T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Paenibacillus larvae BAKTERİYOFAJLARININ İZOLASYONU, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE FARKLI SUŞLARINA KARŞI ETKİNLİĞİN BELİRLENMESİ

Adı SOYADI
ARİF BOZDEVECİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU

JÜRİ ÜYELERİ
Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU
Doç. Dr. Nimet BALTAŞ
Dr. Öğr. Üyesi Yeşim AKTÜRK DİZMAN
Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ
Doç.Dr. Hilal AY

RİZE-2021
Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Paenibacillus larvae BAKTERİYOFAJLARININ İZOLASYONU, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE FARKLI SUŞLARINA KARŞI ETKİNLİĞİN BELİRLENMESİ

Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU danışmanlığında, Arif BOZDEVECİ tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararı ile oluşturulan jüri tarafından …/…/… tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **DOKTORA** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri		**Unvanı, Adı Soyadı**	**İmza**
Başkan	:	Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU	
Üye	:	Doç. Dr. Nimet BALTAŞ	
Üye	:	Dr. Öğr. Üyesi Yeşim AKTÜRK DİZMAN	
Üye	:	Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ	
Üye	:	Doç.Dr. Hilal AY	

Doç. Dr. Ahmet YANIK
ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Amerikan yavru çürüklüğü etkeni olan *Paenibacillus larvae* bakteriyofajlarının izolasyonu, moleküler karakterizasyonu ve farklı suşlarına karşı etkinliğin belirlenmesini amaçlayan bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilimdalı'nda "Doktora Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Arı hastalıklarında bildirimi zorunlu olan Amerikan yavru çürüklüğü hastalığı etkeni *Paenibacillus larvae*'yı hedefleyen bakteriyofajların izole edilmesi, morfolojik ve genetik çeşitliliğinin aydınlatılması, yeni çözüm stratejileri geliştirme potansiyeli çalışmanın önemini ortaya koymaktadır. Tez konusunun belirlenmesinde, çalışmalarımın her aşamasında gerek teorik gerekse uygulamalı konularda bilgisini, danışmanlığını esirgemeyerek göstermiş olduğu anlayış ve destekten dolayı değerli hocam Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarım boyunca bilgi ve önerilerinden yararlandığım Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ, Prof. Dr. Elif SEVİM, Doç. Dr. Nimet BALTAŞ, Dr. Öğr. Üyesi Yeşim AKTÜRK DİZMAN ve Dr. Öğr. Üyesi Bayram TORAMAN'a teşekkür ederim. Deneysel ve teknik çalışmalarda yardımcı olan arkdaşlarım Şeyma SUYABATMAZ, Sinem VATANDAŞLAR, Merve KARALİ ve Cantekin DURSUN'a ve ismini yazamadığım tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi olarak desteklerini esirgemeyen değerli aileme şükranlarımı sunarım.

Arif BOZDEVECİ

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan "*Paenibacillus larvae* Bakteriyofajlarının İzolasyonu, Moleküler Karakterizasyonu ve Farklı Suşlarına Karşı Etkinliğin Belirlenmesi" başlıklı bu tezi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. …/…/…

İmza

Arif BOZDEVECİ

Uyarı: *Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.*

ÖZET

Paenibacillus larvae BAKTERİYOFAJLARININ İZOLASYONU, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE FARKLI SUŞLARINA KARŞI ETKİNLİĞİN BELİRLENMESİ

Arif BOZDEVECİ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi
Danışmanı: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU

Paenibacillus larvae, Amerikan yavru çürüklüğüne(AYÇ) neden olan ve bal arısı kolonilerini etkileyen Dünya çapında bildirilmesi zorunlu olan bir hastalıktır. Bakteriyofajlar, bakterileri enfekte eden virüsler olarak çevrede bulunan bakterilerin doğal kontrolörleridir. Son zamanlarda *Paenibacillus larvae*'ları hedef alan bakteriyofaj çalışmaları, umut verici alternatif tedavi yöntemi olarak ortaya çıkmıştır.

Bu çalışma Türkiye'den izole edilen *P. larvae* suşlarını enfekte ederek parçalayabilen yeni bakteriyofajların morfolojik ve moleküler yapısının belirlenmesi için yapıldı. Bakteriyofajların konak aralığı ve özgüllüğü, patlama boyutu, litik aktivitesi ve morfolojik özellikleri belirlendi. Yeni nesil dizilemeyle tüm genom analizinin yapılması, fonksiyonel gen bölgelerinin belirlenmesi ve karşılaştırılmalı genomik analizi yapılarak filogenetik ağaçları oluşturuldu. Virüs taksonomik adlandırma kurallarına göre iki fajın isimlendirilmesi(vB_PlaP_SV21 ve vB_PlaM_Pd22F) yapıldı. *Paenibacillus* faj SV21'in moleküler analizinde, %39.33 GC içeriğine sahip, 44949 bp lineer dsDNA genomuna ve 77 kodlama bölgesine sahip olduğu belirlendi. *Paenibacillus* faj Pd22F'nin %50,68 GC içeriğine sahip 86388 bp linear dsDNA genomuna ve 124 kodlama bölgesine sahip olduğunu belirlendi. *Paenibacillus* faj SV21'in *Podoviridae, Paenibacillus* faj Pd22F'nin ise *Myoviridae* familyasında yer aldığı belirlendi. Çalışmadaki fajlar, Türkiye'den izole edilerek tüm genom dizisi GenBank'a kaydedilen ilk *Paenibacillus* fajlarıdır. Ayrıca *P. dendritiformis* türünden izole edilerek morfolojik ve moleküler karakterizasyonu yapılarak literatüre kazandırılan ilk faj bildirimi olması açısından da önemlidir.

2021, 110 sayfa

Anahtar Kelimeler: Amerikan Yavru Çürüklüğü, Bakteriyofaj, Faj izolasyonu, *Paenibacillus larvae*.

ABSTRACT

ISOLATION, MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGES OF *Paenibacillus larvae*, AND DETERMINATION OF EFFICIENCY AGAINST DIFFERENT STRAINS.

ARİF BOZDEVECİ

Recep Tayyip Erdogan University
Graduate Education Institute
Department of Biology
Doctorate Thesis
Supervisor: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU

Paenibacillus larvae is a worldwide notifiable disease causing American Foulbrood disease (AFB) and affecting honeybee colonies. As viruses that infecting bacteria, Bacteriophages are natural controllers of bacteria in the environment. Recently, bacteriophage studies targeting *Paenibacillus larvae* have emerged as a promising alternative treatment method. This study was carried out to determine the morphological and molecular structure of new bacteriophages that can infect *P. larvae* strains by degrading isolated from Turkey. The host range and specificity, burst size, lytic activity and morphological characteristics of bacteriophages were determined. By performing whole genome analysis with NGS, functional gene regions were determined, and phylogenetic trees were constructed by comparative genomic analysis. Two phages were named (vB_PlaP_SV21 and vB_PlaM_Pd22F) according to the rules of nomenclature of viruses. In the molecular analysis of *Paenibacillus* phage SV21, it was determined that it has a GC content of 39.33%, a linear dsDNA genome of 44949 bp and 77 coding regions. It was determined that *Paenibacillus* phage Pd22F has 86388 bp linear dsDNA genome with 50.68% GC content and 124 coding regions. It was determined that *Paenibacillus* phage SV21 is in the family *Podoviridae*, and *Paenibacillus* phage Pd22F is in the family *Myoviridae*. The phages in this study are the first *Paenibacillus* phages isolated from Turkey and whose whole genome sequence was recorded in GenBank. Besides, this study is important due to fact that it is the first phage report characterized as morphological and molecular features isolated from *P. dendritiformis*.

2021, 110 pages

Keywords: American Foulbrood, Bacteriophage, Phage isolation, *Paenibacillus larvae*.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ II
ÖZET III
ABSTRACT IV
İÇİNDEKİLER V
ŞEKİLLER DİZİNİ VII
TABLOLAR DİZİNİ VIII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ IX
1. GENEL BİLGİLER 1
1.1. Giriş 1
1.2. Literatür Özeti 3
1.3. Dünya'da ve Türkiye'de Arıcılığın Önemi 10
1.4. Bal Arısı Hastalıkları 12
1.4.1. Amerikan Yavru Çürüklüğü (AYÇ) hastalığı 14
1.4.2. Avrupa Yavru Çürüklüğü (AvYÇ) Hastalığı ve Etkenleri 17
1.5. Arı Hastalıkları ile Mücadele 19
1.6. Bakteriyofaj 21
1.6.1. Bakteriyofajların Sınıflandırılması ve İsimlendirilmesi 22
1.6.2.Bakteriyofaj Çalışmalarında Kulllanılan Bazı Biyoinformatik Programlar 25
1.7. Bakteriyofaj Terapisi ve Güncel Uygulamalar 26
1.8. Veterinerlikte Bakteriyofaj Uygulamaları 28
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR 31
2.1. Materyal 31
2.2. Yöntem 31
2.2.1. Bakterilerin Canlandırılması 31
2.2.2. Bakteriyofaj İndüksiyonun Yapılması 32

2.2.3. Bakteriyofajların Konak Aralığının Belirlenmesi 32
2.2.4. Bakteriyofajların Saflaştırılması ve Yoğunlaştırılması 33
2.2.5. Bakteriyofajların Burst Size Belirlenmesi..... 33
2.2.6. SDS-PAGE Analizi 34
2.2.7. Bakteriyofajların Geçirimli Elektron Mikroskobunda Morfolojik Analizi 35
2.2.8. Bakteriyofajların DNA izolasyonu..... 35
2.2.9. Genom Dizilimi, Annotation ve Biyoinformatik Analiz..... 36
2.2.10. Bakteriyofajların Filogenetik Ağaçlarının Oluşturulması 36
2.2.11. Genbank Erişim Numalarının Alınması 37
3. BULGULAR 39
4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR 64
5. ÖNERİLER 74
KAYNAKLAR 75
EKLER 91

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. *Paenibacillus* fajların izole edilebileceği muhtemel kaynaklar 6
Şekil 2. *P. larvae* koloni morfolojisi ve mikroskobik görünümleri..... 16
Şekil 3. *P. dendritiformis*'in koloni morfolojisi ve mikroskobik görüntüsü. 19
Şekil 4. Virüsların morfolojik sınıflandırılması. 23
Şekil 5. Fajların Self-assembly yolu..... 24
Şekil 6. Fajların ve faj kaynaklı litik proteinlerin uygulama alanları. 27
Şekil 7. Çalışmada kullanılan bakterilerin petri ve Gram boyama görüntüleri 39
Şekil 8. Bakteriyofajların plak görüntüsü 41
Şekil 9. Bakteriyofajların TEM görüntüleri 43
Şekil 10. Bakteriyofajların elektron mikroskobu görüntüleri..... 43
Şekil 11. Fajların SDS PAGE jel görüntüsü) 44
Şekil 12. Bakteriyofaj SV21 fajı için one-step büyüme eğrileri. 45
Şekil 13. *Paenibacillus* faj PB31B için one-step büyüme eğrileri.. 46
Şekil 14. *Paenibacillus* faj PB34 için one-step büyüme eğrileri. 46
Şekil 15. Bakteriyofaj SV21 ve faj API480'in BLAST genomik karşılaştırma analizi.. 47
Şekil 16. Bakteriyofaj SV21 fajının genom haritası ve fonksiyonel protein sıralaması. 49
Şekil 17. Bakteriyofaj Pd22F fajının genom haritası ve fonksiyonel protein sırası. 51
Şekil 18. VICTOR programı ile üretilen tüm genom filogenetik ağacı 52
Şekil 19. Bakteriyofaj Pd22F'nin ViPTree ile oluşturulan Faj Proteomik Ağacı 53
Şekil 20. Fajların terminase large subunit bölgesine göre filogenetik ağacı 54
Şekil 21.Fajların terminase large subunit bölgesine göre VIRIDIC analiz sonucu..... 55
Şekil 22. *Paenibacillus* fajlarının endolizin dizilerine dayanan filogenetik ağacı 56
Şekil 23. *Paenibacillus* fajlarının endolizin bölgesine göre VIRIDIC analiz sonucu 57
Şekil 24. *Paenibacillus* fajlarının major kapsid dizilerine dayanan filogenetik ağacı .. 58
Şekil 25. Major kapsid protein bölgesine göre VIRIDIC analiz sonucu 59
Şekil 26. Bakteriyofaj Pd22F fajının DNA polimeraz I dayanan filogenetik ağacı 60
Şekil 27. Bakteriyofaj Pd22F fajının portal proteine dayanan filogenetik ağacı..... 61
Şekil 28. Bakteriyofaj Pd22F fajının terminase large subunit göre filogenetik ağacı 61
Şekil 29. VIRFAM analizine göre bakteriyofaj Pd22F proteinlerinin genom sırası. 63

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Dünya bal üretiminde ülkelerin koloni sayısı ve bal üretim miktarı 11
Tablo 2. Bal arılarında görülen bakteriyel ve mantar hastalıkları. 12
Tablo 3. Fajların özellikleri ve sınıflandırılması (Ackerman, 2006). 24
Tablo 4. Çalışmada kullanılan suşlar genel bilgileri 40
Tablo 5. Faj Lizatlarnın petri yüzeyindeki plak morfolojisi 41
Tablo 6. Bakteriyofaj/bakteriyosin gözlenen *P. larvae* suşları ve konakları 42
Tablo 7. Bakteriyofajların TEM mikroskobundaki Morfolojik Ölçümleri 44
Tablo 8. Filogenetik ağaçta kullanılan fajların accession numaları 62
Tablo 9. VIRFAM analizinde Aclame'de bakteriyofaj Pd22F proteinlerinin benzerliği 63

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AYÇ	Amerikan Yavru çürüklüğü
AvYÇ	Avrupa Yavru çürüklüğü
ATCC	American Type Culture Collection
Aclame	A Classification Of Mobile Genetic Elements
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BPP	Bayesian Phylogenetics and Phylogeography
CCD	Colony collapse disorder
ERIC	Enterobacterial repetitive intergenic consensus
LMG	Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent
TEM	Transmission Electron Microscope
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next-Generation Sequencing
VIRIDIC	Virus Intergenomic Distance Calculator
VICTOR	Virus Classification and Tree Building Online Resource
FAO	Food And Agriculture Organization Of The United Nations
GBDP	Genome BLAST Distance Phylogeny
ViPTree	Viral Proteomic Tree
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
ML	Maximum Likelihood
MCP	Major Capsid Protein
TermL	Terminaz Large Subunit
MTP	Major Tail Protein
M	Molar
mM	Milimolar
cfu	Colony Forming Unit
pfu	Phage Forming Unit
µL	Mikrolitre
ng	Nanogram
bp	Base pair

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Bal arıları bilinen 1.2 milyondan fazla böcek türü içerisinde üzerinde en fazla bilimsel çalışma yapılan canlı türüdür. *Apis* cinsine bağlı olarak tanımlanan 11 tür içerisinde en önemli ekonomik ve ekolojik değere sahip olanı *A. mellifera* (bal arısı) türüdür.

Arı ürünleri mükemmel birer gıda kaynağı olmaları yanısıra tedavi edici, koruyucu ve iyileştirici özellikler taşımaları nedniyle günümüzde fonksiyonel bir gıda olarak değerlendirilmektedir. Tıp, eczacılık, dişhekimliği ve veterinerlikte bu konu üzerinde araştırmalar her geçen gün daha fazla yoğunluk kazanmaktadır. Bal ürünlerinin yanısıra tarımda çiçekli bitkileri tozlaştırmak için aracı olarak kullanıldığından dolayı tarımsal ekonomide önemli bir yere sahiptir. Bitkilerin tozlaşmasını ve meyve vermesini sağlayan arıların ülke ekonomisine olan katkılarının bal üretiminden elde edilen gelirden 15 kat daha fazla olduğu düşünüldüğünde arıların ve arıcılığın ne kadar önemli olduğu daha iyi anlaşılmaktadır.

Ülkemiz, arıcılık için gerekli her türü kaynak ve alt yapıya sahip olduğu gibi gelecekte de dünyanın bu sektördeki merkezi olma şansına sahiptir. Ülkemizde sabit ve göçer olmak üzere iki tip arı yetiştiriciliği yapılmaktadır. Genel olarak sabit arıcılıkta kovan sayısı azken göçer arıcılıkta kovan sayısının çok olduğu bilinmektedir. Her iki arıcılık şekli bölgesel farklılıklar içermesine rağmen ciddi boyutta arı bakteriyel hastalık etkenleri ile karşı karşıyadır.

Her canlı türünde olduğu gibi bal arılarının da (*Apis mellifera* L.) yaaşama gücünü ve verim düzeyini olumsuz yönde etkileyen hastalık etkeni ve zararlıları vardır. Arılar zararlılarla mücadele davranışına sahiptirler. Bu davranış genetik yapılarının kazandırdığı bir özelliktir ve davranış düzeyleri genetik yapılarına bağlı olarak değişim gösterir. Ancak insan davranışları arı hastalıklarında, hastalık etkenlerine karşı mücadelede zaman zaman olumsuz etkileri bulunmaktadır. Özellikle zirai ilaçların kullanımı arı sağlığını etkileyen en önemli etkenlerden biridir. Bununla birlikte arı mikrobiyal hastalık etkenleri arıcılık faaliyetlerini hem ekonomik hem de sosyal açıdan ciddi boyutlarda etkilemektedir. Özellikle konargöçer arıcılıkla bu etkenler daha da yayılmakta ve iyi arıcılık uygulamaları

konusunda yetersiz bilgiye sahip arıcıların bu hastalıklarla mücadelede özellikle antibiyotik kullanımları da hem arının normal florasını bozmakta hem de arı ürünlerinin ihracını önlemektedir.

Bakteriyel, protozoal, viral ve fungal hastalık etmenleri ve olumsuz çevre koşulları bal arılarının hastalanması ve strese girmesine sebep olan başlıca unsurlardır. Bu unsurlar aynı zamanda hastalık etmenlerine kaynaklık yaparak kolonide, kovanlar arasında ve bölgede yaygınlaşmalarını hızlandırır. Koloniler yeterince güçlü olmadıklarında yeterince beslenemediklerinde, uygun olmayan sistem ve yapılara zorlandıklarında kısacası uygun olmayan çevre koşullarında daha kolay strese girer ve hastalanırlar.

Son yıllarda larva ve ergin bal arıları farklı türde biyotik ve abiyotik streslere maruz kalmakta, sonuçta ciddi koloni kayıplarına ve kovan ürünlerinde azalmaya, büyük ekonomik zararlara neden olmaktadır. Larva ve arı sağlığını etkileyen parazitler ve patojenleri içeren bir dizi etkene maruz kalmaktadırlar. Bunlar; akarlar (*Varroa destructor*), microsporidia (*Nosema* spp.), mantarlar (*Ascosphaera apis*), bakteriler (*Paenibacillus larvae, Melissococcus plutonius*) ve virüsleri ihtiva etmektedir Arı larva evresini etkileyen en bilinen hastalıklar Avrupa yavru çürüklüğü (AvYÇ) ve Amerikan yavru çürüklüğüdür (AYÇ).

AvYÇ, Gram pozitif bakteri *M. plutonius*'un neden olduğu ciddi bir bakteriyel kuluçka hastalığıdır. Hastalık yaygın olarak dağılır ve kuluçka kayıpları ve bunun sonucunda koloni çöküşü meydana gelir. Kontamine gıdaların yutulması, larva orta bağırsağındaki patojenin çoğalmasına ve larva gıdasının tüketilmesine neden olur. Larvalar, hücre kapanmasından önceki herhangi bir aşamada duyarlıdır ve genellikle ölüm, yaşamın 4-5. gününde meydana gelir. Enfekte olmuş larvalar açlıktan ölür, hücre duvarı etrafında bükülür veya gerilir ve daha sonra AvYÇ ile sıklıkla ilişkili iki saprofit bakteri olan *Paenibacillus alvei, Enterococcus faecalis* ve son yıllarda *P. dendritiformis* gibi ikincil istilacılar tarafından ayrıştırılır. Hastalıkla etkilenen kuluçka, çok bayat veya ekşi bir kokuya sahip olur, bazen sirke gibi asidik olabilir, ancak çoğu zaman koku yoktur. Ayrıca larvaların renkleri inci beyazından sarıya dönmesi, sonra kahverengi ve son olarak bozunduklarında grimsi siyaha döner. Larvalar kuluçka hücresinde normal sarmal pozisyonun dışında hareket ettikleri için hastalıklı larvalar kolayca tanımlanabilir.

AYÇ'nin etkeni Gram pozitif, spor oluşturan bakteri olan *P. larvae*'dir. Etken ilk dönem (12-48 saatlik) larvaları kontamine eder ve hücre kapanmasından sonra onları

ölüme götürür. *P. larvae*, arı larvalarına bulaştığında orta bağırsaktan epitel boyunca yol alır ve hemosölü istila eder. Vejetatif büyüme ve enfeksiyon sırasında oldukça aktif hücre dışı proteazlar salgıladığı, muhtemelen epitelyal bariyerin bozulmasına neden olduğu, bal arılarının larva ve pupa evrelerini etkileyen en ciddi bakteri kökenli hastalığıdır. İkinci aşamada larvalar kahverengimsi, yarı sıvı, yapışkana benzer bir kolloid (iplik evresi) haline gelir ve kokuşmuş bir koku bırakır. Larvaya bir kürdanla dokunulduğunda ipliksi ve yapışkan, uzayan görünümü AYÇ'nin varlığını doğrulayan basit bir tekniktir. Larvalar, petek gözün alt hücre duvarına sıkıca yapışır ve uzun süre beklerse kuruyup kalır. Enfeksiyon, yıllarca koloniler arasında dağıtabilen milyonlarca spor içerir. Hastalığın önemli belirtisi, larvaların genellikle 2-3 gün sonra öldüğü, kapaksız hastalıklı larvalar hızla şekillerini kaybettiği ve gövdenin dibinde sıvılaştığı bilinmektedir. Hastalık dünyanın her yerinde görülür ve ciddi boyutlarda zarara yol açmaktadır. Hastalığı önleme ve kontrol için benzersiz yöntemler vardır. Bunlardan biri hastalıklı arı kolonilerini yakmaktır ve şu anda birçok ülkede kullanımda olan bir metoddur. Hastalığın kontrolünde diğer önemli yol antibiyotik kullanımıdır, ancak şu anda, AYÇ'nin önlenmesi ve kontrolü için onaylanmış tek antibiyotik bal arısı kolonilerinde oksitetrasiklin'dir. Balda kalıntıya neden olduğu için Avrupa Birliği ülkeleri dahil olmak üzere bir çok ülkede yasaktır. Antibiyotik kullanımı izin verilen bazı ülkelerde *P. larvae* suşlarında oksitetrasikline dirençli izolatlarının oluştuğu bu nedenle daha ciddi problemlere neden olduğu bilinmektedir.

Çalışmanın amacı, AYÇ ve AvYÇ etkenlerine karşı bakteriyofajların araştırılması amacıyla, kullanılma potansiyeli olabilecek *P. larvae* ve *P. dendritiformis*'in bakteriyofajlarının izolasyonu, karakterizasyonu, genom analizlerinin belirlenmesi ve literatürde varolan bakteriyofajlarla biyoinformatik analizlerle karşılaştırılmasıdır. Ayrıca geniş konak aralığı içeren bakteriyofajların belirlenmesi AYÇ ve AvYÇ hastalık etkenlerine karşı daha ileri çalışmalar için alternatif faj tedavisi seçeneklerinin alt yapısını oluşturmaktır.

1.2. Literatür Özeti

Doğu Karadeniz bölgesinde yapılan çalışmada Amerikan Yavru Çürüklüğü(AYÇ) hastalık etkeni olarak arı örneklerinden izole edilen 29 *Paenibacillus larvae* suşunun 16

farklı antibiyotiğe karşı antibiyotik direnci test edilmiş, gentamisin (% 39), oksitetrasiklin (% 29) ve tetrasiklin (% 4) direncine sahip olduğu belirlenmiştir (Sevim vd., 2016). Arıcılıkta ilaç kullanımının, arı ürünlerinde kalıntı bırakarak insan sağlığını olumsuz etkilediği ve patojen bakterilerde antibiyotik direncinin gelişmesi gibi ciddi problemlere neden olduğu bildirilmektedir (Lodesani ve Costa, 2005; Martel vd., 2006; Flesar vd., 2010). Oksitetrasiklin hidroklorurün önceki yıllarda AYÇ hastalığı tedavisi için yaygın kullanıldığı, ancak hastalığı önlemek yerine sadece maskelediği ve buna bağlı olarak da Amerika, Kanada ve Arjantin gibi ülkelerde tetrasiklin direnci gelişmeye başladığı bildirilmiştir (Cox, 2000; Miyagi vd., 2000; Elzen vd., 2007; Arbia ve Babbay, 2011).

Tsigouri (2009) tarafından, Yunanistan'da toplam 233 arı örneğinin 30'unda, 2000-2009 yılları arasında toplam 3425 arı örneğinin 142'sinde AYÇ tespit edildiği bildirilmiştir. Yalçınkaya (2008), ilkbahar ve sonbaharda Adana ve Hatay'da yavrulu petek ve ergin arı örneklerinin % 29'unda AYÇ tespit edildiğini bildirmiştir. Son yıllarda Dünya'da hastalıklarla mücadele konusunda alternatif yeni stratejiler üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (Wedenig, 2003; Maggi vd., 2011; Boligon vd., 2013).

Bunlardan;

(I) hastalıklara karşı genetik iyileştirme yöntemiyle dirençli arı stoklarının (hat ve soy) yetiştirilmesi (Wedenig, 2003; Evans, 2004)

(II) antagonist bakterilerle biyokontrol yöntemlerin geliştirilmesi(Alippi vd., 2006; Yoshiyama ve Kimura, 2009).

(III) doğal kaynaklı antibakteriyel ürünlerle tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi (Boligon vd., 2013) gibi çalışmalar yapılarak alternatif tedavi stratejileri geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Bakteriyofajlar, bakteri hücrelerini enfekte edebilen virüsler olarak tanımlanır ve çevredeki bakterilerin doğal kontrolörleridir. Konakçılarının bulunduğu her ortamda (nehirler, topraklar, bitkiler, hayvanlar) bulunabilirler. Su ortamlarında fajların popülasyon sayısı, 10^4-10^8 PFU/mL aralığında, toprakta ve sediment partiküllerinde ise 1 gram örnek başına yaklaşık 10^9 PFU/mL faj partikülü belirlenmiştir (Weinbauer, 2004). Alternatif stratejiler için faj seçimi üç temele dayanmaktadır.

(I) Mevcut bir koleksiyondan en etkili birkaç fajın seçilmesi, (II) izole edilmiş bakterilerin faj tiplendirilmesinden sonra mevcut bir koleksiyondan etkili fajların çeşitlendirilmesi, (III)olağanüstü durumlarda, ağır bir patojene karşı aktif bir faj

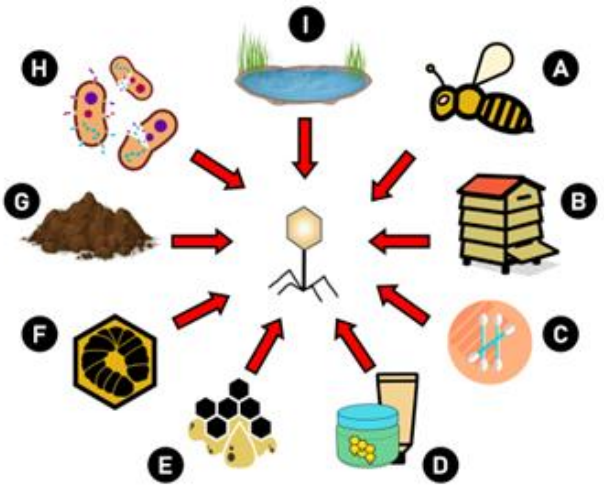
bulunmadığında, uygulama için doğrudan ortamdan izole edilebilen litik bir fajın kullanıma hazır bulundurulmasıdır.

Çevresel fajların bolluğu, direnç gelişimine bakılmaksızın güncel ve gelecekteki patojen bakterilere karşı faj preparatlarını izole etmek ve oluşturmak için sınırsız bir kaynak sunmaktadır (Weinbauer, 2004; Gill ve Hyman, 2010; Drulis-Kawa vd., 2012). Endersen vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada, ahır, kümes, gübre ve toprak gibi ortamlardan izole edilen *Mycobacterium* LE1-LE6 bakteriyofajlarının sütte *M. smegmatis* MC2155 bakterisine karşı kullanım potansiyeli araştırıldı. *M. smegmatis* MC2155 bakterisi $1x10^3$ cfu/mL olacak şekilde süt içerisine inoküle edidi. Bakteri ile enfekte edilen süt içerisine altı bakteriyofaj $1x10^9$ PFU/mL düzeyinde olacak şekilde tek başına veya kokteyl halinde ilave edilerek 4 gün boyunca 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda sütteki bakteri sayısının kontrolle kıyaslandığında yaklaşık 6.0 log arttığı belirlenirken, bakteriyofaj karışımı ilave edilen örneklerde ise *M. smegmatis* MC2155 bakterisi olmadığı bildirildi.

Ticari olarak piyasada satılmak üzere, gıdalarda *Listeria monocytogenes, Escherichia coli* O157 ve *Salmonella enterica* sayısının azaltılmasında kullanılması amacıyla Intralytix şirketi tarafından, sırasıyla; ListShield, EcoShield ve SalmFresh bakteriyofaj ürünleri üretilmektedir. ListexP100 ürünü, Micreos şirketi tarafından, *Streptococcus* türlerine karşı etkili diş ve ağız sağlığında kullanılmak üzere bakteriyofaj karışımını içeren ürünler ise New Horizons Diagnostic şirketi tarafından (sakız, diş macunu) üretilmiştir (Cooper, 2016). Avustralya ve Yeni Zelanda Gıda Standartları tarafından (FSANZ Food Standards Australia New Zealand), İsviçre'de 2012 yılında ListexTM'in peynir ve diğer gıdalarda kullanımına onay verilmiştir (Ly-Chatain, 2014).

İlk *P. larvae* fajları 1950'lerde Rusya'daki Leningrad Veteriner Enstitüsü'nde Smirnova (ölü larvalardan) (Smirnova, 1953) ve Kanada Tarım Bakanlığı'nda Gochnauer tarafından (lizojenik kültürlerden) izole edilmiştir (Gochnauer, 1955). Sonraki yıllarda *P. larvae* fajı BLA (Drobnikova ve Ludvik, 1982), L3 (Valerianov vd., 1976), BL2 (Benada vd., 1984), PBL1(Dingman vd., 1984), PBL0.5 (Bakhiet ve Stahly, 1988), PBL2 (Campana vd., 1991), PBL3 (Stahly vd., 1999), PPL1c (Stahly vd., 1999), 1953 ile 1999 yılları arasında bildirilmiştir. Bu fajların çoğu lizojenlerden izole edilmiş ve farklı *P. larvae* suşlarını karakterize etmek için kullanıldığı bildirilmiştir (Tsourkas, 2020). İzole edilen bu fajların kaynağı; lizojen bakteriler (Gochnauer, 1955; Dingman vd., 1984),

kovan alanından toprak, su (Popova vd., 1976; Valerianov vd., 1976; Ribeiro vd., 2019b), kovan yüzeylerinden sürüntüler, arı kovanı malzemeleri (Beims vd., 2015) balmumu, bal arısı larvası (Oliveira vd., 2015), yetişkin işçi arılar ve hatta içeriğinde arı ürünlerinin kullanıldığı kozmetik ürünler (Merrill vd., 2014; Stamereilers vd., 2016; Yost vd., 2018; Walker vd., 2018; Tsourkas, 2020) olabilmektedir. Muhtemel faj izolasyon kaynakları Şekil 1'de verilmektedir.



Şekil 1. *Paenibacillus* fajların izole edilebileceği muhtemel kaynaklar, (a) arılar ve arı ürünleri, (b) kovan elemanları (c) kovan bölgesinden alınan sürüntüler (d) arı ürünleri içeren kozmetik ürünleri, (e) balmumu, (f) bal arısı larvası, (g) toprak, (h) bakteri, (i) su kaynakları (Jonczyk-Matysiak vd., 2020).

P. larvae türüne özgü fajlar 1950'lerde tanımlanmasına rağmen Portekiz'de izole edilen *P. larvae* phiIBB_Pl23, genom dizilimi Oliveira vd. (2013) tarafından tamamen sıralanmış ilk *Paenibacillus larvae* bakteriyofajıdır. Abouo, Davies, Emery, Jimmer1 ve Jimmer2 fajları da 2013'te ABD Utah'da izole edilerek genom dizilimleri bildirildi (Sheflo vd., 2013). İlk olarak *Bacillus larvae* özgü fajlar olarak tanımlanmışlar, ancak konakçı bakterinin yeniden sınıflandırılmasından sonra (Genersch vd., 2006; Merrill vd., 2014), fajların isimleri *Paenibacillus larvae*'ya özgü fajlar olarak güncellenmiştir. Bazı yayınlar bu fajları *Paenibacillus*'a özgü fajlar olarak kabul görürken (Merrill vd., 2014), diğer çalışmalarda onların bu faj grubunda sınıflandırılmadığı bildirilmektedir (Stamereilers vd., 2016, 2018; Tsourkas, 2020).

Genomu dizilenen ilk *P. larvae* fajının 2013 yılında Portekiz'de izole edilen phiIBB_Pl23 (Oliveira vd., 2013), ardından Almanya'da faj HB10c2 ve Kuzey Carolina'da Diva, Lily, Rani, Redbud, Shelly, Sitara ve Tripp fajları izole edilmiştir (Beims vd., 2015; Carson vd., 2015; Abraham vd., 2016). 2015 yılında Las Vegas Üniversitesi'nde 9 *P. larvae* fajının genomlarının ilk karşılaştırmalı genomik analizi yayınlandı (Tsourkas vd., 2015; Stamereilers vd., 2016). 2013 yılında DNA dizisi GenBank'ta yer alan ancak herhangi bir dergide yayınlanmayan yeni bir faj PG1 tanımlandı. Bundan iki yıl sonra, Kuzey Carolina'da izole edilen Diva, Lily, Rani, Redbud, Shelly, Sitara (Carson vd., 2015) ve Tripp (Abraham vd., 2016) fajları da DNA dizileri sıralanarak GenBank'a kayıt yapıldı. Aynı yıl HB10c2 fajı Almanya'da izole edilmiş ve DNA dizisinin belirlendiği bildirilmiştir (Beims vd., 2015). Sonraki dokuz faj Diane, Fern, Harrison, Hayley, Paisley, Vadim, Vegas, Willow ve Xenia, Nevada ile Texas Üniversitesi'nde yapılan çalışmalarda izole edilerek kapsamlı genomik dizi analizi yapılmıştır (Tsourkas vd., 2015). Farklı kaynaklardan izole edilerek genom dizilimi belirlen bu fajlar birbirleriyle ve diğer dizilerle karşılaştırılmaya başlandı. DNA dizilimi belirlenen *P. larvae* fajlarının ayrıca varsayılan protein fonksiyonlarını tanımlamaya çalışıldı (Stamereilers vd., 2016).

2014-2016 yılları arasında, ABD'deki Brigham Young Üniversitesi'ndeki (BYU) "Phage Hunter" adlı kursta öğrenciler tarafından çok sayıda *Paenibacillus* fajı izole edildiği bildirilmiştir (Merrill vd., 2018). Yost vd. (2018) tarafından dört *Paenibacillus* fajının daha (Halcyone, Heath, Scottie ve Unity) genomlarının 2018'de Brigham Young Üniversitesi'nde dizilendiği bildirildi. Stamereilers vd. (2018) tarafından, tüm genom dizileri GenBank'ta bulunan *P. larvae* fajlarının genomları analiz edildi ve bu fajlar sınıflandırılmaya çalışıldı. GenBank'ta mevcut olan diziler, *Paenibacillus* fajları olarak tanımlanır, ancak bazıları aynı zamanda *Brevibacillus* fajları (örneğin Abouo, Davies, Emery, Jimmer1 ve Jimmer2), bazıları da sadece bakteriyofaj Lily, Sitara, Redbud, Shelly, Rani veya Diva gibi grup şeklinde adı olmayan fajlar olarak isimlendirilmiştir.

Sheflo vd. (2013) tarafından Utah'ta arı kovanlarının yakınında, arı kalıntılarını içeren topraktan bakteriyofajlar izole edildi. İzole edilen Abouo ve Emery, Jimmer1, Jimmer2 ve Davies fajların tüm genomları sekanslanmış ve GenBank'a girilmiştir. Bu beş faj *Myoviridae* familyasında tanımlandı. Jimmer1 ve Jimmer2 aynı toprak örneğinden bağımsız olarak izole edildi ve genomik dizilerinde 54312 bp genomlarının sadece 80

bp'si kadar farklılık gösterdiği (% 99.85 benzerlik) bildirildi. Diğer Emery, Abouo ve Davies sırasıyla genom uzunlukları, 58572, 45552 ve 45798 bp uzunluğunda olduğu bildirildi. *P. larvae* fajlarının genom boyutu 35 kb (faj HB10c2) ile 58 kb (faj Emery) arasında değişmektedir. *P. larvae* fajlarının çoğu, orijinal olarak Diane, PBL1c ve Xenia gibi profajlardan indüklenenler de dâhil olmak üzere, kullanılan bakteri suşları üzerinde in vitro litik döngü yoluyla çoğalır (Stamereilers vd., 2018). Abouo, Davies, Jimmer1 ve Jimmer2 gibi *Myoviridae* fajları birbirine yüksek benzerlik gösterir. Örneğin Jimmer1 ve Jimmer2 arasında % 99.8 nükleotid benzerliği gözlenirken, Abouo ve Davies % 94,9 nükleotid benzerliği gösterdiği ancak Emery fajının diğer fajlardan farklı olduğu bildirilmiştir (Merrill vd., 2014).

Stamereilers vd. (2016) tarafından Diane, Fern, Harrison, Hayley, Paisley, Vadim, Vegas, Willow ve Xenia dokuz fajın karşılaştırmalı genomik analiz yapıldı; Diane, Vadim, Vegas ve Hayley fajlarının birbirine oldukça benzer olduğunu buldu. İkinci benzer çift Harrison ve Paisley, üçüncüsü Fern ve Willow, son olarak Xenia incelenen diğer fajlara benzemediği, ancak başka bir araştırma grubu tarafından izole edilen Shelly fajına benzer olduğu bildirilmiştir (Stamereilers vd., 2016).

Kovan taraklarından izole edilen bakteriyofaj *P. larvae* HB10c2'nin bir dizi *P. larvae* izolatlarına karşı olan litik aktivitesi araştırılmıştır. *P. larvae* HB10c2'nin genom dizisi belirlenmiş ve litik aktivitesinin yüksek olduğu belirtilmiştir. Bakteriyofaj HB10c2, morfotip sınıflandırılmasında *Siphoviridae* familyasında olduğu bildirildi (Beims vd., 2015).

Ribeiro vd. (2019), Guadalajara'da (İspanya) bir kovan çevresinden toplanan toprak örneğinden faj vB_PlaP_API480 (API480) izole edildiğini bildirmişlerdir. API480'in konak aralığını belirlemek için 68 *P. larvae* ve arı florasından oluşan bir seri (referans suşların da dâhil olduğu) bakteriye karşı test edilmiştir. API480 fajı, 61 alan suşunun % 69'unu enfekte ederek geniş bir litik spektrumu ortaya koyduğu ve diğer geri kalan suşlarda (% 31) ise herhangi bir etkinlik görülmediği bildirilmiştir. Bal arısı larvalarının ilk döneminde kommensal florada bulunan *Parasaccharibacter apium* ve *Lactobacillus kunkeei* ise faja karşı duyarlı olmadığı bildirildi (Ribeiro vd., 2019). *Paenibacillus larvae*'ları enfekte eden, API480 fajı (vB_PlaP_API480) bu bakteriyel türlerden bildirilen ilk podovirüstür. Morfolojik yapısı ise 58 nm ikozahedral kapsid ve 12 × 8 nm kısa, kontraktil olmayan kuyruğa sahip olduğu belirlendi. API480, 45026 bp, dsDNA

genomu üzerinde 77 kodlama dizisinin (CDS) olduğu; kütle spektrometrisi kullanılarak bu bölgelerin 47'si doğrulanmıştır. Genomik yapısı karşılaştırmalı olarak, API480'in 28 eşsiz proteine sahip olduğu için yeni bir tür olduğunu göstermektedir. *P. larvae* fajları arasında oldukça korunmuş olan lizis modülü, bir endolisin ve iki holin içerdiği öngörülmektedir. Bu fajın yüksek glikoz konsantrasyonlarına ve larva gastrointestinal koşullarına maruz kaldığında da kararlı olduğu belirlendi. Şimdiye kadar çalışılan, tüm *P. larvae* fajlarının (n = 48) ılımlı bir yaşam tarzına ve çoğunluğu (n = 40) geniş bir genetik benzerliğe sahip siphovirüs olduğu bildirilmiştir. Tek istisna, diğer *P. larvae* fajlarından oldukça farklı olan Halcyone kümesidir (n = 8) (Stamereilers vd., 2018). Genomik karşılaştırma analizinde, API480'in 28 eşsiz proteine sahip olduğu, proteinlerinin çoğunlukla Harrison ve Vegas kümeleriyle olmak üzere sadece 19'unu diğer *P. larvae* siphovirüsleriyle paylaştığını bildirmişlerdir (Ribeiro vd., 2019).

