Faj φtate 28-a ise *A. pittii* SSN 12 ve üç farklı *P. aeruginosa* suşlarını enfekte etmektedir.

Jensen ve ark.'larının (40) yaptığı çalışmada atık sulardan izole ettikleri dört fajın, *Sphaerotilus natans* ATCC 13338, *P. aeruginosa* PAO303 ve *P. aeruginosa* OT684 suşlarını enfekte ettiğini ancak *E. coli* AB1157 suşunun dört faja da dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Malki ve ark.'ları (41), Michigan Gölünden izole ettikleri dört farklı fajın, *P. aeruginosa* ATCC 15692, *E. coli* ATCC 8739, *Arthrobacter* sp., *Chryseobacterium* sp. ve *Microbacterium* sp. enfekte ederek çok geniş spektrumlu fajlar olduklarını göstermişlerdir. Bielke ve ark.'ları (42), atık sudan izole ettikleri WHR fajının spektrumunu belirlemek için *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Kluyvera* ve *Salmonella* bakterileri konak olarak kullanmışlar ve izole ettikleri fajın bunlardan *Klebsiella oxytoca* ve sekiz farklı *Salmonella* türünü enfekte edebilmiştir. Pereira ve ark.'ları (43) Aveiro şehri atık su merkezinden üç farklı faj izole etmişlerdir. Bu fajlara karşı konak olarak önceden izole ettikleri *E. cloacae* suşunu kullanmışlardır. Bu fajların konak spektrumunu incelemek için 47 farklı tür üzerinde çalışmışlar ve izole ettikleri faj E-2'nin, *S. enteritidis* CVA, *E. coli* ATCC 13706, *E. coli* AN19, *E. coli* BM62, *Shigella flexneri* DSM 4782, *C. freundii* 6F, *C. freundii* 10I ve *Proteus mirabilis*

suşlarını enfekte ettiğini göstermişlerdir. E-3 fajı, *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. enteritidis* CVA, *S. enteritidis* CVE, *E. coli* AN19, *E. coli* AC5, *E. coli* AJ23, *S. flexneri* DSM 4782, *P. mirabilis* suşlarını enfekte edebilmiştir. E-4 fajı, *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. enteritidis* CVA, *E. coli* ATCC 13706, *E. coli* AN19 ve *S. flexneri* DSM 4782 suşlarını enfekte edebilmiştir.

Bir çalışmada fajları birbirinden ayırt etmek için morfolojik özelliklerinden yararlanıldı. Bunun için fajlar elektron mikroskobu ile analiz edildi. Böylece fajların kuyruklu, kuyuksuz, kasılabilen kuyruk, filamentöz faj tipi olduğu belirlendi. Fajların çoğunun *Sphoviridae* familyasında yer aldığı ve %96'sının kuyruğa sahip olduğu gözlemlendi (11). Bu tez çalışmasında da izole edilen 14 kuyruklu fajın, 11'i *Sphoviridae*, ikisi *Myoviridae* ve bir tanesi *Podoviridae* familyasına aittir. İzole edilen 14 fajın baş ve kuyruk büyüklükleri birbirinden farklıdır.

Faj φssn 03, *Siphoviridae* familyasına ait bir fajdır. Baş büyüklüğü 59 x 118 nm ve kuyruk uzunluğu 112 nm olarak saptandı. Bradley sınıflandırmasına göre B sınıfında yer almaktadır. Bu faj, *E. asburiae* SSN 03, *E. cloacae* SSN 21, *K. pneumonia* TATE 29 ve *A. pittii* SSN 12 suşlarını enfekte etmiştir.

Faj φssn 09-a, *Siphoviridae* familyasına ait bir fajdır. Baş büyüklüğü 67 x 100 nm ve kuyruk uzunluğu 73 nm olarak saptandı. Bradley sınıflandırmasına göre B sınıfında yer almaktadır. Bu faj sadece *E. asburiae* SSN 09 suşunu enfekte etmiştir.

Faj φssn 11, *Siphoviridae* familyasına ait bir fajdır. Baş büyüklüğü 53 nm ve kuyruk uzunluğu 170 nm olarak saptandı. Bradley sınıflandırmasına göre B sınıfında yer almaktadır. Bu faj *K. pneumonia* SSN 11 ve *A. pittii* SSN 12 suşlarını enfekte etmiştir.

