

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

ATIK SULARDAN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİ ENFEKTE EDEN BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU

Yüksek Lisans Tezi

Fatma TUFAN KÖSE

Danışman
Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ

RİZE
2025

KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında, Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ danışmanlığında, Fatma TUFAN KÖSE tarafından hazırlanan *Atık Sulardan İzole Edilen Bakterileri Enfekte Eden Bakteriyofaj İzolasyonu* adlı bu tez çalışması, 28/11/2025 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliğiyle/~~oy çokluğu~~ başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri		**Ünvanı, Adı SOYADI**	**İmza**
Başkan	:	Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ	
Üye	:	Doç. Dr. İlkay BAHÇECİ	
Üye	:	Dr. Öğr. Üyesi Ülkü Zeynep ÜREYEN ESERTAŞ	

ETİK BEYAN

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tezli Yüksek Lisans Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim "Atık Sulardan İzole Edilen Bakterileri Enfekte Eden Bakteriyofaj İzolasyonu" adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dâhil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve / veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılacak bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim.
28/11/2025

Fatma TUFAN KÖSE

ÖN SÖZ

Bu tez çalışmasının konusu Atık Sulardan İzole Edilen Bakterileri Enfekte Eden Bakteriyofaj İzolasyonu' dur. Bu çalışmanın amacı ileri çalışmalar için bir altyapı oluşturmaktır.

Lisans ve yüksek lisans eğitimi süresince bilgi birikimini, desteğini ve anlayışını benden esirgemeyen, yaptığı eleştiri ve önerilerle yoluma ışık tutan danışman hocam Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ'e teşekkür ederim.

Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Zihni Açar YAZICI'ya bilimsel destekleri için teşekkür ederim.

"Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü birimince desteklenmiştir. Proje Numarası: TSA-2023-1443" ("This work was supported by the Research Fund of Recep Tayyip Erdogan University. Project Number TSA-2023-1443"). Yürütücülüğünü yaptığı bu projede Dr. Öğr. Üyesi Erva RAKICI' ya teşekkürlerimi sunarım.

Arkadaşlığı ve bilimsel desteği ile her zaman yanımda olan Öğr. Gör. Dr. Nebahat EJDER'e teşekkür ederim.

Manevi destekleri ile hep yanımda olan sevgili eşim, canım kızım ve aileme sonsuz teşekkürlerimi iletiyorum.

Fatma TUFAN KÖSE
Rize 2025

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY I
ETİK BEYAN II
ÖN SÖZ III
İÇİNDEKİLER IV
ÖZET VII
ABSTRACT VIII
KISALTMALAR IX
TABLOLAR LİSTESİ X
ŞEKİLLER LİSTESİ XI
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 4
1.1. Bakteriyofajlar 4
1.1.1. Fajların Yapısı ve Sınıflandırması 5
1.1.2. Bakteriyofaj ve Bakteri İlişkisi 7
1.1.3. Litik Döngü 9
1.1.4. Lizojenik Döngü 10
1.1.5. Fajların Kullanım Alanları 11
1.1.6. Fajların Moleküler Biyolojisi ve Faj Terapi 11
1.1.7. Bakterilerde Fajlara Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları 13
1.1.8. Atık Sular 14
1.1.9. Atık Sularda Bulunan Patojen Bakteriler 15
1.1.9.1. *Enterobacterales* Familyası 15
1.1.9.2. *Pseudomonadaceae* Familyası 15
1.1.9.3. *Moraxellaceae* Familyası 16
2. GEREÇ VE YÖNTEM 17
2.1. Gereç 17
2.1.1. Kullanılan Araç Gereç ve Yöntemler 17
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Türleri 17
2.1.3. Besiyerleri 19
2.1.4. Kimyasal ve Biyokimyasallar 19