Literatürdeki *P. larvae* fajları Portekiz'de (Oliveira vd., 2013), Almanya'da (Beims vd., 2015) ve Amerika Birleşik Devletleri'nde (Merrill vd., 2014; Carsonn vd., 2015; Tsourkas vd., 2015; Abraham vd., 2016) izole edilerek genom dizileri belirlenmiştir. *P. larvae* faj genomlarının 35-55 kbp aralığında olduğu, çoğunluğunun ise 38-45 kbp aralığında olduğu bildirildi. Tüm *P. larvae* faj genomları, endolizin görevi gören korunmuş bir N-asetilmuramoil-L-alanin amidaz bölgesi içerdiği bildirilmiştir (Stamereilers vd., 2018).

Stamereilers vd. (2018) tarafından yayınlanan çalışmada *P. larvae* faj protein fonksiyonunu (1) virion oluşumu (2) yapısal (3) liziz proteinleri (4) DNA replikasyonu/metabolizması; (5) düzenleyici ve (6) konakla ilgili proteinler olarak sınıflandırılmıştır. Çalışmadaki NCBI GenBank'ta depolanan *P. larvae* faj genomunda üstünde (1) terminaz large subunit; (2) portal protein; (3) majör kapsid proteini (4,5) iki kuyruk düzeneği proteini; (6) kuyruk bandı ölçü proteini; (7) N-asetilmuramoil-L-alanin amidaz, (8) holin ve (9) çeşitli kuyruk proteini fonksiyonlarına sahip gen bölgelerini kodladığı bildirildi (Stamereilers vd., 2018).

Faj uygulaması, uygulama dozu belirlenerek profilaktik olarak veya AYÇ hastalığından sonra başarıyla kullanılabilir. Enfeksiyon oluşturulan larva denemelerinde faj uygulamasıyla hayatta kalım oranında artış olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Yost vd., 2013; Ghorbani-Nezami vd., 2015; Brady vd., 2017).

Bacillus thuringiensis, B. anthracis ve *B. cereus*'u da içeren bakteriler grubu önemli entomopatojenik türlerdir. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CS33 bakterisi, Lepidoptera ve Diptera türlerinin böcek larvalarına karşı oldukça toksiktirler (Yuan vd., 2011). Bu gruptan köken alan fajların genomları dizilenmiş, ancak *B. thuringiensis* kaynaklı *Siphoviridae* familyasında faj genomu hiç rapor edilmemiştir. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CS33, bakterisinden kaynak alan bu yeni BtCS33 fajının genomu sekans ve analiz yapılarak *B. cereus* grubundan kaynak alan diğer fajlarla kıyaslaması yapılmıştır. Şimdiye kadar bildirilen *B. thuringiensis* fajları *Podoviridae, Myoviridae* ve *Tectiviral* familyalara dâhildirler. BtCS33 fajı, *B. thuringiensis* fajları arasındaki ilk *Siphoviridae* familyasındaki faj olarak bildirilmiştir. Petri yüzeyinde plak morfolojisi küçük ve bulanık plaklar oluştururken, dar bir konakçı aralığına sahip olduğu bildirildi. BtCS33 fajı, 41992 bp'lik linear, çift zincirli bir DNA genomuna ve 57 varsayılan açık okuma çerçevesine (ORF) sahiptir. BtCS33 fajının yapısal proteinlerinin, aminoasit sekanslarının ve genom organizasyonunun *B. cereus* faj Wβ ve bazı Wβ varyantları ile yüksek benzerlik belirlenmiştir(Yuan vd., 2011).

1.3. Dünya'da ve Türkiye'de Arıcılığın Önemi

Arıcılık, dünyada yaygın yapılan tarımsal faaliyetlerden biri olmakla birlikte dünya genelindeki kovan varlığının %20'sinden fazlası Hindistan ve Çin gibi nüfus sayısı yüksek olan ülkelerde bulunmaktadır (Tablo 1). Türkiye ise 7748000 adet kovan varlığı ile dünya kovan varlığında en çok kovan sayısına sahip üçüncü ülke konumundadır (TEPGE, 2021). Bal üretimi 2019 verilerine göre dünya genelinde 1852598 ton olarak verilirken, Türkiye İstatistik Kurumu aynı yıl verilerine göre toplam bal üretimimizi 114067 ton olarak yayınlamıştır (Tablo 1). 2018 yılı verilerine göre ise toplam bal üretimi 112585 ton olarak verilmektedir. Ülkeler bazında bal üretimi bakımından ülkemiz, Çin'den sonra 114067 ton bal üretimiyle dünyada ikinci ülke konumunda yer almaktadır (TEPGE, 2021; TÜİK, 2021).

Tablo 1.Dünya bal üretiminde ülkelerin koloni sayısı ve bal üretim miktarı (TEPGE, 2019)

	Ülkeler	Koloni sayısı	Pay(%)	Ülkeler	Bal üretimi	Pay(%)
1	Hindistan	12247000	13,6	Çin	444100	24
2	Çin	9088000	10,1	Türkiye	114067	6,2
3	Türkiye	7748000	9	Kanada	80345	4,3
4	İran	7394000	8,7	Arjantin	78927	4

Dünyada kovan başına bal üretimi yaklaşık 20,7 kg civarında iken, bu değer ülkemizde kovan başına yaklaşık 14,3 kg'dır (FAO, 2013). Dünya kovan varlığında ilk sırada (%13,6) olan Hindistan'ın, 2019 yılı bal üretiminde sekizinci sırada (67141 ton) yer almasının nedeni, kovan başına düşen bal üretiminin düşük olmasıdır. Çin kovan başına bal verimi 48,9 kg iken Hindistan'ın kovan başına verimi ise 5,5 kg olarak gerçekleşmektedir (TEPGE, 2021).

Türkiye'de 2018 verilerine göre bal üretimi 119 bin ton olurken, bu rakamın 2023 yılı için 121 bin ile 125 bin ton aralığında olabileceği tahmin edilmektedir (TÜİK, 2021; TEPGE, 2021). Arıcılık faaliyetleri ortaya çıkan arı ürünleriyle ülke ekonomisine doğrudan katkı sağladığı gibi, tozlaşma faaliyetlerinde ve tarımsal üretimde kullanılması ile dolaylı bir katkı sağlayan önemli bir sektördür. Bal, bal mumu, arı sütü, arı zehri, propolis ve polen gibi ürünlerde yapılan araştırmalarla insan sağlığındaki önemi anlaşıldıkça gelişmekte olan bir sektör haline gelmiştir.

Türkiye kovan sayısının 2020 verileri göre en fazla olduğu üç il Muğla (900583), Ordu (573375) ve Adana (481557) olarak sıralanmaktadır. Bal üretiminin en fazla olduğu iller ise Ordu 17213 ton, Adana 12172 ton ve Muğla 6104 ton bal üretimi ile ilk üç sırada yer almaktadır (TÜİK, 2021). Bölgesel olarak incelendiğinde ise 2020 yılı bal üretiminde Doğu Karadeniz 23 bin 377 ton, Akdeniz Bölgesi 19 bin 973 ton ve Ege Bölgesi 13 bin 996 ton bal üretimi ile en çok bal üretimi yapılan bölgelerdir. Doğu Karadeniz'de üretilen bal miktarı 2020 yılında Türkiye balının %22,5'lik kısmına karşılık gelmektedir (TÜİK, 2021). Bu sayısal verilere göre ülkemizde arıcılık faaliyetlerinin ekonomiye olan doğrudan veya dolaylı katkılarının önemi anlaşılmaktadır.

1.4. Bal Arısı Hastalıkları

Dünyada koloni sayısı ve bal üretiminde ikinci ve üçüncü sırada olan Türkiye, bal ihracatında ise 2019 verilerine göre 22. sırada yer almaktadır. Dünya bal ihracatında ilk sırayı Çin (120845 ton), ikinci sırayı ise Arjantin (65357 ton) almaktadır. İklim şartlarının uygunluğu ve mevcut bitki tür ve çeşitlerinin %75'inin Türkiye'de bulunması arı yetiştiriciliği ve arı ürünlerinin üretimi konusunda büyük bir şans olarak görülmektedir. Farklı bölgelerinde dört mevsim arıcılık yapılabilen ender ülkelerden birisi olmasına rağmen verim kayıplarına bağlı düşük kârlılık sebebiyle istenilen katma değere ulaşılamamaktadır (Karacaoğlu, 2012). Uygun şartlar olmasına rağmen istenilen ekonomik değerin oluşturulamamasının nedenleri;

- Arıcılığın bilinçsizce ve eğitimsiz olarak yapılması,
- Arıcı birliklerinin yeterince örgütlenmemeleri,
- ilaç uygulamaları sonrası kalıntı problemleri,
- hastalık ve zararlılarının yeterince tanınmaması,
- bakım, teşhis ve tedavinin zamanında uygulanmaması gibi nedenler yer almaktadır (Borum, 2014).

Bal arılarında görülen, bakteriyel, paraziter, mantar kökenli ve viral hastalıklar arıcılık sektörü açısından oldukça önemlidir. Bal arılarında karşılaşılan bakteriyel ve mantar hastalıkları ve etkenleri Tablo 2'de verilmektedir (Shimanuki ve Knox, 2000; Uygur ve Girişgin, 2008). Ekonomik kayba neden olan bu hastalıkları saptamaya yönelik çok sayıda araştırma yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir (Balkaya vd., 2016).

Tablo 2. Bal arılarında görülen bakteriyel ve mantar hastalıkları.

Hastalık	**Etken**	**Etken Grubu**
Amerikan Yavru Çürüklüğü	*Paenibacillus larvae*	Bakteri
Avrupa Yavru Çürüklüğü	*Melisococcus pluton* *Paenibacillus (Bacillus) alvei* *Bacillus laterasporus* *Enterococcus faecalis*	Bakteri
Pudramsı Hastalık	*P. l. subsp. pulvifaciens*	Bakteri
Septisemi (kan zehirlenmesi)	*Pseudomonas apiseptica*	Bakteri
Kireç Hastalığı	*Ascosphaera apis*	Mantar
Taş Hastalığı	*Aspergillus flavus*	Mantar

Arıcıların hastalıklar konusunda yapılacak eğitimlerle bilinçlendirilmesi, hastalıkların yayılma ve önlenmesinde çok önemlidir (Şahinler ve Gül, 2005). Bal arısı ve larvalar üzerinde farklı etken gruplarının neden olduğu bu hastalıklar; koloni gelişimini engelleyen, yavru ve ürün verimini azaltan, kovan sağlığı üzerine doğrudan etki eden, zamanında gerekli önlemler alınmadığında ise kitlesel koloni ölümlerine sebep olan önemli bir problemdir. Son yıllarda dünya çapında arı kolonilerinin sayısında önemli azalmalar gözlemlenmiştir. Bir kolonideki işçi arıların çoğunluğunun ortadan kaybolmasına dayanan anormal bir durum olarak tanımlanan koloni çöküş bozukluğu (CCD) dikkat çeken önemli bir hastalıktır; kalan olgunlaşmamış arılara bakmak için yuvada sadece ana arı, bol miktarda yiyecek ve birkaç hemşire arı kalır (Van Engelsdorp vd., 2009; Van Engelsdorp ve Meixner, 2009). Arı yetiştiriciliğiyle uğraşan kişilerin hastalık ve zararlılarını tanımaları, kolonilerde meydana gelen olumsuz değişimleri önleyici ve koruyucu yöntemleri bilmeleri gerekmektedir. Bu konudaki bilgi ve birikimlerini uzmanlar tarafından yapılan eğitimlerle ve toplantılarla arttırmaları beklenmektedir. Bu hastalık ve zararlılarla mücadelede, yanlış zamanda bilinçsiz ve uygun dozda olmayan ilaç kullanılması sonucunda bal üzerinde ilaç kalıntıları oluşmaktadır. Gezgin arıcılık yapılması hastalık ve zararlıların hızlı şekilde yayılmasındaki önemli faktörlerden bir diğeridir. Özellikle yavru yetiştirme döneminde olumsuz hava koşulları nedeniyle arı hastalıkları daha fazla görülmektedir. Bu nedenle arıların ilkbahar döneminde yavru hastalıklarına karşı korunması için, koloni kontrollerinin daha sık yapılması, bal stoğunun kontrol edilmesi ve arıların üşütülmemesine özen gösterilmesi önem arz etmektedir (Shimanuki ve Knox, 2000).

Bal arıları, son yıllarda modern tarımdaki kimyasallar, bitki koruma ürünlerinin kullanımları, çevresel bozulma, farklı hastalıklara neden olan patojenler ve paraziter hastalıklarıda içeren çok fazla olumsuz faktöre maruz kalmaktadır (Cox-Foster vd., 2007; Dainat vd., 2012). Bu faktörler örtüşme ve etkileşime girme eğilimindedir, bu da onların sinerjik eylemlerinin, işçi arıların koloniden aniden kaybolması gibi arı kolonilerinde sağlık sorunlarına neden olabileceği anlamına gelmektedir.

1.4.1. Amerikan Yavru Çürüklüğü (AYÇ) hastalığı

Amerikan yavru çürüklüğü, bal arısı *Apis mellifera* ve diğer *Apis* türlerini larva evresinde etkileyen, kolonide yavru ölümüne sebep olan tehlikeli ve bulaşıcı bir hastalıktır. Arı hastalıklarının arasında en dikkat çekici olanlardan bir tanesi olup dünyanın hemen her yerinde görülen bir pandemik arı hastalığıdır (Yaşar vd., 2002; Evans., 2004; Genersch., 2010; Boligon vd., 2013). Aynı zamanda bu hastalık, pek çok ülkede olduğu gibi ülkemizde (3.06.2011 ve 639 sayılı Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı) de "ihbarı mecburi" hastalıklar listesinde yer almaktadır (Alippi ve Aguilar, 1998; Genersch., 2010).

Bakıcı ve besleyici arılar hastalık taşıyıcı olup kolonide hastalığa karşı en hassas birey ise ana arıdır. Hastalığın etkeni *Paenibacillus larvae* olarak adlandırılan, Gram pozitif sporlu bir basildir (Alippi ve Aguilar, 1998). *P. larvae*'nın spor formu ergin arılarda hastalığa sebep olmamakta, sadece spor hali larva aşamasında hastalık oluşturabilmektedir. Delikli, rengi koyulaşmış ve çökmüş petek gözlerinde hastalıktan ölmüş larva kadavralarını kolayca görmek mümkündür. Ölü yavru başlangıçta sulu ve hafif yapışkan, hastalık ilerledikçe yapışkanlık artmaktadır (Akmaz., 2001; Aydın vd.,,1999; Kılıç vd., 2010; Tsigouri., 2009). Etken patojen, White (1906) tarafından, enfekte olmuş larva başına bir milyardan fazla spor üretebilen Gram pozitif, spor oluşturan bir bakteri olan *Bacillus larvae* olarak tanımlandı (Shimanuki ve Knox 2000; Genersch vd., 2006; OIE (World Organization for Animal Health), 2018). Bulaşıcı sporlar, işçi arılar veya arıcılık uygulamaları yoluyla koloniler içinde veya arasında transfer edilir olduğu belirlendi (Sturtevant, 1932; Lindström vd., 2008a, b).

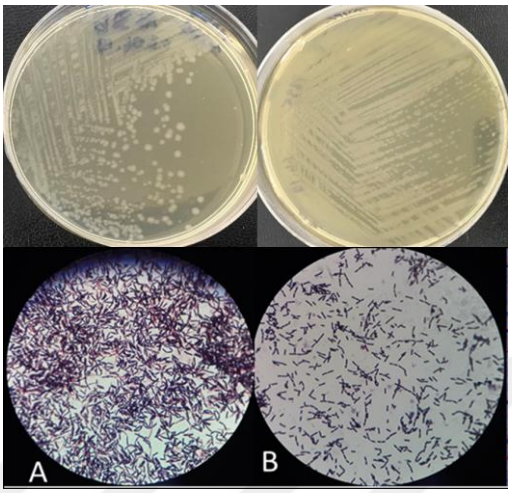
Bakteri sporları olumsuz koşullara, örneğin ısı ve kimyasal maddelere karşı dirençli olup uzaklaştırılması ya da dezenfekte edilmesi çok zordur (Genersch, 2010). Bu amaçla arıcılık ekipmanlarını konsantre çamaşır suyunda bekletme, alevden geçirme, yakma ya da otoklavda sterilizasyon yöntemleri önerilmektedir. Hastalığın yayılmasını önlemek ve kontrolünü sağlamak için pek çok ülke farklı önlemler alınmakta, hastalıklı kovanların imhasını içeren kanuni düzenlemeler bulunmaktadır. Bununla birlikte ABD başta olmak üzere bazı ülkelerde antibiyotik kullanılmasına izin verilmektedir. Antibakteriyel ilaçların kullanılması *Paenibacillus larvae* sporlarına karşı etkili olmaması, sadece klinik semptomları bastırdığı ve hastalığı maskelediği ortaya konulmuştur (Fuselli vd., 2006).

Antibiyotiklerin larva, ergin arı ve ana arılar üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu (Peng vd.,1992), patojenlerin zaman içerisinde başta sulfathiazole ve tetrasiklin olmak üzere pek çok antibiyotiğe karşı direnç geliştirdiği belirlenmiştir (Evans., 2004; Lodesani ve Costa, 2005; Miyagi vd., 2000).

Amerikan yavru çürüklüğü hastalığının seyri, larvaların *P. larvae* kontaminasyonlu gıda ile beslenmesi sonrasında 24-48 saat sonra meydana gelir (Crailsheim ve Riessberger-Galle, 2001). Enfeksiyondan kısa süre sonra larva ölümleri meydana gelmeye başlar (Ashiralieva ve Genersch, 2006; Lindström vd., 2008). Hastalık oluşumu; kontamineli gıdanın larva tarafından alımından 12 saat sonra *P. larvae* sporları ventrikulusta çimlenmeye ve üreyerek çoğalmaya başlar (Yue vd., 2008). Ventrikulusta hızla çoğalan *P. larvae* vejetatif hücreleri bağırsak duvarındaki peritropik zarı delerek vücut boşluğunu dolduran hemolenfe geçer. Besin miktarına bağlı olarak vejetatif formdaki hücreler spor formuna geçer. Enfeksiyondan dolayı ölmüş bir larvada 2.5 milyon civarında spor ortaya çıkmaktadır (Morse ve Flottum, 1997; Morse ve Nowogrodzki, 1990). Larva 53. saate ulaştığında ise *P. larvae* larvada artık hastalık oluşturamamaktadır. Bal arısı larvalarında LD_{50} dozu yaklaşık 35 adet *P. larvae* sporu olarak bildirilsede (Morse ve Flottum, 1997), yumurtadan yeni çıkmış larvada bir spor dahi hastalık oluşturabilme potansiyeline sahiptir. Larva yaşıda hastalığa karşı duyarlılıkta önemli bir faktördür. Larva ilk saatlerinde hastalığa karşı aşırı duyarlı iken, 32 saatlik olduğunda duyarlılık azalmış hastalık direnci artmış olur.

Paenibacillus cinsi bakteriler içerisinde arı hastalıklarına neden olan en önemli türü *P. larvae* olup, mikroaerofilik, Gram pozitif, düz çubuk ya da eğri çubuk şeklinde, 0.5-0.8 µm genişliğinde, 1.5-6 µm uzunluğunda sporlu basildir. Basilleri tekli, zincirli ya da filament şeklinde görünümlü basillerdir (Şekil 2). Kültür ortamı olarak kullanılan MYPGP (Mueller Hinton, maya özütü, pepton, glukoz ve sodyum piruvat) besiyerinde genel olarak R tipi gri renkli hareketsiz koloniler şeklinde gözlenmektedir (Genersch, 2003; de Graaf vd., 2013). Biyotiplerinde koloni morfolojisi farklılıkları gözlenmektedir. *P. larvae*'nın vejetatif ve spor olarak iki yaşam formu bulunmaktadır. Genç hücrelerinin içinde spor yapısı gözlenirken, yaşlanmış hücrelerde ise vejetatif kısım kaybolarak sadece spor formu gözlenir. Ergin arı ya da larvalar için vejetatif formun, bir tehlike oluşturmadığı bildirilmektedir. Fakat bu bakteri ileri safhada spor formuna dönüşür. *P. larvae* sporları, su banyosunda ısıtıldığında 90 °C'de 120 dakika, 100 °C'de 11-14 dakika,

ısıtılmış balda (100 °C) 30 dakika canlılığını koruduğu, 116 °C'de ise 20 dakikada öldüğü bilinmektedir. Ayrıca sporla kontamineli bir alanda toprakta 60 yıl, temel petekte 45 yıl, kovanda ise 33 yıl dormansi halinde canlı kalabilmektedir (Öncüer ve Benlioğlu, 1998).



Şekil 2. *P. larvae* koloni morfolojisi ve mikroskobik görünümleri(a) PB34, (b) P31B.

Geleneksel yöntemle kültür ve biyokimyasal testler ile tanımlanabilmektedir. Moleküler yöntemlerde ise spesifik 16S rRNA primerleri kullanılarak PCR yöntemiyle tanımlanmaktadır. *P. larvae* suşlarında ayrımların daha iyi analiz yapılabilmesinde ve hastalığın epidemiyolojik durumunun ortaya konulmasında son yıllardaki yeni teknik ve gelişmeler önemlidir (de Graaf vd., 2013). Yapılan çalışmalarda kesin ayrımı sağlaması nedeniyle en fazla tercih edilen yöntem tekrarlı elementlerin PCR amplifikasyonu (repPCR) metodudur (Versalovic vd., 1994; Genersch, 2003).

Bakteri genomu üzerinde enterobakteriyel tekrarlayan intergenik konsensus (ERIC) dizileri, tekrarlayan ekstragenik palindromik (REP) diziler ve (boxA, boxB ve boxC) box elemanları olmak üzere alt tiplendirme için rastgele dağılmış üç set tekrarlayan element grubu bulunmaktadır. Rep-PCR'da kullanılan primer yöntemine göre farklı genotip grupları oluşmaktadır. *Paenibacillus larvae* beş farklı genotip (ERIC I, II, III, IV ve V) olarak sınıflandırmada kullanılan ERIC1R/ERIC2 primer çifti bu bakımdan en kullanışlı primer çifti olarak ortaya çıkmaktadır (Genersch vd., 2006). Yüksek oranda korunmuş merkezi bir ters tekrar içeren, ERIC dizileri bakteri genomunun ekstragenik bölgelerinde bulunur. BOX elemanları diferansiyel olarak korunan modüllerden oluşur ve intergenik bölgelerde bulunur. *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* ERIC I ve II genotipleri içerirken; *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* ERIC III ve IV genotiplerini içerdiği belirlendi

(Heyndrickx vd., 1996). Son olarak ERIC V diye adlandırılan yeni genotip, İspanyol polifloral bal örneğinden izole edilmiş ve bu izolat (izolat 138b), daha önceki genotipler ERICI-IV olarak tespit edilemeyen bir boyutta 1.2 kbp'lik ek bir repPCR ürünü belirlenmiştir (Beims vd., 2020).

Avrupa ve Amerika kıtasında yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, yavru çürüklüğü hastalıklı kolonilerden ERIC I sıkça izole edilebildiği, ERIC II'nin ise Avrupa'da sınırlı olduğu bildirilmiştir. ERICIII/IV ise sadece birkaç suş kültür koleksiyonlarında mevcuttur (Genersch ve Otten, 2003; Genersch vd., 2006; Peters vd., 2006; Loncaric vd., 2009). Bu nedenle, *P. larvae* ERIC I ve II, pratikte en önemli iki genotiptir. Bu dört *P. larvae* genotipi farklı virulans fenotipleri göstermektedir. ERIC I'in enfeksiyon oluşturması için 12 gün gibi bir süre gerekmektedir. ERIC II–IV genotipleri enfeksiyon denemelerinde, ölüm süresi açısından larvalara karşı aşırı derecede virülent olduğu gösterilmiştir. Bu genotiplerle enfekte olan tüm larvaların yaklaşık 7 gün içinde öldüğü bildirilmiştir. ERIC II–IV genotipleri ERIC I genotipine göre larvaları öldürme açısından daha fazla virulanttır (Genersch vd., 2005, 2006).

1.4.2. Avrupa Yavru Çürüklüğü (AvYÇ) Hastalığı ve Etkenleri

Avrupa yavru çürüklüğü, larvalarda görülen bakteriyel bir hastalıktır. Ancak Amerikan yavru çürüklüğü kadar tahrip edici değildir. Hastalıklı larvalar beyazdan (sarı, turuncu ve açık kahverengiden koyu kahverengine kadar değişen) grimsi siyah renkte değişim veya bozulma-ekşi koku ile karakterizedir ve hastalığa yakalanan larvalar genellikle pupa aşamasına ulaşamaz. Hastalığın oluşmasında etken olduğu düşünülen bakteriler; *Melissococcus plutonius, Paenibacillus alvei, Paenibacillus dendritiformis, Bacillus pumilus, Brevibacillus laterosporus, Enterococcus faecalis* şeklinde sıralanabilir.

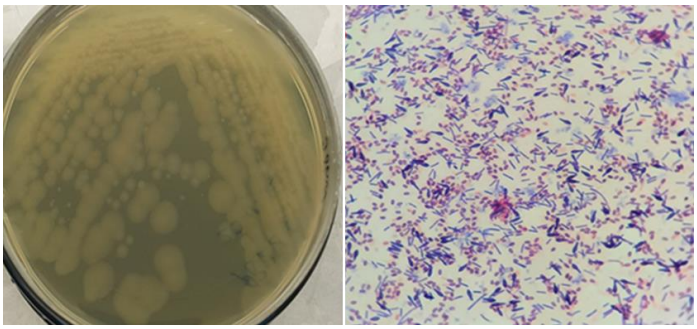
M. plutonius hastalığa neden olan Gram-pozitif ana etken olarak tanımlanırken (Bailey,1956; White, 1920) *Achromobacter eurydice*, *B. pumilus, B. laterosporus, E. faecalis, P. alvei, P. dendritiformis* (Erler, vd., 2014; Forsgren, 2010; Gaggia ve ark., 2015) gibi türler ikincil etkenler olarak literatürde bildirilmektedir. *P. larvae*'nin aksine spor formu bulunmayan *M. plutonius*'un vejetatif hücreleri tek başına, çiftler halinde veya çeşitli boyutlarda zincir şeklinde bulunan Gram-pozitif bir bakteridir (Genersch vd.,

2010). *M. plutonius* virulans faktörleri bilinmemekle birlikte ve AvYÇ patogenezisi hakkında bilinen bilgiler çok sınırlıdır. Bunun temel nedeni *M. plutonius* yapay besiyerlerinde ve koşullarda virulanslığını hızlıca kaybetmesi olarak görülmektedir. *M. plutonius* yapay koşullarda kültür edilmesi zor bir bakteri olarak değerlendirilmektedir.

A. eurydice, B. pumilus, B. laterosporus, E. faecalis, P. alvei, P. dendritiformis sekonder etkenler olarak bildirilmiştir ve bu etkenlerin *M. plutonius*'a göre kültür edilmesi daha kolaydır. Avrupa yavru çürüklüğü sekonder etkeni olarak bilinen diğer bakteri ise *Paenibacillus alvei*, Gram-pozitif, endospor formu oluşturan besiyerinde kayarak hareket (swarming) yapabilen bir bakteridir. Ayrıca *P. alvei* insanda da enfeksiyon oluşturabilmektedir (Reboli vd., 1989). Gaggia vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada ölü arı larvalarından *P. dendritiformis* izole ettikleri bildirildi. *P. dendritiformis* hastalık etkeni olabileceği tahmin edilmekte ancak bu konuda yapılmış çalışma olmadığı belirtilmektedir. *P. dendritiformis, P. vortex* ile birlikte koloni oluşumunda model organizmalar çalışmalarında kullanılmaktadır (Ingham ve Ben Jacob, 2008; Be'er vd., 2013).

P. dendritiformis, toprakta yaşayan rizosfer, böcek larvaları ve klinik örnekler gibi çeşitli heterojen ortamlarda bulunabilen, spor oluşturan bir mikroorganizmadır. Bakteri sporları subterminal konumlu, hücre morfolojisini bozan şişkin şekilde ve kültür ortamında 24-48 saatte bol spor oluşturabilmektedirler. *P. dendritiformis*'in zorunlu çevre şartlarında farklı koloniler ve karmaşık desenler oluşturması diğer türlere göre farklılık içermektedir. Pepton agar plakları üzerinde dallı, uçlara bölünen koloni morfolojisine (T morfotipi) ve 0.5-1.0 x 2.0-3.0 μm bakteri morfolojisine sahip izolatlar bulunmaktadır (Şekil 3). Kenarları belirgin kıvrılma düzenlerine sahip, ince dallar sergileyen (C morfotipi) bir kiral morfolojisine sahip 1.0-1.5 x 4.0-6.0 μm boyutlarında izolatlar da içermektedir. Farklı morfotipler arasında geçiş yapabilme kabiliyetiyle kendini gösterir (Tcherpakov vd., 1999).

Optimum büyüme sıcaklığı 37 °C olup fakültatif anaerobik, % 2-5'lik NaCl ortamında ve pH 5.0-7.5'de büyüyebilmektedir. Katalaz ve oksidaz aktivitesi pozitiftir. *P. larvae* suşlarından farklı mikroskobik ve kültürel özellik göstermekte olup nütrient agar besiyerinde aerobik şartlarda kolayca üreyebilmekte ancak *P. larvae* üretememektedir (Forsgren vd., 2013).



Şekil 3. *P. dendritiformis*'in koloni morfolojisi ve mikroskobik görüntüsü.

1.5. Arı Hastalıkları ile Mücadele

Amerikan yavru çürüklüğüne (AYÇ) karşı sürdürülebilir ve etkili bir mücadele, hastalığa dirençli bal arısı hatlarının geliştirilerek, yasaklı olan antibiyotik kullanımının tamamen ortadan kaldırılması olabilir (Spivak ve Reuter, 2001a). Koloni düzeyinde hastalığa karşı direncin en önemli göstergesi ise yetişkin arıların petekteki enfekte larvalara karşı gösterdikleri hijyenik davranıştır. İşçi arılar tarafından sergilenen bu hijyenik davranış, enfekte olan larvaların petekte bulunması ve petek gözlerinin açılarak enfeksiyonlu larvanın koloniden dışarı atılması şeklindedir. Hastalığa karşı direnç ve hijyenik davranış gösterme seviyesi farklı hatlardan gelen arılarda çeşitlilik göstermektedir (Spivak ve Gilliam, 1998 a,b). Koloni içerisinde gerçekleştirilen bu hijyenik davranış orta yaşlı arılar (15-20 günlük) tarafından yapılmaktadır (Arathi ve Spivak, 2000). AYÇ'ye karşı geliştirilen bu hijyenik davranış, arı hastalığına neden olan diğer hastalıklara (*Ascosphera apis*, Taş hastalığı) karşı da direnç oluşumunu göstermektedir (Palacio vd., 2010). Kolonilerde sergilenen bu hijyenik davranış ile varroa ve deforme kanat virüsünün (DWV) sebep olduğu hastalıkların yayılmasının da sınırlandırılabildiği bildirilmiştir (Al Toufailia vd., 2014). Yapılan ıslah çalışmaları ile sadece AYÇ için değil diğer hastalıklara karşıda dirençli arı ırkları geliştirilmesi, izlenen stratejilerden biridir.

AYÇ'ye karşı mücadelede temel olarak uçucu yağlar, probiyotikler ve propolis temel alınarak AYÇ'nin önlenmesi ve tedavisi için alternatif stratejiler araştırılmaktadır (Fuselli vd., 2006; Bastos vd., 2008; Daisley vd., 2020).

Bitkilerin tıbbi özellikleri, düşük toksisiteleri ve farmakolojik aktiviteleri nedeniyle *P. larvae*'ya karşı deneme çalışmaları yapılmaktadır (Auddy vd., 2003). Bu çalışmalarda, bitkilerden elde edilen fitokimyasalların faydalarına ve arı sağlığına etkilerine odaklanılmıştır. Bitkilerden doğal olarak elde edilen bu maddeleri, tek tek bileşikler, bileşik grupları veya uçucu yağlar şeklinde olabilirler. Uçucu yağların ve aromatik bitki özlerinin gıda ürünlerine doğrudan eklenmesinin, antioksidan veya antimikrobiyal etkisini gösterdiği bildirilmiştir (Carvalho Costa vd., 2015). Farklı bitkilerden elde edilen esansiyel yağ asitleri, *P. larvae* karşı yapılan *in vitro* çalışmalarda etkili sonuçlar vermiş ve bitkilerin ekstraktlarının bu patojenin kontrolünde izlenebilir bir yol olabileceği bildirilmiştir (Fuselli vd., 2006 ; Gende vd., 2010 ; González ve Marioli, 2010 ; Mărghitaş vd., 2011; Özkırım vd., 2012 ; Boligon vd., 2013). *P. larvae* türlerinin *in vitro* ve *in vivo* kontrolü ve ayrıca *Apis mellifera*'ya karşı akut oral toksisiteleri için bitkilerden elde edilen essansiyel yağ çalışmaları değerlendirilmiştir (Fuselli vd., 2019). Bu araştırmaların ana hedefi; tedavinin etkinlik düzeyinin yüksek olması, arı ürünlerinde kalıntı bırakmaması ve ergin arı sağlığının korunmasıdır. Doğal ürünlerden antibakteriyel etki gösteren allisin (Aronstein ve Hayes, 2004), Timol (Fuselli vd., 2006), esansiyel yağ asitleri (González ve Marioli, 2010 ; Boligon vd., 2013) gibi biyoaktif moleküller önemli yere sahiptir. Alternatif tedavi stratejisinde doğal kaynaklı antibakteriyel ürünlerin kullanılması düşüncesi yaygındır (Flesar vd., 2010 ; Maggi vd., 2011). Mărghitaş vd. (2011) *P. larvae* suşuna karşı dört bitkinin *Achillea millefolium* (Civanperçemi), *Ocimum basilicum* (Fesleğen), *Thymus vulgaris* (Kekik) ve *Urtica dioica* (Isırgan otu) fenolik ekstraktlarının test edildiğini ve tümünün etkili olduğunu bildirilmiştir. Flavon ve flavanoid bileşikleri yüksek olan *Ocimum basilicum* ve *Urtica dioica* bitkilerinin en etkili ekstraktlar olduğu bildirilmektedir. Boligon vd. (2013) *Scutia buxifolia* bitkisinin farklı (ham ekstrat, diklorometan, etil asetat ve n-bütanol) ekstraktlarının 6 adet *Paenibacillus* suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesinin test edildiğini ve aktivitelerinin 1.56-50 mg/mL aralığında olduğunu; diklorometan ekstraksiyonunun en iyi etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. González ve Marioli, (2010) tarafından yapılan çalışmada 10 farklı bitkinin sulu ekstraktları ve uçucu maddelerinin *P. larvae*'ya karşı test edildiği; *Eucalyptus cinerea* ve *Minthostachys verticillata* ekstraktlarının test edilen tüm *P. larvae* suşlarına etkili olduğu belirlendi.

AYÇ hastalığıyla mücadele için her ülkede farklı uygulamalar yürütülmektedir. Hastalık ya enfekte olmuş kolonilerin yakılması ya da antibiyotik kullanımıyla kontrol altına alınmaya çalışılmaktadır. Onay verilmiş bir antibiyotik olmamasından dolayı, hastalıklı kovanların yakılarak imhasını içeren kanuni düzenlemeler mevcuttur. AYÇ'ye karşı kullanılan bazı antibiyotikler ise; Tilosin, Tetrasiklin, Streptomisin ve sulfonamidler, Oksitetrasiklin hidroklorür (OTC), kloramfenikol veya sulfatiazol olarak sıralanabilir (Evans, 2004; Yoshiyama ve Kimura, 2009). Arjantin'de (Alippi ve Reynaldi, 2006) ve Kanada'da (Thompson vd., 2007) Oksitetrasiklin, ABD'de (FDA-CVM,2006) Tetrasiklin ile Tilosin, Meksika'da, Streptomisin ve sulfonamidler, Çin'de ise Kloramfenikol hastalığa karşı en sık kullanılmış antibiyotiklerdir. Florida ve New Jersey'deki çalışmalarda dirençli AYÇ izolatlarına karşı Tilosin ve Linkomisin'in, etkili olduğu bildirilmiştir (Kochansky vd., 2001). Tilosin, bal arıları için toksik olmadığı (Peng vd., 1992) ve Tilosine karşı *P. larvae* direnci bildirilmemiştir (Alippi vd., 2005). OTC'ye dirençli *P. larvae* büyümesini engellemek için üçüncü bir alternatif olarak Linkomisin önerilmekteydi (Kochansky vd., 2001). Yapılan çalışmalarla OTC direnci % 15.78, Tetrasiklin direnci % 21.05, Tilosin direnci % 7.8 ve Linkomisin dirençli izolatlar % 7.8 olarak bildirilmiştir (Krongdang vd., 2017). Birçok ülkede antibiyotik kullanımı yasak olmasına karşın arıcıların kovan kaybını göze alamadıklarından dolayı bazen profilaktik bazen de hastalık esnasında OTC gibi antibiyotikleri kullandıkları bilinen bir gerçektir. Bu durumda ise bal ve diğer arı ürünlerinde kalıntı antibiyotik tespiti nedeniyle bu ürünler özellikle AB ülkelerine ihraç edilememektedir. Ülkemizde balda zaman zaman tespit edilen bu tür kalıntılardan dolayı üretilen bal ürünlerinin büyük bir kısmı iç piyasada tüketildiği bilinen bir gerçektir.

1.6. Bakteriyofaj

Bakterilere spesifik olan ve bakterileri infekte eden viruslara bakteriyofaj denir. Bakteriyofajlar virusların genel özelliklerini taşırlar. Nükleik asit olarak DNA veya RNA'dan sadece birine sahiptirler. Bakteriyofajlar İngiltere'de Frederick Twort (1915) ve Fransa'da Pasteur Enstitüsü'nde Felix d'Herelle (1917) tarafından ortaklaşa keşfedilmiştir. Felix d'Herelle "Bakteriyofaj" terimini, bakteri yemek anlamında kullanmış ve virülent bakteriyofaj, duyarlı bir bakteri kültürünün rekabetçi bir şekilde

parçalanmasına neden olabileceğinden böyle adlandırılmıştır. Genellikle "faj" olarak da adlandırılırlar. Bakteriyofajlar, konakçı biyosentetik mekanizmasının bir kısmını veya tamamını kullanarak bakterilerin içinde çoğalan zorunlu hücre içi parazitleridir. Doğada yaygın olarak bulunurlar ve dışkı ve kanalizasyondan kolaylıkla izole edilebilirler (Weinbauer, 2004).

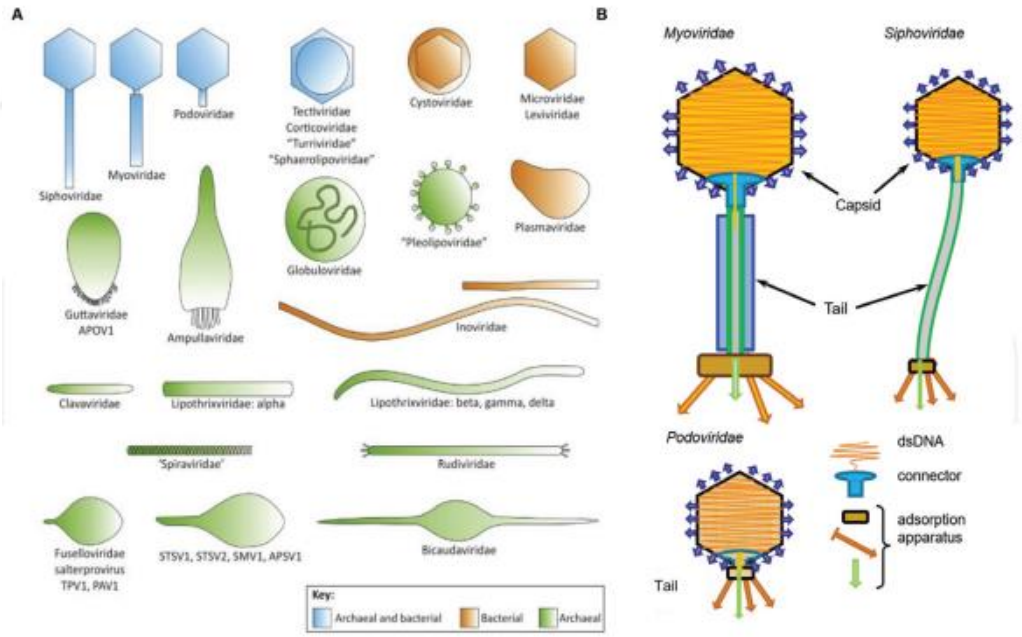
1.6.1. Bakteriyofajların Sınıflandırılması ve İsimlendirilmesi

Elektron mikroskobu çalışmalarındaki gelişmeler sonrasında, Bradley vd. (1967); nükleik asit tipine, konakçı aralığına ve morfolojik yapılarına (Forde ve Fitzgerald, 1999) göre fajları 6 basit tipe (A-F) ayırmıştır. 1971 yılından itibaren Bradley morfolojik sınıflandırılması olarak 6 faj morfotipi kabul edilmiştir. Sonraki yıllarda nükleik asit yapıları da dikkate alındığında "Ackerman sınıflandırma" modeli geliştirilmiştir.

Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV; International Committee of Taxonomy of Viruses) fajları nükleik asit yapıları ve morfolojilerine göre 14 aileye ayırmıştır (Ackerman, 2006; Tunail, 2009; Acar Soykut ve Tunail 2009a). Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV), virüsleri sınıflandırmak için bir sistem oluşturdu (https://talk.ictvonline.org/taxonomy/). ICTV'ye göre taşınabilir kriterler ile virüsler, aileye kadar sınıflandırılabilirken, kesin ayrıştırıcı bir kriter oluşturulamadığı için cins ve tür bazında ayrımı yapılamamaktadır. Nükleik asit yapısı, DNA-DNA hibridizasyonu, nükleotit veya aminoasit dizilimleri gibi parametreler sınıflandırma için kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, DNA sekans analizleri, konakçı özgüllükleri, restriksiyon endonükleaz kesim analizi, yapısal protein içerikleri gibi sonuçlara dayandırılarak sınıflandırma yapılmaktadır (Tablo 3). Elde edilen sonuçlar diğer çalışma sonuçları ile karşılaştırılmaya çalışılmaktadır (Acar Soykut ve Tunail 2009a).

Genom bir veya çok parçalı olabilir ve faj kapsidi içinde, çeşitli morfolojilerde bulunur: ipliksi fajlar, lipit içeren bir zarfa sahip fajlar ve partikül kabuğunda lipitlere sahip fajlar şeklinde gözlenebilmektedirler (Şekil 4a). Yaklaşık 5500 bakteriyel virüs, elektron mikroskobu (EM) ile karakterize edilmiştir (Ackerman, 2006). Virüslerin şekli, genomlarıyla yakından ilişkilidir ve büyük bir genom, büyük bir kapsidi ve dolayısıyla daha karmaşık bir organizasyonu gösterir. Tek veya çift sarmal olabilen ve parçacıkları, hücre moleküler metabolizmasını virüsler lehine değiştirmekten sorumlu olan ek

proteinleri ve dolayısıyla kendi kendine bir araya gelme süreci hakkındaki bilgileri oluşturan proteinler hakkında bilgi içeren DNA veya RNA genomları vardır. En çok çalışılan faj grubu, kuyruk tipine göre sınıflandırılan kuyruklu fajlardır (Caudovirales takımı). *Siphoviridae*'nin kontraktil olmayan uzun bir kuyruğu, *Podoviridae*'nin kontraktil olmayan kısa bir kuyruğu ve *Myoviridae*'nin karmaşık bir kontraktil kuyruğu var olduğu bilinmektedir (Şekil 4b). Fajların isimlendirilmesinin Kropinski vd. (2009) tarafından tanımlanan faj terminolojisine göre yapılması önerilmektedir. Böylece fajların adlandırılmasındaki benzerliklerin, kafa karışıklığının ve tuhaf isimlendirilmenin önüne geçilmesi amaçlanmıştır. Adlandırmada kurala göre bakteriyi enfekte ettiğini vB kısaltması ile, enfekte ettiği konak bakteriyi Pla (*Paenibacillus larvae*), dahil olduğu familyayı M (*Myoviridae*), S (*Siphoviridae*) veya P (*Podoviridae*), son olarakta verilen izolasyon kodunun yazılması şeklindedir. Örnek isimlendirme; vB_PlaM_SV21 (*Paenibacillus* faj SV21), vB_PlaM_Pd22F (*Paenibacillus* faj Pd22F) şeklinde isimlendirilir.

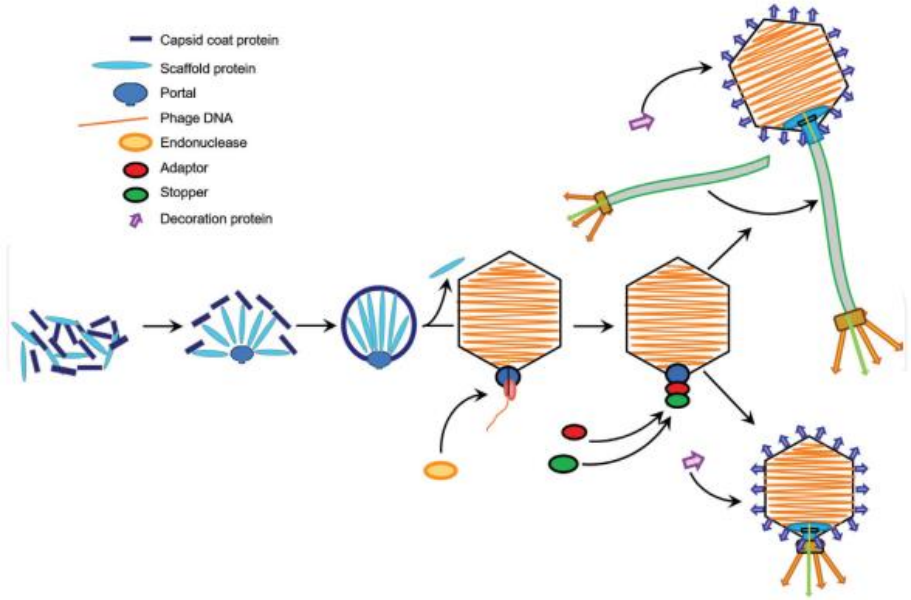


Şekil 4. Virüslerin morfolojik sınıflandırılması (a) Prokaryot bakteriyofaj morfotiplerinin temsili görünümleri (Pietilä vd., 2014), (b) Caudovirales ailesi üyelerinin görünümleri (Orlova, 2012).

Tablo 3. Fajların özellikleri ve sınıflandırılması (Ackerman, 2006).

Morfoloji	Nükleik Asit	Takım Ve Familya	Cins	Örnek	Üye	Özellikleri
Kuyruklu	DNA, ds, L	Caudovirales	15		4950	
		Myoviridae	6	T4	1243	Kontraktil kuyruk
		Siphoviridae	6	λ	3011	Uzun kuyruk
		Podoviridae	3	T7	696	Kısa kuyruk
Polihedral	DNA, ss, C	*Microviridae*	4	ϕX174	40	Lipid içeren kompleks
	ds, C, T	*Corticoviridae*	1	PM2	3	Kapsid
	ds, L	*Tectiviridae*	1	PRD1	18	Lipoprotein kaplı
	RNA, ss, L	*Leviviridae*	2	MS2	39	Kapsid
	ds, L, S	*Cystoviridae*	1	ϕ6	1	Lipid zarf
Filamentöz	DNA, ss, C	*İnoviridae*	2	FS	57	Uzun veya kısa
	ds, L,	*Lipothrixviridae*	1	TTV1	6?	filament
	ds, L,	*Rudiviridae*	1	SIRV1	2	Lipid zarf veya TMV benzeri yapı
Pleomorfik	DNA, ds, C, T	*Plasmaviridae*	1	L2	6	Kapsid yok, lipid zarf
	ds, C, T	*Fuselloviridae*	1	SSV1	8	Kapsid yok, limonformlu

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



Şekil 5. Fajların Self-assembly yolu görsel anlatımı (White ve Orlova, 2019).

Kapsid/iskele kompleksinin çoklu kopyaları, prokapsidi oluşturmak için portal proteini bağlar; daha sonra, yapı iskelesi proteinleri çıkarılır ve DNA, olgun kapsidin boyutuna genişleyen prokapsid içine paketlenir. Baş tamamlama proteinleri (durdurucu

ve adaptör), DNA sızıntısını önleyen portal kompleksine bağlanır. Daha sonra, dekorasyon proteinleri kapside bağlanır (Şekil 5) Ayrı olarak veya DNA paketlemesinden sonra bir araya getirilen kuyruk eklenir; böylece nihai bulaşıcı faj üretilir. Önceden birleştirilmiş kuyruk *Myoviridae* ve *Siphoviridae*'de takılırken, *Podoviridae*'de kuyruk durdurucuda toplanır (White ve Orlova, 2019).

Fajlar farklı şekil ve boyutlara sahip olabilir (Şekil 4a). En çok çalışılan grup, bir dsDNA genomuna sahip kuyruklu fajlardır ve aynı zamanda en büyük grubu temsil eder (Şekil 4b). Kuyruklu fajların üç ana bileşeni vardır: genomun paketlendiği bir kapsid, enfeksiyon sırasında genomun konakçı hücreye transferini sağlamak için bir boru görevi gören bir kuyruk ve kuyruğun en ucunda konakçı hücreyi tanıyacak ve içine nüfuz edecek özel bir yapışkan sistem (adsorpsiyon aparatı). Faj üretimi için hücre kaynakları kullanılır. Fonksiyonel bir faj, enfeksiyondan sonra konakçı hücre tarafından üretilen gerekli tüm proteinlerle başlayan çok aşamalı bir sürecin sonucudur: kapsid, portal, kuyruk, yapı iskelesi, terminaz, vb. (Şekil 5) yapılar oluşturur.

Kuyruğun distal ucunda bulunan adsorpsiyon aparatı, konak hücrenin bir reseptörünü veya zarf kimyasını tanır ve hücre sitoplazmasına genom iletimini sağlar. *Myoviridae* ve *Siphoviridae*'de kuyruk, konak tanıma cihazının kuyruğun sonunda yer aldığı bir dizi yığılmış halkadan oluştuğu belirlenmiştir. *Podoviridae*'de adsorpsiyon aparatı hemen "Baş-kuyruk arayüzü" bölgesine bağlanır. Adsorpsiyon aparatı, birçok fajda konak hücreye sıkı bir bağlantı sağlayan fibriller tarafından çevrilidir (Şekil 5) (White ve Orlova, 2019).

1.6.2.Bakteriyofaj Çalışmalarında Kulllanılan Bazı Biyoinformatik Programlar

RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) açıklama motoru, bakteri ve arkea genomlarına açıklama (Annotation) eklemek için 2008'de oluşturulan bir platformdur. Genomik özellikleri (yani protein kodlayan genler ve RNA) tanımlamak ve işlevlerine açıklama eklemek için standart bir yazılım hattı sunarak çalışır.

Prokaryotik virüslerin tüm nükleotid ve proteom dizilerinden filogenetik çıkarım için bu çalışmada belirlenen GBDP parametrelerinin en iyi kombinasyonu, bağımsız web hizmeti 'VICTOR', "Virus Classification ve Tree Building Online Resource" kullanıldı. Sonuçları, dal destekli filogenomik ağaçları içerir ve takson sınırları için önerilerle

desteklenirek böylece bilinçli bir taksonomik karar ortaya konulabilir (https://victor.dsmz.de) (Meier-Kolthoff vd., 2013; Meier-Kolthoff ve Göker, 2017).

VIRIDIC, virüslerin intergenomik benzerliklerini hesaplamak için Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) tarafından kullanılan geleneksel algoritma uygulanarak geliştirilmiştir (Moraru vd., 2020). VIRIDIC programı, özellikle Bakteri ve Arkea virüsleri göz önünde bulundurularak, intergenomik benzerlikleri hesaplamak için geleneksel algoritma kullanılarak ICTV tarafından geliştirilmiştir. Cins ve tür düzeyinde kümeleri tanımlamak için intergenomik benzerlik hesaplanır. *Paenibacillus* faj genomları arasındaki ikili intergenomik mesafeler ve benzerlikler, VIRIDIC (Virus Intergenomic Distance Calculator) web sunucusu kullanılarak hesaplanır.

ViPTree sunucusu, tBLASTx tarafından hesaplanan genom çapında dizi benzerliklerine dayalı olarak viral genom dizilerinin "proteomik ağacını" oluşturur. ViPTree, esnek bir şekilde seçilmiş referans viral genomlarla birlikte yüklenen genomlar için proteomik ağaçlar oluşturur. Proteomik ağaç yaklaşımı, metagenomlarda tanımlananların yanı sıra yeni dizili virüslerin genomlarını araştırmak için etkilidir.

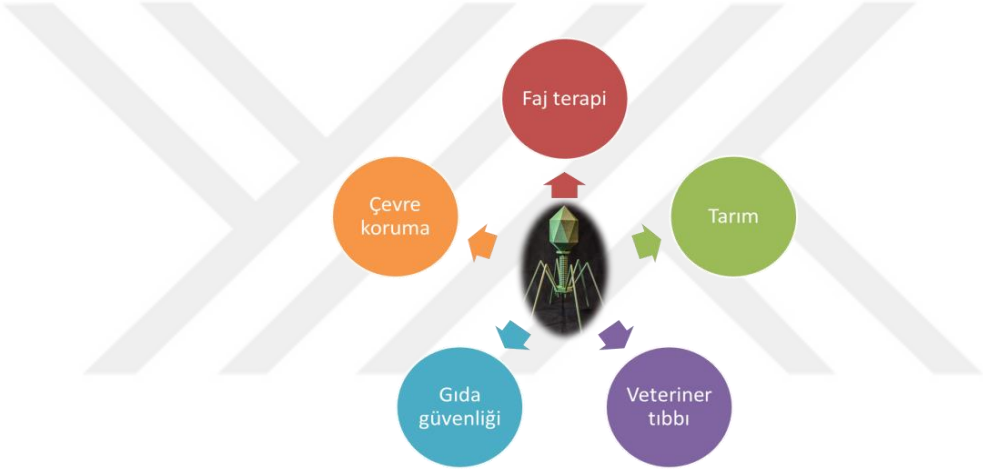
VIRFAM, faj genomlarındaki baş-boyun-kuyruk modüllerinin ve rekombinaz genlerinin tanınmasına dayanmaktadır. Bu sunucu, bakteriyofajların protein dizileri içinde belirli protein ailelerinin uzak homologlarını aramak için kullanabilmektedir (http://biodev.extra.cea.fr/virfam/.). VIRFAM sunucusu fajların otomatik olarak sınıflandırılmasına izin verdiğinden, viromların atanmasını ve bakteriyel metagenomik örneklerden fonksiyonel fajların saptanmasını kolaylaştırmaktadır (Lopes vd., 2014).

1.7. Bakteriyofaj Terapisi ve Güncel Uygulamalar

Geleneksel antibiyotik uygulamalarının yerini alması veya tamamlayıcı tedavi için önerilen antimikrobiyaller arasında, bakteriyofajlar ve faj türevi proteinler (topluca faj tedavisi olarak bilinir), insan bakteriyel enfeksiyonlarının tedavisi için en güçlü adaylardandır (Sulakvelidze ve Morris, 2001). Enfeksiyonların ortaya çıkma riski, artan ilaç direnci ve antibiyotik kullanımını azaltma çabaları gibi nedenlerle uluslararası sağlık kuruluşları antibiyotikler yerine diğer preparatlarla değiştirmeye çalışmaktadır. Bu çabalar, 18 Ağustos 2006'da *L. monocytogenes*'e karşı bir antibakteriyel madde olarak *L. monocytogenes*'e özgü bir bakteriyofaj süspansiyonu olan 102-LMP™'nin (Intralytix

Incorporated, USA), FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanması ile sonuçlandı. Bu ürünün 170'den fazla *Listeria* spp. suşunu başarıyla öldürdüğü tahmin edilmektedir (Housby ve Mann, 2009). Bu şirket, USDA ve FDA tarafından *Listeria* ürünü LISTEX™ P100, tüm Gıda Ürünleri için GRAS (Genel Olarak Güvenli Olarak Tanınan) statüsüne ulaşmıştır (Housby ve Mann, 2009).

Faj terapi uygulamalarının başarılı sonuçlarının yayınlanmasının ardından, bu yaklaşım tarım, veterinerlik, gıda güvenliği ve atık su arıtma gibi diğer alanlara da hızla yayıldı (Şekil 6) Tarımsal gıda süreci bağlamında, tüm gıda zinciri boyunca (çiftlikten çatala) gıda güvenliğini sağlamak için faj ve faj litik proteinleri birlikte kullanılabilir (García vd., 2008).



Şekil 6. Fajların ve faj kaynaklı litik proteinlerin uygulama alanları.

Hayvanlarda enfeksiyon hastalıklarının kontrolü için faj tedavisinin etkinliğini ve potansiyelini gösteren çeşitli çalışmalar vardır (Richards, 2014; Carvalho vd., 2017; Doss vd., 2017; Wernicki vd., 2017). Ayrıca, bir ABD şirketi kümes hayvanlarında *Salmonella* (PLSV-1^{TM}) ve *Clostridium perfringens*'e (INT-401^{TM}) karşı etkili olan bakteriyofaj bazlı hayvan sağlığı ürünleri geliştirmiş ve lisanslamıştır (Fernández vd., 2018). Hayvancılık tesislerinde ve gıda endüstrilerindeki yüzey dezenfeksiyonundaki biyositler ve antibiyotikler arasındaki çapraz direnç varlığı nedeniyle antimikrobiyal direncin ortaya çıkmasının bir kaynağını oluşturmaktadır (Hernández vd., 2011). İki ABD şirketi yüzeylerin dezenfeksiyonu için *Salmonella* (BacWashTM) ve *E. coli* O157:H7'ye "FinalyseTM" gibi ürünleri ticarileştirmiştir. Yüzey dekontaminasyonunun yanı sıra fajlar gıdalarda biyo-koruyucu olarak uygulanabilir.

Bu uygulamalar, düzenleyici perspektiften yasal olarak daha karmaşık görünse de, günümüzde ABD'de gıda katkı maddesi olarak tasarlanan çeşitli faj ürünleri ticari pazarlarda yer almaktadır. *Listeria monocytogenes* (ListshieldTM), *Salmonella enterica* (SalmoFreshTM) ve *Escherichia coli*'e (EcoshieldTM) karşı faj preparatları, gıdaya doğrudan uygulanması için FDA tarafından GRAS (Generally Recognized As Safe) olarak onay almış ve ticari olarak temin edilebilmektedir. Ayrıca son zamanlarda, *L. monocytogenes*'i çiğ balıktan uzaklaştırmak için PhageGuard Listex isimli üründe 2012 yılında değerlendirilmiştir. Çalışmada EFSA (European Food Safety Authority), bakteriyofajların tüketiciler için zararsız olduğu sonucuna varmıştır. Son olarak, bakteriyofajlar birçok ülkede gıda işleme ve işletmelerinde yardımcı materyal olarak onaylanmıştır. Aslında, *L. monocytogenes* (PhageGuard Listex) ve *Salmonella*'ya (PhageGuardS) karşı bu tür iki ürün şu anda mevcuttur. Her iki ürün de yüzeylerin dekontaminasyonu için kullanılabilir (Fernández vd., 2018).

Avrupa Birliği'nde ise fajların dezenfektan olarak veya hayvanlarda ve bitkilerde bulaşıcı hastalıkların tedavisinde profilaktik olarak kullanılmasına izin veren herhangi bir düzenleme yoktur (Verbeken vd., 2014; Kutter vd., 2015). Amerika Birleşik Devletleri'nde USDA, FSIS Direktifi 7120.1 kurallarını karşıladıkları sürece, çiftlik hayvanlarına kesimden önce faj uygulanmasına izin verilirken, İsrail, Kanada, İsviçre, Avustralya ve Yeni Zelanda gibi ülkelerde benzer düzenlemeleri uygulamaktadır (Fernández vd., 2018).

1.8. Veterinerlikte Bakteriyofaj Uygulamaları

D'Herelle tarafından (1919), kümes hayvanı tavuklarda tifo'nun başarılı bir şekilde tedavi edilmesiyle hayvanlarda faj tedavisi ilk kez test edildi. Uygulama yapılan hayvanlarda hayatta kalım oranı tedavi edilmemiş kontroller için % 0-25'e, faj ile tedavi edilen kuşların hayatta kalma oranının % 95-100'ü olarak bildirildi.

Clostridium perfringens ile deneysel olarak enfekte edilmiş piliç tavuklarına (0 ila 42 günlük) oral gavaj veya içme suyu ile 10^5 PFU/mL'de beş faj kokteylinin oral yoldan uygulanmasının, tedavi edilmeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında mortalite'nin %92 azalma ile sonuçlandığı bildirildi (Miller vd., 2010). Ayrıca 0-42 gün periyodunda, kullanılan spesifik kokteylin (INT-401) hem suda faj grubunda (2.618 ± 0.059 kg) hem

de beslemede faj grubu (2,547 ±0,059 kg), tedavi edilmeyenle karşılaştırıldığında (2.296 ± 0.059 kg) faj grubunda ağırlık artışı ve yem dönüşüm oranlarını arttırdığı sonucuna varılmıştır. Bakteriyofaj uygulamasının *C. perfringens*'in neden olduğu nekrotik enteriti kontrol etmek için etkili bir tedavi olabileceği bildirildi (Miller vd., 2010).

Tavuklarda *Campylobacter*'i azaltmak için aday olarak kullanmak üzere tavuk dışkısından izole edilen 53 faj izolatından CP8 ve CP34 fajları, geniş bir konakçı aralığı temelinde seçilmiştir. Tavuklar, 18 ila 20 günlükken ağızdan gavaj yoluyla çeşitli dozlarda (2.7 ila 7.8 log10 CFU) *C. jejuni* izolatları HPC5 ve GIIC8 ile deneysel olarak enfekte edilmiştir. Tek bir faj tedavisi (5-9 log10 PFU) 25 günlükken oral gavaj ile uygulanmıştır. Fajlar $\geq 10^7$ PFU'da uygulandığında, fajla tedavi edilen kuşların üst bağırsaklarındaki *C. jejuni* sayıları 0,5 ile 5 log10 CFU/g arasında azaldığı bildirilmiştir (Loc-Carrillo vd., 2005).

Kolibasilloz hastalığına karşı antibiyotik ve faj tedavisinin potansiyel sinerjisi araştırıldı. Yedi günlük olan 10 civcivden oluşan gruplara sol torasik hava kesesine 6×10^4 cfu/mL *E. coli* enjekte edildi. Bunu hemen iki fajdan birinin doğrudan uyluk kasına enjeksiyonu takip etmiştir (sırasıyla, DAF6 veya SPR02 fajlarının mL'si başına $3.7x10^9$ ve $9.3x10^9$). Enrofloksasin, *E coli* uygulamasından hemen sonra başlayarak, ardışık 7 gün boyunca 50 ppm'de kuşların içme suyuna katılmıştır. Tedavi edilmeyen kontrol grubu için yüksek mortalite (% 68) kaydedilmiştir. Bu, fajla tedavi edilen grupta %15 ölüm, Enrofloksasin ile tedavi edilen grupta %3 ve hem faj hem de antibiyotik ile tedavi edilen kuşlar için % 0 olarak bildirilmiştir. Bu sonuç geliştirilmiş etkinlikle faj ve antibiyotik birlikte kullanıldığında her iki terapötik ajan arasında sinerji oluşumunu önermesine yol açmıştır (Huff vd., 2004).

Sucul organizmalar Aeromonosis ve Pseudomonosis gibi birçok bakteriyel hastalığa yatkındır ve bu nedenle su çiftliklerinde ekonomik olarak zararlı etkilerden (yüksek ölüm, azalan büyüme vb.) kaçmak için antibiyotik tedavisi gerektirir. Bakterilerde giderek artan antibiyotik direnci sorunu göz önüne alındığında, faj tedavisi geniş uygulama alanı bulabilmektedir (Nasibullin vd., 2013). Aeromonoz tedavisinde faj tedavisi kullanılabilir. Faj tedavisinin standart tedaviye göre avantajları arasında, fajların hayvan için toksik olmadığı (örn. bağışıklık sistemi baskılanmaz ve bakteri florası zarar görmez) ve fajlar sadece belirli bir patojene karşı aktif olduğu (yüksek özgüllük)

bilinmektedir. Bu nedenle, faj tedavisinin aeromonoz tedavisinde avantajı vardır.

Faj tedavisinin, yavru deniz kralı balıklarını intraperitoneal olarak *Lactococcus garvieae* ile enfekte edildikten sonra *L. garviae* fajlarını intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Sonuç olarak, faj tedavisi gören balıkların % 100'ü hayatta kalırken, kontrol grubundaki balıkların sadece %10'unun hayatta kaldığı bildirilmiştir (Nakai vd., 1999).

Pseudomonas plecoglossicida, balıklarda hemorajik asitlere neden olan fırsatçı su patojenidir. İki haftalık bir deneyde, balıklara ağızdan *P. plecoglossicida* (10^7 cfu/g) bulaştırıldı ve bunun üzerine ilgili fajlarla (10^7 pfu/g) beslenmiştir. İlk haftadan sonra, kontrol gruplarındaki balıklar ölmeye başlamış ve sonunda % 65'lik bir ölüm oranına ulaşırken, faj uygulaması yapılan gruplarda ölüm oranının % 23'ü geçmediği bildirilmiştir. Faj uygulamasının yapılması, günlük ölüm oranını kontrol gruplarına göre 14 gün sonra üç kat azaltarak % 5'e düşürmüştür (Sulakvelidze ve Kutter, 2005).

Amerikan yavru çürüklüğü ve fajlarla ilgili bilgi ve yapılan çalışmalar çok az sayıda ve bilgi sınırlıdır. *P. larvae* NRRL B-3650 suşu sporları ile yapay olarak beslenerek bal arısı larvaları enfekte edilmiştir. Fajla tedavi edilen larvalar için hayatta kalma oranları, bakteri sporları ile enfekte olmamış larvalarla (% 84) yaklaşık olarak aynı olduğu, yani fajların larvalar üzerinde hiçbir zararlı etkisi olmadığı gözlenmiştir. Ek olarak, larvaların spor enfeksiyonundan önce fajlarla profilaktik tedavisi, enfeksiyondan sonra fajların uygulanmasından daha etkili olduğu gözlenmiş, ancak her iki durumda da hayatta kalma oranı tek başına sporlarla enfekte olanlardan % 45 daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Ghorbani-Nezami vd., 2015). Ancak bu çalışma fajların optimal kombinasyonunu ve konsantrasyonunu belirlemek için daha fazla deney ve gerçek kovan koşullarının test yapılması gerekmektedir.

AYÇ'ye karşı tek bir faj yerine çoklu fajlardan oluşan bir kokteylin kullanılması, faj direnci geliştirme potansiyelini de azaltır. AYÇ ile enfekte olmuş bir kovandan bir *P. larvae* suşu izole edilerek faj testine tabi tutulabilir. Bu da verimli bir tedavi veya profilaksi tasarımına olanak tanır; bir kokteylin faj bileşenlerini ayarlama esnekliğinin, tedavi etkinliğinin başarısını da arttıracağı düşünülmektedir (Yost vd., 2016).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizmalar, 2014-2016 yılları arasında yüksek lisans tezlerinde izole edilerek geleneksel ve moleküler olarak tanımlanmış bakterilerdir. Mikroorganizmalar hastalık şüpheli temel petek, bal, bal mumu, ölü arı ve larva örneklerinden izole edildi (Baş ve Karaoğlu, 2015; Pınarbaş ve Karaoğlu, 2017). Hastalık şüpheli örnekler Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden temin edildi. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Biyoloji bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarının kültür koleksiyonundan yeniden canlandırılarak kullanıldı. Ayrıca kullanılan referans suşlar uluslarası kültür koleksiyonlarından ticari olarak temin edildi. Arı mikrobiyotasında yer alan bakteriler ise sağlıklı bal arısı ve larvalarından izole edilen bakterilerdir. Çalışmada kullanılan DNA izolasyon kiti, elektron mikroskobunda kullanılan karbon kaplı bakır gridler, besiyerileri ve kimyasal maddeler ticari olarak temin edildi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Bakterilerin Canlandırılması

Çalışmada profaj varlığını belirlemek için *Paenibacillus larvae, P. dentritiformis* suşları kullanıldı. Konakçı aralığını belirlemek için *Paenibacillus* türleri, referans suşlar (*P. larvae* ERIC I, II, III ve ERIC IV, *Lactobacillus casei* RSKK 591, *Bacillus subtilis* ATCC 6633) ve laboratuvar kültür koleksiyonundaki (*P. alvei* ve *Melisococcus plutonius*) bakterileri kullanıldı. Bakterilerin canladırılması için MYPGP agar ve sıvı besiyerileri kullanıldı. MYPGP agar besiyeri içeriği; Mueller-Hinton sıvı besiyeri (10 $g.L^{-1}$), yeast ekstrakt (15 $g.L^{-1}$), K_2HPO_4 (3 $g.L^{-1}$), glukoz (% 2) (Merck), and Sodium-piruvat (1 $g.L^{-1}$) (Fisher Scientific), Agar (14 $g.L^{-1}$) hazırlandıktan sonra 121 °C'de 25 dakika otoklavda steril edildi. Bakteriler MYPGP agar besiyerinde ekimi yapıldıktan sonra % 5 CO_2 inkubator, 37 °C'de 2-3 gün inkübe edildi (De Graaf vd., 2013). Deneylerde taze kültürlerinin kullanılmasına özellikle dikkat edildi.

2.2.2. Bakteriyofaj İndüksiyonun Yapılması

Bakteriler, MYPGP agarda canladırıldıktan sonra bir gece MYPGP sıvı besiyerinde 120 rpm'de çalkalamalı inkübatorde inkube edildi. Bir gecelik taze kültürleri hazırlanan *P. larvae* suşlarının bakteriyofaj indüksiyonu Mitomisin C ile yapıldı (Bradley, 1967; Kılıç vd., 1996). Taze kültürden MYPGP sıvı besiyeri içine 1/100 oranında bakteri kültür ilavesi yapıldı. Yaklaşık 2-4 saat (OD_{600} nm=0,4) inkübasyondan sonra mid-log safhasına gelen bakteri kültürü içerisine son konsantrasyon 0,2 µg/ml olacak şekilde Mitomisin-C ilave edilerek 2-24 saat arasında 120 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Mitomisin-C ile indüklenmiş kültürlerin inkübasyon süresince takip edilerek kültürlerin tamamen liz olması besiyerinin berraklaşması ile belirlendi. Lizis gözlenen tüm kültürlerden 3 ml ependorf tüplerine alınarak 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve 0.45 µm steril tek kullanımlık filtreler vasıtasıyla süzüldü. Süpernatantlar ependorf tüplerine aktarılarak 1-2 damla kloroform ilave edildi. Bu süpernatantlar (lizat) kullanılacağı süreye kadar 4 °C'de saklandı (Kılıç vd., 1996). Elde edilen lizatlar, bakteriyofaj varlığı ve fajların konak aralığının belirlenmesinde kullanıldı.

2.2.3. Bakteriyofajların Konak Aralığının Belirlenmesi

Paenibacillus larvae ve *P. dendritiformis*'lerin Mitomisin C indüksiyonu ile elde edilen faj lizatlarının konak aralığı belirlenmesi için *P. larvae*, *P. dendritiformis* ve diğer referans suşlar kullanıldı. Tüm suşlar için uygun besiyerileri hazırlandı. Sıvı kültürde mid-log fazında olan konak bakterilerinin (OD_{600} nm= 0.4) 500 µL'si, 50 °C'deki 4.5 mL yumuşak agara (%0.7 agar) ilave edilerek, vortekslendikten sonra petri yüzeyine homojen olarak döküldü (Dingman ve Stahly, 1983). Besiyeri katılaştıktan sonra lizatların 5-10 µL'si bakteri içeren besiyeri yüzeyine damlatıldı. Kültürler 37 °C'de % 5 CO_2'li inkübatörde 24-72 saat inkübe edildi. Arı mikrobiyotası bakterileri için de aynı büyüme koşulları (37 °C'de % 5 CO_2) kullanıldı. Lizat damlatılan alanlarda konak bakterinin üremememesi, bulanık, veya berrak görüntünün olması bakteriyofaj varlığı olarak değerlendirildi (Trevors vd., 1983). Konak aralığının belirlenmesi ve petri yüzeyindeki plak şekli fajların karakterizasyonundaki önemli parametrelerdendir.

2.2.4. Bakteriyofajların Saflaştırılması ve Yoğunlaştırılması

Bakteriyofaj yoğunlaştırılması için büyük hacimde lizata ihtiyaç olmasından dolayı 200 ml MYPGP sıvı besiyeri içerisine taze hazırlanmış bakteri kültürü inokule edildi. Mid-log safhasına gelen bakteri kültürü içerisine son konsantrasyon 0,2 µg/mL olacak şekilde Mitomisin-C ilave edilerek 120 rpm'de çalkalamalı inkübatörde tamamen lizis oluncaya kadar inkübe edildi. Lizis olan bakteri kültüründeki ölü kalıntılarını uzaklaştırmak için 10000 rpm'de 4 °C'de santrifüjde çöktürüldü. Süpernatantlar 0.45 µm steril tek kullanımlık filtreler vasıtasıyla süzüldü. Fajların yoğunlaştırılması için lizat ve yoğunlaştırma sıvısı (steril PEG8000 ve 2.5 M NaCI karışımı) eşit hacimde alt üst edilerek karıştırıldı. Bir gece 4 °C'de buz içerisinde bekletilen karışım (Lizat/ yoğunlaştırma sıvısı) 1 saat 65000 rpm'de ultrasantrifüjde (Beckman Optima^{TM} XE) santrifüjlendi (Carroll-Portillo vd., 2021). Pellet 1 ml of SM (pH 7.5; 100 mM NaCl, 8 mM $MgSO_4$, 50 mM Tris HCI, and % 0.002 gelatine) tamponunda nazikçe çözüldü. Yoğunlaştrılan faj lizatındaki mL'deki faj sayısının belirlenmesi için dilusyon tekniği kullanıldı. Bakteri içeren petri yüzeyine faj sayısının belirlenmesi için seri dilusyonları hazırlanan lizatlardan 5 µL damlatılarak 37 °C'de % 5 CO_2 inkübatörde 1-3 gün inkübe edildi. Petrilerde uygulanan seri dilüsyonlarda oluşan plak sayıları sayılarak dilusyon oranına göre mL'deki faj sayısı hesaplandı (Santos vd., 2009).

2.2.5. Bakteriyofajların Burst Size Belirlenmesi

Bakteriyofajın konak hücreyi bir seferde patlattığında çıkan faj partikülü sayısının belirlenmesi için bir basamaklı üreme eğrisi ya da patlama sayısı belirlenmesi için test edildi. Bu işlem şeffaf plak oluşturan fajlarda izlenebilir olduğundan ve plak gelişimi izlenmesi gerektiğinden bakteriyofaj PB31B, PB34 ve SV21 fajlarında uygulanabilmiştir. Konak olarak kullanılacak olan bakterinin bir gecelik taze kültürleri hazırlandı. 100 mL MYPGP sıvı besiyerinde, konak olarak kullanılan *P. larvae* ($1x10^6$ cfu/mL) suşları inoküle edildi. Mid-log safhasına geldikten sonra mililitredeki faj partikül sayısı bilinen ve de patlama sayısı belirlenecek faj lizatı 1/10 oranında (bakteriyofaj SV21 için bu oran $1x10^5$ PFU/mL kullanıldı) mid-log fazındaki kültüre ilave edildi. Kültürden işlem

başlamadan önce ve faj ilave edildiği anda 3 mL örnek alındı. Çalkalamalı inkübatörde inkübe edilen örneklerden inkübasyon süresi boyunca belirli aralıklarla 3 mL örnek alındı. Alınan her örneğin 200 µL OD_{600} nm'de yoğunluk ölçümü için anında spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Kalan örneklerin üzerine 1-2 damla $CHCl_3$ ilave edilerek 10000 rpm'de santrifüj ile bakteri kalıntıları uzaklaştırıldı. Supernatant kısmı alınarak seri dilusyonları hazırlandı (Chow vd., 1988). İçeriğindeki bakteriyofajların sayısının belirlenmesi 5 µL damlatılan ve 1-3 gün inkübasyondan sonra oluşan plakların sayımı ile belirlendi. Seri dilüsyonları yapılan faj lizatının her dilüsyonu üç tekrarlı olarak damlatıldı. Faj sayımının iki farklı metodla belirlenmesi için, yayma plak tekniği kullanıldı. Sıvı kültürde mid-log fazına gelen konak bakteri ile faj lizat dilusyonunun 500 µL'si, 48-50°C'deki 4 mL yumuşak agar (%0.7 agar) içine ilave edilerek vortekslendikten sonra petri yüzeyine homojen olarak döküldü (Dingman ve Stahly, 1983). Petride oluşan faj plak sayıları sayılarak logaritmik grafik çizilerek artan sürede açığa çıkan faj partikülü sayısı hesaplanması yapıldı.

2.2.6. SDS-PAGE Analizi

SDS-PAGE analizi, Laemmli'nin (1970) protokolüne göre gerçekleştirildi. Yoğunlaştırılan bakteriyofaj lizat örnekleri ($>10^{10}$ PFU/mL), SDS-PAGE yükleme boya tamponu (0.075 M Tris–HCl, pH 6.8, % 2 SDS, % 10 gliserol, %5 2-merkaptoetanol ve bromofenol mavisi) ile karıştırıldı ve 100 °C'de 10 dakika su banyosunda kaynatıldı. Proteinin moleküler kütlesini belirlemek için standart olarak geniş aralıklı bir protein marker (Thermo, ABD) kullanıldı. SDS-PAGE, üst jel (%5'lik yükleme) ve alt jel (%12 ayırma jeli) hazırlandı. Protein numuneleri SDS-PAGE'e yaklaşık 20 µL yüklenerek önce 80 volt, sonra 120 volt elektrik akımında yürütüldü. Jeldeki protein bantları, Coomassie Brillant blue boya çözeltisi (%1 CBB, %10 asetik asit, %50 metanol, %40 H_2O) ile boyanarak görselleştirildi. Coomassie Brillant blue ile boyanan protein jeli, ChemiDoc MP görüntüleme sistemleri (Bio-rad, ABD) kullanılarak görüntülendi.

2.2.7. Bakteriyofajların Geçirimli Elektron Mikroskobunda Morfolojik Analizi

TEM (Transmission Electron Microscope) analizi için taze hazırlanmış faj lizatları kullanıldı. Faj stok solüsyonu (10 µL, yaklaşık $1x10^{10}$ PFU/mL) karbon kaplı bakır grid üzerine (200 mesh, Pelco Grids, Kanada) damlatıldı. Grid üzerine faj süspansiyonu damlatıldıktan 1 dakika sonra fazlalık lizat filtre kağıdı ile alındı ve %2 üranil asetat (Merck) ile negatif olarak boyandı (Kim ve Ryu, 2011). Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM-HT7800, Tokyo, Japonya) kullanılarak grid örnekleri görüntülendi. Elektron mikroskobu görüntüleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (ARUM) hizmet alımı yapılarak görüntülendi. Bakteriyofajların, morfolojik ölçümleri alınarak fotoğraf görüntüleri, Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi'nin (ICTV) standart sınıflandırma kılavuzu ile karşılaştırılarak sınıflandırıldı (Fauquet vd., 2005).

2.2.8. Bakteriyofajların DNA izolasyonu

Bakteriyofaj DNA izolasyonu için yoğunlaştırılan (>10^{10} pfu/mL) ve TE tamponu içinde çözülen faj lizatı (9 mL) kullanıldı. β-merkaptoetanol (30 µL), proteinaz K (100 µL), 5 M NaCl (400 µL) ve % 10 SDS (1 mL) solüsyona ilave edildi ve 5 saat boyunca 37 °C'de bekletildi. Daha sonra çözelti bir gece boyunca 4 °C'de tutuldu. Karışım üzerine aynı hacimde Fenol: kloroform (1:1) karışımı ilave edilerek nazikçe 10 dakika boyunca alt-üst edildi. Karışım, süpernatant alınmadan önce 4000 rpm 4°C'de 10 dakika santrifüjlendi. Fenol: kloroform aşaması bir kez daha tekrarlandı. Süpernatant buz üzerine yerleştirildi ve toplam hacmin 1/10'una eşit 3 M NaOAc (pH; 7.0) ve 2.5 hacim soğuk etanol (%100) ilave edildi ve gece boyunca -20 °C'de bekletildi. Karışım bir saat boyunca 4 °C'de soğutmalı santrifüjde 16000 rpm'de çöktürüldü. . Süpernatant atıldı ve alkolün buharlaşması için 37 °C'de 5 dakika bekletildikten sonra 200 µL steril ultra saf su ile nazikçe çözüldü (Pickard, 2009). Bir gece 4 °C'de bekletildikten sonra %1 agaroz jel elektroforezinde DNA görüntülendi ve nanodrop (Thermofisher) spektrofotometresiyle miktarı ölçüldü. DNA (>10 ng/uL) elde edildikten sonra tüm genom dizilimi için MicrobesNG (Birmingham, İngiltere) firmasına gönderildi.