Faj φssn 12-a, *Siphoviridae* familyasına ait bir fajdır. Baş büyüklüğü 36 x 45 nm ve kuyruk uzunluğu 118 nm olarak saptandı. Bradley sınıflandırmasına göre B sınıfında yer almaktadır. Bu faj *K. pneumonia* TATE 29, *A. pittii* SSN 12, *C. freundii* SSN 16 ve *E. coli* SSN 22 suşlarını enfekte etmiştir.

Faj φssn 14-a, *Siphoviridae* familyasına ait bir fajdır. Baş büyüklüğü 43 nm ve kuyruk uzunluğu 76 nm olarak saptandı. Bradley sınıflandırmasına göre B sınıfında yer almaktadır. Bu faj sadece *C. youngae* SSN 14 suşunu enfekte etmiştir.

Faj φssn 16-a, *Myoviridae* familyasına ait bir fajdır. Baş büyüklüğü 69 x 100 nm ve kuyruk uzunluğu 100 nm olarak saptandı. Bradly sınıflandırmasına göre A sınıfında yer almaktadır. Bu faj *K. pneumonia* TATE 29, *C. freundii* SSN 16 ve *C. freundii* TATE 19 suşlarını enfekte etmiştir.

Faj φssn 21, *Myoviridae* familyasına ait bir fajdır. Baş büyüklüğü 100 x 117 nm ve kuyruk uzunluğu 133 nm olarak saptandı. Bradly sınıflandırmasına göre A sınıfında yer almaktadır. Bu faj *E. coli* C600, *E. cloacae* SSN 21 ve *E. asburiae* SSN 09 suşlarını enfekte etmiştir.

Faj φssn 22-a, *Siphoviridae* familyasına ait bir fajdır. Baş büyüklüğü 57 nm ve kuyruk uzunluğu 228 nm olarak saptandı. Bradly sınıflandırmasına göre B sınıfında yer almaktadır. Bu faj sadece *E. coli* SSN 22 suşunu enfekte etmiştir.

Faj φtate 13, *Siphoviridae* familyasında yer almaktadır baş büyüklüğü 50 nm ve kuyruk uzunluğu ise 95 nm olarak saptandı. Bradly sınıflandırmasına göre B sınıfında yer almaktadır. Bu faj *A. xylosoxidans* TATE 13 ve *P. aeruginosa* TATE 28 suşlarını enfekte etmiştir.

Faj φtate 19-a, *Podoviridae* familyasına ait bir fajdır. Baş büyüklüğü 92 x 84 nm ve kuyruk uzunluğu 31 nm olarak saptandı. Bradly sınıflandırmasına göre C sınıfında yer almaktadır. Bu faj *C. freundii* TATE 19 ve *P. aeruginosa* TATE 27 suşlarını enfekte etmiştir.

Faj φtate 20-a, *Siphoviridae* familyasında yer almaktadır. Baş büyüklüğü 50 nm ve kuyruk uzunluğu ise 128 nm olarak saptandı. Bradly sınıflandırmasına göre B sınıfında yer almaktadır. Bu faj *K. pneumonia* TATE 29 ve izole edilen üç farklı *P. aeruginosa* türlerini enfekte etmiştir.

Faj φtate 27-a, *Siphoviridae* familyasında yer almaktadır. Baş büyüklüğü 50 nm ve kuyruk uzunluğu ise 168 nm olarak saptandı. Bradly sınıflandırmasına göre B sınıfında yer almaktadır. Bu faj izole edilen üç farklı *P. aeruginosa* türünü enfekte etmiştir.

Faj φtate 28-a, *Siphoviridae* familyasında yer almaktadır. Baş büyüklüğü 58 x 64 nm ve kuyruk uzunluğu ise 186 nm olarak saptandı. Bradly sınıflandırmasına göre B

sınıfında yer almaktadır. Bu faj *A. pittii* SSN 12 ve üç farklı *P. aeruginosa* türlerini enfekte etmiştir.

Faj Tate 29-a, *Siphoviridae* familyasında yer almaktadır. Baş büyüklüğü 69 nm ve kuyruk uzunluğu ise 223 nm olarak saptandı. Bradley sınıflandırmasına göre B sınıfında yer almaktadır. Bu faj, *K. pneumonia* TATE 29 ve *P. aeruginosa* TATE 27 suşlarını enfekte etmiştir.