2.2. Yöntem 19
2.2.1. Çözelti ve Besiyerlerinin Hazırlanması 19
2.2.2. Atık Su Örneklerinin Toplanması ve Stoklanması 21
2.2.3. Atık Su Örneklerinden Bakteri ve Faj Zenginleştirmesi, İzolasyonu, Replika Ekimler ve Stoklama 22
2.2.4. Fajların Atık Sulardan Zenginleştirilmesi ve İzolasyonu 23
2.2.5. Agar Spot-Test ile Faj Varlığının Taranması 23
2.2.6. Litik Faj Enfeksiyonunun Yapılması 24
2.2.7. Fajların Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Stoklanması 25
2.2.8. Faj Titresinin Belirlenmesi 26
2.2.9. Fajların Farklı Sıcaklık ve pH Koşullarına Karşı Stabilitelerinin Saptanması 27
2.2.10. Fajların Optimum Enfektivite Değerlerinin Belirlenmesi 28
2.2.11. Fajların Tek Aşamalı Gelişme Grafiklerinin Belirlenmesi 28
2.2.12. Faj ve Lizat Örneklerinin ATCC Tip Suşlarındaki Konak Aralığının Belirlenmesi ve Litik Faj Enfeksiyonu 28
2.2.13. Faj ve Lizat Örneklerinin Çeşitli Klinik Bakterilerde Konak Aralığının Belirlenmesi ve Litik Faj Enfeksiyonu 29
2.2.14. Bakteri Suşlarının Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi 29
2.2.15. Bakteriyofaj DNA Ekstraksiyonu 29
2.2.16. Bakteriyofaj DNA'sının Rekstriksiyon Enzimleri ile RFLP Profilinin Belirlenmesi 30
2.2.17. Fajların Elektron Mikroskobi Morfolojileri 30
3. BULGULAR 32
3.1. Atık Su Örneklerinden Bakteri İzolasyonu 32
3.2. Fajların Konak Aralıkları 32
3.3. Litik Faj Enfeksiyon ve Faj Saflaştırması 32
3.4. Faj Titreleri 34
3.5. Fajların Farklı Sıcaklık ve pH Koşullarına Karşı Stabiliteleri 35
3.6. Fajların Optimum Enfektivite Değerleri 38
3.7. Fajların Tek Aşamalı Gelişme Grafikleri 40

3.8. Faj ve Lizat Örneklerinin ATCC Bakterilerinde Konak Spektrumları ve Litik Faj Enfeksiyonları 42
3.9. Faj ve Lizat Örneklerinin Çeşitli Klinik Bakterilerde Konak Spektrumları ve Litik Faj Enfeksiyonları 45
3.10. Klinik Kökenli Konak Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılıkları 48
3.11. Bakteriyofaj DNA Ekstraksiyonu 50
3.12. Bakteriyofaj DNA'sının Rekstriksiyon Enzimleri ile RFLP Profilleri 50
3.13. Fajların Elektron Mikroskobisi 51
4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER 52
KAYNAKÇA 59
EKLER 65
ETİK KURUL KARARI 66

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji
Tez Türü : Yüksek Lisans Tezi
Danışman : Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ
Hazırlayan : Fatma Tufan KÖSE
Yıl : 2025
Sayfa Sayısı : 76

ÖZET

ATIK SULARDAN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİ ENFEKTE EDEN BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU

Litik bakteriyofajlar, son derece spesifik, kendi kendini çoğaltan ve yan etkisi olmayan bir antimikrobiyal alternatif sunarken, antibiyotiklerin yanlış kullanımı ve aşırı kullanımı, çoklu ilaç dirençli (MDR) bakterilerin ortaya çıkmasını hızlandırmaya devam etmektedir. Bu çalışmada, yeni fajları izole etmek, klinik olarak önemli patojenlere karşı konakçı yelpazesini değerlendirmek ve ilk moleküler ve morfolojik karakterizasyonu yapmak amacıyla, Türkiye'nin Rize ilindeki beş antropojenik atık su çıkışının faj rezervuarı incelenmiştir. Zenginleştirme ve çift katmanlı plak testleri ile sekiz litik faj (ΦD2D, ΦD5D, ΦD5T, ΦD9D, ΦT3D, ΦT3S, ΦT3T, ΦT6D) ve beş duyarlı çevresel konak elde edilmiştir. Çapraz enfeksiyon testlerine göre, sekiz faj, Moraxellaceae, Enterobacteriaceae ve Pseudomonadaceae familyalarından on MDR klinik izolatını toplu olarak lize etti. Fajların temel biyolojik özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan deneylerde, tek aşamalı üreme eğrisi analizinde maksimum patlama boyutu 10^9–10^{10} pfu/mL aralığında bulundu; sıcaklık ve pH stabilite testlerinde çoğu fajın geniş aralıkta stabilitesini koruduğu görüldü. ΦD2D, ΦT3D ve ΦD9D'nin kısıtlama fragmanı uzunluğu polimorfizmi profili, yakın genomik akrabalık ortaya çıkardı. ΦD9D ve ΦT3D, transmisyon elektron mikroskobunda Podoviridae ve Tectiviridae morfolojisi gösterdi. VITEK-2 otomatik sistemi, klinik izolatların antibiyotik duyarlılık modellerini belirlemek için kullanıldı ve yaygın çoklu ilaç direncini doğruladı. Bu bulgular bir araya getirildiğinde, atık suda terapötik olarak yararlı fajların bol miktarda bulunduğunu gösterir ve izole edilmiş litik fajları, gelecekte MDR Gram-negatif bakterileri hedefleyen faj tedavisi kokteylleri oluşturmak için geçerli seçenekler olarak belirler.