2.2.9. Genom Dizilimi, Annotation ve Biyoinformatik Analiz

Fajların genomik DNA dizisi, ticari bir şirkette (Microbes NG, Birmingham, UK) de novo dizileme ile belirlendi. Genom dizilimi, üreticinin protokolü izlenerek Nextera XT kütüphane hazırlık kiti (Illumina) kullanılarak hazırlanan genomik DNA kütüphanesi ile MicrobesNG (Birmingham, İngiltere) tarafından gerçekleştirildi. Paired-end dizilimi, 2x300 bp okuma uzunluğuna sahip Illumina MiSeq PE300 dizileyici (Illumina) ile yapıldı. Firma tarafından gönderilen ham sekans verileri SPades 3.1 (Bankevich vb., 2012) and Unicycler v0.4.4 (Wick vd., 2017) online tabanlı biyoinformatik programları kullanılarak birleştirildi. Programların çıktısında oluşturulan contigler, Glimmer3 (Delcher vd., 2007), Prodigal (Hyatt vd., 2010) ve GeneMarkS (Borodovsky ve Lomsadze, 2011) kullanılarak open reading frame tahmin etmek için web kaynaklı MyRASTtk (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Overbeek vd., 2014; Brettin vd., 2015) kullanıldı. Gen ürünleri için varsayılan fonksiyonları, BLASTP ve PSI-BLAST kullanılarak aminoasit dizileri NCBI veri tabanına karşı sorgulanmasıyla manuel olarak doğrulandı (Altschul vd., 1990; Altschul vd., 1997). Potansiyel tRNA genleri, tRNAscan-SE2.0 ve ARAGORN v2.36 kullanılarak tahmin edildi (Laslett ve Canback, 2004). BLAST genomik karşılaştırma sonucunun grafiksel gösterimi için Kablammo online platform analizi sonucunda elde edildi. Genom haritası, CGview software (Stothard ve Wishart, 2005) kullanılarak görselleştirildi ve transmembran alanları, TMHMM Server 2.0 kullanılarak tahmin edildi (Krogh vd., 2001). VIRIDIC, virüslerin intergenomik benzerliklerini hesaplamak için Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) tarafından kullanılan geleneksel algoritma uygulanarak geliştirilmiş web kaynaklı bir uygulamadır (Moraru vd., 2020). *Paenibacillus* faj genomları arasındaki ikili intergenomik mesafeler ve benzerlikler, VIRIDIC (Virus Intergenomic Distance Calculator) web uygulaması kullanılarak hesaplandı.

2.2.10. Bakteriyofajların Filogenetik Ağaçlarının Oluşturulması

Paenibacillus fajları ve bakteriyofaj SV21'in tüm genoma dayalı filogenetik ağacı, Genome-BLAST Mesafe Filogenisi (GBDP) yöntemi ve prokaryotik virüsler için varsayılan ayarlar ile Virüs Sınıflandırma ve Ağaç Oluşturma Çevrimiçi Kaynağı

(VICTOR) kullanılarak oluşturuldu (Meier-Kolthoff vd., 2013; Meier-Kolthoff ve Göker, 2017). *Paenibacillus* bakteriyofajlarında major kapsid proteini, terminaz large subunit ve endolizin bölgeleri bilinmektedir (Stamereilers vd., 2018). Bakteriyofaj SV21 bu üç gen bölgesine (major kapsid proteini, terminaz large subunit ve endolizin) göre filogenetik ağaçları, Bayesian (BPP) ve Maximum Likelihood (ML) yöntemleri kullanılarak oluşturuldu. En iyi nükleotid ikame modelleri, AIC (Akaike Information Criterion) kapsamında MrModelTest v2.3 (Nylander, 2004) ile belirlendi. Buna göre her bir gen için en iyi evrimsel modelin GTR+G olduğu bulundu. Bayes analizi MrBayes 3.2.6 kullanılarak gerçekleştirildi (Ronquist ve Huelsenbeck, 2003). ML analizleri, RaxML v8.0'da (Stamatakis, 2014) 1000 bootstrap tekrarlı ve GTRCAT modeli ile gerçekleştirildi. Filogenetik ağaçlar FigTree v 1.4.0 (Rambaut, 2012; Rambaut vd., 2018) kullanılarak görselleştirildi.

Bakteriyofaj Pd22F'nin tüm genom dizisine dayalı olarak, bilinen *Bacillus* fajlarıyla filogenetik ilişkisi, ViPTree web sunucusu (versiyon 1.99) (Nishimura vd., 2017) kullanılarak oluşturuldu. ViPTree sunucusu, tBLASTx tarafından hesaplanan genom çapında dizi benzerliklerine dayalı olarak viral genom dizilerinin "proteomik ağacını" oluşturur. VIRFAM çevrimiçi programı kullanılarak bakteriyofaj Pd22F'in familyası belirlendi. Toplam proteom karşılaştırmaları için "'head-neck-tail" tabanlı bir sınıflandırma yöntemi olan VIRFAM analizi (http://biodev.cea.fr/virfam) kullanıldı (Lopes vd., 2014). Bakteriyofaj Pd22F'nin DNA polimeraz, portal protein ve terminaz large subunit gen bölgelerine göre filogenetik ağaçları, Bayesian (BPP) ve Maximum Likelihood (ML) yöntemleri kullanılarak oluşturuldu. Filogenetik ağaç oluşturulmasında en iyi evrimsel modelin DNA polimeraz için GTR+I+G, portal protein ve terminaz large subunit bölgeleri için ise GTR+G olduğu belirlendi. En iyi model belirlendikten sonra yukarıda bakteriofaj SV21 için yapılan işlemlerin tümü sırasıyla yapılarak genomik analizleri tamamlandı.

2.2.11. Genbank Erişim Numalarının Alınması

Tüm genoma göre karşılaştırılmalı analizleri yapılan ve muhtemel fonksiyonel bölgeleri belirlenen bakteriyofajların NCBI GenBank'a verileri kaydedildi. Bu çalışmada GenBank'ta, *Paenibacillus* faj SV21 (vB_PlaP_SV21) BioSample erişim numarası

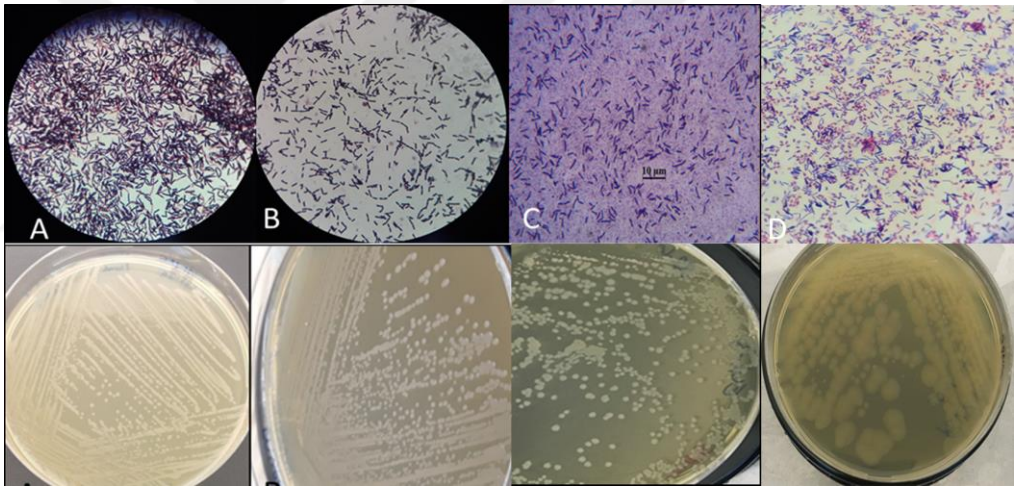
SAMN19073730 ve GenBank erişim numarası MZ218124 olarak kaydedildi.

Paenibacillus faj Pd22F (vB_PlaM_Pd22F) BioSample erişim numarası SAMN18974726 ve GenBank erişim numarası MZ092003 olarak kaydedildi. Profaj indüksiyonunda doğal konak olan *Paenibacillus larvae* SV21'in GenBank erişim numarası MZ156074, *Paenibacillus dendritiformis* Pd22F'in GenBank erişim numarası MZ156073 olarak kaydedildi.

3. BULGULAR

Çalışmada, 2014-2016 yılları arasında hastalık belirtisi taşıyan bal, temel petek, larva ve ölü arı örneklerinden izole edilen, geleneksel ve moleküler metodlar (16S rRNA) ile tanımlanan *Paenibacillus* suşları kullanıldı (Karaoğlu ve Baş, 2015; Karaoğlu ve Pınarbaş, 2017).

Çalışmada konak ve lizat olarak kullanılan suşların isimleri, GenBank erişim numaraları, izolasyon kaynakları ve izole edildikleri bölgeler Tablo 4'te verilmiştir. Bazı suşlar ise laboratuvarda yer alan suşlar olduğu için GenBank numaraları alınmamıştır. Bakteriler canlandırıldıktan sonra kontaminasyon kontrolü için her aşamada Gram boyama ile bakteri-spor morfolojileri ve petri görüntüleri izlenerek kontrol edildi (Şekil 7).



Şekil 7. Çalışmada kullanılan bakterilerin petri ve Gram boyama görüntüleri (a) PB34, (b) PB31B, (c) SV27B, (d) Pd22F

Mitomisin C ile indüklenen ve tamamen liz olan faj lizatları konak aralığının belirlenmesinde kullanıldı. İndükleme süreci laboratuvar ortamında çok dikkatli takip edilmiş, morfolojik olarak liz olmayan, kısmen veya tamamen liz olan örnekler kayıt altına alındı. Lizatların tümü damlatma tekniği ile konak olarak kullanılan suşlar üzerinde test edildi. Tamamen liz olan fajların kültürleri ortamdan alınmış ve 1/10 oranında kloroform ilave edilerek işlem durduruldu. Lizatların konak aralığının belirlenmesinde çapraz damlatma tekniği kullanılarak en uygun konak veya konaklar belirlendi.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan suşların genel bilgileri.

Suş ismi	Accession No	İzolasyon kaynağı	Şehir
P. larvae PB3.1A	KU598688	Bal arısı larvası	Rize, Turkey
P. larvae PB3.2A	KU598689	Bal arısı	Rize, Turkey
P. larvae PB3.2B	KU598690	Bal arısı	Rize, Turkey
P. larvae PB4A	KU598693	Bal arısı larvası	Samsun, Turkey
P. larvae PB5A	KU598694	Bal arısı larvası	Samsun, Turkey
P. larvae PB5B	KU598695	Bal arısı larvası	Samsun, Turkey
P. larvae PB6A	KU598696	Bal arısı	Samsun, Turkey
P. larvae PB6B	KU598697	Bal arısı	Samsun, Turkey
P. larvae PB19B	MZ673469	Bal arısı larvası	Rize, Turkey
P. larvae PB31B	MZ673470	Bal arısı larvası	Samsun, Turkey
P. larvae PB34	MZ673471	Bal arısı larvası	Bayburt, Turkey
P. larvae PB35	MW227606	Bal	Bayburt, Turkey
P. larvae SV21	MZ156074	Bal arısı larvası	Giresun, Turkey
P. larvae SV27B	MZ156075	Bal arısı larvası	Samsun, Turkey
P. larvae SV30B	MZ673472	Bal arısı larvası	Samsun, Turkey
P. larvae SV35	MW227607	Bal mumu	Tokat, Turkey
P. larvae ATCC9545	ERIC I	Referans suş	ATCC
P. larvae DSMZ25430	ERIC II	Referans suş	DSMZ
P. larvae LMG 16252	ERIC III	Referans suş	LMG
P. larvae LMG 16247	ERIC IV	Referans suş	LMG
P. alvei	*Lab stock*	nd	nd
M. plutonius	*Lab stock*	nd	nd
P. den. PB11	MZ673474	Bal arısı larvası	Rize, Turkey
P.den PB13.2	MZ673475	Bal arısı larvası	Gümüşhane
P. den. Pd22F	MZ156073	Bal	Rize, Turkey
P. den. PB30A	*Lab stock*	Bal arısı larvası	Samsun, Turkey
P. den. PB32A	MZ673477	Bal arısı larvası	Rize, Turkey
Bacillus subtilis	ATCC6633	Referans suş	ATCC
Lactobacillus casei	RSKK591	Referans suş	RSKK

Damlatma sonucundaki plaklara göre toplam 14 adet suşta bakteriyofaj varlığı bulanık ve şeffaf açılma şeklinde gözlenerek belirlendi (Tablo 5). Bu plakların oda ısısında bekletilmesi sonucu plak zon çaplarının genişlemesi, bu açılmaların faj olduğunu doğruladı. Petrilerin bekletilmesi sonucu zon çaplarında değişiklik olmayan lizatlar

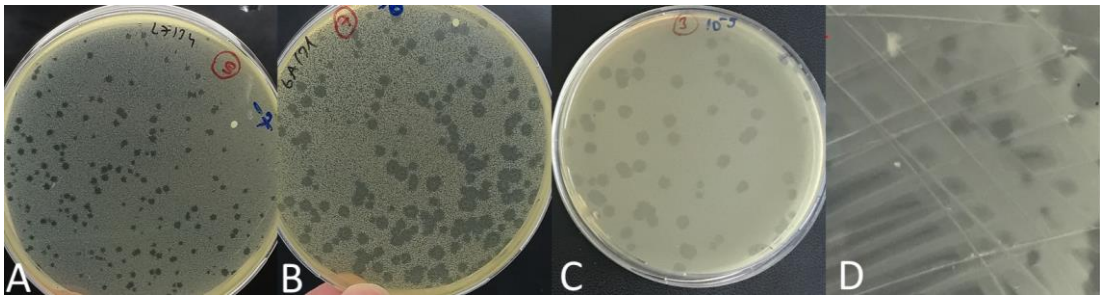
bakteriyosin/antimikrobiyal etkinlik şeklinde değerlendirildi.

Paenibacillus faj PB34, *Paenibacillus* faj SV21 ve *Paenibacillus* faj Pd22F'in petri yüzeyindeki plak morfolojileri belirlenirken konak olarak *P. larvae* SV27B, *Paenibacillus* faj PB31B için *P. larvae* PB6A kullanıldı. *Paenibacillus* faj SV21, MYPGP yumuşak agar (% 0.7 (w/v)) plakaları üzerinde 1.5 ile 2.5 mm arasında çapları olan berrak plaklar oluşturdu (Şekil 8).

Tablo 5. Faj lizatlarnın petri yüzeyindeki plak morfolojisi (n=14)

Bakteriyofaj	**Morfoloji**	**Bakteriyofaj**	**Morfoloji**
PB4	Bulanık	PB34	Şeffaf
PB5B	Şeffaf	PB35	Bulanık
PB6A	Bulanık	SV21	Şeffaf
PB6B	Şeffaf	SV27B	Şeffaf
PB13.1	Bulanık	PB30A	Bulanık
PB13.2	Bulanık	PB31A	Bulanık
PB31B	Şeffaf	PD22F	Bulanık

Paenibacillus faj PB34, MYPGP yumuşak agar plakaları üzerinde 0.5 ile 1.0 mm arasında çapları olan berrak plaklar oluşturdu. *Paenibacillus* faj PB31B, MYPGP yumuşak agar plakaları üzerinde 1.0 ile 1.5 mm arasında çapları olan berrak plaklar oluşturdu. *Paenibacillus* faj Pd22F ise yumuşak agar (%0.7 (w/v)) plakaları üzerinde 1.0-1.5 mm arasında plak oluşturduğu belirlendi (Şekil 8)



Şekil 8. Bakteriyofajların plak görüntüsü (a) PB34, (b) PB31B, (c) SV21, (d) Pd22F

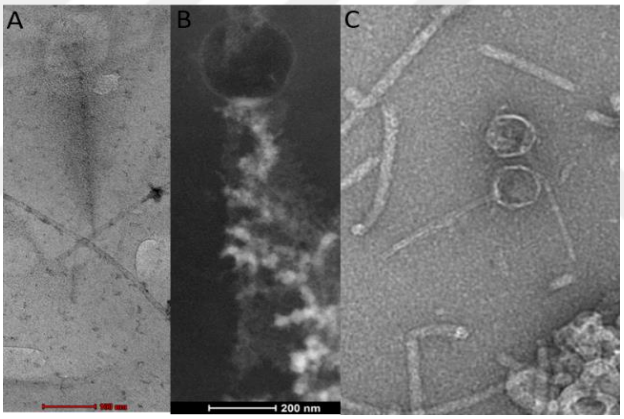
Çapraz damlatma tekniğine göre yapılan testte 28 konak, 14 faj lizatı kullanıldı. Fajların arı florasındaki suşları enfekte edip etmediğinin belirlenmesi için doğal flora suşları (*L. casei, B. subtilis*) kullanıldı. Fajların birçoğunun birden fazla konağı enfekte edebildiği, dolayısıyla geniş konak aralığına sahip olduğu gözlendi (Tablo 6).

Tablo 6. Bakteriyofaj/bakteriyosin gözlenen *P. larvae, P. dentritiformis* suşları ve enfeksiyon için test edilen konakları

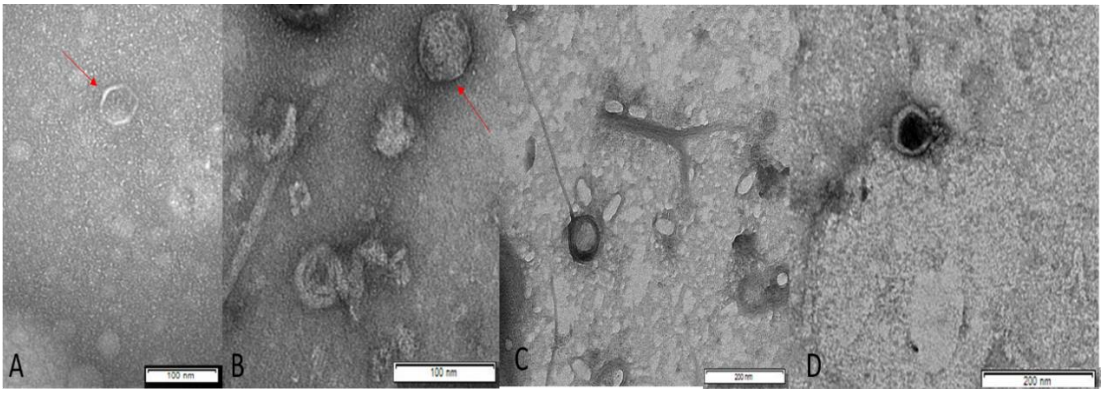
Lizatlar (N=14)	**Faj Plağı veya İnhibisyon Gözlenen Konaklar (N=29)**																											
	PB 3.1A	PB 3.2A	PB 3.2B	PB3.3A	PB4	PB 5A	PB 5B	PB 6A	PB 6B	PB11	PB 13.2	PB19B	PD22F	PB 31B	PB32A	PB 34	PB35	SV 21	SV 27B	SV30B	SV35	RSKK591	*M. plutonius*	*L. casei*	*P. alvei* C	DSMZ25430	ATCC9545	LMG 16252	LMG 16247
PB 4	-	-	-	-	-	-	-	-	$3+^{t\phi}$	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PB 5B	-	-	-	-	-	-	-	-	$3+^{t\phi}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$2+^{t\phi}$	-	-	-	-	-	-	-	-	$+^{b}$	-
PB 6A	-	-	-	-	-	-	-	-	$3+^{t\phi}$	-	-	-	-	-	-	-	-	$+^{t}$	$+^{t\phi}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PB 6B	-	-	-	-	-	$+^{t}$	-	$+^{t\phi}$	$3+^{t\phi}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$+^{t\phi}$
PB13.1B	-	$+^{b}$	-	-	-	-	-	-	$2+^{t\phi}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PB13.2	-	-	-	-	-	-	-	$+^{\phi}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SV 21	$+^{b}$	$+^{b}$	-	-	-	$+^{t\phi}$	$+^{t\phi}$	$+^{t\phi}$	-	$+^{b\phi}$	-	-	-	-	-	-	-	-	$+^{t\phi}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$+^{b}$
SV 27B	-	-	-	-	-	-	$+^{t}$	+	$+^{t}$	-	-	-	-	-	-	$+^{t}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PB 31B	$+^{t}$	-	-	-	-	$+^{t}$	$+^{t}$	$+^{t\phi}$	-	-	-	-	-	-	-	$2+^{t\phi}$	-	$2+^{t}$	$+^{t}$	-	-	-	-	-	-	-	-	$+^{b}$	-
PB 34	$+^{t}$	-	-	-	-	$+^{\phi}$	$+^{t\phi}$	$3+^{t\phi}$	-	-	-	-	-	$+^{b}$	-	-	-	-	$2+^{t\phi}$	$+^{t\phi}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PB 35	-	-	-	-	-	-	-	-	$2+^{t}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$+^{t}$	-	-	-	-	-	-	-	-	$+^{b}$	-
PB30A*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$+^{t\phi}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PB32A*	-	-	-	-	-		-	-	$+^{t\phi}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$+^{t\phi}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PD22F*	-	$+^{b}$	-	-	-	$+^{t\phi}$	$+^{t\phi}$	-	$+^{t\phi}$	$+^{t\phi}$	$+^{b\phi}$	-	$+^{b}$	-	$+^{b}$	-	-	$+^{t\phi}$	$2+^{t\phi}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-; faj plak yok, +; <5 mm faj plak, ++; 6-10 mm faj plak, +++; ≥ 11 mm faj plak, b; bulanık zon, t; tam açılma zonu, $^{\phi}$: bakteriyofaj, *: *P. dendritiformis*

Elektron mikroskobu görüntüleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (ARUM) hizmet alımı yapılarak görüntülendi. Karbon kaplı bakır gridlerde faj lizatları negatif boyama yapıldı. Örneklerin bazılarında uygun görüntü alınamazken 8'inde uygun görüntü alınabildi ve faj morfolojik ölçümleri yapıldı (Tablo 7). Görüntülenen fajlar virüs taksonomik veriler ile kıyaslandığında bakteriyofaj Pd22F myovirus, bakteriyofaj SV21 podovirus, bakteriyofaj PB4, PB6A, PB6B ve SV27B'in siphovirus morfolojisinde olduğu belirlendi (Şekil 9, Şekil 10). Bakteriyofaj PB34 ve PB31B ise sadece baş kısmı ölçülebildiği ve kuyruk kısmı koptuğu/parçalandığı için morfolojik olarak sınıflandırılamamıştır. Morfoloji ölçümlerinde bakteriyofaj SV21'in kısa kuyruklu, diğerlerinin uzun kuyruklu faj oldukları belirlendi. Bakteriyofaj PB4, PB6A ve PB6B'nin iri kapsomerli fajlar olduğu gözlendi (Tablo 7).



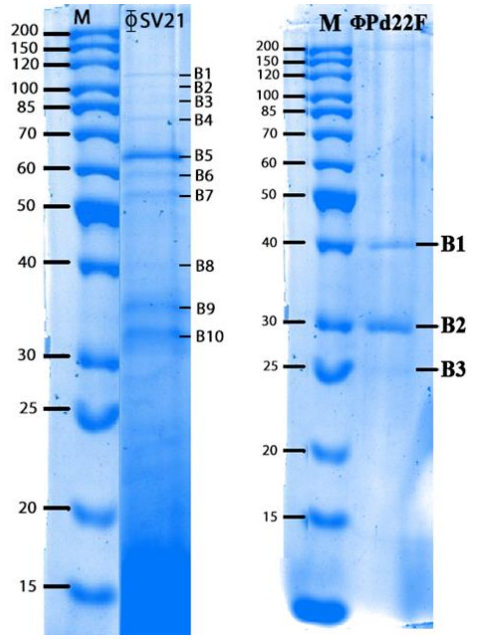
Şekil 9. Bakteriyofajların TEM görüntüleri (a)bakteriyofaj PB4, (b) bakteriyofaj PB6A, (c) bakteriyofaj Pd22F



Şekil 10. Bakteriyofajların elektron mikroskobu görüntüleri, (a) bakteriyofaj PB31B, (b) bakteriyofaj PB34, (c) bakteriyofaj SV27B, (d) bakteriyofaj SV21.

Tablo 7. Bakteriyofajların TEM mikroskobu ile elde edilen morfolojik ölçümleri

Bakteriyofaj	Baş	Kuyruk uzunluğu	Kuyruk genişliği
PB4	120.4 ±1 nm	300.0 ±1 nm	6.0 ±1 nm
PB6A	169.4 ±1 nm	359.5 ±1 nm	18.5 ±1 nm
PB6B	133.0±1 nm	280.0 ±1 nm	nd
Pd22F	55.2 ±1 nm	160.60 ±1 nm	15.44 ±1 nm
PB31B	64.25 ±1 nm	nd	nd
PB34	79.23±1 nm	nd	nd
SV21	60.0±1 nm	12.0 ±1 nm	7.44 ±1 nm
SV27B	109.1±1 nm	325.01±1 nm	12.21±1 nm

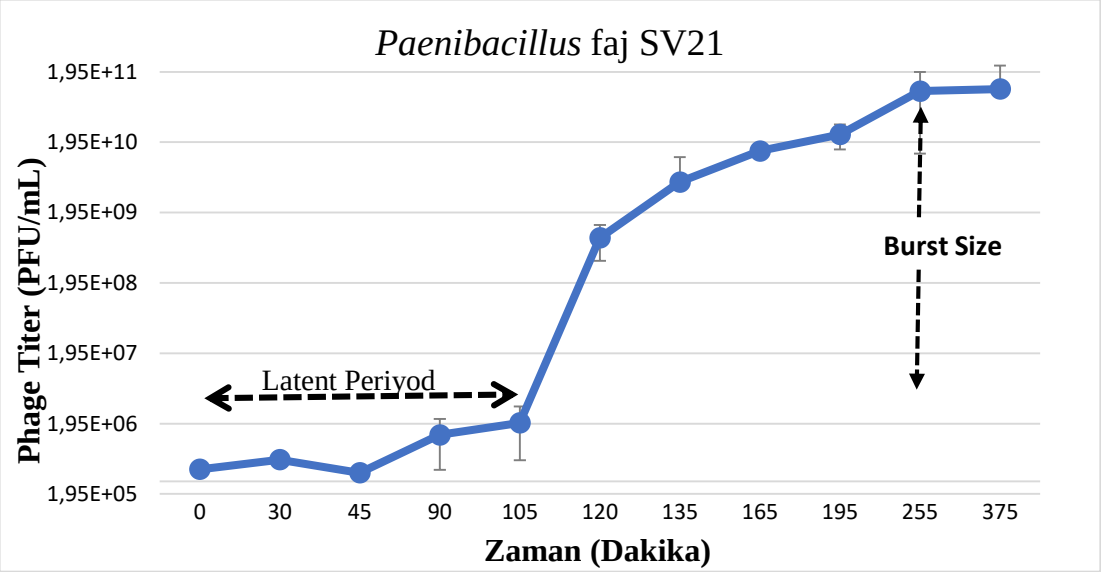


Şekil 11. Fajların SDS-PAGE jel görüntüsü (M; marker, B; bant).

Yapısal proteinlerini araştırmak için saflaştırılmış lizatlar SDS-PAGE yapıldı. Şekil 11'de görüldüğü üzere 10-200 kDA marker kullanılarak protein büyüklükleri belirlenmeye çalışıldı. Bakteriyofaj SV21'in SDS-PAGE jelinde farklı büyüklüklerde 10 belirgin bant oluşurken, bakteriyofaj Pd22F'de ise üç belirgin bant oluştuğu belirlendi (Şekil 11).

Belirli bir konakta bir virüsün yaşam döngüsünü belirlemek için one-step büyüme eğrileri kullanılır. Tam açılma gösteren ve uygun konağı olan üç adet fajın bir basamaklı üreme eğrisi yapıldı. Bulanık üreme gösteren fajların üreme eğrileri test edildi ancak uygun veri alınamadığı için çalışmada kullanılmadı. Bakteriyofaj SV21'in latent periyodu

ve patlama boyutu, bir replikatif döngü sırasında faj partiküllerinin sayısındaki dinamik değişiklikler izlenerek belirlendi. 120-240 dakika içinde büyüme platosuna ulaşıldığı 255. dakikada stasyonel faza gelindiği gözlendi. Ulaşılan maksimum faj partikül sayısının 10^{10}-10^{11} PFU/mL ulaştığı gözlendi (Şekil 12). Enfeksiyonun ilk 45-50 dakikası eklips dönemi, yaklaşık 100. dakikası latent döneminin bitişi ve hücre dışı ilk fajın gözlenme saati olarak belirlendi. ΦSV21 fajının patlama boyutu, enfekte bakteri hücresi başına yaklaşık 10 faj partikülü olarak hesaplandı.

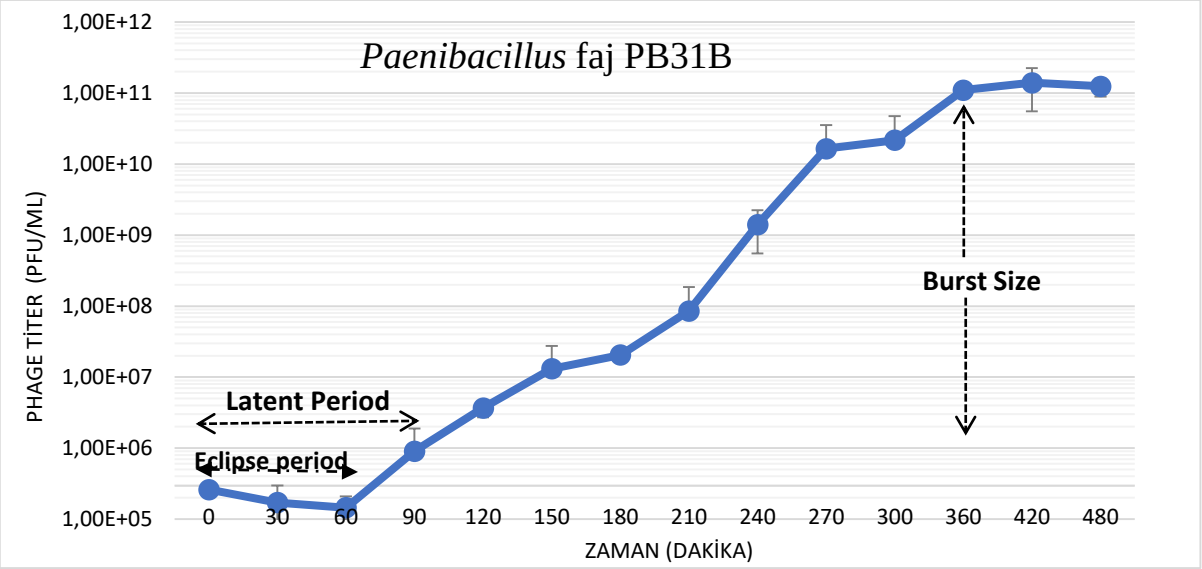


Şekil 12. Bakteriyofaj SV21 için one-step büyüme eğrileri. Hata çubukları standart sapmayı gösterir.

Bakteriyofaj PB31B'in latent periyodu ve patlama boyutu, bir replikatif döngü sırasında faj partiküllerinin sayısındaki dinamik değişiklikler izlenerek belirlendi. Enfeksiyonun eklips dönemi 60 dakika ve hücre dışına ilk faj partikülünün çıkış süresi yaklaşık 90 dakika olduğu gözlendi. Bakteriyofaj PB31B'in patlama boyutu, enfekte bakteri hücresi başına yaklaşık 10 faj partikülü olarak hesaplandı (Şekil 13). Latent dönemden (90 dakika) sonra aynı boyutta çoklu patlama meydana geldi ve 360. dakikada stasyonel faza ulaştığı, maksimum faj konsantrasyonu $1x10^{10}$-$1x10^{11}$ PFU/mL ulaştığı olduğu belirlendi.

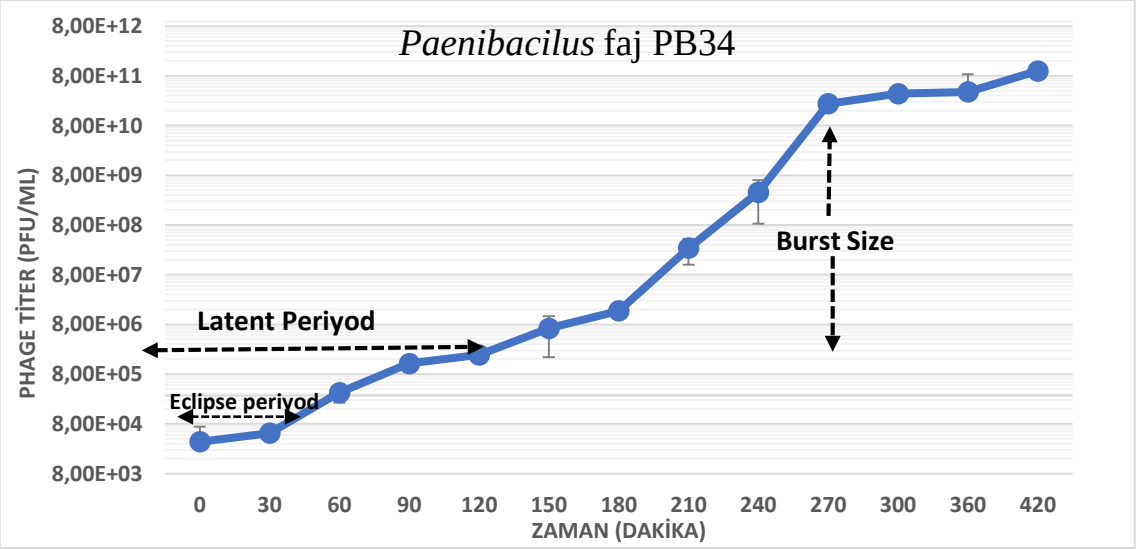
Bakteriyofaj PB34'ün latent periyodu ve patlama boyutu, bir replikatif döngü sırasında faj partiküllerinin sayısındaki dinamik değişiklikler izlenerek belirlendi. Fajın hızlı replike olduğu 270 dakika içinde büyüme platosuna ulaştığı gözlendi. Enfeksiyonun

ilk 20-30 dakikasının eklips ve 40-50 dakikasından sonra latent süre sonuna gelindiği belirlendi.



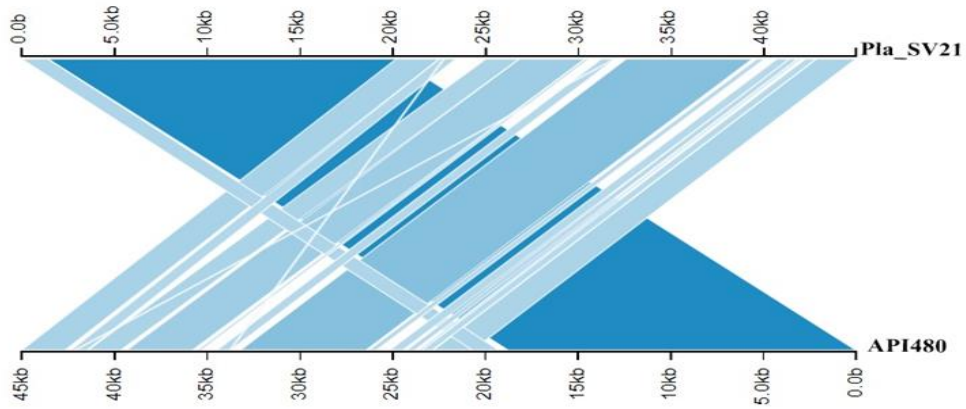
Şekil 13. *Paenibacillus* faj PB31B için one-step büyüme eğrileri. Hata çubukları standart sapmayı gösterir.

Bakteriyofaj PB34 patlama boyutu, enfekte bakteri hücresi başına yaklaşık 8-10 faj partikülü olarak hesaplandı (Şekil 14). Logaritmik dönem sonunda çoklu patlama meydana gelmiş ve ulaşılan maksimum faj konsantrasyonu $8x10^{10}$ - $8x10^{11}$ PFU/mL olduğu belirlenmiştir.



Şekil 14. *Paenibacillus* fajı PB34 için one-step büyüme eğrileri. Hata çubukları standart sapmayı gösterir.

Bakteriyofaj Pd22F fajının latent periyodu ve patlama boyutu, oluşan plak petri yüzeyinde net bir görüntü oluşturmadığı için belirlenemedi. Çalışmada elde edilen faj DNA'ları bütçe yetersizliği nedeniyle sadece bakteriyofaj Pd22F ve bakteriyofaj SV21'in yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing) ile tüm genom analizleri yapıldı. Tüm genom analizi yapılan fajların verileri ICTV tarafından tavsiye edilen programlar kullanılarak analiz edildi.



Şekil 15. Bakteriyofaj SV21 ve faj API480'in BLAST genomik karşılaştırma analizi.

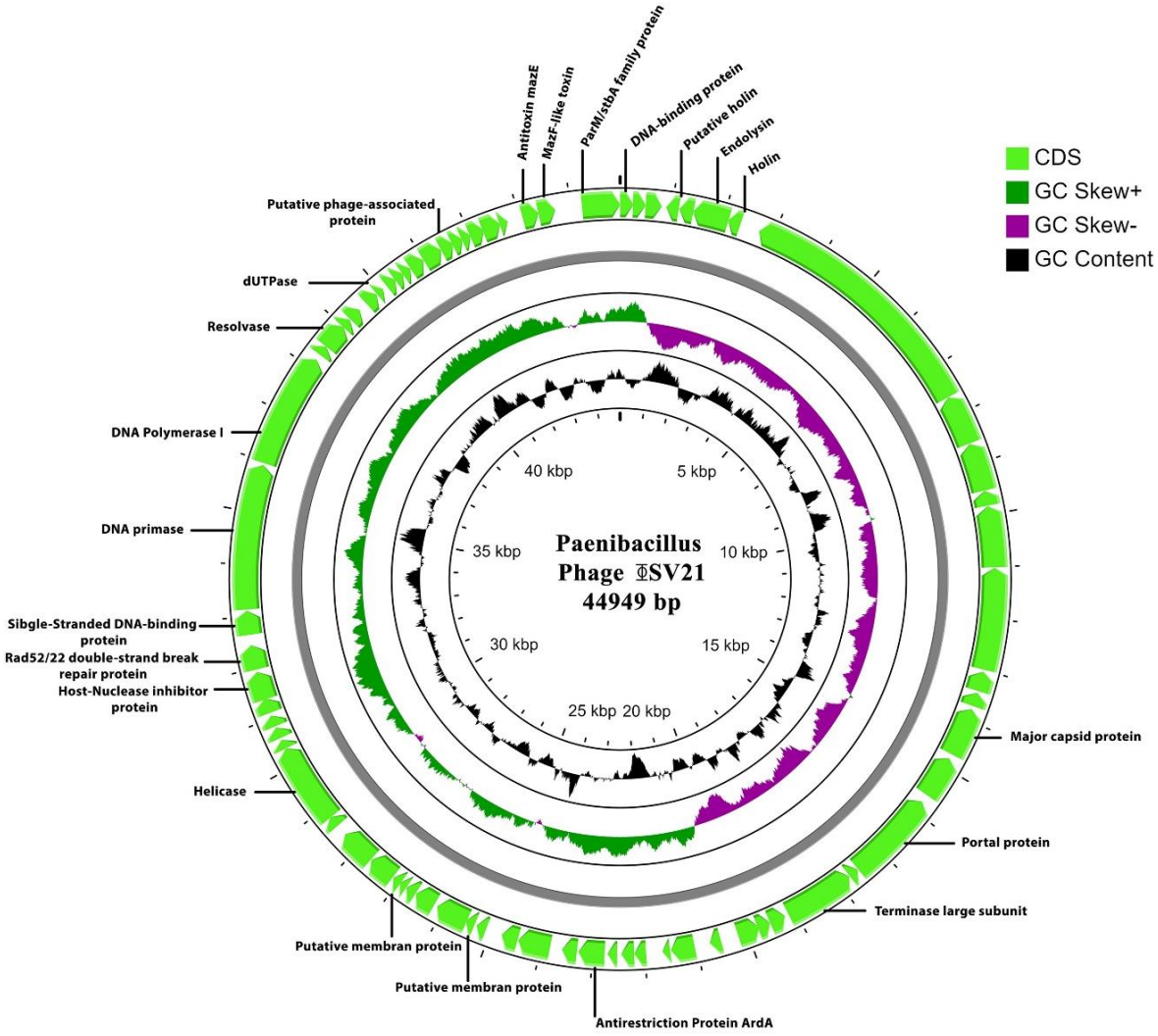
Kablammo (Wintersinger ve Wasmuth, 2015) online kaynaklı karşılaştırma programı olup bakteriyofaj SV21(MZ218124.1) ve faj API480'in (MK533143.1) BLAST genomik karşılaştırma analizini grafiksel olarak göstermektedir. BLAST genomik karşılaştırma sonucunun grafiksel gösterimi, SV21 ve API480 fajının Kablammo yazılımı kullanılarak analizinden elde edilmiştir (Şekil 15). Eksen arasına çizilen yamuklar, iki tam genom dizisi arasındaki BLAST hizalamalarını gösterir. Hizalamaların benzerliği ne kadar yüksek olursa, renk koyuluğu da o derece artmaktadır. BlastN sonucuna göre 1-20 kb arasında faj bölgelerinin genom benzerliğinin daha yüksek olduğu belirlendi. Bakteriyofaj SV21 genomunun, NCBI GenBank'ta bulunan *Myoviridae* familyasına dahil olan *Paenibacillus* faj genomlarından tamamen farklı olduğu belirlendi. Fajlar kendi aralarında sınırlı gen içeriği paylaşsalar da, hepsinin ortak yapılara sahip olduğu gösterildi.