Wittmann ve ark.'ları (44) *Achromobacter* türlerine karşı Almanya'nın farklı atık su kaynaklarından 35 faj izole etmişlerdir. Bunlardan 31'i farklı konak sepekturumu göstermiştir. Bu fajların, *Siphoviridae*, *Myoviridae* ve *Podoviridae* familyasına ait oldukları tespit edilmiştir. Bu fajların baş büyüklükleri 57 nm'den 135 nm'e kadar değişken, kuyruk uzunluğu ise 22 nm'den 303 nm'e kadar değişen uzunlukta saptanmıştır.

Zaika ve ark.'ları (45) atık sudan *E. aerogenes*'e karşı üç farklı faj izole etmişlerdir. Bunlardan N1 fajını *Siphoviridae*, N2 fajını *Myoviridae* familyasına dahil etmişlerdir. N4 fajını ise küresel kuyruksuz 46-48 nm olarak belirtmişlerdir.

Zhao ve ark.'ları (46) idrar örneğinden izole ettikleri *C. freundii* P10159 konak olarak kullanarak Tianjin şehrinin atık suyundan bu bakteriye karşı faj izole etmişlerdir. Bu faj *Podoviridae* familyasına ait bir fajdır. Baş büyüklüğü 50 nm ve kuyruk uzunluğu ise 12 nm olarak saptanmıştır. Bu faj 2 farklı *C. freundii* suşunu enfekte edebildiği tespit edilmiştir.

Loessner ve ark.'ları (47) çeşitli kaynaklardan izole ettikleri *E. cloacea* suşlarına karşı atık sulardan izole ettikleri 9 farklı fajı kullanmışlardır. Bu fajların, *Siphoviridae*, *Myoviridae* ve *Podoviridae* familyasında oldukları gösterilmiştir. Bu fajların baş büyüklükleri 65 nm'den 113 nm'e kadar değişken, kuyruk uzunluğu ise 12 nm'den 225 nm'e kadar değişen uzunlukta saptanmıştır.

Jin ve ark.'ları (48) *Acinetobacter baumannii*'e karşı izole ettikleri ZZ1 fajını karakterize etmişlerdir. Bu faj üç farklı *A. baumannii* suşunu enfekte etmiştir. Bu fajın 120 nm uzunluğunda kasılabilen kuyruğa sahip olduğu tespit edilmiş ve *Myoviridae* familyasında guruplandırılmıştır. Bu fajın DNA büyüklüğü 166 kbp olarak saptanmıştır.

Ceyssens (49) yaptığı tez çalışmasında farklı kaynaklardan izole ettiği bakteri ve fajları morfolojik açıdan incelerken, bu fajları *Siphoviridae*, *Myoviridae* ve *Podoviridae* familyasında olduklarını tespit etmişlerdir. İzole ettikleri 28 fajdan sadece 15 tanesinin morfolojik özellikleri belirlenmiştir. Bu fajların baş büyüklükleri 62 nm'den 76 nm'e kadar değişken, kuyruk uzunluğu ise 10 nm'den 210 nm'e kadar değişen uzunlukta saptanmıştır.

Szeloch ve ark.'ları (50) çeşitli su kaynaklarından 32 faj izole etmişlerdir. Bu fajların hepsi *K. pneumonia* türünü enfekte etmiştir. Bu fajlardan sekiz tanesi *Myoviridae*, 16 tanesi *Podoviridae* ve sekiz tanesi *Siphoviridae* familyasına ait oldukları saptanmıştır. İzole ettikleri *Myoviridae* familyasındaki fajların burst büyüklükleri yaklaşık 10-15 PFU/mL iken *Siphoviridae* ve *Podoviridae* familyasındaki fajların burst sızeleri 50-60 PFU/mL olarak saptanmıştır.

Mishra ve ark.'ları (51) atık sudan izole ettikleri F20 fajını *E. aerogenes* ATCC 13048'i enfekte ettiği belirtilmektedir. Bu faj 10 farklı bakteri cinsi üzerine enfeksiyon yapabildiği halde sadece *E. aerogenes* türünden 2 farklı suşu enfekte edebilmiştir. Bu faj *Siphoviridae* familyasına ait bir fajdır ve DNA büyüklüğü 51.5 kbp olarak hesaplanmıştır. Bu fajın latent dönemi 35 dak burst time'i 90 dak ve burst size'i 72 PFU/mL olarak bulunmuştur.