Anahtar Kelimeler: bakteriyofaj, litik faj, atık su, antibiyotik direnç, faj terapisi, MDR bakteri

Recep Tayyip Erdogan University Institute of Graduate Studies
Department : Medical Microbiology
Thesis Type : Master Thesis
Supervisor : Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ
Author : Fatma Tufan KÖSE
Year : 2025
Pages : 76

ABSTRACT

ISOLATION OF BACTERIOPHAGE INFECTING BACTERIA ISOLATED FROM WASTEWATER

While lytic bacteriophages provide a highly specific, self-amplifying, and side-effect-free antimicrobial alternative, antibiotic misuse and overuse continue to hasten the emergence of multidrug-resistant (MDR) bacteria. In order to isolate novel phages, evaluate their host range against clinically relevant pathogens, and conduct an initial molecular and morphological characterization, the phage reservoir of five anthropogenic wastewater outlets in Rize, Turkey, was investigated in this study. Eight lytic phages (Φd2d, Φd5d, Φd5t, Φd9d, Φt3d, Φt3s, Φt3t, Φt6d) and five susceptible environmental hosts were obtained through enrichment and double-layer plaque assays. The eight phages collectively lysed ten MDR clinical isolates from the Moraxellaceae, Enterobacteriaceae, and Pseudomonadaceae families, according to cross-infection tests. In experiments conducted to determine the fundamental biological characteristics of phages, the maximum burst size in the stepwise growth curve analysis was found to be in the range of 10^9–10^{10} pfu/mL; in temperature and pH stability tests, most phages were found to maintain their stability over a wide range. Restriction fragment length polymorphism profiling of ΦD2D, ΦT3D, and ΦD9D revealed close genomic relatedness. ΦD9D and ΦT3D showed Podoviridae and Tectiviridae morphology in transmission electron microscopy. The VITEK-2 automated system was used to determine the antibiotic susceptibility patterns of the clinical isolates, confirming widespread multidrug resistance. When combined, these findings demonstrate wastewater's abundance of therapeutically useful phages and establish the isolated lytic phages as viable options for creating phage therapy cocktails that target MDR Gram-negative bacteria in the future.

Keywords: bacteriophage; lytic phage; wastewater; antibiotic resistance; phage therapy; multidrug-resistant bacteria

KISALTMALAR

ATCC	:	American Type *Culture Collection*
BHIA	:	Brain Heart Infusion Agar
CFU	:	Colony Forming Unit
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
dH_2O	:	Distile Su
EMB	:	Eozin Metilen Blue Agar
LB	:	Luria Bertani
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
ml	:	Mililitre
M	:	Molarite
NaCl	:	Sodyum Klorür
MOI	:	Multiplicity of Infection
MHA	:	Mueller Hinton Agar
PBS	:	Fosfat Tampon Solüsyonu
PFU	:	Plaque Forming Units
RNA	:	Reoksiribonükleik Asit
Rpm	:	Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
SM	:	Saline Magnesium Buffer
TEM	:	Transmission Electron Microscope
TSA	:	Tryptone Soya Broth Agar
TSB	:	Tryptic Soy Broth
Ty	:	Tarihsiz Kaynak
Vb	:	Ve benzeri
Vd	:	Ve diğerleri
Φ	:	Bakteriyofaj
°C	:	Santigrat Derece