Bakteriyofaj SV21 genomu, MZ218124 erişim numarasıyla GenBank'ta depolandı. Fajın genomu, %39.33 GC içeriğine sahip, 44949 bp doğrusal dsDNA'dan oluşmaktadır. Bakteriyofaj SV21, 55'i pütative proteinlerle ve 22'si fonksiyonu bilinen bir proteinle

eşleşmiş, 77 kodlama dizisine (CDS) sahip olduğu gözlenmiştir (Ek 1). Genler, coverage 2520.07, 1000 bp başına 1.9 gen verecek şekilde sıkıca paketlendiği ve genomun %91,2'si protein kodladığı bulunmuştur. Bakteriyofaj SV21 genomu, soldan sağa 21 gen bölgesi ve ardından sağdan sola 56 gen bölgesinden oluşmaktadır (Şekil 16).

Bakteriyofaj SV21 genomunda antibiyotik direnç genleri veya tRNA'lar genomda tanımlanmamasına rağmen, MazE(gp74) antitoksin ve mRNA-degrading endonükleaz (gp75) MazEF toksin-antitoksin modülünün bileşenlerini içerdiği belirlendi (Ek 1). Serine recombinase/resolvase (gp57), integraz, repressor ve anti-repressor gibi bölgelerin varlığı, bunun ılıman bir faj olduğunu gösterir (Thorpe ve Smith, 1998). DNA paketleme ve faj morfogenezi genleri, *P. larvae* siphoviruslerde olduğu gibi solda yer almaktadır. Bu bölgede, atanmış fonksiyonlara sahip üç protein tanımlandı: major kapsid proteini (gp16), portal proteini (gp18) ve terminaz large subunit alt birimi (gp20) (Ek 1). Terminaz large subunit proteini bir montaj geni olarak sınıflandırılırken, portal ve major kapsid proteinleri yapısal genler olarak sınıflandırılır.

DNA replikasyonu, transkripsiyon ve metabolizma ile ilgili genomlar sırasıyla bakteriyofaj SV21 genomunda aşağıdaki gibidir. DNA binding protein (gp1), anti-restriksiyon proteini ArdA (gp30), pütative membran proteini (gp36 ve gp41), helikaz (gp45), konakçı nükleaz inhibitör proteini (gp50), DNA primaz (gp54), DNA polimeraz (gp55), single-stranded DNA-binding protein(gp53), resolvaz (gp57), deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (gp62), putative phage-associated protein (gp68), antitoksin, MazE (gp74), mRNA-degrading endonuclease (gp75), ParM/StbA familyası proteininin (gp77) sağ tarafında yer aldığı belirlendi (Şekil 16, Ek 1).



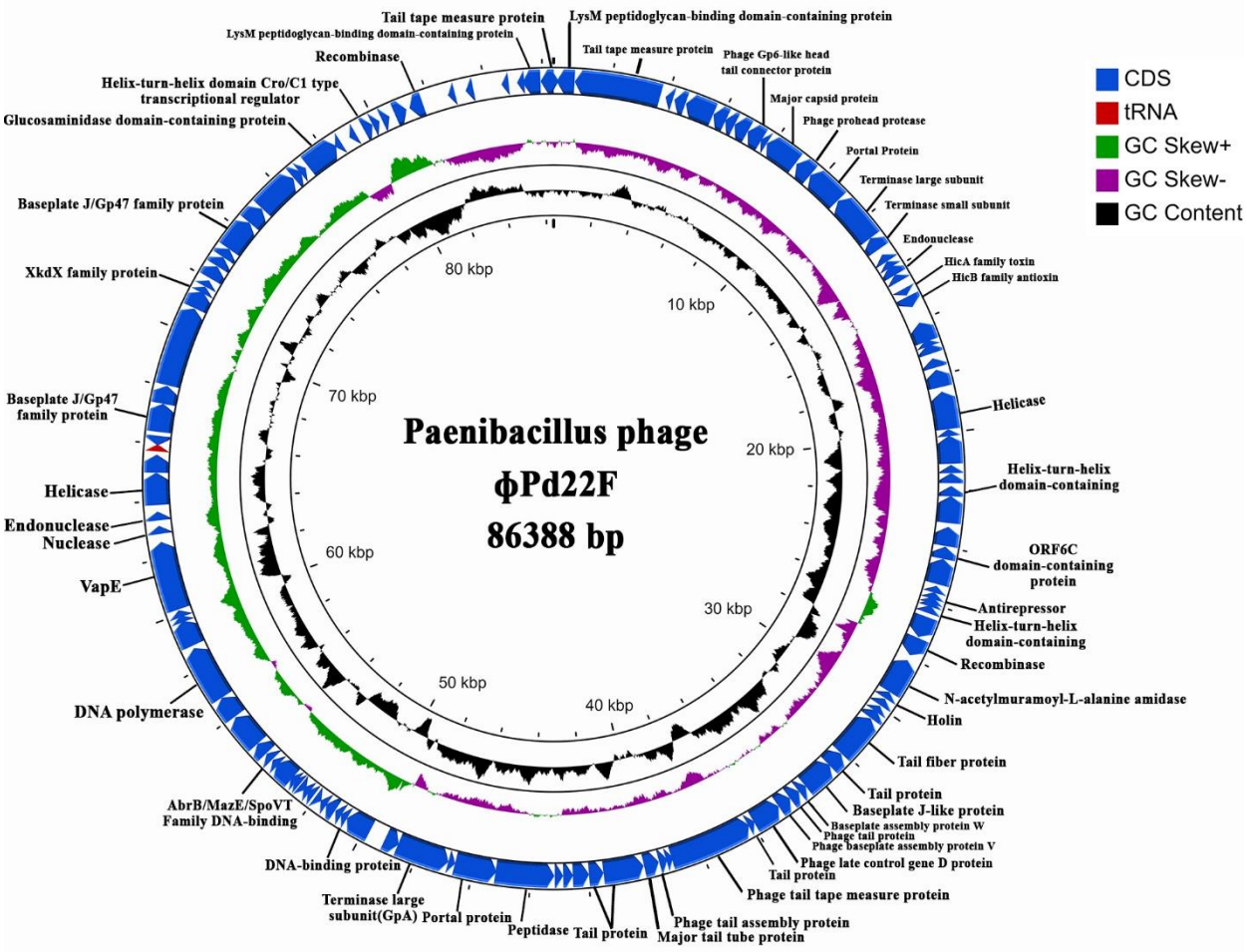
Şekil 16. Bakteriyofaj SV21 fajının genom haritası ve fonksiyonel protein sıralaması.

Bakteriyofaj Pd22F genomu, GC içeriği %56,68 olan 86388 bp doğrusal dsDNA'dan oluşmaktadır. Bakteriyofaj Pd22F, 66'sının pütative proteinlere sahip olduğu ve 57'sinin fonksiyonu bilinen proteinle eşleştiği ve 124 kodlama dizisinden (CDS) oluştuğu belirlendi (Ek 2). Genler, coverage 55.649, 1000 bp başına 1.9 gen verecek şekilde sıkıca paketlenir ve genomun %88.62'si protein kodlamaktadır. Bakteriyofaj Pd22F'in tüm genom dizisi, MZ092003 erişim numarası ile NCBI GenBank'a depolandı. Bakteriyofaj Pd22F genomunda, soldan sağa 75 gen bölgesi, sağdan sola ise 48 gen bölgesi yer almaktadır (Şekil 17, Ek 2). Antibiyotik direnç genlerinin genomda tanımlanmamasına rağmen, tip II (HicA, HicB) toksin-antitoksin modülünün bileşenlerini içerdiği belirlendi.

Prolin (Pro) için antikodonlar TGG ile birlikte bir tRNA geninin, faj genomunun aşağı akışında (Pro için 65818 ila 65890 bp arasında) bulunduğu belirlendi (Ek 2). DNA paketleme ve faj morfogenez genleri, *P. larvae* siphoviruslerine benzer şekilde solda yer almaktadır. Bu bölgede, işlevleri bilinen üç önemli protein: major kapsid proteini (gp13), portal proteini (gp15, gp68) ve terminaz large subunit (gp16, gp70) ve terminaz small subunit (gp17) proteinleri yer almaktadır. Terminaz large subunit proteini montaj genleri olarak sınıflandırılırken, portal ve major kapsid proteinleri yapısal genler olarak sınıflandırılır. Konak hücre lizis proteinleri N-asetilmuramoil-L-alanin amidaz (endolisin) (gp45) ve holin (gp46) genomun başında bulunur.

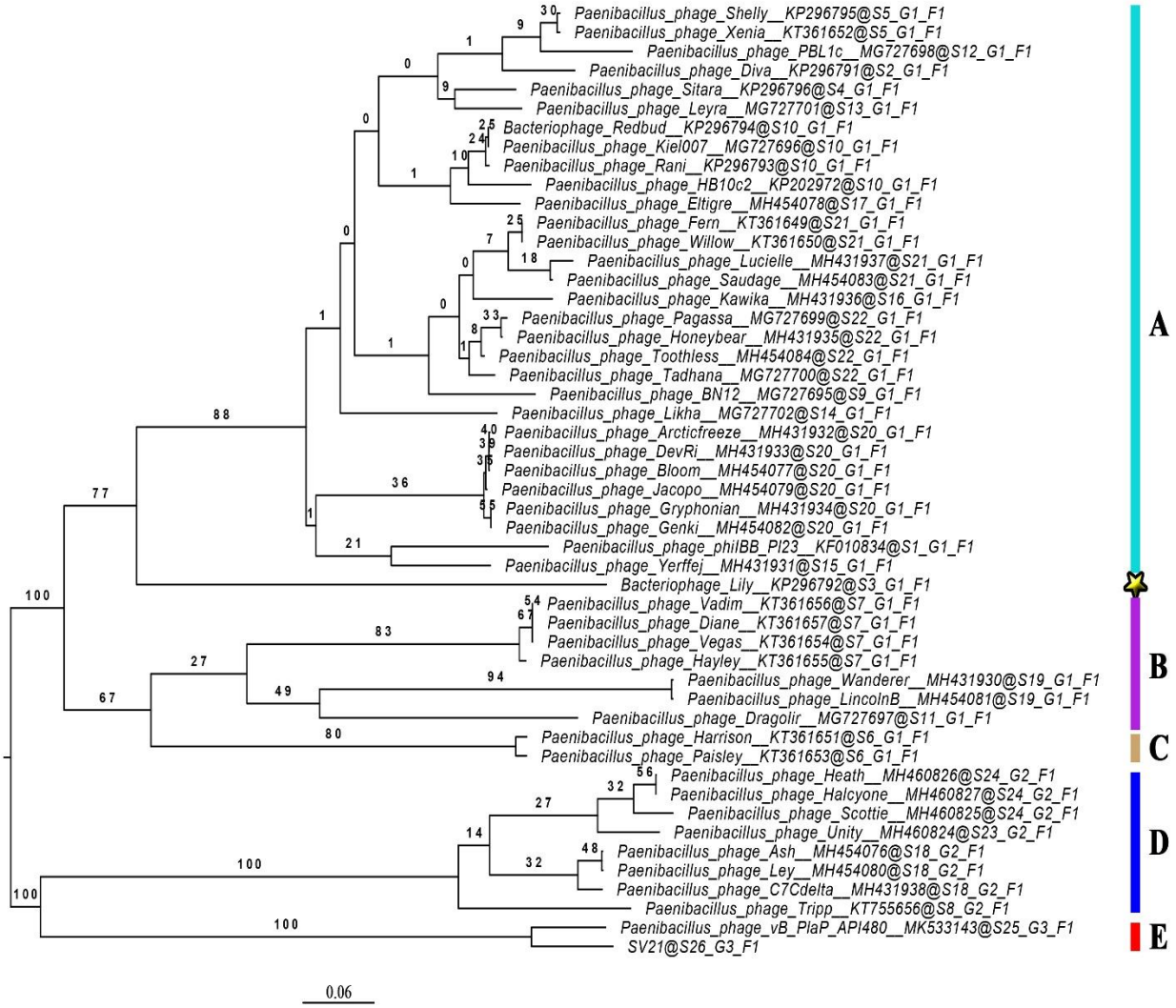
DNA replikasyonu, transkripsiyon ve metabolizmada yer alan genler, bakteriyofaj Pd22F genomunda sırasıyla; DNA binding protein (gp73), LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein (gp2, gp123), endonuclease (gp18), type II toxin-antitoxin system ((HicA family toxin (gp21), HicB family antitoxin (gp22)), Replicative DNA helicase (gp28), helix-turn-helix domain-containing protein (gp33 ve gp42), Phage late control gene D protein (GPD) (gp56), peptidase (gp67), AbrB family transcriptional regülatör (gp84), DNA polymerase I (gp88), DEAD/DEAH box helicase (gp95), nuclease (gp93), HNH endonuclease (gp94), XkdX family protein (gp102), glucosaminidase domain-containing protein (gp112), virulence-associated protein E (gp92) and helix-turn-helix domain Cro/C1-type transcriptional regülatör (gp115) proteinleri belirlendi (Şekil 17, Ek 2).

Bakteriyofaj Pd22F genomunda fonksiyonu bilinen diğer proteinler sırasıyla; phage tail tape measure protein (gp3, gp58, gp124), phage gp6-like head-tail connector protein (gp11), Phage prohead protease (HK97 family) (gp14), phage tail protein I (gp51), baseplate J/gp47 family protein (gp52, gp98, gp107), GPW/gp25 family protein (gp53), phage tail protein (gp54, gp62, gp64), phage baseplate assembly protein V(gp55), phage tail protein X (gp57), phage tail assembly protein (gp60), phage major tail tube protein (gp61). Serin rekombinaz (gp44 ve gp119) ve antirepresör (gp39) bölgeleride faj genomunda kodlandığı belirlendi (Ek 2).



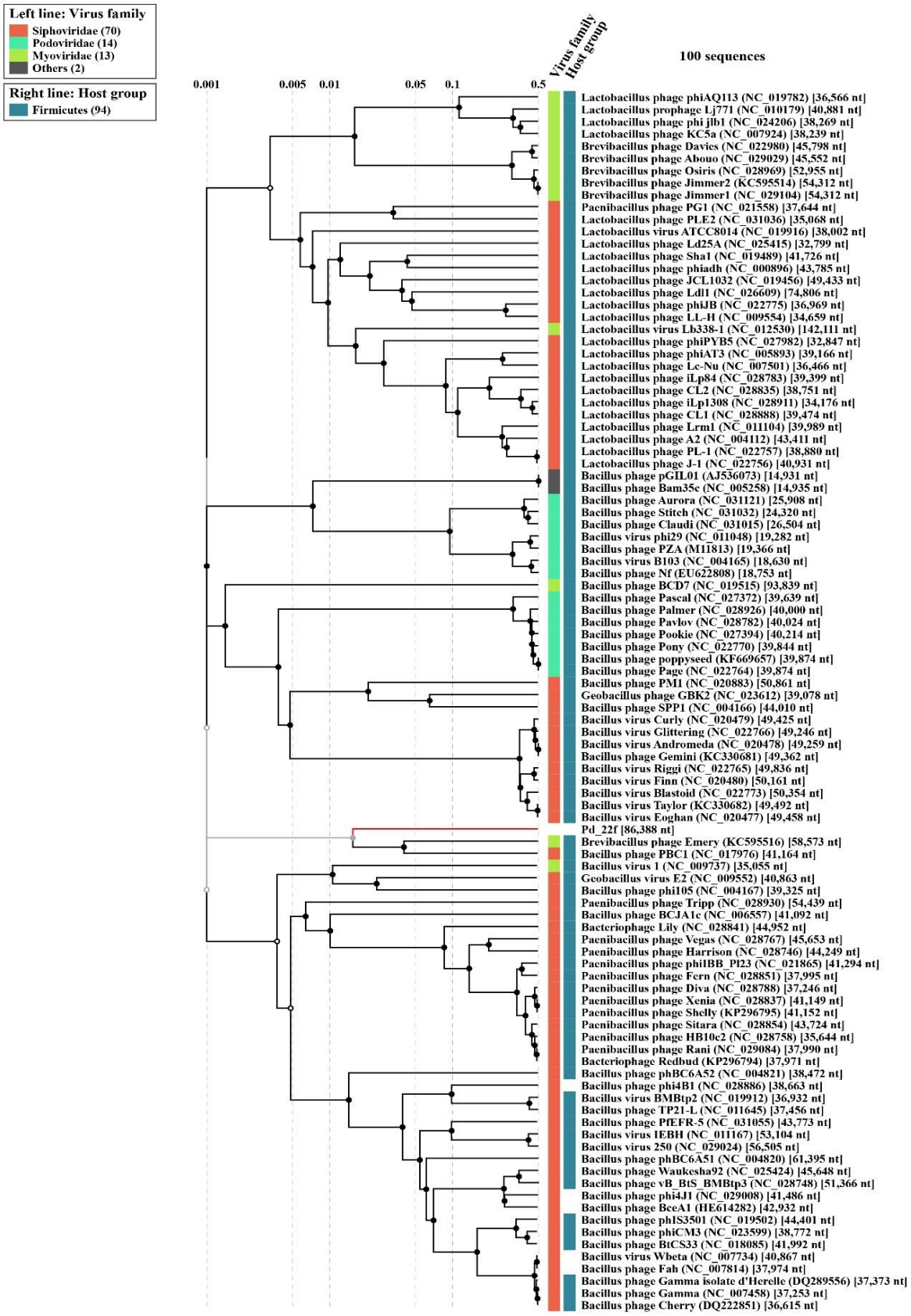
Şekil 17. Bakteriyofaj Pd22F fajının genom haritası ve fonksiyonel protein sırası.

Bakteriyofaj SV21 ve 49 *Paenibacillus larvae* fajının (48 siphovirus ve 1 podovirus) tüm genom dizisi verileri, çevrimiçi biyoinformatik programı kullanılarak filogenetik ağacı yeniden yapılandırmak için kullanıldı (Meier-Kolthoff vd., 2013; Meier-Kolthoff ve Göker, 2017). Diğer *Paenibacillus larvae* fajlarından (48 siphovirus) farklı olarak bakteriyofaj SV21 ve API480 fajının oldukça benzer olduğu gözlendi ve oluşturulan ağaçta aynı dalda yer aldığı belirlendi. Filogenetik ağaç Şekil 18'de verilmiştir ve aralarındaki ilişkiler dal uzunlukları ile gösterildi. Şekil 18'de VICTOR ile oluşturulan ağaçtaki A; Fern Cluster, B; Vegas cluster, C; Harrison cluster, D; Halcyone cluster, E; API480 cluster, yıldız; Bacteriophage Lily'yi göstermektedir.



Şekil 18. VICTOR programı ile üretilen tüm genom filogenetik ağacı.

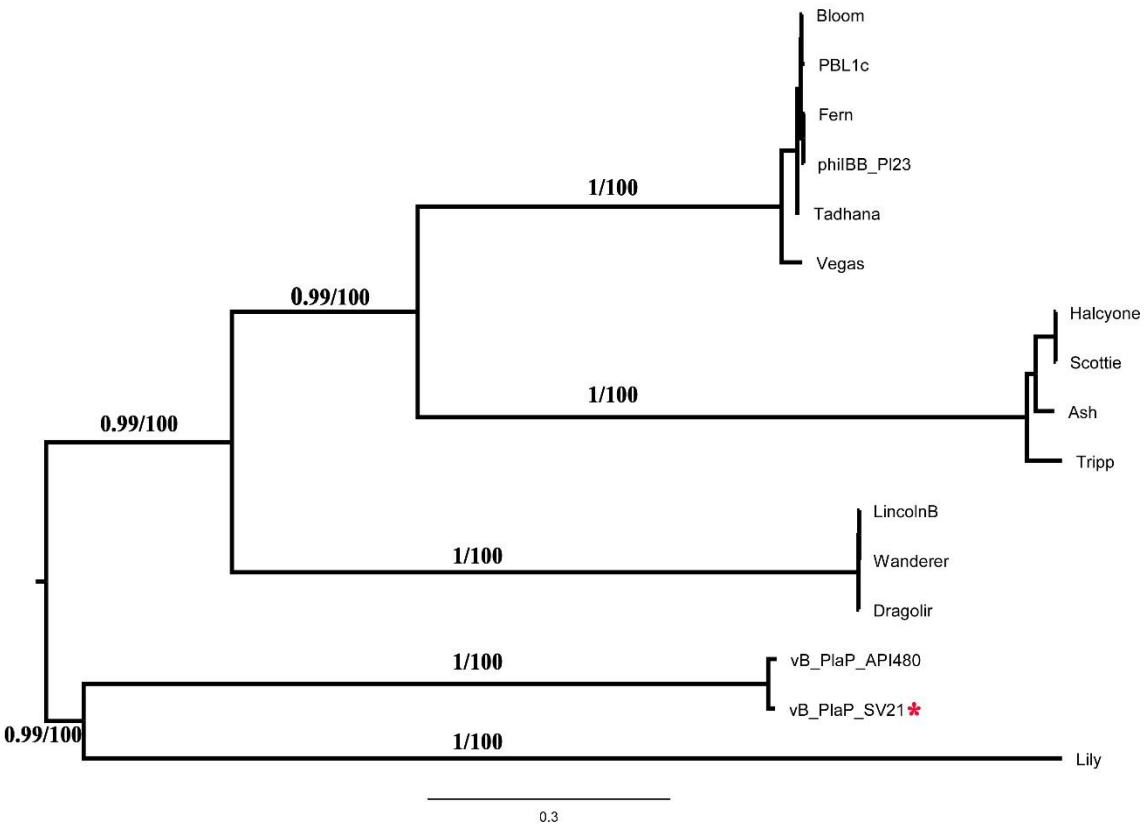
NCBI viral genom veritabanında, Bakteriyofaj Pd22F'nin tüm genom dizisi için sorgulandığında genomunun % 3'ünden fazlasını kapsayan herhangi bir anlamlı eşleşme ortaya çıkarmadı (Hatfull ve Hendrix, 2011). Bu durum, bakteriyofaj Pd22F genomunun yeni bir faj olduğunu göstermektedir. Bakteriyofaj Pd22F'in bilinen *Lactobacillus*, *Bacillus* ve *Paenibacillus* fajları arasındaki yerini belirlemek için Virus NCBI GenBank'taki fajlarla karşılaştırıldı. Bakteriyofaj Pd22F ve seçilen 100 *Bacillus* fajının proteom karşılaştırmalarına dayalı oluşturulan filogenetik ağaçta beş ana dal gözlendi (Şekil 19).



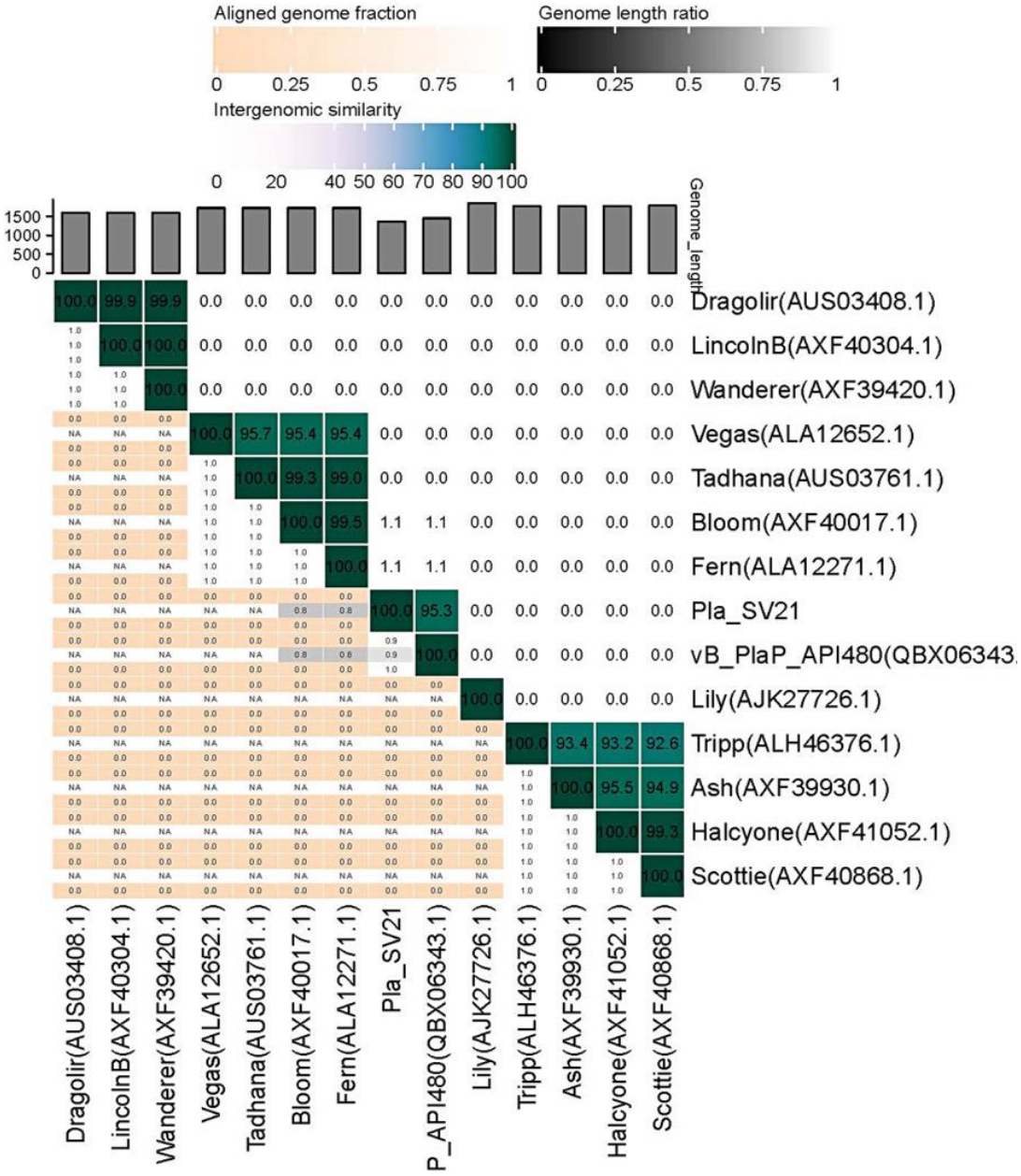
Şekil 19. Bakteriyofaj Pd22F'nin ViPTree (version 1.9) ile oluşturulan faj proteomik ağacı (Nishimura vd., 2017).

Prokaryotik dsDNA virüslerinin proteomik ağacında virüs aileleri ve konak taksonomik grupları renklendirildi. Filogenetik ağaç analizi, *Brevibacillus* faj Emery ve *Bacillus* faj PBC1 fajlarıyla yakından ilişkili yeni bir bakteriyofaj Pd22F'i ortaya çıkardı. Faj proteomlarının filogenetik analizi, bunların *Lactobacillus* ve bazı *Bacillus* fajları ile nispeten uzaktan ilişkili olduğunu ortaya çıkarıldı (Şekil 19).

Paenibacillus fajları tarafından kodlanan fonksiyonu bilinen gen ürünleri arasında N-asetilmuramoil-L-alanin amidaz, terminaz large subunit ve major kapsid proteini, tüm *Paenibacillus* fajlarında bilinen genom dizisine sahip proteinlerdir (Stamereilers vd., 2018). Bu protein bölgeleri, virüslerin sınıflandırılması için kullanılan yüksek oranda korunmuş genom dizileridir (Feiss ve Rao, 2012). Bakteriyofaj SV21'in filogenetik analizi, bazı seçilmiş *P. larvae* fajları ve API480 fajıyla birlikte, bu üç fonksiyonel proteine göre Bayesian ve Maximum Likelihood olasılık yöntemleri kullanılarak filogenetik ağacı oluşturuldu (Şekil 20-21).



Şekil 20. *Paenibacillus* fajlarının terminase large subunit bölgesine göre filogenetik ağacı**.**

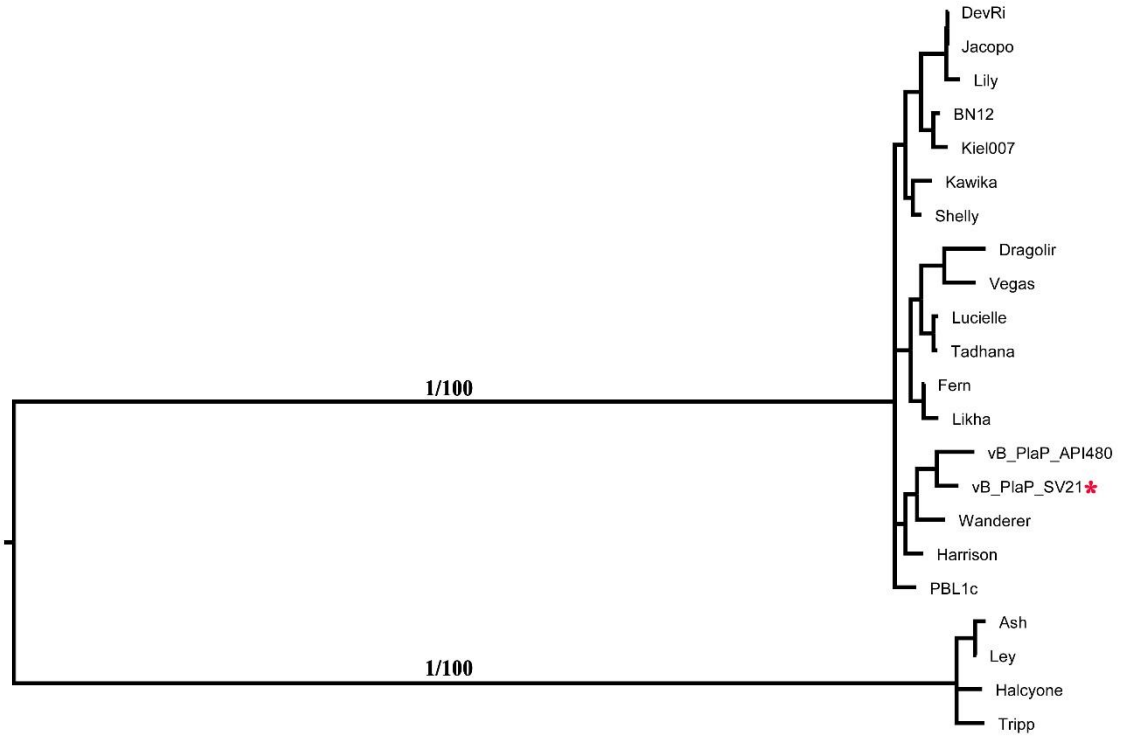


Şekil 21. Fajların terminase large subunit bölgesine göre VIRIDIC analiz sonucu

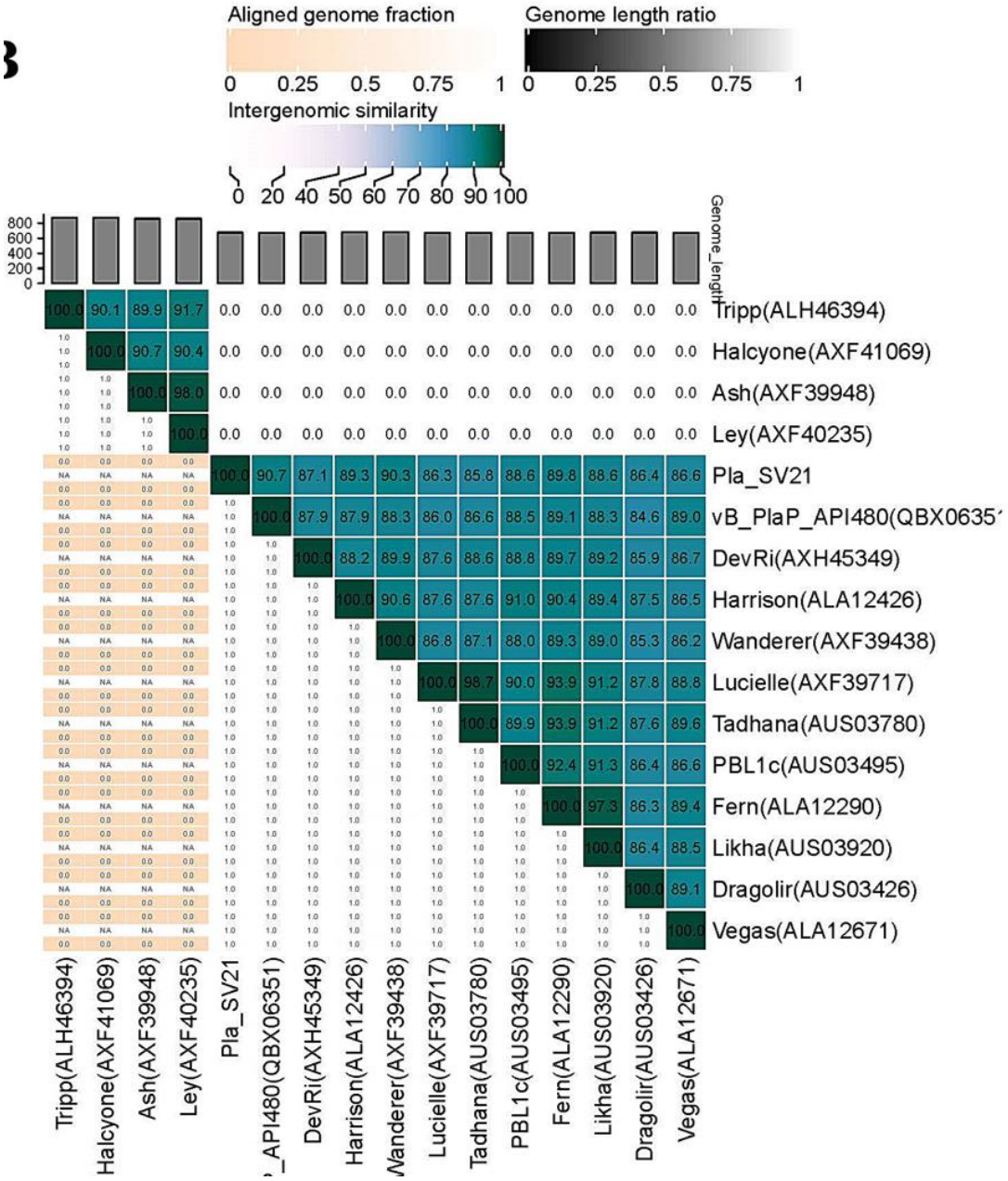
Faj yaşam döngüsünün merkezinde yer alan terminase large subunit proteini, çift sarmallı DNA'nın boş bir kapsid içine paketlenmesinden sorumludur. Terminaz large subunit, fajların karşılaştırmalı genomik analizinde filogenetik ağacı oluşturmak için bir işaretleyici olarak kullanılan nispeten korunmuş bir proteindir (Feiss ve Rao, 2012). Bakteriofaj SV21'in evrimsel konumunu belirlemek için, terminaz large subunit bölgesine göre yapılan filogenetik analizde, bazı seçilmiş *P. larvae* fajları, Bayesian ve Maximum Likelihood yöntemleri kullanılarak analiz edildi (Şekil 20). Filogenetik ve

VIRIDIC analizi sonucuna göre, *P. larvae* fajları terminase large subunit proteinine göre beş grupta dağılım gösterdi. Bakteriyofaj Lily ağaçta ayrı bir dal oluşturdu (Şekil 20, Şekil 21).

Lily fajında terminaz large subunit ve major capsid protein diğer *P. larvae* fajlarından daha farklı olmasına rağmen, N-asetilmuramoil-L-alanin amidaz grubu içinde >%90 üzerinde yüksek bir benzerliğe sahiptirler (Şekil 22, Şekil 23). Bu durum *Paenibacillus larvae* fajlarında bu bölgenin en çok korunan bölge olduğunu gösterir (Stamereilers vd., 2018). N-asetilmuramoil-L-alanin amidaz geni, tüm *P. larvae* faj genomlarında tanımlanmıştır. Bu gen tarafından üretilen protein, peptidoglikan hücre duvarını bozarak bakteri hücresini bozduğu için *in vivo* ve *in vitro* en çok çalışılan *P. larvae* faj proteinidir (Oliveira vd., 2015). *Paenibacillus* faj SV21 genomundaki gp4, gp6 ve gp7'deki proteinlerin, bakteri hücre duvarının bozulmasında rol oynadığı tahmin edilmektedir. Gp4 ve gp7, sırasıyla faj API480 gp21 (%100 benzerlik) ve gp17'nin (% 94.04 benzerlik) holin proteini homologlarıdır. Gp6, faj API480 gp20 (% 90.7 benzerlik), *Paenibacillus* faj HB10c2'nin (%93.75 benzerlik) ve Bacteriophage Redbud gp21 (% 94.17 benzerlik) N-asetilmuramoil-L-alanin amidaz proteinlerine homologdur.

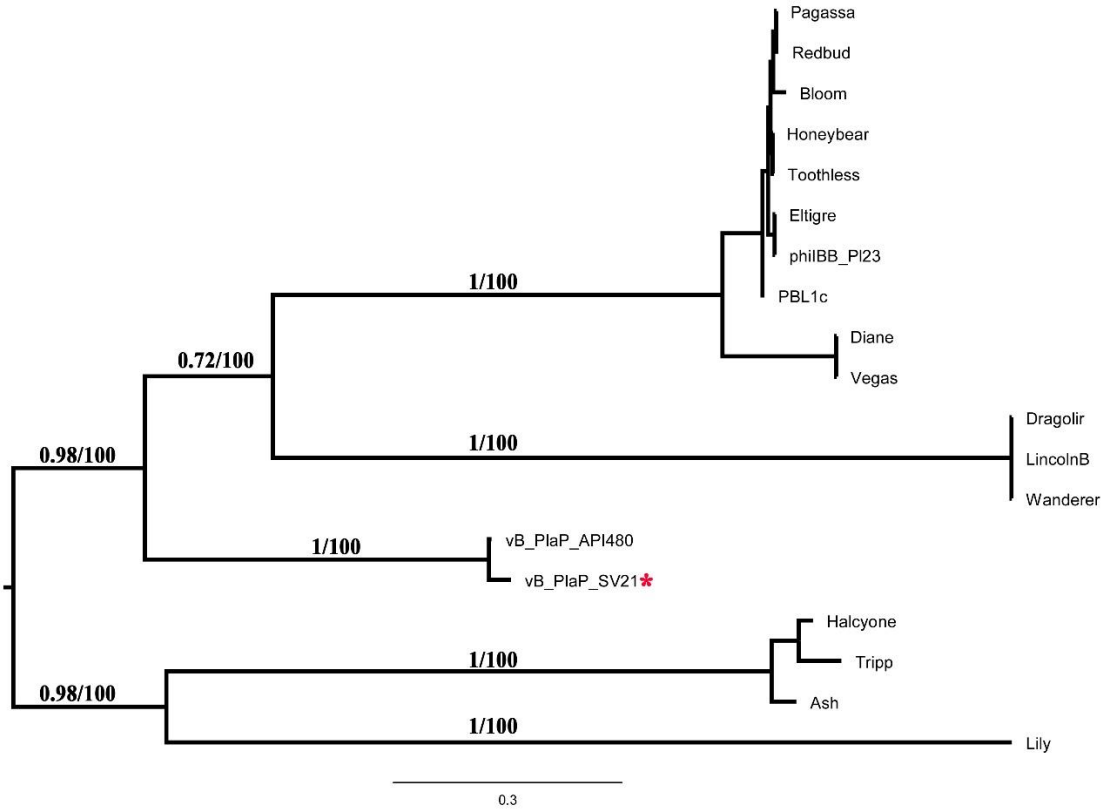


Şekil 22. *Paenibacillus* fajlarının endolizin dizilerine dayanan filogenetik ağacı

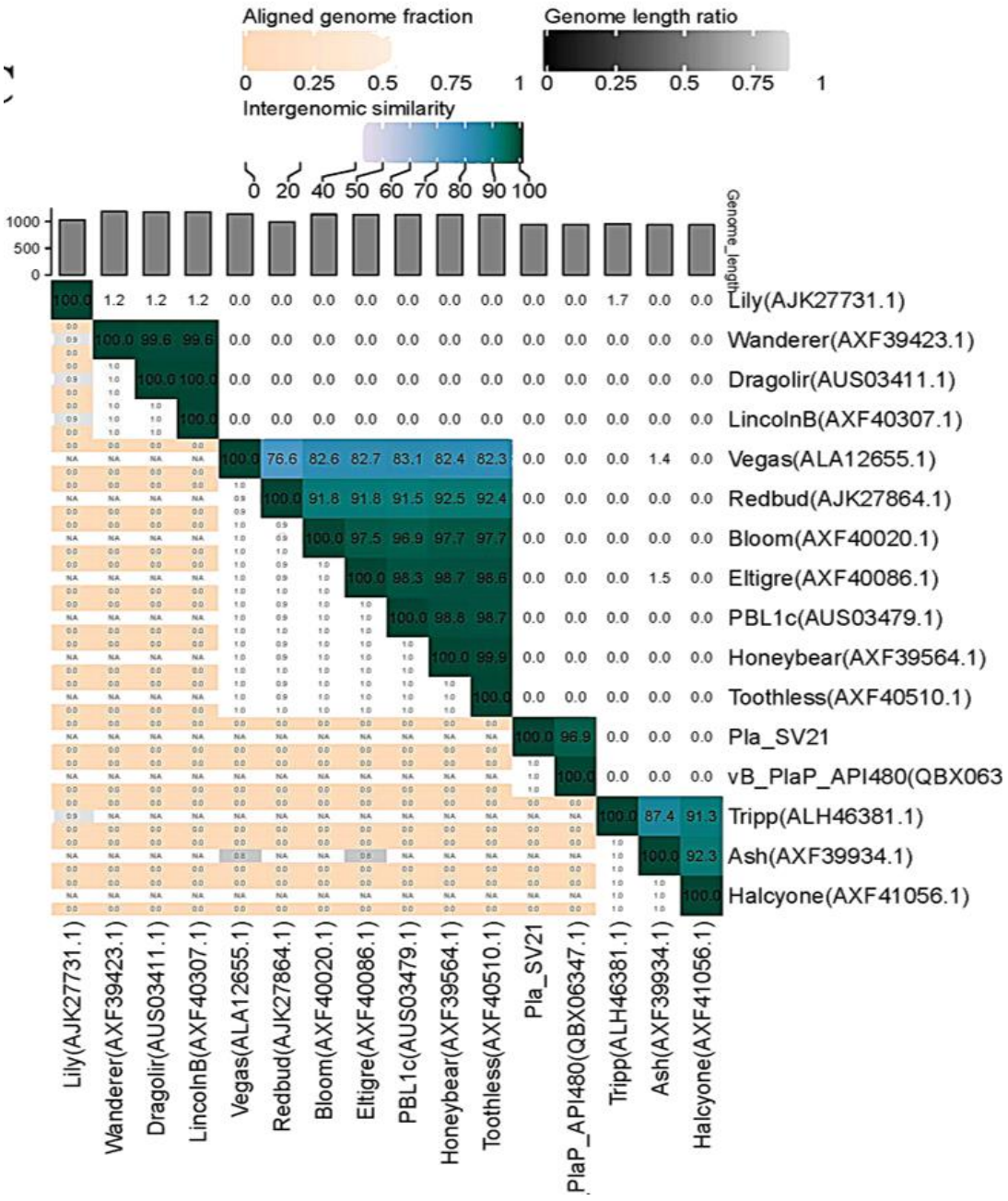


Şekil 23. *Paenibacillus* fajlarının endolizin bölgesine göre VIRIDIC analiz sonucu.