Başka bir çalışmada Fan ve ark.'ları (52) hastane atık suyundan izole ettikleri geniş spektrumlu faj E12P1, izole edilen 30 hastane *E. coli* suşundan 18 suşu enfekte etmiştir. Bu faj *Myoviridae* familyasına ait bir fajdır. Bu fajın latent periyodu 30 dak, burst time 20 dak ve burst size 43 PFU/mL olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada faj E12P1 DNA'sı *EcoR* I enzimi ile kesim reaksiyonuna bırakılmış fakat herhangi bir kesim elde edilememiştir ve DNA büyüklüğü tespit edilememiştir.

Letarova ve ark.'ları (53) yaptıkları çalışmada, *E. coli* C600 suşunu konak olarak kullanarak at dışkısından 9g fajını izole etmişlerdir. Bu faj *Siphoviridae* familyasına dahil edilmiştir ve baş büyüklüğü 62 × 76 nm, kuyruk büyüklüğü ise 185 nm olarak ölçülmüştür. Fajın DNA büyüklüğü 56.7 kbp olarak hesaplanmıştır. Bu fajın latent periyodu 90 dak ve burst size 400 PFU/mL olarak saptanmıştır.

Bu tez çalışmasında faj  $\phi$ ssn 21'nin DNA kesimi başarı ile yapıldığı için fajın litik enfeksiyon siklusu saptandı. Faj  $\phi$ ssn 21 latent periyodu 10 dak, burst zamanının 30 dak

ve burst büyüklüğü 20 PFU/mL olarak tespit edildi. DNA büyüklüğü yaklaşık 60 kbp olarak hesaplandı. Bu faj konak spektrumu olarak *E. coli* C600, *E. cloacae* ve izole edilen iki *E. asburiae* suşundan sadece bir tanesini enfekte edebilmiştir. Morfolojik incelemesinde bu fajın *Myoviridae* familyasına ait olduğu ve baş büyüklüğünün 100 x 117 nm, kuyruk büyüklüğü ise 133 nm olarak saptandı.

Bu çalışmada elde edilen bulgular literatürdeki benzer çalışmalarda rapor edilen litik faj türlerinin insidansı, konak spektrumu ve morfolojik özellikleri ile benzerlik göstermekle birlikte, genetik yapıları, konak spektrumları ve taşıdıkları genler yönünden farklı ve literatür için yeni fajlardır. Bu fajların genetik olarak karakterize edilerek moleküler biyolojide, gıda endüstrisinde ve faj terapi amaçlı kullanım potansiyellerininin araştırılması önem arz etmektedir.



## 8. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen TYL-2015-5287 sayılı BAP06 projesi desteği ile Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Bu proje kapsamında atık sulardan toplam 68 Gram negatif bakteri izole edilmiş ve bunlardan 14' nün aynı sulardan izole edilmiş fajlara duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Her bir bakterinin bir veya birden fazla faja duyarlılık gösterdiği saptanmıştır.
2. İzole edilen bakterilerin tanımlanması Farabi Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarında otomatize MALDI-TOF cihazı ile yapıldı ve antibiyotik duyarlılıkları Phoenix™ 100 cihazı ile saptandı. İzole edilen bakteriler *E. asburiae*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *A. pittii*, *C. youngae*, *C. freundii*, *E. coli*, *A. xylosoxidans* ve *P. aeruginosa* olarak tanımlandı. *P.aeruginosa* türünden üç farklı suş, *E. asburiae*, *C. freundii* ve *K. pneumonia* türlerinden iki farklı suş izole edildi ve her bir suşun farklı faj duyarlılığı göstermektedir. İzole edilen iki *E. asburiae* suşu netilmisine, izole edilen iki *C. freundii* suşu piperacillin/tazobactama karşı farklı duyarlık profili göstermiştir fakat iki *K. pneumoniae* ve üç *P.aeruginosa* türünde antibiyotik duyarlılıkları aynı olduğu için farklı suş oldukları bu yönüyle ispat edilemedi. Aynı türden olan bakterilerin farklı suş olduklarını göstermek için 16s rDNA dizi analizlerinin yapılması gerekmektedir.
3. İzole edilen bakterilere karşı toplam 14 faj izole edildi bu fajların konak spektrumunu belirlemek amacıyla izole edilen bakteriler konak olarak kullanıldı. İzole edilen fajların konak spektrumunu birbirinden farklı profil göstermektedir. Bazı fajlar sadece tek konağı enfekte ederken bazıları da iki, üç ve dört konağı enfekte etmektedir.
4. İzole edilen fajların birbirinden farklı olduklarını kanıtlamak amacıyla fajlar morfolojik yönüyle analiz edildi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında bulunan geçirimli elektron mikroskopta (TEM) fajlar görüntülendi. Bu fajlar Bradley sınıflandırmasına göre A, B ve C tiplerinde sınıflandırıldı. On bir faj *Sphoviridae*, iki faj *Myoviridae* ve bir faj *Podoviridae* familyasına ait oldukları görüldü.