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Bradley'e göre tiplendirme. 6
Tablo 2. Bakteriyofaj familyaları. 7
Tablo 3. ATCC tip suş listesi 17
Tablo 4. Tez çalışması 1'den elde edilen klinik bakteriler 18
Tablo 5. İstanbul Medipol hastane orjinli klinik suşları listesi 18
Tablo 6. Atık su örneklerinin alındığı yer, alındığı tarih ve koordinatları 21
Tablo 7. Atık sulardan izole edilen bakterilerin tanımlanması..... 33
Tablo 8. Zenginleştirme lizatlarının çevre bakterilerine litik etkisi 33
Tablo 9. Atık sulardan izole edilen konak bakteriler ve konakçı fajları..... 34
Tablo 10. Fajların titrasyon değerleri 34
Tablo 11. Faj Lizatlarının ATCC Tip Şuşlarındaki Plak Etkileri Etkileri..... 42
Tablo 12. Atık sulardan izole edilen fajların ATCC tip suşlarındaki plak..... 43
Tablo 13. Zenginleştirme lizatlarının, tez çalışması 1'den elde edilen karbapenem duyarlı *klebsiella pneumoniae* bakterilerine litik etkileri 45
Tablo 14. Çevre faj ve lizatlarının İstanbul Medipol hastane suşlarına etkisi..... 47
Tablo 15. İstanbul Medipol hastane suşları antibiyogram sonuçları 49
Tablo 16. Tez çalışması 1'den sağlanan Karbapenem duyarlı olmayan *Klebsiella pneumoniae* suşları antibiyogram sonuçları 49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Fajlar, faj terapisi ve antibiyotikler üzerine araştırma tarihindeki önemli olayların zaman çizelgesi 4
Şekil 2. Bir bakteriyofajın elektron mikroskoptaki görüntüsü ve anatomik yapısı. 5
Şekil 3. Fajın bakterideki litik ve lizojenik döngüsü. 8
Şekil 4. Atık su kirliliğinin başlıca kaynakları 15
Şekil 5. Zenginleştirme tek koloni ekim plağı 22
Şekil 6. Replika ekim yöntemi örneği 23
Şekil 7. Faj konak tarama ekim plağı örneği 24
Şekil 8. Faj plak görünümü 25
Şekil 9. Faj lizatının sm buffer ile hazırlanan on kat seri dilisyon 27
Şekil 10. Faj titrasyon plağı 35
Şekil 11. ΦT3D, ΦT3T, ΦT3S ve ΦT6D Fajlarının sıcaklık stabilite aktivitleri. 35
Şekil 12. ΦD9D, ΦD2D, ΦD5D ve ΦD5T Fajlarının sıcaklık stabilite aktiviteleri. 36
Şekil 13. ΦD9D, ΦD2D, ΦD5D ve ΦD5T Fajlarının pH stabilite aktiviteleri. 37
Şekil 14. ΦT3D, ΦT3T, ΦT3S ve ΦT6D Fajlarının pH stabilite aktiviteleri. 38
Şekil 15. ΦD2D, Φ D9D, ΦD5D ve ΦD5T Fajlarının optimum MOI değerlendirmesi. 39
Şekil 16. ΦT3T, ΦT3D, ΦT6D ve ΦT3S Fajlarının Optimum MOI değerlendirmesi 39
Şekil 17. Fajların tek aşamalı gelişme Grafikleri. Sırasıyla; ΦD2D, ΦD9D, ΦD5D, ΦD5T, ΦT3S, ΦT3T, ΦT3D ve ΦT6D. 41
Şekil 18. ATCC Tip Suşlarında Meydana Gelen Farklı Morfolojideki Litik Faj Plakları 44
Şekil 19. Farklı morfolojiye sahip tez çalışması 1'den elde edilen klinik bakterilere ait enfeksiyon plakları 46
Şekil 20. Farklı Morfolojiye Sahip İstanbul Medipol Klinik Orijinli Bakterilerdeki Enfeksiyon Plakları. 48
Şekil 21. Faj DNA'larının agaroz jel elektrofores görüntüsü. 50
Şekil 22. RFLP sonucu jel elektroforez faj profilleri 51
Şekil 23. ΦD9D ve ΦT3D fajlarının elektron mikroskop görüntüleri. 51

GİRİŞ

Bakteriyofaj (faj) bakteriye özgü olan ve onları enfekte eden virüslerdir. Bakterilerin doğal biyolojik düşmanları olarak kabul edilirler. Dünya üzerinde en çok bulunan organizmalar olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda, tanımlanmış faj sayısında bir artış olsa da gezegenimizde tahminen 10^{31} faj parçacığı olduğu düşünüldüğünde aslında çok küçük bir parçasına bakılmaktadır (Comeau vd., 2008). Yani dünyadaki her bir kum tanesi başına bir trilyon faj yanlış bir tahmin olmaz. Fajlar her yerden izole edilebilir. Her bakteriyi enfekte edebilecek bir faj olduğu düşünülmektedir (Keen, 2015). GenBank'ta listelenen 2025 yılı itibariyle 25 binden fazla tam faj genomu vardır ve deneysel olarak incelenmiştir (Sayers vd., 2025).