Kapsidin birincil bileşeni olan major kapsid proteini, benzer fajlar arasında korunur ve bakteriyofajların sınıflandırılmasında sıklıkla kullanılır. Major kapsid proteini, aynı kümedeki fajlarda farklılık gösterebilirken, aynı protein farklı kümelerdeki fajlar arasında yakın benzerlik gösterebilir (Stamereilers vd., 2018). Filogenetik ve VIRIDIC analizi sonucuna göre, *Paenibacillus larvae* fajları major kapsid proteinine göre analiz edildiğinde beş grupta dağılım gösterdi. Bakteriyofaj Lily ağaçta ayrı dal oluşturdu (Şekil 24, Şekil 25).

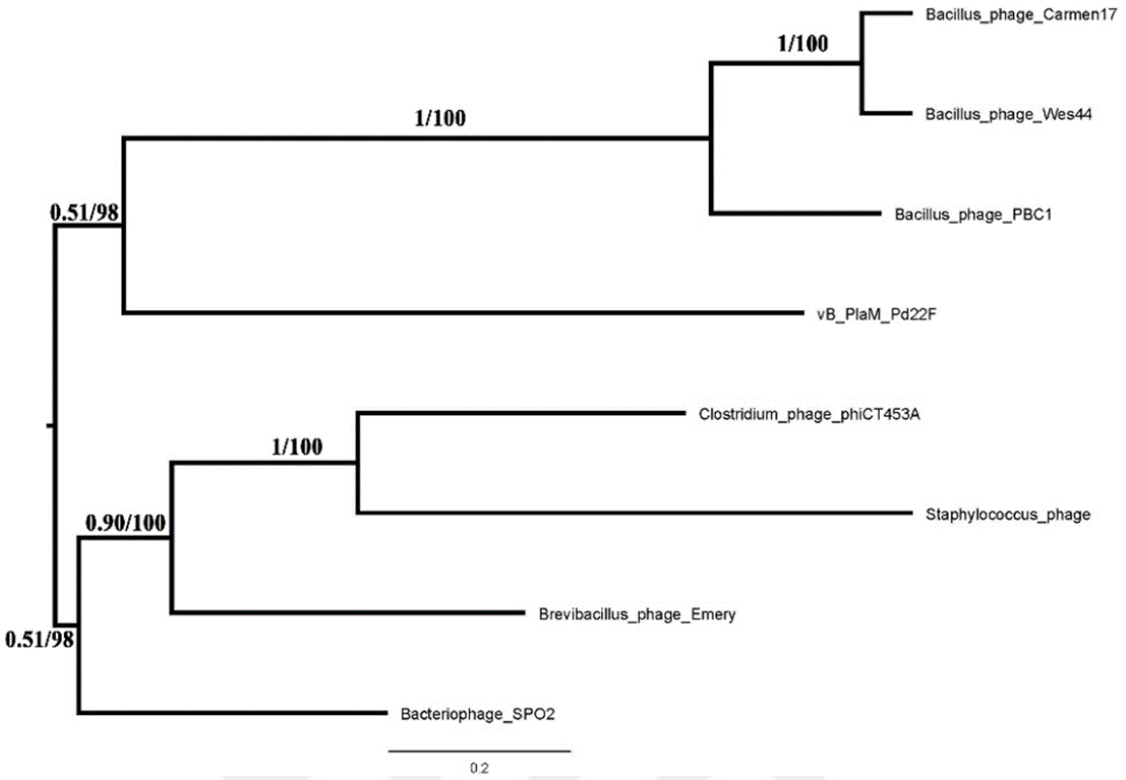


Şekil 24. *Paenibacillus* fajlarının major kapsid dizilerine dayanan filogenetik ağacı**.**



Şekil 25. Major kapsid protein bölgesine göre VIRIDIC analiz sonucu

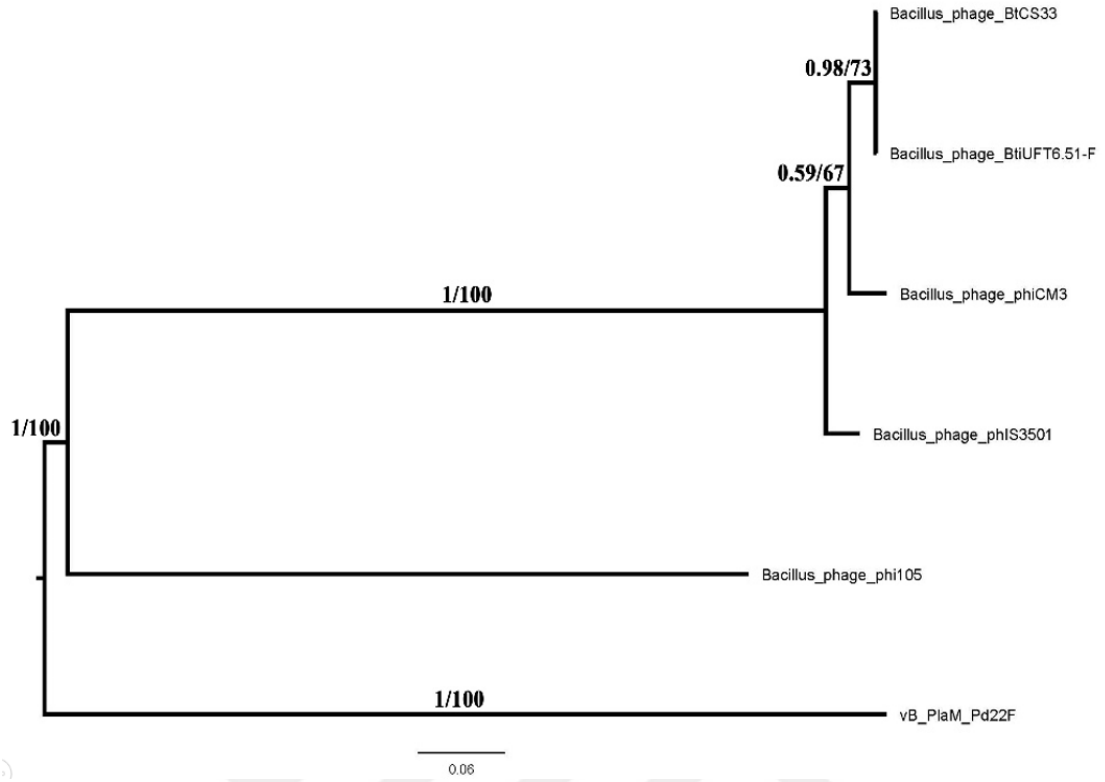
Bakteriyofaj Pd22F ve kuyruklu fajlar arasındaki evrimsel ilişkileri araştırmak için DNA polimeraz, portal protein ve terminaz large subunit için filogenetik ağaçlar oluşturuldu. Filogenetik analizi üç protein bölgesine göre bazı seçilmiş fajlarla birlikte Bayesian ve Maximum Likelihood yöntemleri kullanılarak analiz edildi. DNA polimeraza dayalı filogenetik analizde, bakteriyofaj Pd22F'nin filogenetik ağaçlardaki diğer fajlardan açıkça farklı olduğu gözlemlendi (Şekil 26).



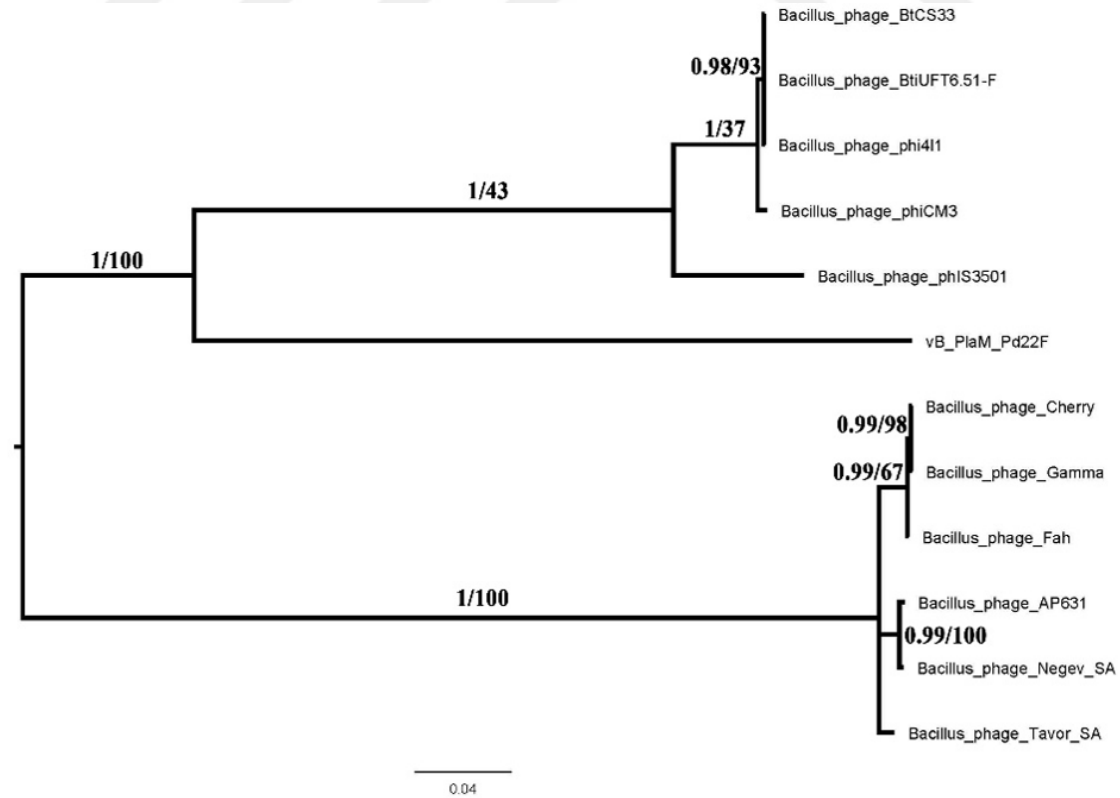
Şekil 26. Bakteriyofaj Pd22F fajının DNA polimeraz I dayanan filogenetik ağacı

Portal proteine dayalı filogenetik analizde, bakteriyofaj Pd22F'nin en çok *Bacillus* cinsi bakteriye ait fajlarla ilişkili olduğu belirlendi. Portal proteine göre oluşturulan filogenetik ağaçta, bakteriyofaj Pd22F fajının diğer fajlardan ayrı bir dal halinde ayırt edildiği belirlendi (Şekil 27).

Terminaz large subunit (gpA) proteininin (gp70), DNA paketlemesinin geç aşamalarında aktif olarak yer aldığı bilinmektedir (Duffy ve Feiss, 2002). Filogenetik analizler sonucunda fajların terminase large subunit gen bölgeleri için iki gruba ayrıldı. Bakteriyofaj Pd22F, filogenetik ağaçta diğer faj gruplarından açıkça ayrıldığı gözlendi (Şekil 28).



Şekil 27. Bakteriyofaj Pd22F fajının portal proteine dayanan filogenetik ağacı.



Şekil 28. Bakteriyofaj Pd22F fajının terminase large subunit göre filogenetik ağacı.

Yukarıdaki DNA polimeraz, terminase large subunit ve portal protein dizilerine göre oluşturulan filogenetik ağaçta kullanılan fajların listesi Tablo 8'de verilmektedir.

Tablo 8. Filogenetik ağaçta kullanılan fajların GenBank erişim numaraları.

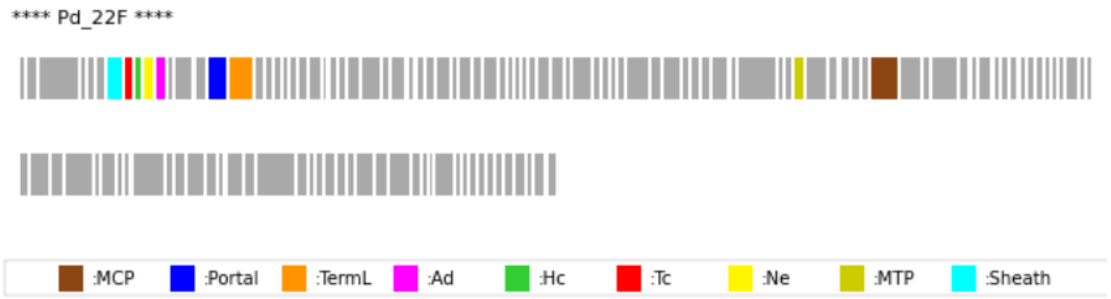
Protein	Faj ismi	Erişim Numarası
DNA polimeraz	Bakteriyofaj SPO2	K02752.1
	Brevibacillus faj Emery	KC595516.1
	Clostridium faj phiCT453A	NC_028991.1
	Staphylococcus faj StauST398-2	JQ957932.1
	Bacillus faj PBC1	NC_017976.1
	Bacillus faj Carmen17	NC_048698.1
	Bacillus faj Wes44	MH598512.1
Portal Protein	*Bacillus* faj phiCM3	NC_023599.1
	Bacillus faj phi105	HM072038.1
	Bacillus faj phIS3501	NC_019502.1
	Bacillus faj BtiUFT6.51-F	MG710484.1
	Bacillus faj BtCS33	JN191664.1
	Bacillus faj BtCS33	JN191664.1
	Bacillus faj phi4I1	KT967075.1
Terminase Large subunit	*Bacillus* faj phIS3501	NC_019502.1
	Bacillus faj phiCM3	NC_023599.1
	Bacillus faj BtiUFT6.51-F	MG710484.1
	Bacillus faj Tavor_SA	KY963369.1
	Bacillus faj Cherry	DQ222851.1
	Bacillus faj Negev_SA	ARW58459.1
	Bacillus faj Fah	NC_007814.1
	Bacillus faj Gamma	NC_007458.1
	Bacillus faj AP631	MK085976.1

VIRFAM analizine göre, bakteriyofaj Pd22F, Tip 1–cluster 4 kategorisi myovirus olarak sınıflandırıldı ve bu fajın *Myoviridae* fajlarının yapısal organizasyonuna benzediği belirlendi (Şekil 29). VIRFAM analizinde, Aclame'de yüksek benzerlik göstererek yakından ilişkili fajların protein ismi, numarası, faj ismi ve benzerlik yüzdeleri Tablo 9'da verildi.

Tablo 9. VIRFAM analizinde Aclame'de bakteriyofaj Pd22F proteinlerinin benzerliği.

Protein	Aclame'de Karşılık Gelen Protein	Aclame Faj	Dizi benzerliği
MCP	Protein: vir: 79548	cdtI	23%
	Protein: vir: 96762	VP882	21%
	Protein: vir: 103886	D3112	20%
Portal	Protein: vir: 1266	PHİ-105	43%
	Protein: vir: 102118	PhiSM101	32%
	Protein: vir: 102855	Cherry	30%
TermL	Protein: vir: 81178	*Geobacillus* virüs E2	55%
	Protein: vir: 1263	Phi-105	47%
	Protein: vir: 102079	Fah	46%
MTP	Protein: vir: 2036	P2	27%
	Protein: vir: 6080	WPhi	27%
	Protein: vir: 5712	L-413C	27%
Sheath	Protein: vir: 80052	B054	32%
	Protein: vir: 95263	Felix01	25%
	Protein: vir: 5260	Aaphi23	20%
Ad1	Protein: vir: 486	P27	24%
	Protein: vir: 80320	Phi644-2	21%
	Protein: vir: 1435	PhiE125	20%
Hc1	Protein: vir: 80104	B054	23%
	Protein: vir: 95261	Felix 01	25%
	Protein: vir: 5258	Aaphi23	17%
Ne1	Protein: vir: 99546	BcepF1	26%
	Protein: vir: 96105	F8	26%
	Protein: vir: 5257	Aaphi23	24%
Tc1	Protein: vir: 80105	B054	31%
	Protein: vir: 5259	Aaphi23	18%
	Protein: vir: 101569	Bcep43	10%

MCP; major capsid protein, Portal; Portal protein, TermL; terminase large subunit, MTP; major tail protein, Sheath; sheath (yalnızca *Myoviridae*), Ad1; adaptor of type 1, Hc1; head-closure of type 1, Ne1; neck protein of type 1; Tc1; tail-completion of type 1.



Şekil 29. VIRFAM analizine göre bakteriyofaj Pd22F proteinlerinin genom sırası.

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Çalışmada hastalık şüpheli bal, arı ve ölü larva örneklerinden izole edilen *P. larvae, P. dentritiformis* suşları ve referans suşlar (ERIC I-IV) kullanıldı. Konak aralığının belirlenmesinde arı ve larvaların doğal florasında bulunan bakteriler de kullanıldı. Hastalık etkeni *Paenibacillus larvae* suşları Doğu Karadeniz bölgesinden gelen hastalık şüpheli örneklerden önceden yapılan yüksek lisans tezleri kapsamında izole edilmiş ve tanımlanmış bakteri suşlarıdır (Tablo 4). Kullanılan suşlar hem farklı illerden, hem farklı arıcılardan ve de farklı arı ürünlerinden (yetişkin arı, larva, bal ve petek gibi) izole ve karakterize edilmiştir. Suşların makroskobik ve mikroskobik morfolojik özellikleri her aşamada kontaminasyon riskinin ekarte edilmesi adına test edilmiştir (Şekil 7). Elde edilen suşlar ve referans suşlarından yapılan faj içeriği ve konak genişliği çalışması sonucunda toplam 14 suşta belirgin faj morfolojileri morfolojik olarak gözlenmiştir (Tablo 5). Genel olarak bulanık ve şeffaf plak oluşumu gözlenmiş, tür bakımından morfolojide ayrım yapılamadığı ancak *P. dendritiformis* suşlarına ait fajların karakterizasyonunun yayılma gösteren bakteriler olduğu için daha güç olduğu belirlenmiştir. Fajların çapraz enfeksiyonunda çok sayıda suş kullanılmış, ancak tez kapsamında 29 tanesi dikkate alınmıştır (Tablo 6). Faj varlığı, berrak veya bulanık plak oluşturma özelliklerine göre *P. dendritiformis* fajları (PB13.2, PB32A ve SV22F) ve *P. larvae* fajları seçilmiş olup her birinin en az bir, en çok 10 konağı enfekte edebilen fajlar olduğu belirlendi. En uygun konakların PB6A ve SV27B olduğu, bu suşları PB6A, PB5A ve PB5B'nin takip ettiği gözlendi. Konak genişliği dar olan yani konaklardan sadece birini (Bakteriyofaj PB4, PB13.2 ve PB30A) ve ikisini enfekte edebilen (bakteriyofaj PB13.1B ve PB32A) fajlar belirlendi. En geniş konak aralığına sahip olan faj *P. dentritiformis* suşuna ait bakteriyofaj Pd22F toplamda on farklı konağı ve iki ayrı türü (*P. dentirtiformis* ve *P. larvae*) enfekte edebiliyor olması, faj terapisi adına önemli bulunmuştur. Çalışmada ayrıca Pd22F fajının lizin genleri için daha ileri çalışmalar yapılması gerektiği düşünülmektedir. *P. larvae* fajları arasından PB31B ve SV21 fajları geniş konak aralığına sahip diğer fajlardır. Bakteriyofaj PB5B, PB6B, SV21, PB31B ve PB34'ün *P. larvae* referans suşlarını da enfekte etmesi farklı ülkelere ait örnekler olduğu için önemli bulunmuştur (Tablo 6, Şekil 8).

Bakteriyofaj SV21'in, test edilen 29 suşun 6'sını enfekte ettiği ve şeffaf plak morfolojisi göstererek litik spektruma sahip olduğu gözlemlendi. Referans suşlar konak olarak kullanıldığında, *P. larvae* LMG 16247'nin (ERIC-IV) enfekte olduğu ancak *P. larvae* LMG 16252'nin (ERIC-II) enfekte olmadığı belirlendi. Ayrıca bal arısı larvalarının bağırsak mikrobiyotasında bulunan *B. subtilis, L. casei* suşları olumsuz etkilenmemiştir (Tablo 6). Her fajın plak morfolojisinin genel olarak farklı olduğu gözlendi. İndüksiyon ile elde edilen faj lizatlarından bal arısı larvalarının bağırsak mikrobiyotasında bulunan *Lactobacillus casei, B. subtilis* ve *B. licheniformis* etkilenmediği, sadece hastalık etkeni *P. larvae* ve *P. dentritiformis* suşlarını seçici olarak enfekte edebildiği gözlendi.

Merrill vd. (2014) *P. larvae* suşlarından 6 bakteriyofaj izole etmiş, konakçı aralıklarını belirlemiş ve *P. larvae*'lar dışındaki suşları (*Bacillus cereus, B. subtilis, Lactobacillus acidophilus, Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*) enfekte etmediklerini bildirmiştir. Bu sonuçlar çalışmamızda karşılaştığımız sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte, geniş bir konukçu aralığına sahip litik fajların varlığı önemli bulunmuştur. Beims vd. (2015), Bakteriyofaj HB10c2'nin geniş bir konakçı aralığına sahip olduğu sayısız *P. larvae* suşuna ve ayrıca mikrobiyota ve çevresel kökenli *Bacillales* suşlarına karşı litik aktivite gösterdiğini bildirmiştir. Çalışmamızda izole edilen fajların hiçbirinin *Bacillus* sp. suşunu enfekte etmediği gözlenmiştir.

vB_PlaP _SV21, MYPGP yumuşak agarda (%0.7 (w/v) konak üzerinde 1.5 ile 2.5 mm, *Paenibacillus* faj PB34'ün plak büyüklüğü 0.5 ile 1.0 mm arasında, *Paenibacillus* faj PB31B ise enfekte ettiği konak üzerinde 1.0 ile 1.5 mm arasında faj plakları oluşturduğu ölçüldü (Şekil 8). Ribeiro vd. (2019) API480 fajının konak üzerinde 0.9 to 2.6 mm, faj plağı oluşturduğunu bildirmiştir. Jończyk-Matysiak vd. (2021) tarafından en son yayınlanan çalışmada izole edilen bakteriyofajların (1/A, 2/A, 3/A, 4/A and 5/A) yaklaşık 0.5 mm plak ölçümüyle çalışmamızdaki verilerle morfolojik olarak benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Günümüzde izole edilen *Paenibacillus* fajları *Paenibacillus* faj phiIBB_P123 (Portekiz), faj HB10c2 (Almanya) ve faj vB_PlaP _API480 (İspanya) (Oliveira vd., 2013; Beims vd., 2015; Ribeiro vd., 2019) haricindeki fajların tamamının Amerika Birleşik Devletleri'nden izole edildiği bildirilmiştir. Fajların coğrafi kaynağı, izole edildikleri enstitüdür. API480 fajı, İspanya'da Ribeiro vd. (2019) tarafından kovan altındaki

topraktan izole edilirken, bakteriyofaj SV21, *P. larvae* suşu SV21 izolatının Mit-C indüksiyonu ile izole edilen bir profajdır. Bakteriyofaj SV21, Türkiye'den bildirilen ilk *P. larvae* bakteriyofajıdır. Bakteriyofaj API480 ve bakteriyofaj SV21 arasında yüksek benzerliğin ortaya çıkması (Şekil 15), coğrafi köken ile genom dizi benzerliği arasında bir ilişki olmadığını göstermektedir.

Paenibacillus türlerinin çeşitli ortamlardan (toprak, bitki rizosferi, böcek larvaları ve sediment mikrobiyal yakıt hücrelerinin (SMFC) anodik yüzeyindeki biyofilm gibi) izole edildiği bildirilmiştir (McSpadden vd., 2004; Lapidot vd., 2015; Hubenova vd., 2020; Ruiu, 2020). Hastalık şüpheli baldan izole edilen sekonder hastalık etkeni *P. dendritiformis* Pd22F'in Mitomisin C ile indüksiyonuyla bakteryofaj Pd22F (vB_PlaM_Pd22F) izole edildi. Bakteriyofaj Pd22F , *P. dendritiformis*'in indüklenmesiyle elde edilen ve literatür ilk kez kazandırılan bir bakteriyofajdır. *P. dentritiformis* AvYÇ hastalığının sekonder etkeni olması son yıllarda kabul edilmiş olup bu çalışmamızda faj içeriğinin ilk olarak literatüre kazandırılması açısından da ayrı bir önem taşımaktadır.

Çalışmamızda fajların Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri alınmıştır. Bakteriyofaj SV21'in izometrik baş çapı 60.0±1 nm, kuyruk uzunluğu 12.0±1 nm ve kuyruk genişliği 7.44±1 nm idi; *Podoviridae* ailesine ait kontraktil olmayan kısa kuyruklu faj parçacıkları gösterildi (Tablo 7, Şekil 9-10). ICTV tarafından belirlenen morfolojik özellikler ve kriterlere göre (Fauquet vd., 2005) bakteriyofaj SV21, Caudovirales ordosu, *Podoviridae* familyası içinde sınıflandırıldı. API480 fajının TEM görüntüsünde morfolojik ölçümlerinde 58 nm çapında ikosahedral kapsid ve 12 × 8 nm kısa kontraktil olmayan kuyruk ölçüldü. Jończyk-Matysiak vd. (2021) tarafından izole edilen *Siphoviridae* familyasındaki fajların baş büyüklüğü 100-150 nm aralığında, kuyruk uzunluğu ise 135-220 nm aralığında ölçüldü.

ICTV tarafından belirlenen kriterlere göre vB_PlaM_Pd22F fajı *Myoviridae* familyası, Caudovirales ordosunda sınıflandırıldı. Bakteriyofaj Pd22F'nin konakçı bakterilerin bazılarında bulanık (*P. larvae* PB3.2A, PB13.2, *P. dentritiformis* PB32A) diğerlerinde ise (*P. larvae* PB5A, PB5B, PB6B, SV21 ve SV27B ile *P. dentritiformis* PB11) tam açılma şeklinde plak oluşturduğu gözlendi. TEM görüntülerinde, baş büyüklüğü 55.2 ±1 nm, kuyruk uzunluğu 160.60 ±1 nm ve kuyruk genişliği 15.44±1 nm olarak ölçüldü. Bakteriyofaj PB34 baş büyüklüğü 79.23 ±1 nm ve bakteriyofaj PB31B

baş büyüklüğü ise 64.25±1 nm olarak ölçüldü (Tablo 7). Merrill vd. (2014) çalışmasında, *Myoviridae* familyasında *P. larvae*'yı enfekte edebilen beş farklı bakteriyofaj (Abouo, Davies, Emery, Jimmer 1 ve Jimmer 2) izole edildi. Bu beş fajın baş büyüklüğü 62.9 ± 2.5 - 73.5 ± 3.2 nm arasında, kuyruk uzunluğu 75.6 ± 8.7- 162.2 ± 5.2 nm arasında ölçüldüğü bildirildi.

SDS-PAGE analizinde, bakteriyofaj SV21'in protein profiline bakıldığında yaklaşık 34 kDa, 36 kDa ve 65 kDa'lık moleküler ağırlıklara sahip üç ana protein bandının varlığı gözlendi (Şekil 11). Yapısal proteinleri açısından, bakteriyofaj SV21'in API480 fajına benzer olduğu bulundu. Yoğun olarak gözlemlenen diğer bantların (B5, B6 ve B7) sırasıyla 68.14 kDa (Portal protein), 60.63 kDa (DEAD/DEAH box helikaz) ve 55.47 kDa (Terminase large subunit) olarak bildirilen bantlara benzer olduğu düşünülmektedir. Bakteriyofaj SV21'in SDS-PAGE jel görüntüsündeki gözlemlenebilir protein bantlarından ikisi olan B9 ve B10 bantlarının, 31.45 ve 34.38 kDa moleküler ağırlığına karşılık geldiği, bu bantların API480 fajının SDS-PAGE jel görüntüsünde GP7 ve GP8'e karşılık geldiği ve major kapsid proteinine benzer proteinler olduğu rapor edilmiştir (Ribeiro vd., 2019).

Bakteriyofaj Pd22F'in SDS-PAGE jel görüntüsünde üç ana bant belirlendi. Bu üç bandın, yaklaşık 40 kDa, 30 kDa (iki ana yapısal protein) ve 25 kDa (bir küçük yapısal protein) moleküler ağırlıklarına karşılık gelen proteinler olduğu gözlendi (Şekil 11). Faj proteinlerinin amino asit dizisi moleküler ağırlık olarak değerlendirildiğinde, 40 kDa ağırlığındaki bandın major kapsid proteini olduğu düşünülmektedir.

Ribeiro vd., (2019), API480'in, enfekte ettiği hücre başına yaklaşık 3 PFU/mL faj sayısı ve konakçı hücreye absorbe olmasının (30 dakika içinde) yavaş olduğu bildirildi. Bakteriyofaj HB10c2 patlama boyutunun ise, *P. larvae* ERIC II (DSM 25430) enfeksiyonundan sonra 8.34 PFU/mL olarak hesaplandı (Beims vd., 2015). Çalışmamızda enfeksiyon süresi 30 dakika ve latent süre 105 dakika olarak belirlendi. Bakteriyofaj SV21 fajının patlama boyutu, enfekte bakteri hücresi başına yaklaşık 10 PFU/mL partikülü olarak hesaplandı (Şekil 12). 105 dakikalık bir latent dönemden sonra aynı boyutta çoklu patlama meydana geldi ve ulaşılan maksimum faj konsantrasyonu 10^{10}-10^{11} PFU/mL'dir. *Paenibacillus* faj PB31B enfeksiyon süresi 30 dakika ve latent süresi 90 dakika olarak belirlendi. *Paenibacillus* faj PB31B patlama boyutu, enfekte bakteri hücresi başına yaklaşık 10 faj partikülü olarak hesaplandı (Şekil 13). Latent periyot (90 dakika) sonununda aynı boyutta çoklu patlama meydana geldi ve ulaşılan maksimum faj

konsantrasyonu $1x10^{10}$-$1x10^{11}$ PFU/mL olarak belirlendi.

Paenibacillus faj PB34 enfeksiyon süresi 30 dakika ve latent periyot ise 120 dakikadır. *Paenibacillus* faj PB31B patlama boyutu, enfekte bakteri hücresi başına yaklaşık 10 faj partikülü olarak hesaplandı (Şekil 14). 120 dakikalık bir latent dönemden sonra aynı boyutta çoklu patlama meydana geldi ve ulaşılan maksimum faj $8x10^{10}$-$8x10^{11}$ PFU/mL olarak belirlendi. *Paenibacillus* faj Pd22F'nin latent periyodu ve patlama boyutu, oluşan plak görüntüsünün petri yüzeyinde bulanık olması nedeniyle plak sayısı belirlenemedi.

T4 fajları ile yapılan bir araştırmaya göre, faj gelişimi (patlama boyutu ve latent periyod) ve hücre liziz parametreleri bakteri üreme hızına bağlıdır (Hadas vd., 1997). Lizojenik özelliklerle ilişkili ılıman fajların çalışmalarında, düşük faj salınımının yetersiz büyüme koşullarından kaynaklanabileceği bildirildi (Touchon vd., 2016). Buna göre, *P. larvae* gibi yavaş büyüyen bakterilerde yavaş adsorpsiyon oranları, küçük patlama boyutu ve yüksek bir gecikme süresi gözlemlenebilir (Garcia-Gonzalez vd., 2014).

Bakteriyofaj SV21 genomu, % 39.33 GC içeriğine sahip, 44949 bp doğrusal dsDNA oluşturmaktadır. Bakteriyofaj SV21, 55'i pütative proteinlerle ve 22'si fonksiyonu bilinen bir proteinle eşleşmiş, 77 kodlama dizisine (CDS) sahip olduğu belirlendi. Ayrıca genomun, soldan sağa 21 gen bölgesi ve ardından sağdan sola 56 gen bölgesinden oluştuğu ve %91,2'si protein kodladığı belirlendi (Şekil 16, Ek 1). *P. larvae* siphovirusleri faj genomlarında kodlanan genlerin sayısı 58 (HB10c2) ile 91 (Scottie) arasında değişmektedir (Stamereilers et al., 2018). Bu fajların genom uzunluğu 35644 bp (HB10c2) ila 56468 (Ash) arasında değişmektedir. Fern, Harrison ve Vegas kümesindeki fajlar 35-45 kb aralığındayken, Halcyone kümesindeki fajlar 50-56 kb aralığında bir genom uzunluğuna sahiptir. Bakteriyofaj SV21'in 44949 bp''lik bir genom uzunluğuna sahip olduğu, API480 fajının ise 45026 bp'lik bir genom uzunluğuna sahip olduğu bulundu. Bakteriyofaj Lily, 44952 bp genom uzunluğu ve %42.7 GC içeriği bulunurken, API480'in genom uzunluğu 45026 bp ve GC içeriği % 39.24'tür. (Ribeiro vd., 2019).

Bakteriyofaj Pd22F(vB_PlaM_Pd22F) genomu, GC içeriği %56.68 olan 86388 bp dairesel dsDNA oluşmaktadır. Bakteriyofaj Pd22F, 66'I pütative proteinlere sahip olduğu, 57'sinin fonksiyonu bilinen bir proteinle eşleştiği ve 124 kodlama dizisine (CDS) sahip olduğu belirlendi. Ayrıca genomun, soldan sağa 75 gen bölgesi ve sağdan sola 48 gen bölgesinden oluştuğu ve % 88.62'sinin protein kodladığı belirlendi (Şekil 17, Ek 2).

P. larvae miyovirüslerinde genom uzunluğu 45552 bp -58572 bp aralığında ve G+C içeriği % 38.0 ila % 41.44 aralığındadır. *P. larvae* miyoviruslerinde faj genomlarında kodlanan genlerin sayısı 94 (Davies, Emery) ile 102 (Jimmer1, Jimmer2 ve Abouo) arasında değişmekte ve genomun % 73 ila % 90'ında protein kodladığı bildirildi (Merril vd., 2014). Çalışmamızda karakterize edilen bakteriyofaj Pd22F'in daha önce bildirilen *Paenibacillus* fajlarından yapısal ve genetik olarak farklılıklar içerdiği belirlendi. *Paenibacillus* fajları ile karşılaştırıldığında, bakteriyofaj Pd22F, genom uzunluğu (86388 bp), G+C içeriği (%56.68), kodlanan genomun yüzdesi (124 CDS) açısından tamamen farklıdır. Kodladığı gen bölgesi, genom uzunluğu ve G+C oranının *Paenibacillus* fajlarına göre daha yüksek olduğu belirlendi.

Prolin (Pro) için antikodonlar TGG ile birlikte bir tRNA geninin, bakteriyofaj Pd22F genomunun aşağı akışında (Pro için 65.818 ila 65.890 bp arasında) bulunduğu belirlendi (Şekil 17). Dragolir faj (Merrill vd., 2014; Stamereilers 2018; Ribeiro vd., 2019) dışında *P. larvae* suşlarını enfekte edebilen fajlarda hiçbir tRNA rapor edilmemiştir. Bakteriyofaj Pd22F'de tRNA bulunması önemli bir veri olarak gözlenmiştir.

Bakteriyofaj SV21 genomu, antibiyotik direnç genleri veya tRNA'lar genomda tanımlanmamasına rağmen, MazE (gp74) antitoksin ve mRNA-degrading endonükleaz (gp75) MazEF toksin-antitoksin modülünün bileşenlerini içerdiği belirlendi (Ek 1). Bakteriyofaj Pd22F genomunda virülans ile ilgili üç gen bölgesi (tip II HicAB toksin-antitoksin modülü, VapE ve Peptidaz) belirlendi. *Paenibacillus* siphovirus arasında, toksin-antitoksin sistemi yaygın olmasına rağmen, korunmuş bir bölge değildir. Toksin-antitoksin modülü, Tadhana (gp62, gp63), Fern (gp65, gp66), Diane (gp81, gp82) ve PBL1c (gp74, gp75) fajları gibi *Paenibacillus* profajlarında bulunan bir modüldür (Stamereilers vd., 2018). *Paenibacillus* profajlarının genomunda, bir HicAB toksin-antitoksin modülü olarak kodlanırken, bakteriyofaj SV21 ve API480'de ise MazEF toksin-antitoksin modülü olarak kodlanmaktadır (Stamereilers vd., 2019; Ribeiro vd., 2019). Bakteriyofaj SV21 ve API480 *Podoviridae* familyasında, profajların ise *Siphoviridae* familyasında olması dikkat çekicidir. Toksin-antitoksin modülünün podovirüs ve siphovirüslerde kodlanırken, miyovirüslerde kodlanmadığı bildirildi (Merril vd.,2014). *Paenibacillus* faj Pd22F genomunda tip II HicAB toksin-antitoksin modülü kodlanmakta ve *Myoviridae* familyasında yer almaktadır. Çalışmamızda *Myoviridae*

familyasındaki bakteriyofaj Pd22F genomunda virülansla ilişkili tip II toksin-antitoksin (HicA, HicB) modülünün varlığı ilk kez bu çalışmamızla bildirilmektedir. Toksin-antitoksin (TA) modülleri, bakteri ve arkea genomlarında yaygın olarak bulunan küçük genetik modüllerdir. Tip II toksin-antitoksin modülü en iyi karakterize edilen modüldür. Bu modül (Tip II toksin-antitoksin) sisteminin, konak içindeki profajların genomlarında faj stabilizasyonu ve kendini koruma için kodlandığı bildirilmektedir (Van Melderen, 2010; Yamaguchi ve Inouye, 2011; Wang vd., 2012; Rocker ve Meinhart, 2016; Page ve Peti, 2016; Yao vd., 2018).

Virüsleri sınıflandırmak, 16S rRNA veya ITS genlerine benzer şekilde viral çeşitliliği kataloglayacak korunmuş işaretleyici genlerin olmaması nedeniyle karmaşık bir hal almaktadır. Bu karmaşıklığı çözebilmek için, podovirüslerdeki DNA polimeraz gibi fonksiyonel genler veya miyovirüslerdeki portal protein ve major kapsid proteini gibi yapısal genler dahil olmak üzere, belirli faj grupları için faj çeşitliliğinin belirteçleri olarak çeşitli yapısal veya fonksiyonel genler kullanılmaktadır (Breitbart vd., 2004b; Chow ve Fuhrman, 2012).