5. Aynı familyada görüntülenen fajlar birbirinden farklı olduklarını kanıtlamak amacıyla restriksiyon enzim analizi yapıldı. Fakat fajlardan izole edilen DNA'lar yüksek bir düzeyde konakları tarafından modifiye edildikleri için çok sayıda restriksiyon enzimleri ile reaksiyona bırakıldığı halde kesim işlemi başarıyla gerçekleşmedi. Bu sorunu çözmek amacıyla DNA modifikasyonu geni mutasyona uğratılmış *E. coli* C600 laboratuvar şusu bu fajlar için konak olarak kullanıldı. Bunlardan sadece  $\phi$ ssn 21 fajı *E. coli* C600 'u basarili bir sekilde enfekte ederek yüksek titrasyonda faj partikülü oluşturdu. Faj DNA'sı izole edilerek *AvaI*, *BstEII*, *EcoRI*, *HindIII*, *NcoI* ve *PstI* enzimleri ile kesildi. Bu kesim sonucunda faj  $\phi$ ssn 21 genomunun çift zincirli, yaklaşık 60 kbp büyüklüğünde olduğu saptandı. Diğer fajların DNA büyüklüğü ve profilini açığa çıkartmak için DNA modifikasyonu yapmayan suşlar ile enfeksiyonunun yapılması ve ondan sonra restriksiyon enzim analizinin yapılması gerekmektedir.
6. Faj  $\phi$ ssn 21, *E. coli* C600, *E. cloacae* SSN 21 ve *E. asburiae* SSN 09 suşlarını enfekte eden geniş spektrumlu bir fajdır. Bu fajın spektrum genişliğini saptamak için *Enterobacter* ve *Escherichia* cinslerinin klinik suşları ile test edilmesi önerilmektedir.
7. Faj  $\phi$ ssn 21, morfolojik açıdan *Myoviridae* familyasında yer almaktadır. İkozohedral başı 100 x 117 nm büyüklüğünde ve kasılabilen kuyruğu 133 nm uzunluğundadır.
8. Faj  $\phi$ ssn 21'nin DNA profili belirlendiği için bu fajın litik enfeksiyon siklusu incelendi. Bu fajın latent periyodu 10 dak, burst time 30 dak ve burst size'ı 20 PFU/mL olarak saptandı. Hücre başına üretilen faj partikül sayısı enfekte ettiği farklı konaklarda da ölçülmesi önerilir. Konak değişikliği fajın litik enfeksiyon siklusu değerlerini değiştirebilir. Ayrıca fajların bakterileri parçalama zamanı (lysis time) kısa olduğunda burst buyuklukleri de düşük olabilir. Gallet ve ark.'ları yaptıkları çalışmada elde ettikleri en düşük burst size'ı yaklaşık 10 PFU/mL olarak saptamıştır (54).
9. İzole edilen fajların biyolojik yönünden daha detaylı incelenmesi gerektirmektedir. Böylece ilerdeki çalışmalar için faj terapiye uygun fajlar olup olmadığını tespit ederek, faj terapi çalışmaları için kullanılabilir.

10. Dr. Alexander Sulakvelidze'nin (Intralytix firması yöneticilerinden) ifadesiyle;  
"Yarım yüzyıllık antibiyotik kullanımının bizlere öğrettiği bir şey var: Bakterilere karşı savaş kazanmanın gerçekten çok zor olduğu. Ancak fajlarla, ekolojik dengeyi kendi yararımıza döndürmeyi deneyebiliriz."(55).