Bakteriyofaj SV21 ve Pd22F'in, DNA paketleme ve faj morfogenezi genleri, *P. larvae* siphoviruslerinde olduğu gibi solda yer almaktadır. Bakteriyofaj SV21'de bu bölgede, fonksiyonu bilinen üç protein sırasıyla; major kapsid proteini (gp16), portal proteini (gp18) ve terminaz large subunit (gp20) bulunmaktadır (Ek 1). ΦPd22F fajında bu bölgede önemli fonksiyona sahip üç protein sırasıyla; portal protein (gp15), terminaz large subunit (gp70) ve DNA polimeraz I (gp88) bölgeleri bulunmaktadır (Ek 2).

Stamereilers vd. (2018), *Paenibacillus* fajlarının tüm genoma dayalı filogenetik ağacında, dört (Fern, Vegas, Harrison, Halcyone) kümenin oluştuğunu, Bakteriyofaj Lily ve API480'in ise ayrı ayrı dallarda yer alarak iki singleton oluşturduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda VICTOR ile oluşturulan ağaçta ortaya çıkan sonuca göre Fern, Vegas, Harrison, Halcyone ve API480 küme olarak yeniden oluşturuldu. Bacteriophage Lily filogenetik ağaçta singleton olarak tek başına kalmaya devam etti. Böylece *Paenibacillus* fajları beş küme ve bir singleton olarak sınıflandırıldı (Şekil 18). *P. larvae* fajları (48 siphovirus ve 1 podovirus) ve bakteriyofaj SV21 arasındaki intergenomik benzerlik ve hizalanmış genom fraksiyonları, ICTV tarafından önerilen VIRIDIC kullanılarak çizildi. Tüm genoma dayalı yapılan VIRIDIC analizinde, ΦSV21 ve API480 arasında %85,6 nükleotid bazlı intergenomik benzerlik gösteren yeni bir küme oluşturduğu teyit edildi.

API480 olarak adlandırılan bu yeni küme, Harrison (Harrison ve Paisley) kümesi gibi iki bakteriyofajdan oluşmaktadır. Bakteriyofaj SV21'in Wanderer (% 4,8), LincolnB (% 4,8), Harrison ve Paisley (% 4,0) fajları ile yakından ilişkili olduğu belirlendi. API480 fajının (vB_PlaP_API480) genomunun, 17'sinin fonksiyonel proteinler olduğu bilinen 77 geni (CDS) kodladığı bildirildi (Ribeiro vd., 2019). Karşılaştırmalı genom analizinde bakteriyofaj SV21 genomunun 77 gen dizisini (CDS) kodladığı ve 22 tanesinin fonksiyonel protein olduğu belirlendi. Kodlanan üç protein bölgesinin ise, GenBank'ta bilinen herhangi bir aminoasit dizisiyle eşleşmedi (Ek 1).

Paenibacillus fajları tarafından kodlanan fonksiyonu bilinen gen ürünleri arasında N-asetilmuramoil-L-alanin amidaz, terminaz large subunit ve major kapsid proteini, tüm *Paenibacillus* fajlarında fonksiyonu bilinen proteinlerdir (Stamereilers vd., 2018). Bakteriyofaj SV21'in evrimsel konumunu daha fazla araştırmak için bakteriyofaj SV21'in filogenetik analizi, bazı seçilmiş *P. larvae* fajları ve API480 fajıyla birlikte, bu üç fonksiyonel proteine göre Bayesian ve Maximum Likelihood olasılık yöntemleri kullanılarak analiz edildi. Terminaz large subunit (gpA), DNA paketlemesinin geç aşamalarında aktif olarak yer aldığı bilinmektedir (Duffy ve Feiss, 2002). Çalışmamızda bakteriyofaj SV21 genomunda terminaz large subunit gp20'de yer alırken, API480 faj genomunda ise gp4'te yer aldığı bildirilmiştir. Fajlarda terminaz large subunit bölgesi değerlendirildiğinde, Wanderer, LincolnB ve Dragolir %100 benzerlikle gruplanırken, bakteriyofaj Lily diğer *Paenibacillus* fajlarının aksine ayrı bir dal oluşturdu (Şekil 20). Bakteriyofaj SV21 terminaz large subunit bölgesinin, API480'e %98.68'e benzer olduğu belirlendi. Filogenetik ağaç ve VIRIDIC analizi sonucuna "Terminaz large subunit" bölgesine göre, bakteriyofaj SV21 ve API480 aynı dalda bulunduğunu ve yakından ilişkili olduğunu gözlendi (Şekil 21).

Bakteriyofajların % 95'inden fazlasını temsil eden dsDNA fajları, konak hücre lizizi için holin ve endolizin adı verilen en az iki proteini kodlar (Ackermann, 2009). Endolizinler, enfeksiyon sırasında konakçı peptidoglikan duvarını parçalamak için kuyruklu fajların kullandığı enzimlerdir ve hızlı ozmotik hücre lizizini indüklerler (Young ve Wang, 2006; São-José vd., 2007). Holinler, faj replikasyonunun orta veya geç evrelerinde sitoplazmik zarda oluşmaya başlayan hidrofobik proteinlerdir. Sitoplazmik membranda belirli bir konsantrasyona ulaştıktan sonra hücrenin hızlı ölümüne yol açan delikler oluşturmak üzere tetiklenirler (Gründling vd., 2001). *P. larvae* fajları (Diane,

PBL1c ve Xenia gibi profajlar dahil) *in vitro*'da litik özellik gösterirler (Stamereilers vd., 2018). Konak hücre lizis proteinleri, holin (gp4 ve gp7) ve endolizin (gp6) genomun başında bulunurlar. Endolizin proteininin (gp6) bir N-asetilmuramoil-L-alanin amidaz olarak işlev gördüğü tahmin edilmektedir. Endolizinin yukarı ve aşağı akışında olduğu tahmin edilen iki holin proteini ile holin/endolizin kasetini oluşturur. ΦSV21, tüm *P. larvae* fajlarının N-asetilmuramoil-L-alanin amidaz (endolizin) proteini ile ≥ %85 üzerinde yüksek bir benzerlik gözlenirken, API480 fajıyla % 90.7 benzerlik gösterdi. Bakteriyofaj SV21'in, N-asetilmuramoil-L-alanin amidaz bölgesine oluşturulan filogenetik ağaçta iki dal oluştu. Filogenetik ağaç ve VIRIDIC analizi sonucu, N-asetilmuramoil-L-alanin amidaz bölgesine göre iki ana grup oluşturduğu belirlendi (Şekil 21, Şekil 23).

Kapsidin birincil bileşeni olan major kapsid proteinin, benzer fajlar arasında korunur olması ve sınıflandırmada sıklıkla kullanılması önemlidir. Bakteriyofaj SV21 major kapsid proteininin, API480 fajına % 96.78 benzer gösterdiği belirlendi (Şekil 24, Şekil 25). Filogenetik ağaç ve VIRIDIC sonucunda, major kapsid proteinine göre beş grubun oluşturulduğu belirlendi. API480 fajının major kapsid proteini gp8'de bulunurken (Riberio ve diğerleri, 2019), bakteriyofaj SV21'de major kapsid proteininin gp16'da yer aldığı çalışmamızda belirlendi. *Podoviridae* ailesinde yer alan bakteriyofaj SV21 ve API480'in genomlarındaki yapısal proteinleri kodlayan dizilerin çok benzer olması doğaldır (Şekil 15).

Filogenetik analizler sonucunda, terminaz large subunit ve major kapsid protein gen bölgeleri için beş grup oluşurken endolizin (N-asetilmuramoil-L-alanin amidaz) bölgesi için iki ana grup oluştuğu belirlendi. Çalışmamızda izole edilen bakteriyofaj SV21 ve API480 ile birlikte lizin protein bölgesi dışındaki filogenetik ağaçlarda diğer faj gruplarından açıkça ayrıldığı görüldü.

Bakteriyofaj Pd22F'in evrimsel konumunu belirlemek için, filogenetik analizinde bazı seçilmiş fajlarla birlikte üç protein (DNA polimeraz, portal protein ve terminaz large subunit) bölgesine göre Bayesian ve Maximum Likelihood yöntemleri kullanılarak analiz edildi. BLAST sonucuna göre, en yüksek benzerlik oranı olan fajlar DNA polimeraz I göre karşılaştırıldığında, *Brevibacillus* Emery fajında gp81'de bulunurken, bakteriyofaj Pd22F'de ise gp88'de bulunduğu belirlendi (Şekil 19).

Viral genom (dsDNA) paketlenmesinde ve salıverilmesinde çok önemli bir rol oynayan portal protein, aynı zamanda baş-kuyruk bağlayıcısı olarak da bilinir (Prevelige ve Cortines, 2018). Filogenetik analizler sonucunda fajlar portal protein gen bölgelerine göre üç gruba ayrıldı (Şekil 27). BLAST sonucuna göre benzer olan diğer fajlar sırasıyla *Bacillus* fajlarıdır (*Bacillus* faj phi105, phiS3501, phiCM3, BtiUFT6.51-F ve BtCS33). Portal proteinin bu fajlardaki yeri değişsede ((BtCS33, BtiUFT6.51-F (gp3), phi105 (gp4), phiCM3 (gp8), phIS3501 (gp22)) genellikle genomun başlangıç kısmında yer aldığı görülmektedir. Portal proteinin *Bacillus* fajlarındaki gibi, bakteriyofaj Pd22F genomunun (gp15) başlangıcında yer aldığı belirlendi. Portal proteine göre oluşturulan filogenetik ağaçta bakteriyofaj Pd22F fajının diğer fajlardan net bir şekilde ayrıldığı belirlendi (Şekil 27).

Bakteriyofaj Pd22F genomundaki terminaz large subunit dizisinin benzerlik karşılaştırmaları yapıldı ve yüzdelik benzerlikleri sırasıyla; *Bacillus* fajları BtCS33, BtiUFT6.51-F ve phi4I1 (% 61 benzerlik), *Bacillus* fajları phIS3501, phiCM3 (% 60 benzerlik), *Bacillus* fajları Cherry, Negev_SA, Gamma, Fah, AP631 ve Tavor_SA (% 48 benzerlik) benzerlikler gözlendi. VIRFAM analizine göre, bakteriyofaj Pd22F, Tip 1–cluster 4 kategorisinde miyovirus olarak sınıflandırıldı. Fajın *Myoviridae* fajlarının yapısal organizasyonuna benzediği belirlendi (Şekil 29). NCBI veri tabanında 11000 ila 271000 bp aralığında bulunan 547 *Myoviridae* genomuyla karşılaştırıldığında (Cepko vd., 2020), bakteriyofaj Pd22F faj genomu 86.388 bp ile orta büyüklükte bir faj olduğu belirlendi. VIRFAM ve Aclame veritabanlarında Cluster 4 kategorisinin diğer üyelerinden (Omega ve T5 fajı hariç) daha uzun bir nükleotit dizisine sahip olması dikkat çekicidir. Terminaz large subunit bölgesinin VIRFAM analizinin sonucuna göre, bakteriyofaj Pd22F'in sırasıyla üç fajla yakından ilişkili olduğunu belirlendi. Bunlar; *Geobacillus* E2 (% 55), *Bacillus* faj Phi-105 (% 47) ve *Bacillus* faj Fah (% 46) fajlarıdır. VIRFAM sonucuna göre, bakteriyofaj Pd22F'in portal proteini ile Aclame'deki yakından ilişkili en yüksek benzerliğe sahip fajlar sırasıyla; *Bacillus* faj PHI-105 (% 43), *Bacillus* faj PhiSM101 (% 32) ve *Bacillus* faj Cherry (% 30) şeklinde belirlendi (Tablo 9).

Çalışmamızda *P. larvae* ve *P. dendritiformis* suşlarına ait toplam 14 faj konak genişliği açısından incelendi, 7 tanesinin faj morfolojisi ve ölçümleri TEM analiziyle belirlendi. Bakteriyofaj SV21 ve Pd22F olarak belirtilen fajların tüm genom analizi, one-step büyüme eğrisi, yapısal protein profili ve karşılaştırmalı genomik analizi yapıldı.

5. ÖNERİLER

Bu çalışma arı bakteriyel hastalık etkenlerinin bakteriyofaj içeriği açısından ülkemizde yapılan ilk çalışmadır. Amerikan yavru çürüklüğü etkeni *P. larvae* suşlarından 11 tanesinde ve Avrupa yavru çürüklüğü sekonder etkeni *P. dendritiformis* suşlarından üç tanesinde faj varlığı, konak aralığı ve herbirinden birer tanesinin karşılaştırmalı tüm genom analizi yapılmıştır.

Arı bakteriyel hastalık etkenlerinde faj içeriği konusunda yapılan ilk çalışma olup bu alanda daha fazla sayıda bakteri taranarak faj kolleksiyonu elde edilmelidir. Arı bakteriyel hastalık etkenleriyle faj aracılığı ile mücadele etmek için daha fazla *P. larvae* suşların taranmasına gerektiği düşünülmektedir. Çalışmada izole ve kısmen karakterize edilen diğer *Paenibacillus* fajlarının da tüm genom analizlerinin yapılması ve karşılaştırılmalı biyoinformatik analizleriyle sınıflandırılması gerekmektedir. *Paenibacillus* bakteriyofajlarından kokteyl hazırlanarak laboratuvar ve arazi şartlarında larva hastalık etkenlerine karşı etkinliklerinin araştırılması yapılmalıdır. Fajların özellikle holin ve endolizin enzim bölgelerinin *E. coli* bakterisine aktarılarak ekspresyon edilmesi, saflaştırılması ve karakterizasyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Saflaştırılan enzimlerin (Holin ve endolizin) aktivite, formülasyon ve sitotoksik çalışmaları yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

Acar Soykut, E. and Tunail, N. (2009a) Termofilik faj taksonomisi. *Gıda*, 34(4):251-258.

Ackermann HW. 2006. Classification of bacteriophages. In: Calendar R, editor. The Bacteriophages. New York, USA: Oxford University Press; 2006. pp. 8-16. ISBN: 0-19-514850-9

Ackermann, H.W. (2009). Phage classification and characterization. *Methods in Molecular Biology*, 501, 127–140.

Alippi, A.M. and Reynald, F.J. 2006. Inhibition of the growth of Paenibacillus larvae, the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources. *Journal of Invertebrate Pathology*. 91, 141-146. https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.12.002.

Altschul, S.F, Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. https://doi.org/10. 1093/nar /25.17.3389.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3), 403–410. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

Al Toufailia H. M., Amiri E., Scandian L., Kryger P. and Ratnieks F. L. W. (2014). Towards integrated control of varroa: effect of variation in hygienic behaviour among honey bee colonies on mite population increase and deformed wing virus incidence. *Journal of Apicultural Research*. 53, 555-562. https://doi.org/10.3896/ IBRA.1.53.5.10.

Arathi H.S. and Spivak M. (2001). Influence of colony genotypic composition on the performance of hygienic behavior in the honey bee (Apis mellifera L.), *Animal Behaviour*. 61(2), 57–66. https://doi.org/10.1006/anbe.2000.1731

Arbia, A. and Babbay, B. (2011). Management Strategies of Honey Bee Diseases. *Journal of Entomology.* 8(1), 1-15.

Aronstein, KA. and Hayes, GW. (2004). Antimicrobial activity of allicin against honey bee pathogens. *Journal of Apicultural Research*, 43(2), 57-59. https://doi.org/10.1 080 /00218839.2004.11101111.

Auddy, B., Ferreira, M., Blasina, F., Lafon, L., Arredondo, F., Dajas, F., Tripathi, P. C., Seal, T. and Mukherjee, B. (2003). Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. *Journal of ethnopharmacology*, 84(2-3), 131–138. https://doi.org/10.1016 /s03 78-8741(02)00322-7.

Bakhiet, N. and Stahly, DP. (1991). Properties of clear plaque mutants of the *Bacillus larvae* bacteriophages PBL0.5 and PBL2. *Journal Invertebrate Pathology*. 1988; 52: 78-83. http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(88)90105-X.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V. M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., and Pevzner, P.A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*. 19(5), 455–77. https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021.

Bastos, E. M., Simone, M., Jorge, D. M., Soares, A. E. and Spivak, M. (2008). In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. *Journal Of İnvertebrate Pathology*, 97(3), 273–281. https://doi.org/10. 1016/j.jip.2007.10.007.

Baş, Y. and Karaoğlu, S.A.(2015). Characterization and antimicrobial susceptibility of spore-forming bacilli isolated from honeycomb. Master Thesis. Recep Tayyip Erdogan University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Biology, 123s.

Be'er, A., Strain, SK., Hernandez, RA. and Ben-Jacob, E. Florin EL. (2013). Periodic ´reversals in *Paenibacillus dendritiformis* swarming. *Journal of Bacteriology* 195: 2709-2717. https://doi.org/10.1128/JB.00080-13.

Beims, H., Wittmann, J., Bunk, B., Spröer, C., Rohde, C., Günther, G., Rohde, M., von der Ohe W. and Steinert, M., (2015). *Paenibacillus larvae*-directed bacteriophage HB10c2 and its application in American foulbrood-affected honey bee larvae. *Applied and Environmental Microbiology.* 81(16), 5411–5419. https://doi.org/10 .1128 /AEM.00804-15.

Benada O, Ludvink J, Drobnkovb V. (1984). Morphology of a new bacteriophage isolated from *Bacillus larvae*. Folia Microbiologica. 29: 520-521.

Boligon, AA., Brum, TF., Zadra, M., Piana, M., Alves, CF., Fausto, VP., Júnior, V., Vaucher, R., Santos, RC. and Athayde, ML. (2013). Antimicrobial activity of *Scutia buxifolia* against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae. Journal of Invertebrate Pathology*. 112(2), 105-107. https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.11.009.

Borodovsky, M. and Lomsadze, A., 2011. Gene identification in prokaryotic genomes, phages, metagenomes, and EST sequences with GeneMarkS suite. *Current Protocols in Bioinformatics*, 4.5. 1–4.5. 17. https://doi.org/10.1002/0471250953 .bi0405s35.

Borum, E. (2014). Arıların Yavru Çürüklüğü Enfeksiyonlarında Doğru Teşhis, Mücadele ve Korunma Yöntemleri. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 14(1), 44-55. https://doi.org/10. 31467/ uluaricilik.376732.

Bradley, D.E. (1967). Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriology Reviews*, 31(4), 230–314. https://doi.org/10.1128/br.31.4.230-314.1967.

Brettin, T., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Olsen, G. J., Olson, R., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G. D., Shukla, M., Thomason, J. A., 3rd, Stevens, R., Vonstein, V., Wattam, A. R. And Xia, F. (2015). RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports*, 5, 8365. https://doi.org /10.1038/srep08365.

Breitbart, M. Miyake, JH. and Rohwer F. (2004b). Global distribution of nearly identical phage-encoded DNA sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 236(2), 249-256. https://doi. org/ 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09654.x

Campana CF, Bakhiet N. and Stahly DP. (1991). Morphology of *Bacillus larvae* bacteriophage PBL3 and physical map of its DNA. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57(1), 141-143. https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90055-U.

Carroll-Portillo, A., Coffman, C.N., Varga, M.G., Alcock, J., Singh, S.B., and Lin, H.C. (2021). Standard Bacteriophage Purification Procedures Cause Loss in Numbers and Activity. *Viruses*, 13(2), 328. https://doi.org/10.3390/v13020328

Carvalho Costa D., Costa, H.S. Gonçalves Albuquerque, T. Ramos, F. Castilho, M.C. and Sanches-Silva, A. (2015). Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications, *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 336-354. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.009

Cepko, L.C.S, Garling, E.E, Dinsdale, M.J, Scott, W.P, Bandy, L., Nice, T., Faber-Hammond, J., Mellies, J.L. (2020) *Myoviridae* phage PDX kills enteroaggregative *Escherichia coli* without human microbiome dysbiosis. *Journal of Medical Microbiology*, 69(2):309-323.https://doi.org/10.1099/jmm.0.001162

Chow, J.J., Batt, C.A. and Sinskey, A.J. (1988). Characterization of Lactobacillus bulgaricus Bacterio phage ch2. *Applied and Environmental Microbiology*, 54 (5), 1138–1142. https://doi.org/10.1128/aem.54.5.1138-1142.1988.

Chow CET, Fuhrman JA (2012) Seasonality and monthly dynamics of marine Myovirus communities. Environ Microbiol 14:2171-2183. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02744.x.

Cooper, I.A.(2016). A review of current methods using bacteriophages in live animals, food and animal products intended for human consumption. *Journal of microbiological methods*, *130*, 38–47. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.07.027

Cox, RL. (2000). Incidence of oxytetracycline-resistance *Paenibacillus larvae* spores in honey samples from Iowa. Am. Bee. J., 140:903-903.

Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., Quan, P. L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D. M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkstein, A. L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S. K., Simons, J. F., Egholm, M., Pettis J.S, Lipkin W.I. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science (New York, N.Y.),

318(5848), 283–287. https://doi.org/10.1126/science.1146498.

Daisley, B.A., Pitek, A.P., Chmiel, J.A., Al K.F., Chernyshova, A.M. Faragalla K.M., Burton J.P., Thompson G.J., Reid G. (2020). Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. ISME J, 14, 476–491 https://doi.org/ 10.10 38/s 41396-019-0541-6.

Dainat, B., Evans, J. D., Chen, Y. P., Gauthier, L. and Neumann, P. (2012). Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS One*, 7:e32151. https://doi.org/10. 1371/ journal.pone.0032151.

De Graaf, D.C., Alippi, A.M., Antúnez, K., Aronstein, K.A., Budge, G., De Koker, D., De Smet, L., Dingman, D.W., Evans, J.D., Foster, L. J., Fünfhaus, A., Garcia-Gonzalez, E., Gregorc, A., Human, H., Murray, K.D., Nguyen, B.K., Poppinga, L., Spivak, M., Van Engelsdorp, D., Wilkins S. and Genersch, E.(2013). Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research* 52(1). https://doi.org/10.3896/IBRA. 1.52.1.11.

d'Herelle F.(1917) Sur un microbe invisible antagoniste des bacillus dysentérique. Comptesrendus Acadamy of Science Paris. 1917;165:373–5

d'Herelle, F.(1919). Sur le role du microbe bacteriophage dans la typhose aviare. Comptesrendus Acadamy of Science Paris, 169: 932–934.

Delcher, A.L., Bratke, K.A., Powers, E.C. and Salzberg S.L. (2007). Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics*, 23(6), 673–679. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm009.

Dingman, D.W. and Stahly, D.P., (1983). Medium Promoting Sporulation of Bacillus larvae and Metabolism of Medium Components. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(4), 860–869. https://doi.org/10.1128/aem.46.4.860-869.1983.

Dingman, D.W., Bakhiet, N., Field, C.C. and Stahly, D.P. (1984). Isolation of two bacteriophages from Bacillus larvae, PBL1 and PBL0.5, and partial characterization of PBL1. *Journal of General Virology* 65, 1101-1105.https:// doi.org/ 10.1099/0022-1317-65-6-1101.

Drobnkovb, and Ludvnk, J. (1982) Bacteriophage of *Bacillus larvae*. *Journal of Apicultural Research,* 21, 53-56. https://doi.org/10.1080/00218839.1982.11100516

Drulis-Kawa, Z., Grayna, M.S., Barbara, M., Delattre, A.S., Lavigne, R. (2012). Learning from Bacteriophages-Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Applications. *Current Protein and Peptide Science* 13, 699–722.

Duffy, C. and Feiss, M. (2002). The large subunit of bacteriophage lambda's terminase plays a role in DNA translocation and packaging termination. *Journal of Molecular Biology* 316(3), 547–561. https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5368.

Elzen, PJ., Westervelt, D., Causey, D., Ellis, J., Hepburn HR. and Neumann, P. (2003). Method of application of tylosin, an antibiotic for American foulbrood control, with effects on small hive beetle (Coleoptera: Nitidulidae) populations. *Journal of Economic Entomology*, *95*(6), 1119–1122. https://doi.org/10.1603/0022-0493-95.

Endersen, L., Coffey, A., Neve, H., McAuliffe, O., Ross, R.P., O'Mahony, J.M.(2013). Isolation and characterisation of six novel mycobacteriophages and investigation of their antimicrobial potential in milk. *International Dairy Journal* 28(1): 8-14. 10.1016/j.idairyj.2012.07.010.

Evans, J.D. 2004. Transcriptional immune response by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Journal of invertebrate pathology*, *85*(2), 105–111. https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.02.004.

Fauquet, C., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (ed). 2005. Virus taxonomy. Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.

FAO, 2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO. http://www.fao.org/faostat/en/#data, Erişim: 01.03.2021.

FDA-CVM, (2006).Food and Drug Administration-Center for Veterinary Medicine (2006), FDA Approved Animal Drug List (The Green Book)(http://www. fda.gov/cvm/ Green_Book/greenbook.html) (December 23, 2006).

Fernández L., Gutiérrez D., Rodríguez A. and García P. (2018). Application of Bacteriophages in the Agro-Food Sector: A Long Way Toward Approval. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 296.

Feiss, M. and Rao, V., (2012). The bacteriophage DNA packaging machine. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 726, 489–509. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_22

Forsgren E., Budge,G.E, Charrière J.D., Hornitzky M.A.Z.(2013). Standard methods for European foulbrood research, *Journal of Apicultural Research*, 52:1, 1-14, https:// doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.12.

Fuselli, S. R., García De La Rosa, S. B., Gende, L. B., Eguaras, M. J., Fritz, R. (2006). Inhibición de Paenibacillus larvae empleando una mezcla de aceites esenciales y timol [Inhibition of *Paenibacillus larvae* employing a mixture of essential oils and thymol]. Revista Argentina de microbiologia, 38(2), 89–92.

Fuselli, S., Martínez, P., Fuentes, G., Alonso-Salces, R.M., Maggi, M. (2019). Prevention and Control of American Foulbrood in South America with Essential Oils: Review. DOI: 10.5772/intechopen.85776.

Flesar, J., Havlik, J., Kloucek, P., Rada, V., Titera, D., Bednar, M., Stropnicky, M., and Kokoska, L. (2010). In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus larvae* and their acute oral toxicity to adult honey bees. *Veterinary microbiology*, 145(1-2), 129–133. https://doi.org/10.1016/j.vet .

García, P., Martínez, B., Obeso, J. M., and Rodríguez, A. (2008). Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology*, 47(6), 479–485. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02458.x

Garcia-Gonzalez, E., Poppinga, L., Fünfhaus, A., Hertlein, G., Hedtke, K., Jakubowska, A., and Genersch, E. (2014). *Paenibacillus larvae* Chitin-Degrading Protein PlCBP49 Is a Key Virulence Factor in American Foulbrood of Honey Bees. *PLoS Pathogens*, 10(7), e1004284. https:// doi.org /10.1371 /journal.ppat.1004284.

Gende, L.B., Fernandez, N., Buffa, F., Ruıu, L., Satta, A., Frıtz, R., Eguaras, M.J., Floris, I.(2010).Susceptibility of *Paenibacillus larvae* isolates to a tetracycline hydrochloride and Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil mixture Bulletin of Insectology, 63(2):247-250.

Genersch, E. (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103 Suppl 1*, S10–S19. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.015.

Ghorbani-Nezami, S., LeBlanc, L., Yost, D. G. and Amy, P. S. (2015). Phage Therapy is Effective in Protecting Honeybee Larvae from American Foulbrood Disease. *Journal of insect science (Online)*, *15*(1), 84. https://doi.org/10.1093/ jisesa /iev051.

Gill, J. J. and Hyman, P. (2010). Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Current pharmaceutical biotechnology*, *11*(1), 2–14. https://doi.org/10. 2174 / 138920110790725311.

Gochnauer TA. 1955. The isolation of a bacteriophage (bacterial virus) from Bacillus larvae. Bee World 1955; 36: 101-103. https://doi.org/10.1080/0005772X.1955.110 94880.

González, M. J. and Marioli, J. M. (2010). Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood. *Journal of invertebrate pathology*, *104*(3), 209–213. https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.04.005

Gründling, A., Manson, M.D., and Young, R., (2001). Holins kill without warning. *Proceedings of National Academy Sciences of the United States of America*, 98(16), 9348–52. https://doi.org/10.1073/pnas.151247598.

Hadas, H., Einav, M., Fishov, I. and Zaritsky, A. (1997). Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading, England)*, *143 (Pt 1)*, 179–185. https://doi.org/10.1099/00221287-143-1-179

Hatfull, G.F., and Hendrix, R.W. (2011) Bacteriophages and their genomes. *Current Opinion in Virology*, 1(4), 298-303. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.06.009

Hyatt, D., Chen, GL., LoCascio, P.F., Land, M.L, Larimer, F.W., Hauser, L.J.(2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11, 119. https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119.

Hernández, A., Ruiz, F. M., Romero, A., and Martínez, J. L. (2011). The binding of triclosan to SmeT, the repressor of the multidrug efflux pump SmeDEF, induces antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS Pathogens*. 7:e1002103. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002103.

Housby, J.N. and Mann, N.H. (2009). Phage therapy, *Drug Discovery Today*, 14, (11–12), 536-540, https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009. 03.006.

Hubenova, Y., Hubenova. E. and Mitov, M. (2020). Electroactivity of the Gram-positive bacterium *Paenibacillus dendritiformis* MA-72. *Bioelectrochemistry*, 136:107632. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107632.

Huff, W.E, Huff, G.R, Rath N.C., Balog, J.M, Donoghue, A.M. (2004). Therapeutic efficacy of bacteriophage and Baytril (enrofloxacin) individually and in combination to treat colibacillosis in broilers. *Poultry Science*, 83(12), 1944–1947. https://doi.org/10.1093/ps /83.12.1944.

Ingham, C.J, Ben, Jacob E. (2008). Swarming and complex pattern formation in *Paenibacillus vortex* studied by imaging and tracking cells. *BMC microbiology*, *8*, 36. https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-36.

Jończyk-Matysiak E., Owczarek B., Popiela E., Świtała-Jeleń K., Migdał P., Cieślik M., Łodej N., Kula D., Neuberg J., Hodyra-Stefaniak K., Kaszowska M., Orwat F., Bagińska N., Mucha A., Belter A., Skupińska M., Bubak B., Fortuna W., Letkiewicz S., Chorbiński P., Weber-Dąbrowska B., Roman A., Górski A.(2021). Isolation and Characterization of Phages Active against *Paenibacillus larvae* Causing American Foulbrood in Honeybees in Poland. *Viruses.* 13(7):1217. https://doi.org/10.3390/v13071217

Karacaoğlu, M., (2012). Türkiye Arıcılığının Yapısal Analizi. Standart Ekonomik ve Teknik Dergisi. *Türk Standartlar Enstitüsü yayını*, 51(601), 26-33.

Kim, M., and Ryu, S., (2011). Characterization of a T5-like coliphage, SPC35, and differential development of resistance to SPC35 in Salmonella enterica serovar typhimurium and Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(6), 2042–2050. https://doi.org /10.1128/AEM.02504-10.

Kılıç, A.O., Pavlova, S.I., Alpay, S., Kiliç, S.S., and Tao, L., 2001. Comparative study of vaginal Lactobacillus phages isolated from women in the United States and Turkey: prevalence, morphology, host range, and DNA homology. *Clinical And Diagnostic Laboratory İmmunology*, 8(1), 31–39.https://doi.org/10.1128/CDLI.8.1.31-39.

Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L.,(2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* 305(3), 567–580. https://doi. org/10. 1006 /jmbi.2000. 4315.

Krongdang S, Evans JD, Pettis JS, Chantawannakul P (2017) Multilocus sequence typing, biochemical and antibiotic resistance characterizations reveal diversity of North American strains of the honey bee pathogen Paenibacillus larvae. *PLoS ONE* 12(5): e0176831. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176831

Kochansky, J., Knox, D.A., Feldlaufer, M., and Pettis J.S.(2001). Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and -resistant *Paenibacillus larvae*. Apidologie 32 (3) 215-222 (2001) https://doi.org/10.1051/apido:2001123.

Kutter, E. M., Kuhl, S. J., and Abedon, S. T. (2015). Re-establishing a place for phage therapy in western medicine. *Future Microbiology*. 10(5), 685–688. https://doi.org /10.2217/fmb.15.28.

Laemmli, U.K.,(1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685, https://doi.org/10.1038/227680a0.

Lapidot, D., Dror, R., Vered, E., Mishli, O., Levy, D. and Helman, Y. (2015). Disease protection and growth promotion of potatoes (*Solanum tuberosum L*.) by Paenibacillus dendritiformis. *Plant Pathol,* 64:545-551.https://doi.org/10.1111/ ppa.12285.

Laslett, D. and Canback, B., (2004). ARAGORN, A program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Research*, 32(1), 11–16. https://doi.org/10.1093/ nar/gkh152.

Loc Carrillo, C., Atterbury, R. J., el-Shibiny, A., Connerton, P. L., Dillon, E., Scott, A. And Connerton, I. F. (2005). Bacteriophage therapy to reduce Campylobacter jejuni colonization of broiler chickens. *Applied and environmental microbiology*, 71(11), 6554–6563. https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6554-6563.2005.

Lodesani, M., Costa, M. 2005. "Limits of chemotherapy in beekeeping: development of resistance and the problem of residues". Bee World, 86:102-109. https://doi.org/10. 1080/0005772X.2005.11417324.

Lopes A, Tavares P, Petit MA, Guérois R, Zinn-Justin S (2014). Automated classification of tailed bacteriophages according to their neck organization. *BMC Genomics* 15, 1027 (2014). https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1027

Ly-Chatain M. H. (2014). The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in microbiology*, 5, 51. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014. 00051.

Maggi, P., Bellacosa, C., Carito, V., Perilli, F., Lillo, A., Volpe, A., Trillo, G., Angiletta, D., Regina, G., Angarano, G. (2011). Cardiovascular risk factors in patients on long-term treatment with nevirapine- or efavirenz- based regimens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.66:896-900. https://doi.org/10.1093/jac/dkq507.

Mărghitaş, L., Dezmirean, D., Chirilă, F., Fiţ, N., Bobiş, O. (2011). Antibacterial Activity of Different Plant Extracts and Phenolic Phytochemicals Tested on *Paenbacillus larvae* Bacteria.Scientific Papers.*Animal Science and Biotechnologies*,44(2):94-99.

Martel, AC., Zeggane, S., Drajnudel, P., Faucon, JP., Aubert, M. (2006). Tetracycline residues in honey after hive treatment. *Food Additives and Contaminants*, 2006, 23 (03), pp.265.ff10.1080/02652030500469048ff.

McSpadden, GBB.(2004) Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. Phytopathology 94:1252-1258. https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94. 11.1252.

Meier-Kolthoff, J. P. and Göker, M. (2017). VICTOR: genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *33*(21), 3396–3404. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx440.

Meier-Kolthoff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H.P. and Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatic,* 14, 60. 10.1186/1471-2105-14-60.

Merrill, B.D, Grose, J.H,Breakwell, D.P., Burnett, S.H.,(2014). Characterization of *Paenibacillus larvae* bacteriophages and their genomic relationships to firmicute bacteriophages. *BMC Genomics* 15(1), 745. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15

Miyagi, T., Peng, CYS., Chuang, RY., Mussen, EC., Spivak, MS. and Doi, RH. 2000. Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen Paenibacillus larvae in the United States. *Journal of invertebrate pathology*, 75(1), 95–96. https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4888

Moraru, C., Varsani, A. and Kropinski, A.M. (2020).VIRIDIC–a novel tool to calculate the inter genomic similarities of prokaryote-infecting viruses. https://doi.org/10. 1101/2020.07.05.188268.

Nakai, T., Sugimoto, R., Park, K. H., Matsuoka, S., Mori, K., Nishioka, T. and Maruyama, K. (1999). Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Diseases of aquatic organisms*, *37*(1), 33–41. https://doi.org/10.3354/dao037033.

Nasibullin, I., Kuklina, N., Viktorov, D., Gorshkov, I., Vasilev, D. and Nafeev, A. (2013). Research of lytic activity of bacteriophages aeromonas hydrophila.

Nishimura, Y., Yoshida, T., Kuronishi, M., Uehara, H., Ogata, H., and Goto, S. (2017). ViPTree: the viral proteomic tree server. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *33*(15), 2379–2380. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx157

Nylander, J.A.A., 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

OIE, 2018. Terrestrial Animal Health Code, Chapter 9.2, Infection of honey bees with Paenibacillus larvae (American foulbrood), Section 9, Volume I.

Oliveira, A., Melo, L.D.R., Kropinski, A.M., Azeredo, J. (2013). Complete genome sequence of the broad-host-range *Paenibacillus larvae* phage phiIBB_Pl23. Genome Announcements,1(5), e00 438–13. https://doi.org/10.1128/genomeA.004

Oliveira, A., Leite, M., Kluskens, L.D., Santos, S.B., Melo, L.D., Azeredo, J.(2015). The first *Paenibacillus larvae* bacteriophage endolysin (PlyPl23) with high potential to control american foulbrood. *PLOS ONE* 10(8): e0136331. https://doi.org/10.1371/ journal.pone.0136331.

Orlova E.V.(2012). Bacteriophages and Their Structural Organisation. In: Kurtböke İ, editor. *Bacteriophages*. IntechOpen; 2012.doi: 10.5772/1065. ISBN: 978-953-51-0272-4.

Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A. R., Xia, F., Stevens, R., (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research*, 42 (Database issue), D206–D214. https://doi.org/10.1093/ nar/gkt1226.

Özkırım, A., Keskin, N., Kürkçüoğlu, M. and Başer, KHC. (2012). Evaluation of some essential oils as alternative antibiotics against American foulbrood agent *Paenibacillus larvae* on honey bees *Apis mellifera* L. *Journal of Essential Oil Research*, 24(5):465-470.

Palacio, M. A., Rodriguez, E., Goncalves, L., Bedascarrasbure, E., and Spivak, M. (2010). Hygienic behaviors of honey bees in response to brood experimentally pin-killed or infected with Ascosphaera Apis. Apidologie 41, 602–612. doi: 10.1051/apido/2010 022.

Page, R. And Peti, W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nature Chemical Biology*, 12(4), 208–214. https://doi.org/10.1038/ nchembio.2044.

Peng, Y., Mussen, E., Fong, A., Montague, M. and Tyler, T. (1992). Effects of chlortetracycline of honey bee worker larvae reared. *Journal of Invertebrate Pathology*. 60(2); 127-133. https://doi.org/10.1016/0022-2011(92)90085-I.

Peng, YC., Mussen, E., Fong, A., Montague, MA. and Tyler, T. 1992. "Effects of chlortetracycline of honey bee worker larvae reared in vitro". Journal of invertebrate pathology, 60(2):127-133.

Pickard D. J. (2009). Preparation of bacteriophage lysates and pure DNA. *Methods İn Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 502, 3–9. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-565-1_1

Pietilä, M.K., Demina, T.A., Atanasova, N.S., Oksanen, H.M.,and Bamford, D.H. (2014). Archaeal viruses and bacteriophages: comparisons and contrasts. *Trends İn Microbiology*, 22(6), 334–344. https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.02.007

Pietilä MK, Demina TA, Atanasova NS, Oksanen HM, Bamford DH. 2014. Archaeal viruses and bacteriophages: Comparisons and contrasts. Trends in Microbiology. 2014;22:6334-6344.

Pınarbaş, M., and Karaoğlu, S.A. (2017). Characterization and antibiotic sensitiveness of gram positive bacterïa isolated from American foulbrood suspect bee (apis mellifera) and bee products, with genetic diversity of *Paenibacillus larvae* isolates. Master thesis. Recep Tayyip Erdogan University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Biology, 117s.

Prevelige, P.E. Jr. and Cortines, J.R. (2018). Phage assembly and the special role of the portal protein. *Current Opinion in Virology* 31, 66–73. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.09.004.

Rambaut, A., 2012. FigTree 1.4.0 software. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh.

Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., and Suchard, M. A. (2018). Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic biology*, 67(5), 901–904. https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032

Ribeiro, H.G., Melo, L.D.R., Oliveira, H., Boon, M., Lavigne, R., Noben, J.P., Azeredo, J., Oliveira, A. (2019). Characterization of a new podovirus infecting *Paenibacillus larvae*. *Scientific Reports* 9, 20355. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56699-y.

Rocker A. and Meinhart, A. (2016) Type II toxin: Antitoxin systems. More than small selfish entities? *Current Genetics*, 62(2), 287–290. https://doi.org/10.1007/s00294-015-0541-7

Ronquist, F. and Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* (Oxford, England), 19(12), 1572–1574. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180.

Ruiu, L.(2020). Plant-Growth-Promoting Bacteria (PGPB) against Insects and Other Agricultural Pests. *Agronomy* 10(6):861. https://doi.org/10.3390/agronomy 10060861.

Santos, S.B., Carvalho, C.M., Sillankorva, S., Nicolau A., Ferreira, E.C. and Azeredo J., (2009). The use of antibiotics to improve phage detection and enumeration by the double-layer agar technique. *BMC Microbiology*, 9, 148. https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-148.

São-José, C., Nascimento, J., Parreira, R., Santos, M.(2007). Release of progeny phages from infected cells. In: McGrath S., van Sinderen D., editors. *Bacteriophage*: *Genetics and Molecular Biology*. Caister Academic Press; Norfolk, UK. pp. 307–333.

Sevim, E., Sevim, A., Akpınar, R., Pınarbaş, M., Alpay Karaoğlu, Ş. 2016. Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinden İzole Edilen Paenibacillus larvae Suşlarının Genetik Çeşitliliği . *5. Uluslar Arası Muğla arıcılık ve çam Balı Kongresi* (1-5 Kasım 2016) Muğla-Türkiye.

Sharaf, A., Oborník, M., Hammad, A., El-Afifi, S., Marei, E.(2018). Characterization and comparative genomic analysis of virulent and temperate *Bacillus megaterium* bacteriophages. *PeerJ* 6, e5687. https://doi.org/10.7717/peerj.5687.

Sheflo, M. A., Gardner, A. V., Merrill, B. D., Fisher, J. N., Lunt, B. L., Breakwell, D. P., Grose, J. H., Burnett, S.H. (2013). Complete Genome Sequences of Five *Paenibacillus larvae* Bacteriophages. *Genome Announcements*, 1(6), e00668-13. https://doi.org/10.1128/genomeA.00668-13.

Shimanuki, H. and Knox, D. A. (2000). Bacterial Diseases. 3-8 s. Diagosis of Honey Bee Diseases, Department of Agriculture, Agriculture Handbook Number 690, 57s

Smirnova, N.I. (1953).Isolation and the use of a bacteriophage of Bacillus larvae in the diagnosis of American foulbrood. Sbornik nauchnykh trudov Leningradskogo instituta usovershenstvovaniya veterinarykh vrachel 1953; 9: 85–88 (in Russian).

Spivak M., Gilliam M. (1998a) Hygienic behavior of honey bees and its application for control of brood diseases and Varroa mites. Part 1. Hygienic behavior and resistance to American foulbrood, Bee World 79, 124–134.

Spivak, M. and Gilliam, M (1998b). Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa: Part II. Studies on hygienic behaviour since the Rothenbuhler era. *Bee world*, 79(4), 169-186.International Bee Research Association. https://hdl.handle.net/11299/181250.

Spivak M., Reuter G.S. (2001a). Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. Apidologie, Springer Verlag, 2001, 32 (6), pp.555-565. (10.1051/apido:2001103).

Stahly, D. P., Alippi, A. M., Bakhiet, N., Campana, C. F., Novak, C. C. and Cox, R. (1999). PPL1c, a virulent mutant bacteriophage useful for identification of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae*. *Journal Of İnvertebrate Pathology*, 74(3), 295–296. https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4893.

Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30(9), 1312–1313. https://doi.org /10.1093 /bioinformatics/btu033.

Stamereilers, C., LeBlanc, L., Yost, D., Amy, P. S. and Tsourkas, P.K.(2016). Comparative genomics of 9 novel *Paenibacillus larvae* bacteriophages. *Bacteriophage*, 6(3), e1220349. https://doi.org/10.1080/21597081.2016.1220349.

Stamereilers, C., Fajardo, C. P., Walker, J. K., Mendez, K. N., Castro-Nallar, E., Grose, J. H., Hope, S. and Tsourkas, P. K. (2018). Genomic Analysis of 48 *Paenibacillus larvae* Bacteriophages. *Viruses*, 10(7), 377. https://doi.org/10.3390/v10070377.

Stothard, P. and Wishart, D.S. (2005). Circular genome visualization and exploration using CGView. *Bioinformatics* (Oxford, England), 21(4), 537–539. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti054.

Sulakvelidze, A., and Morris, J.G.,Jr. (2001). Bacteriophages as therapeutic agents. *Annals Of Medicine*, 33(8), 507–509. https://doi.org/10.3109/07853890108995959.

Sulakvelidze A, and Kutter E. (2005). Bacteriophage therapy in humans, p 381–436. In Kutter E, Sulakvelidze A (ed), Bacteriophages: biology and application. CRC Press, Boca Raton, FL. ISBN 9780849313363.

Şahinler, N. ve Gül, A. (2005). Hatay Yöresinde Bulunan Arıcılık İşletmelerinde Arı Hastalıklarının Araştırılması. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 05 (1),27-31.https://dergipark.org.tr/tr/pub/uluaricilik/issue/53635/162582.

Tcherpakov, M., Ben-Jacob, E., and Gutnick, D. L. (1999). *Paenibacillus dendritiformis* sp. nov., proposal for a new pattern-forming species and its localization within a phylogenetic cluster. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, 49 Pt 1, 239–246. https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-239

TEPGE, (2021). Arıcılık Tarım Ürünleri Piyasaları Raporu 2021-1. Tarımsal Ekonomi Ve Politika Geliştirme Enstitüsü Müdürlüğü, https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/.

Thompson, T. S., Pernal, S. F., Noot, D. K., Melathopoulos, A. P. and van den Heever, J. P. (2007). Degradation of incurred tylosin to desmycosin--implications for residue analysis of honey. *Analytica Chimica Acta*, 586(1-2), 304–311. https://doi.org/10.1016 /j. aca. 2006.09.043.

Thorpe, H. M., and Smith, M. C. (1998). In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(10), 5505–5510. https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5505

Touchon, M., Bernheim, A. and Rocha, E. P. (2016). Genetic and life-history traits associated with the distribution of prophages in bacteria. *The ISME journal*, 10(11), 2744–2754. https://doi.org/10.1038/ismej.2016.47.

Trevors, K.E., Holley, R. and Kempton, A. (1983), Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage isolated from a meat starter culture. *Journal of Applied Bacteriology*, 54: 281-288. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02 618.x.

Tsigouri, A. (2009). Honeybee Diseases-The Current Situation in Greece. Workshop: Medicines for Bees, *EMEA*,14-15/12.

Tsourkas, P.K, Yost, D., Krohn, A., Leblanc, L., Zhang, A., Stamereilers, C. and Amy, P.S.(2015). Complete genome sequences of nine phages capable of infecting *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease of honeybees. *Genome Announcements*, 3(5), e01120-15. https://doi.org/10.1128/genomeA. 01120-15.

Tsourkas, P. K., Yost, D. G., Krohn, A., LeBlanc, L., Zhang, A., Stamereilers, C., & Amy, P. S. (2015). Complete Genome Sequences of Nine Phages Capable of Infecting Paenibacillus larvae, the Causative Agent of American Foulbrood Disease in Honeybees.

Tsourkas, P.K.(2020). *Paenibacillus larvae* bacteriophages: obscure past, promising future.*Microbial Genomics* 6(2), e000329.https://doi.org/10.1099/mgen.0.00032 9.

Tunail, N. (2009). Virüsler ve Bakteriyofajlar, Mikrobiyoloji, Pelin Ofset, Ankara,126-149.

Twort F. (1915) An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*. 1915;186:4814.

Uygur, Ş. Ö. ve Girişgin A. O. (2008). Bal Arısı Hastalık ve Zararlıları. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 8(4), 130-142. https://dergipark.org.tr/tr/pub/uluaricilik/issue/53267/1624

Valerianov T, Popova A. and Toshkov AS. (1976). Isolation from the soil of a bacteriophage lysing *Bacillus larvae*. *Acta Microbiologica, Virologica Et İmmunologica*, 4, 81–85.

Van Melderen L. (2010). Toxin-antitoxin systems: why so many, what for?. *Current Opinion İn Microbiology*, 13(6), 781–785. https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.10.006.

Vanengelsdorp, D. and Meıxner M.D. (2009) A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* (in press). DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.011

Vanengelsdorp, D., Evans, J D., Donovall, L., Mullın, C., Frazıer, M., Frazıer, J., Tarpy D R., Hayes Jr J. and Pettıs, J.S. (2009) "Entombed Pollen": a new condition in honey bee colonies associated with increased risk of mortality. *Journal of Invertebrate Pathology* (in press). DOI:10.1016/j.jip.2009.02.008.

Verbeken G., Huys, I., Pirnay, J.P., Jennes, S., Chanishvili, N., Scheres, J., Górski, A., De Vos, D. and Ceulemans, C..(2014). Taking Bacteriophage Therapy Seriously: A Moral Argument, *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 621316. https://doi. org/ 10.1155/2014/621316.

Walker, J.K., Merrill, B.D., Berg, J.A., Dhalai, A., Dingman, D.W., Fajardo, C.P., Graves, K., Hill, H.L., Hilton, J.A., Imahara, C., Knabe, B. K., Mangohig, J., Monk, J., Mun, H., Payne, A. M., Salisbury, A., Stamereilers, C., Velez, K., Ward, A.T., Breakwell, D.P., Grose, J.H, Hope, S., Tsourkas, P.K.,(2018). Complete genome sequences of *Paenibacillus larvae* phages BN12, Dragolir, Kiel007, Leyra, Likha, Pagassa, PBL1c, and Tadhana. *Genome Announcements*, 6(24), e01602-17. https://doi.org/10.1128/genomeA.01602-17.

Wang, X., Lord, D. M., Cheng, H. Y., Osbourne, D. O., Hong, S. H., Sanchez-Torres, V., Quiroga, C., Zheng, K., Herrmann, T., Peti, W., Benedik, M. J., Page, R. and Wood, T. K. (2012). A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nature Chemical Biology*, 8(10), 855–861. https://doi.org/10.1038/nchembio.1062.

Wedenig, M., Riessberger-Galle, U. and Crailsheim, K. (2003). A substance in honey bee larvae inhibits the growth of *Paenibacillus larvae*. *Apidologie*. 2003; 34:43–51. https://doi.org/10.1051/apido:2002043.

Weinbauer M. G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(2), 127–181. https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.08.001

Weinbauer, M.G., 2004. Ecology of prokaryotic viruses. FEMS Microbiol Rev. 28, 127–181. doi:10.1016/j.femsre.2003.08.001.

White, H.E. and Orlova E.V. (2019). Bacteriophages: Their Structural Organisation and Function. doi:10.5772/intechopen.85484.

Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L. and Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *Plos Computational Biology*, 13(6), e1005595. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi. 1005595

Wintersinger, J.A. and Wasmuth, J.D. (2015). Kablammo: an interactive, web-based BLAST results visualizer, *Bioinformatics* 31(8),1305–1306, https://doi.org/10. 1093 /bioinformatics/btu 808.

Yalçınkaya, A. (2008). Hatay ve Adana Yöresindeki Bal Arılarının (*Apis mellifera* L.) Mikrobiyal ve Paraziter Hastalıklar Yönünden İncelenmesi". Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi.

Yamaguchi, Y. and Inouye, M. (2011). Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. *Nature reviews. Microbiology*, 9(11), 779–790. https://doi.org/10.1038/nrmicro2651

Yao, J., Guo, Y., Wang, P., Zeng, Z., Li, B., Tang, K., Liu, X., Wang, X. (2018). Type II toxin/antitoxin system ParESO/CopASO stabilizes prophage CP4So in *Shewanella oneidensis*. *Environmental microbiology*, 20(3), 1224–1239. https://doi.org/10. 1111/1462-2920.14068

Young, R., and Wang, I.N. (2006). Phage lysis. The Bacteriophages (Calendar R, ed.), pp. 104–126. Oxford University Press, New York.

Yoshiyama, M., Kimura, K. (2009). Bacteria in the gut of japanese honeybee, *apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of american foulbrood. *Journal of invertebrate pathology*, 102(2), 91–96. https://doi.org/10. 1016/ j.jip.2009.07.005

Yost, D. G., Tsourkas, P., Amy, P. S. (2016). Experimental bacteriophage treatment of honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood Disease. *Bacteriophage*, 6(1), e1122698. https://doi.org/10. 1080 /21597081.2015.1122698.

Yost, D.G., Chang, C., LeBlanc, L., Cassin, E., Peterman, C., Rai, P., Salisbury, A., Barroga, N., Cisneros, R., Fersini, J., Juste, J., Ines, J., Leyva, G., Macalinao, D., Muscelli, S., Reyes G.S., Rhoden, H., Tan, R., Torres, E., Tran, K., Uriarte-Valle, G., Wallace, C., Wong, S., Ayala-Pineda, K., Cadiz, V., Jeanite, T., Nhan, S., Grose, J.H., Strong, C., Amy, P.S., Tsourkas, P.K., (2018). Complete genome sequences of *Paenibacillus larvae* phages Halcyone, Heath, Scottie, and Unity from Las Vegas, Nevada. *Microbiology Resource Announcements*, 7(12), e00977-18. https://doi.org/10.1128 /MRA.00977-18.

.

EKLER

Ek 1. *Paenibacillus* faj SV21'nin genom annotation tablosu

CDS	Start	Stop	Strand	Aa	Protein	Coverage	Benzerlik(%)	Erişim numarası	Organizma	E-value
gp1	3	254	+	83	DNA-binding protein	100.00	100.00	QBX06345.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	3e-51
gp 2	247	489	+	80	hypothetical protein	100.00	100.00	WP172423966.1	hypothetical protein (*P.larvae*)	8e-47
gp 3	490	798	+	102	hypothetical protein	87	100.00	WP172423965.1	hypothetical protein (*P. larvae*)	2e-58
gp 4	1125	886	-	79	Putative holin	100.00	100.00	QBX06388.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	3e-48
gp 5	1407	1138	-	89	hypothetical protein	100.00	96	YP008320358.1	*Paenibacillus* phage phiIBB_Pl23	3e-55
gp 6	2099	1404	-	231	Endolysin	96	94	AJK27880.1	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase-like protein [Bacteriophage Redbud]	1e-158
gp 7	2338	2096	-	80	holin	100	98	QBX06386	*P.* phage vB_PlaP_API480	1e-48
gp 8	7615	2723	-	1630	hypothetical protein	100	98	QDF44514.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	0.0
gp 9	8588	7620	-	322	hypothetical protein	100	99.07	QBX06346.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	0.0
gp10	9530	8601	-	309	hypothetical protein	100	95.79	QBX06348.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	0.0
gp 11	9825	9535	-	96	hypothetical protein	100	71.88	WP172423958.1	hypothetical protein (*P. larvae*)	2e-46
gp 12	11010	9838	-	390	hypothetical protein	100	76.02	QBX06344.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	0.0
gp 13	13013	11022	-	663	hypothetical protein	100	99.40	QBX06340.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	0.0
gp 14	13402	13022	-	126	hypothetical protein	100	97.62	WP172423955.1	hypothetical protein [*P. larvae*]	1e-85
gp 15	13704	13441	-	87	hypothetical protein	100	100	QBX06377.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	1e-54
gp 16	14711	13770	-	313	major capsid protein	100	96.81	QBX06347.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	0.0
gp 17	15621	14803	-	272	hypothetical protein	100	98.90	WP172423952.1	hypothetical protein [*P. larvae*]	0.0
gp 18	17556	15778	-	592	portal protein	100	99.49	QBX06341.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	0.0
gp 19	17762	17571	-	65	hypothetical protein	100	98.41	WP172423950.1	hypothetical protein [*P. larvae*]	3e-37
gp 20	19142	17775	-	455	terminase large subunit	100	98.68	QBX06343.1	*Paenibacillus* phage vB_PlaP_API480	0.0
gp 21	19527	19219	-	102	hypothetical protein	100	97.06	QBX06369.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	4e-64
gp 22	19780	19532	-	82	hypothetical protein	100	70.73	QBX06382.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	2e-33
gp23	20183	19758	-	141	hypothetical protein	100	98.58	WP172423947.1	hypothetical protein (*P. larvae*)	4e-94

Ek 1(devamı). *Paenibacillus* faj SV21'nin genom annotation tablosu

CDS	Start	Stop	Strand	Aa	Protein	Coverage	Benzerlik(%)	Erişim numarası	Organizma	E-value
gp 24	20530	20745	+	71	hypothetical protein	100	92.69	QBX06391.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	5e-41
gp 25	21044	21499	+	151	hypothetical protein	100	96.69	QBX06361.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	4e-102
gp 26	21526	21657	+	43	hypothetical protein	97	100	QBX06412.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	7e-22
gp 27	21980	22204	+	74	hypothetical protein	100	98.67	WP_172424005.1	hypothetical protein (*P. larvae)*	6e-45
gp 28	22209	22454	+	81	hypothetical protein	100	96.30	QBX06384.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	4e-49
gp 29	22533	22715	+	60	hypothetical protein	100	98.33	QBX06404.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	1e-34
gp 30	22772	23272	+	166	Antirestriction protein ArdA	100	96.39	QBX06358.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	4e-110
gp 31	23304	23588	+	94	hypothetical protein	100	63.83	QHZ53382.1	hypothetical protein ERICV_04331(P.l.subsp. *larvae*)	1e-38
gp 32	23588	23725	+	45	hypothetical protein	-	-	-	Not match	-
gp 33	23823	24443	+	206	hypothetical protein	-	-	-	Not match	-
gp 34	24458	24775	+	105	hypothetical protein	100	87	ARF70319.1	hypothetical protein (*P. larvae*)	2e-59
gp 35	25094	25285	+	63	hypothetical protein	100	95.24	QBX06399.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	4e-37
gp 36	25330	25506	+	58	putative membrane protein	100	100	QBX06407.1	*Paenibacillus* phage vB_PlaP_API480	3e-33
gp 37	25493	26122	+	209	hypothetical protein	100	93.30	QBX06352.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	4e-142
gp 38	26183	26593	+	136	hypothetical protein	98	97.01	QBX06363.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	3e-91
gp 39	26606	26809	+	67	hypothetical protein	100	97.01	WP172423996.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	3e-39
gp 40	26816	26965	+	49	hypothetical protein	98	70.83	QBX06409.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	1e-16
gp 41	26955	27122	+	55	Putative membran protein	100	98.2	QBX06408.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	1e-28
gp 42	27140	27664	+	174	hypothetical protein	100	97.13	QBX06355.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	3e-119
gp 43	27677	28363	+	228	hypothetical protein	100	95.18	QBX06350.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	6e-160
gp 44	28582	28797	+	71	hypothetical protein	100	81.69	QHZ54055.1	*P. l.* subsp. *larvae* Eric_V_05071	2e-35
gp 45	28790	30358	+	522	DEAD/DEAH box helicase	100	95.02	QBX06342.1	*Paenibacillus* phage vB_PlaP_API480	0.0
gp 46	30361	30543	+	60	hypothetical protein	100	91.67	AQR77698.1	*P. larvae* BXP28_10475	4e-31
gp 47	30585	30800	+	71	hypothetical protein	94	94.12	ETK29802.1	*P. l*.subsp. *larvae* DSM 25719	2e-40
gp 48	30829	31047	+	72	hypothetical protein	94	94.12	WP083041682.1	*P. larvae*	7e-39
gp 49	31105	31395	+	96	hypothetical protein	90	98.85	YP009838759.1	*Paenibacillus* phage Kawika	3e-51

Ek 1(devamı). *Paenibacillus* faj SV21'nin genom annotation tablosu

CDS	Start	Stop	Strand	Aa	Protein	Coverage	Benzerlik(%)	Erişim numarası	Organizma	E-value
gp 50	31376	31924	+	182	host-nuclease inhibitor protein	100	97.25	QBX06353.1	*Paenibacillus* phage vB_PlaP_API480	3e-124
gp 51	31973	32446	+	157	Rad52/22 double-strand break repair protein	96	70.20	EJW14840.1	*P. alvei* DSM 29	2e-71
gp 52	32453	32581	+	42	hypothetical protein	95	50	WP175532541.1	*Paenibacillus* sp. YR247	0.004
gp 53	32648	33109	+	153	Single-stranded DNA-binding protein	100	100	QBX06360.1	*Paenibacillus* phage vB_PlaP_API480	4e-109
gp 54	33133	35925	+	930	DNA primase	100	99	QBX06338.1	*Paenibacillus* phage vB_PlaP_API480	0.0
gp 55	35965	38190	+	741	DNA polymerase I (EC 2.7.7.7)	100	89.88	QBX06339.1	*Paenibacillus* phage vB_PlaP_API480	0.0
gp 56	38304	38498	+	64	hypothetical protein	100	98	QBX06397.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	3e-36
gp 57	38500	39003	+	167	Resolvase	100	95.81	QBX06356.1	*Paenibacillus* phage vB_PlaP_API480	1e-113
gp 58	38996	39184	+	62	hypothetical protein	100	98	QBX06394.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	6e-34
gp 59	39199	39450	+	83	hypothetical protein	93	78.21	QHZ52192.1	*P. larvae* subsp. Larvae ERICV_03078	2e-34
gp 60	39476	39589	+	37	hypothetical protein	100	97.30	QHZ52191.1	*P. larvae* subsp. Larvae ERICV_03077	3e-15
gp 61	39626	39886	+	86	hypothetical protein	98	92.94	QBX06380.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	3e-39
gp 62	39898	40047	+	49	(EC 3.6.1.23) (dUTPase)	100	91.84	QBX06357.1	*Paenibacillus* phage vB_PlaP_API480	2e-22
gp 63	40139	40339	+	66	hypothetical protein	96	98.44	AXF39479.1	*P.* phage Wanderer	2e-36
gp 64	40336	40527	+	63	hypothetical protein	98	95.16	AXF39684.1	*P.* phage Kawika	1e-34
gp 65	40520	40699	+	59	hypothetical protein	98	93.10	AGN89373.1	*P.* phage phiIBB_Pl23	7e-30
gp 66	40703	40993	+	96	hypothetical protein	100	91.67	QBX06372.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	2e-59
gp 67	41000	41383	+	127	hypothetical protein	100	98.43	QHZ54034.1	ERICV_05050P. l. subsp. Larvae Eric_V	7e-87
gp 68	41385	41642	+	85	putative phage-associated protein	100	98.82	QHZ54033.1	*P. larvae* subsp. *larvae* Eric_V	2e-55

Ek 1(devamı). *Paenibacillus* faj SV21'nin genom annotation tablosu

CDS	Start	Stop	Strand	Aa	Protein	Coverage	Benzerlik(%)	Erişim numarası	Organizma	E-value
gp 69	41627	41839	+	70	hypothetical protein	100	98.57	QHZ54032.1	*P. larvae* subsp. *larvae* ERICV_05048	1e-39
gp 70	41829	42011	+	60	hypothetical protein	96	96.55	QBX06402.1	P. phage vB_PlaP_API480	4e-31
gp 71	42001	42282	+	93	hypothetical protein				Not Match	
gp 72	42263	42616	+	117	hypothetical protein	100	86.29	QBX06366.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	7e-68
gp 73	42609	42767	+	52	hypothetical protein	100	100	QBX06410.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	5e-29
gp 74	43066	43380	+	104	antitoxin MazE	100	98.88	QBX06375.1	*P.* phage vB_PlaP_API480)	4e-57
gp 75	43377	43706	+	109	MazF-like toxin	100	99.08	QBX06367.1	*P.* phage vB_PlaP_API480	8e-75
gp 76	43985	43701	-	94	hypothetical protein	-	-		Not Match	-
gp 77	44220	44948	+	243	ParM/StbA protein	100	99.18	WP172423967.1	*P.* phage vB_PlaP_API480)	2e-176

Ek 2. *Paenibacillus* faj Pd22F'nin genom annotation tablosu

CDS	Strand	Start	Stop	Aa	Protein ve Organizma	Coverage	Benzerlik	E-value	Erişim numarası
gp1	+	90	1	30	hypothetical protein (*P. dendritiformis*)	100	100.00	3e-24	WP111156573.1
gp 2	-	720	100	206	LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein (*P.dendritiformis*)	100	92.72	1e-139	WP111156572.1
gp 3	-	3735	727	1002	phage tail tape measure protein(*P. dendritiformis*)	100	87.74	0.0	WP111156571.1
gp 4	-	3867	3748	39	hypothetical protein (*Paenibacillus* sp. FSL R7-269)	100	61.54	4e-04	WP036697634.1
gp 5	-	4192	3920	90	hypothetical protein (*P. dendritiformis*)	96	100	4e-58	GIO82142.1
gp 6	-	4643	4239	134	DUF3277 family protein (*P. dendritiformis*)	100	100.00	2e-92	WP111156569.1
gp 7	-	5674	4661	337	DUF3277 family protein (*P. dendritiformis*)	100	95.55	0.0	WP111156568.1
gp 8	-	6153	5680	133	hypothetical protein (*P. dendritiformis*)	100	87.22	2e-82	WP111156567.1
gp 9	-	6496	6131	121	hypothetical protein (*P. dendritiformis*)	100	90.08	2e-75	WP111156566.1
gp 10	-	7008	6493	171	hypothetical protein (*P. dendritiformis* C454)	100	93.57	1e-117	EHQ63674.1
gp 11	-	7568	7008	186	phage gp6-like head-tail connector protein(*P. alvei*)	100	70.74	1e-93	WP005544005.1
gp 12	-	7748	7572	58	hypothetical protein J6TS7_57450 (*P. dendritiformis*)	100	100	7e-31	GIO82135.1
gp 13	-	8994	7789	401	phage major capsid protein (*Brevibacillus laterosporus*)	99	74.19	0.0	TPG84966.1
gp 14	-	9645	9040	201	HK97 family phage prohead protease (*Paenibacillus alvei*)	100	100	0.0	GIO82134.1
gp 15	-	10919	9648	423	phage portal protein, HK97 family (*P. alvei* DSM 29)	99	81.75	0.0	EJW20033.1
gp 16	-	12668	10959	569	terminase large subunit (*Paenibacillus alvei*)	100	95.96	0.0	WP163979963.1
gp 17	-	13153	12665	162	phage terminase small subunit P27 family (P. *alvei*)	100	88.27	2e-101	WP163979964.1
gp 18	-	14204	13827	125	endonuclease (*P.dendritiformis*)	99	99	8e-87	GIO82127.1
gp 19	-	14469	14188	93	hypothetical protein J6TS7_44720 (*P. dendritiformis*)	100	100	3e-62	GIO80862.1
gp 20	-	14627	14511	38	hypothetical protein	-	-	-	Not match
gp 21	+	14804	15019	71	type II toxin-antitoxin system HicA family toxin (*P.thiaminolyticus*)	100	98.59	3e-43	WP087444663.1
gp 22	+	15068	15466	132	type II toxin-antitoxin system HicB family antitoxin (*P.thiaminolyticus*)	100	96.97	5e-89	WP087444662.1
gp 23	-	16759	16055	234	hypothetical protein J6TS7_60040 (*P. dendritiformis)*	100	93.54	9e-164	GIO82794.1
gp 24	-	16869	16756	37	hypothetical protein PAV_15c00270 *(P. alvei* DSM 29)	100	75.61	3e-13	EJW14238.1
gp 25	-	17203	16862	113	hypothetical protein (*P. dendritiformis*)	99	34.78	4e-06	WP111155840.1
gp 26	-	17707	17372	111	hypothetical protein (*P. dendritiformis*)	91	84.31	2e-53	GIO82790.1
gp 27	-	18408	17785	207	hypothetical protein J6TS7_63990 (*P. dendritiformis*)	98	92.16	5e-138	GIO82789.1

Ek 2 (devamı). *Paenibacillus* faj Pd22F'nin genom annotation tablosu

CDS	Strand	Start	Stop	Aa	Protein ve Organizma	Coverage	Benzerlik	E-value	Erişim numarası
gp 28	-	19886	18570	438	Replicative DNA helicase [*Paenibacillus alvei*]	98	70.30	0.0	WP171417985.1
gp 29	-	20131	19883	82	hypothetical protein J6TS7_34150(*P. dendritiformis*)	100	95.12	7e-27	GIO73901.1
gp 30	-	21086	20112	324	DUF4373 domain-containing protein (*B.borstelensis*)	89	56.66	2e-103	WP052259770.1
gp 31	-	21413	21126	95	hypothetical protein (*Paenibacillus popilliae*)	100	81.05	2e-50	WP006287786.1
gp 32	-	21760	21410	116	hypothetical protein (*P. dendritiformis*)	100	92.24	1e-71	GIO82990.1
gp 33	-	22220	21855	121	helix-turn-helix domain-containing protein (*P. alvei*)	100	64.75	1e-51	WP171417975.1
gp 34	-	23142	22207	311	hypothetical protein (*P. dendritiformis*)	100	99.68	0.0	GIO78446.1
gp 35	-	23945	23274	223	hypothetical protein (P. *dendritiformis*)	100	100	3e-164	GIO78445.1
gp 36	-	24399	23968	143	ORF6C domain-containing protein (*Paenibacillus alvei*)	100	86.71	1e-88	WP005542758.1
gp 37	-	25294	24392	300	DUF3102 domain-containing protein (*Paenibacillus alvei*)	63	58.20	6e-62	WP005542761.1
gp 38	-	25596	25369	75	hypothetical protein (*P. dendritiformis*)	100	100	9e-48	GIO78442.1
gp 39	-	25820	25599	73	antirepressor (Bacteriophage Lily)	90	72.31	7e-27	YP009202254.1
gp 40	-	25936	25817	39	hypothetical protein (*Paenibacillus alvei*)	76	70.00	8e-04	WP172619513.1
gp 41	-	26055	25921	44	hypothetical protein (*P. dendritiformis)*	100	100	1e-21	GIO77011.1
gp 42	-	26345	26070	91	helix-turn-helix domain-containing protein(P. larvae)	98	71.43	3e-37	WP083041178.1
gp 43	+	26484	27236	250	hypothetical protein (*P. dendritiformis*)	97	99.18	6e-176	GIO77009.1
gp 44	+	27271	27933	221	recombinase family protein (*P. dendritiformis*)	92	100	1e-139	GIO77008.1
gp 45	-	28119	29381	420	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (*P. thiaminolyticus*)	100	82.62	0.0	WP143800677.1
gp 46	-	29378	29647	89	phage holin family protein (*P. campinasensis*)	100	71.91	2e-40	WP095266854.1
gp 47	-	29663	29944	93	hypothetical proteinJ6TS7_065220(*P. dendritiformis*)	100	100	1e-57	GIO82912.1
gp 48	-	30021	30155	44	hypothetical proteinJ6TS7_065210(P. dendritiformis)	100	100	8e-24	GIO82911.1
gp 49	-	30152	30493	113	hypothetical protein (*Paenibacillus dendritiformis*)	100	77.39	6e-55	WP133382386.1
gp 50	-	30504	32090	528	Phage tail protein (*Paenibacillus dendritiformis*)	70	50.77	6e-89	WP206106266.1
gp 51	-	32902	32670	192	phage tail protein I (*Paenibacillus dendritiformis*)	97	100	2e-133	GIO83038.1
gp 52	-	32648	33766	372	baseplate J/gp47 family protein (*P. dendritiformis*)	100	84.41	0.0	TDL57837.1
gp 53	-	33753	34058	101	GPW/gp25 family protein (*P. dendritiformis*)	100	93.07	1e-60	WP133379725.1
gp 54	-	34055	34447	130	phage tail protein (*P. dendritiformis*)	100	93.08	4e-83	WP133379726.1
gp 55	-	34444	34923	161	phage baseplate assembly protein V (*P. alvei*)	98	76.73	3e-87	WP021259385.1
gp 56	-	34929	35942	337	Phage late control gene D protein (*P.dendritiformis*)	100	91.39	0.0	TDL57841.1

Ek 2 (devamı). *Paenibacillus* faj Pd22F'nin genom annotation tablosu

CDS	Strand	Start	Stop	Aa	Protein ve Organizma	Coverage	Benzerlik	E-value	Erişim numarası
gp 57	-	35939	36151	70	Phage tail protein X [*P. dendritiformis*]	100	87.14	4e-35	WP133379729.1
gp 58	-	36144	39056	970	Phage tail tape measure protein [*P. alvei* TS-15]	100	75.67	0.0	EPY07419.1
gp 59	-	39053	39199	48	hypothetical proteinJ6TS7_065340(P. dendritiformis)	100	100	2e-24	GIO82924.1
gp 60	-	39208	39504	98	phage tail assembly protein (*P. dendritiformis*)	100	96.94	2e-62	WP133379730.1
gp 61	-	39520	40044	174	phage major tail tube protein (*Paenibacillus alvei)*	100	93.68	3e-118	WP005543805.1
gp 62	-	40061	41467	468	phage tail protein (*P. dendritiformis*)	99	91.22	0.0	TDL57845.1
gp 63	-	41460	41972	170	hypothetical protein (*P. dendritiformis*)	100	84.12	6e-107	WP133379733.1
gp 64	-	41969	42532	187	phage tail protein (*Paenibacillus dendritiformis*)	100	80.75	3e-104	WP133379734.1
gp 65	-	42519	42866	115	hypothetical protein (*P. dendritiformis*)	99	91.23	2e-70	WP133379735.1
gp 66	-	42863	43156	97	hypothetical protein (*P. dendritiformis*)	100	100	2e-60	GIO83050.1
gp 67	-	43171	45213	680	peptidase (*Paenibacillus dendritiformis*)	99	90.06	0.0	TDL57849.1
gp 68	-	45179	46645	488	phage portal protein (*Paenibacillus dendritiformis*)	100	100	0.0	GIO82795.1
gp 69	-	46648	46869	73	hypothetical protein (*Paenibacillus dendritiformis*)	100	100	7e-43	GIO83062.1
gp 70	-	46876	48723	615	Phage terminase large subunit (GpA) (*P. alvei*)	99	89.98	0.0	WP021259398.1
gp 71	-	48701	49228	175	hypothetical protein (*Paenibacillus alvei* TS-15)	94	99.40	5e-117	GIO82797.1
gp 72	+	49800	50714	304	hypothetical protein (*Paenibacillus alvei*)	100	100.00	0.0	WP157266934.1
gp 73	+	50730	50933	67	DNA-binding protein (*Paenibacillus alvei*)	100	91.04	9e-37	WP005548362.1
gp 74	+	50930	51187	85	hypothetical protein (*P. dendritiformis*)	100	91.76	9e-51	GIO82878.1
gp 75	+	51200	51577	125	hypothetical protein (*Paenibacillus alvei* TS-15)	48	63.93	6e-17	EPY07451.1
gp 76	+	51574	51786	70	hypothetical protein(J6TS7_66440 (*P.dendritiformis*)	97	100	6e-40	GIO83034.1
gp 77	-	51783	52022	79	DUF1883 domain-containing protein (*Bacillus* sp.)	100	78.48	1e-38	WP_026574496.1
gp 78	+	52106	52360	84	hypothetical protein (*P.dendritiformis*)	100	90.70	1e-47	GIO82925.1
gp 79	-	52472	52648	58	hypothetical protein (*Paenibacillus larvae*)	100	56.90	1e-15	WP155121051.1
gp 80	+	52753	52944	63	hypothetical protein(*P.dendritiformis*)	100	100	9e-38	GIO83018.1
gp 81	+	52931	53059	42	hypothetical protein (*P.dendritiformis*)	100	100	6e-23	GIO83019.1
gp 82	+	53056	53793	245	hypothetical protein(*P.dendritiformis*)	97	76.89	6e-128	GIO80843.1
gp 83	+	53790	53915	41	hypothetical protein (*P.dendritiformis*)	100	100	3e-21	GIO83054.1
gp 84	+	54002	54283	93	AbrB family transcriptional regulator(*P.dendritiformis*)	100	95.70	1e-57	GIO82930.1
gp 85	+	54298	54750	150	hypothetical protein (*P.dendritiformis*)	100	100	2e-98	GIO82322.1
gp 86	+	54747	55940	397	DUF2800 domain-containing protein (*P. alvei*)	98	80.66	0.0	WP021259416.1

Ek 2 (devamı). *Paenibacillus* faj Pd22F'nin genom annotation tablosu

CDS	Strand	Start	Stop	Aa	Protein ve Organizma	Coverage	Benzerlik	E-value	Erişim numarası
gp 87	+	55968	56768	266	hypothetical protein (*P.dendritiformis*)	100	100	0,0	GIO82325.1
gp 88	+	56765	58732	655	DNA polymerase (*P.dendritiformis*)	100	95.73	0.0	GIO80850.1
gp 89	+	58828	59757	309	hypothetical protein (*P.dendritiformis*)	88	99.64	0.0	GIO82328.1
gp 90	+	59768	59893	41	hypothetical protein	-	-	-	Not match
gp 91	+	59890	60144	84	hypothetical protein (*P.dendritiformis*)	100	100	1e-51	GIO82329.1
gp 92	+	60174	62585	803	virulence-associated protein E (*Paenibacillus* sp. PDC88)	100	70.06	0.0	SDW31150.1
gp 93	+	62868	63149	93	nuclease (*Paenibacillus dendritiformis*)	100	100	8e-60	GIO82331.1
gp 94	+	63338	63646	102	HNH endonuclease (*Bacillus* phage Carmen17)	82	58	2e-34	AUR81228
gp 95	+	63872	64996	374	DEAD/DEAH box helicase (*P. dendritiformis*)	100	99.73	0.0	GIO82332.1
gp 96	+	64993	65619	208	hypothetical protein (*P.dendritiformis*)	98	84.88	6e-121	GIO71326.1
	+	65818	65890		tRNA-Pro(tgg)				
gp 97	-	65932	66270	112	hypothetical protein	-	-	-	Not match
gp 98	+	66407	67399	330	baseplate J/gp47 family protein (*P. dendritiformis*)	100	92.12	0.0	WP_006675402.1
gp 99	+	67392	68033	213	hypothetical protein (*P.dendritiformis*)	100	99.53	1e-153	GIO82671.1
gp 100	+	68051	70870	939	hypothetical protein(*P.dendritiformis*)	99	62.72	0.0	GIO81493.1
gp 101	+	70882	71520	212	hypothetical protein*(P.dendritiformis*)	100	92.45	1e-129	GIO81935.1
gp 102	+	71517	71666	49	XkdX family protein (*P. dendritiformis*)	97	85.42	2e-21	WP_143799579.1
gp 103	+	71747	71932	61	hypothetical protein(*P.dendritiformis*)	93	100	3e-31	GIO82955.1
gp 104	+	72049	72531	160	hypothetical protein (*Paenibacillus dendritiformis*)	100	94.38	2e-105	WP_006675399.1
gp 105	+	72533	72910	125	hypothetical protein (*Paenibacillus dendritiformis*)	100	96.80	5e-83	WP_111156575.1
gp 106	+	72907	73263	118	DUF2634 domain-containing protein*(P dendritiformis)*	100	94.12	3e-76	WP_111156576.1
gp 107	+	73256	74416	385	baseplate J/gp47 family protein (*P. dendritiformis*)	100	94.82	0.0	WP_006675402.1
gp 108	+	74409	75050	213	hypothetical protein (*Paenibacillus dendritiformis*)	100	96.24	5e-149	WP_006675403.1
gp 109	+	75066	76571	501	hypothetical protein(*P.dendritiformis*)	83	83.85	0.0	GIO78749.1
gp 110	+	76589	76930	113	hypothetical protein(*P.dendritiformis*)	100	100	5e-77	GIO78748.1
gp 111	+	76930	77073	47	hypothetical protein (*Paenibacillus dendritiformis*)	100	85.11	6e-22	WP_197256929.1
gp 112	+	77227	78432	401	glucosaminidase domain-containing protein (*P. alvei*)	99	69.19	0.0	WP_171420004.1
gp 113	-	78422	78589	55	hypothetical protein	-	-	-	Not match
gp 114	-	79011	79184	57	hypothetical protein(*P.dendritiformis*)	100	100	1e-33	GIO76805.1

Ek 2 (devamı). *Paenibacillus* faj Pd22F'nin genom annotation tablosu

CDS	Strand	Start	Stop	Aa	Protein ve Organizma	Coverage	Benzerlik	E-value	Erişim numarası
gp 115	+	79541	79879	112	helix-turn-helix domain Cro/C1-type transcriptional regulator (0*Paenibacillus* phage Dragolir)	86	56.00	4e-29	AUS03436.1
gp 116	+	79885	80154	89	hypothetical protein(*P.dendritiformis*)	100	98.88	1e-57	GIO76803.1
gp 117	+	80250	80531	93	hypothetical protein(*P.dendritiformis*)	100	98.72	7e-56	GIO76802.1
gp 118	+	80738	81169	143	hypothetical protein(*P.dendritiformis*)	100	100	2e-99	GIO76801.1
gp 119	-	81283	81768	161	Serine recombinase (*P.dendritiformis*)	100	100	3e-108	GIO77008.1
gp 120	-	82693	82929	78	hypothetical protein (*Paenibacillus* sp. 598K)	100	92.31	4e-45	GBF72354.1
gp 121	-	83380	83508	42	hypothetical protein(*P.dendritiformis*)	100	100.00	1e-20	GIO76386.1
gp 122	-	85189	85296	35	hypothetical protein (*Paenibacillus alvei*)	88	87.10	2e-10	WP_005543989.1
gp 123	-	85306	85926	206	LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein 8*Paenibacillus dendritiformis*)	100	94.17	7e-141	WP_111156572.1
gp 124	-	85933	86388	151	phage tail tape measure protein (*P. dendritiformis*)	100	95.33	3e-81	WP_111156571.1