## 9. KAYNAKLAR

1. Wittebole X, De Roock S, Opal SM (2013). A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 5:226-235.
2. Ackermann HW (2011). Bacteriophage taxonomy in 1987. *Microbiol Sci*, 4:214-218.
3. Haq IU, Chaudhry WN, Akhtar MN, Andleeb S, Qadri I (2012). Bacteriophages and their implications on future biotechnology : a review. *Viroloji J*, 9 (1):9.
4. Henein A (2016). What are the limitations on the wider therapeutic use of phage?. <http://doi.org/10.4161/bact.24872>.
5. Golkar Z, Bagasra O, Gene Pace D (2014). Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. *IDC*, 8:129-136.
6. Sulakvelidze A, Alavidze Z (2001). Bacteriophage Therapy *AAC*, 3:649-659.
7. Parasion S, Kwiatek M, Gryko R, Mizak L, Malm A (2014). Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. *PJM*, 63(2):137-145.
8. Arda M (2006). Temel Mikrobiyoloji. Ankara: Medisan yayınevi, 209-213.
9. Chase C, Bradley KW (2011). Phage Resource Guide. *Sci Educ Alliance Howard Hughes Med Inst, Part 1 Capture 3*, 41.
10. Alpay Ş, Kılıç AO (1999). Vajinal kaynaklı laktobasillerde bakteriyofaj ve bakteriyosinlerin araştırılması. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Trabzon.
11. Soykut EA, Tunail N (2009). Termofilik faj taksonomisi. *GIDA*, 34(4):251-258.
12. W. LKLLB (2003). *World of microbiology and immunology*. The Gale Group USA, 457.
13. Hyman P, Abedon ST (2009). Bacteriophages: methods and protocols. Humana Press, Chapter 18, 188-195.
14. Fortier L, Sekulovic O (2013). Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*, 354-365.
15. Domingo-Calap P, Georgel P, Bahram S (2016). Back to the future: bacteriophages as promising therapeutic. *HLA*, 133-140.
16. Viertel T, Ritter K, Horz H (2014). Viruses versus bacteria-novel approaches to

- phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *JAC*, 2326-2336.
17. Hermoso JA (2007). Taking aim on bacterial pathogens : from phage therapy to enzybiotics. *COM*, 10:461-472.
  18. Nilsson AS (2014). Phage therapy-constraints and possibilities. *JMS*, 119; 192-198.
  19. Labrie SJ., Samson JE, Moineau S (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *NRM*, 8(5), 317-327.
  20. Gerardi MH (2006). Wastewater bacteria. John Wiley & Sons Inc, 49-51.
  21. Murray PR, Rosenthal KS., Pfaller MA (2010). *Tıbbi Mikrobiyoloji*. Altıncı baskı. Çev. Edit. Başustaoğlu A, Atlas Kitapçılık, Ankara, 649-803.
  22. Coenye T, Vanlaere E, Samyn E, Falsen E, Larsson P, Vandamme P (2005). *Advenella incenata* gen. nov., sp. nov., a novel member of the *Alcaligenaceae*, isolated from various clinical samples. *IJSEM*, 251-256.
  23. Marti E, Variatza E, Balcazar JL (2014). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol*; 36-41.
  24. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı (2014). Ankara.
  25. Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Smith C (2008). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc.
  26. Available from: <http://ieg.ou.edu/protocol/Protocols/Phenol%20Saturation.pdf>, (2015).
  27. Available from: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec466.full?text-only=true>, (2006).
  28. Popova AV, Zhilenkov EL, Myakinina VP, Krasilnikova VM, Volozhantsev NV (2012). Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiology Letters*, 332(1), 40-46.
  29. Beaudoin RN, Decesaro DR, Durkee DL, Barbaro SE (2007). Isolation of a bacteriophage from sewage sludge and characterization of its bacterial host cell. *River Academic Journal*, 3(1), 1-8.
  30. Available from: [www.virapur.com/protocols/Phage%20Plaque%20Assay%20Protocol.pdf](http://www.virapur.com/protocols/Phage%20Plaque%20Assay%20Protocol.pdf), (2015).

31. Lin NT, ChiouPY, Chang KC, Chen LK, Lai MJ (2010). Isolation and characterization of AB2: A novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*. *Research in Microbiology*, 308-314.
32. Fortier LC, Moineau S (2009) *Bacteriophages: Methods and Protocols, Isolation, Characterization, and Interactions*. Humana Press, Volume 1: Chapter 19, 203-219.
33. Available from: <https://msu.edu/course/lbs/159h/DNAFingerprinting.pdf>, (2015).
34. Flaherty SO, Ross RP, CoffeyBA. (2009). Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 33: 801-819.
35. Sundar MM, Nagananda GS, Das A (2009). Isolation of Host-Specific Bacteriophages from Sewage Against Human Pathogens. *AJB*, 1689-1699.
36. Tan GH, Nordin MS, Napsiah AB (2008). Isolation and characterization of lytic bacteriophages from sewage water. *JTAF Sci*. 36(2), 000-000.
37. Kumari S, Harjai K, Chhibber S, Chhibbe S (2009). *Pseudomonas aeruginosa* PAO Specific Bacteriophages Isolated from Sewage Samples. *AJB Sci*, 1(2), 91-102.
38. He X, Pan R (1992). Bacteriophage lytic patterns for identification of salmonellae, shigellae, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Enterobacter cloacae*. *JCM*, 30(3), 590-594.
39. Lu TK, Koeris MS. (2011). The next generation of bacteriophage therapy. *COM*, 14,524-531.
40. Jensen EC, Schrader HS, Rieland B, Thompson TL, Lee KW, Nickerson KW, Kokjohn T (1998). Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *AEMicrobiology*, 575-580.
41. Malki K, Kula A, Bruder K, Sible E, Hatzopoulos T, Steidel S, Watkins SC, Putonti C (2015). Bacteriophages isolated from Lake Michigan demonstrate broad host-range across several bacterial phyla. *Virology J*, 12(1), 164.
42. Bielke LR, Higgins SE, Donoghue AM, Donoghue DJ, Hargis BM, Tellez G (2007). Use of wide-host-range bacteriophages to reduce *Salmonella* on poultry products. *IJP Sci.*, 6(10), 754-757.

43. Pereira S, Pereira C, Santos L, Klumpp J, Almeida A (2016). Potential of phage cocktails in the inactivation of *Enterobacter cloacae*-An in vitro study in a buffer solution and in urine samples. *Virus Research*, 211, 199-208.
44. Wittmann J, Dreiseikelmann B, Rohde C, Rohde M, Sikorski J (2014). Isolation and characterization of numerous novel phages targeting diverse strains of the ubiquitous and opportunistic pathogen *Achromobacter xylosoxidans*. *Plos one*, 9(1).
45. Zaika S, Kot T, Kharina A (2011). Heterogeneity of enterobacter aerogenes bacteriophage population in sewage. *Бюлогия*, 29-31.
46. Zhao X, Huang S, Zhao J, He X, Li E, Li H, Shen Z (2016). Characterization of phiCFP-1, A Virulent Bacteriophage Specific for *Citrobacter freundii*. *JMV*, 895-905.
47. Loessner J, Neugirg E, Zink R, Schere S (1993). Isolation, classification and molecular characterization of bacteriophages for *Enterobacter* species. *JGM*, 2627-2633.
48. Jin J, Li ZJ, Wang SW, Wang SM, Huang DH, Li YH, Zhao GQ (2012). Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *BMC Microbiology*, 12(1), 156.
49. Ceysens PJ (2009). Isolation and characterization of lytic bacteriophages infecting *Pseudomonas aeruginosa*. Doktora tezi, Leuven Katolik Üniversitesi, Biosystemen Anabilim Dalı, Belçika.
50. Szeloch AK, Kawa DZ, Dabrowska BW, Kassner J, Skrobek GM, Augustyniak D, Kropinski AM (2013). Characterising the biology of novel lytic bacteriophages infecting multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Virology J*, 10: 100.
51. Mishra CK, Choi TJ., Kang SC. (2012). Isolation and characterization of a bacteriophage F20 virulent to *Enterobacter aerogenes*. *JGV*, 2310-2314.
52. Fan H, Zhang L, Hua Y, Wang L, Tong Y (2012). A fast method for large-scale isolation of phages from hospital sewage using clinical drug-resistant *Escherichia coli*. *AJB*, 6143-6148.
53. Letarova MA, Kulikov EE, Golomidova AK, Kostryukova ES, Zelenin AS, Prokhorov NS, Letarov AV (2014). Genomic sequencing and biological

characteristics of a novel Escherichia Coli bacteriophage 9g, a putative representative of a new siphoviridae genus. *Viruses*, 5077-5092.

54. Gallet R, Kannoly S, Wang I (2011). Effects of bacteriophage traits on plaque formation. *BMC Microbiology*, 11:181.
55. Coşkun MY (2003). Bakteriyofaj tedavisi. *Bilim ve Teknik*, 82-85.





## 10. ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Soyadı, Adı** : KHORSHIDTALAB, MONA  
**Uyruğu** : İRAN  
**Doğum tarihi ve yeri** : 09/10/1988-TAHRAN  
**Medeni hali** : Bekar  
**E-posta** : monakht@yahoo.com  
**Yazışma adresi** : KTÜ SABE Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

### EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu KurumAdı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	KTÜ SABE Tıbbi Mikrobiyoloji Ab.D.	2016
Lisans	KTÜ Eczacılık Fakültesi	2013-devam ediyor
Lisans	Falavarjan Azad İslami Üniversitesi Mikrobiyoloji Ab.D.	2011
Lise	Pişdaneşgahi Sara	2007
Yabancı Dil	İngilizce, Türkçe	

### BİLDİRİLER:

1. **Mona Khorshidtalab**, Gülin Renda. Geçmişten Günümüze Safran: Eczacılık Tarihindeki Yolculuğu. XI. Türk Eczacılık Tarihi Toplantısı. Kayseri, 25-28 Mayıs 2014.
2. **Khorshidtalab M**, Tabbouche S, Tüfekci EF, Çamurşen A, Palabıyık T, Kılıç AO. Trabzon İli ve Çevresi Tatlı Su Kaynaklarından İzole Edilen Mikroalg Ekstraktlarının Antimikrobiyal Özelliklerinin Araştırılması. 36. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, 12-16 Kasım 2014.
3. Tabbouche S, Palabıyık T, Tüfekci EF, **Khorshidtalab M**, Kılıç AO. Trabzon İli Çevresindeki Tatlı ve Tuzlu Sulardan İzole Edilecek Mikroalglerin Antimikrobiyal

Madde Üretimi Yönünden Araştırılması. Ekoloji 2015 Sempozyum, Sinop, 6-9 Mayıs 2015.

4. Durukan I, **Khorshidtalab M**, Karahan D, Tufekci EF, Bayramoglu G, Kılıç AO. Identification of a Lytic Bacteriophage From Wastewater Infecting Clinical Isolates of *Klebsiella spp.* 6th Southeast European Conference on Chemotherapy and Infection. Thessaloniki, Greece, 17-21 Kasım 2015.
5. **M. Khorshidtalab**, I. Durukan, S. S. Nas, E. F. Tufekçi, M. Abdurahman, A.O. Kiliç. Isolation and Characterization of A Lytic Bacteriophage From Wastewater Infecting *Enterobacter spp.* 3th Congress of Baltic Microbiologists. Vilnius, Lithuania, 18-21 Ekim 2016 (Başvuru yapıldı).
6. Mujib Abdurahman, İlknur Tosun, İnci Durukan, **Mona Khorshidtalab**, Gülçin Bayramoğlu, Ali O. Kiliç. Klinik *Staphylococcus aureus* Suşlarından Lizojenik Bakteriyofaj İzolasyonu ve Konak Spektrumlarının Belirlenmesi. 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, 16-20 Kasım 2016 (Başvuru yapıldı).
7. Merve Cora, İnci Durukan, Gülşen Uluçam, **Mona Khorshidtalab**, Seyran S. Nas, Ali O. Kiliç. Atık Sulardan İzole Edilen Bakterilerin Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi. 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, 16-20 Kasım 2016 (Başvuru yapıldı).
8. Mona Khorshidtalab, Seyran S. Nas, İnci Durukan, Enis F. Tufekci, Mujib A. Abdurrahman, Ali O. Kiliç. Atık Sudan Litik Bakteriyofaj İzolasyonu Ve Morfolojik Karakterizasyonu. 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, 16-20 Kasım 2016 (Başvuru Yapıldı).

#### **PROJELER:**

1. “Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsüne Özgü Serolojik Tanı Sistemlerinin Geliştirilmesi” TUBİTAK-1003 (213S132), 2014-2016, Bursiyer.
2. “Atık Sulardan Litik Bakteriyofaj İzolasyonu ve Karakterizasyonu”, BAP06, Yüksek Lisan, TYL-2015-5287, 2015-2016, Araştırmacı.