Ancak milyonlarca faj genomunun olduğu tahmin edilmektedir. Bakteriyofajlar, biyosferdeki tüm organizmaların mutlak çoğunluğunu temsil ederek biyolojide benzersiz bir konuma sahiptir (Hatfull, 2011). Fajların en önemli özelliği çeşitliliğidir. Faj virionları boyut, şekil ve karmaşıklık açısından çeşitlilik gösterir ve içerdikleri genomlar daha da çeşitlidir (Keen, 2015). Her yerde bulunmaları ve çeşitlilikleri fajların biyolojik süreçlerde ve ekosistemde aktif rol oynamalarını sağlamaktadır (Naureen vd., 2020).

Fajlar, özellikle litik fajlar önemli bir terapötik potansiyele sahiptir. Fransız-Kanadalı mikrobiyolog Felix d'Herelle 3 Eylül 1917'de, yaklaşık 100 yıl önce "dizanteri basilinin düşmanının, görünmez bir mikrobunu" keşfettiğini açıklayıp ona bakteriyofaj adını verdi ve faj odaklı çalışmaların temelleri atıldı (Summers, 2011). Faj terapisi; bakteriyofaj keşfinden sonra 1921'de tifoya karşı ilk terapötik kullanımıyla başlamıştır. Özellikle 1920- 1950'ler arasında terapötik faj kokteyli genel kabul gören bir yöntem olmuştur. Doğu Avrupa ve Sovyetler Birliği antibiyotiğin keşfine, yani 1940'lara kadar faj ürünlerini kullanmaktaydı. Rus ve Alman orduları yara enfeksiyonlarının tedavisinde faj terapisini kullanmıştır (Gündoğdu ve Kılıç, 2018).

Antibiyotiğin keşfi ile batıda faj odaklı çalışmaların terk edilmesi ve zaman içerisinde antibiyotik dirençli bakterilerin artışı, yeni antibiyotik keşfinin azalması ve mevcut antibiyotiklerin enfeksiyon tedavilerinde yetersiz kalması ile "Antibiyotik öncesi döneme" dönüş uyarıları giderek daha yaygın hale geldi ve Hastalık Kontrol

ve Önleme Merkezleri (CDC) ve WHO gibi düzenleyici kuruluşlar antibiyotik direncini küresel sağlık için bir tehdit olarak ilan etti. Bu durum alternatif antibakteriyel tedavi olarak bakteriyofajlara olan ilgiyi yeniden canlandırmıştır. Faj terapi için bakteriyofajların izolasyonu ve karakterizasyonu çalışmaları artmıştır. Bakteriyofajların su, toprak gibi çevresel kaynaklardan izole edilebilir olması faj tedavilerinin hızlı gelişmesine olanak sağlamıştır. Son teknolojik gelişmeler ile faj terapisi araştırmalarında bir rönesansa yol açtı (Lin vd., 2017).

"Faj terapisi" terimi, zararlı bakterileri enfekte edebilen, parçalayabilen ve sonunda ortadan kaldırabilen litik bakteriyel virüsler olan bakteriyofajların kullanımını ifade eder. Faj terapisinde litik bir bakteriyofajın kullanımı tedavi sırasında patojenik olmayan bakterileri etkilemezken diğer yandan aynı özgüllük belirli patojen bakteriyi etkiler. Faj terapisinde "faj kokteyli" olarak bilinen şey kullanmaktadır. Faj kokteylleri, farklı patojenik bakteri türlerini veya belirli bir türün farklı suşlarını öldürmeyi amaçlayan dar aralıklı fajların bir kombinasyonunu içerebilir. (Bozidis vd., 2024).

Faj terapisinin spesifik ve düşük maliyetli olması çalışmaların yapılmasını kolaylaştırmıştır. Faj terapisindeki dezavantaj; konağa özgü olmasından dolayı tedavilerde birçok fajdan oluşan karışımın gerekliliğidir. Bunun için sürekli faj izolasyonu ve yeni konak bulma çalışmaları yapılmalıdır (Lin vd., 2022).

Faj tedavisinin aktif olarak yapıldığı en önemli yerlerden biri Tiflis'teki "George Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology" kuruluşudur. Eliava Faj ve Suş Koleksiyonu şu anda insan, bitki ve hayvan bakteriyel patojenlerine karşı aktif 1000'den fazla faj'a ev sahipliği yapmaktadır. Koleksiyon ayrıca Gürcistan'ın farklı coğrafi bölgelerinden ve ayrıca dünyanın her yerindeki (Avrupa, Amerika, Asya, Avustralya, Afrika) çeşitli ülkelerden izole edilen 215 bakteri türünün ve 70 cinsin 12.000'den fazla farklı temsilcisini içermektedir (Eliava Institute, 2025).

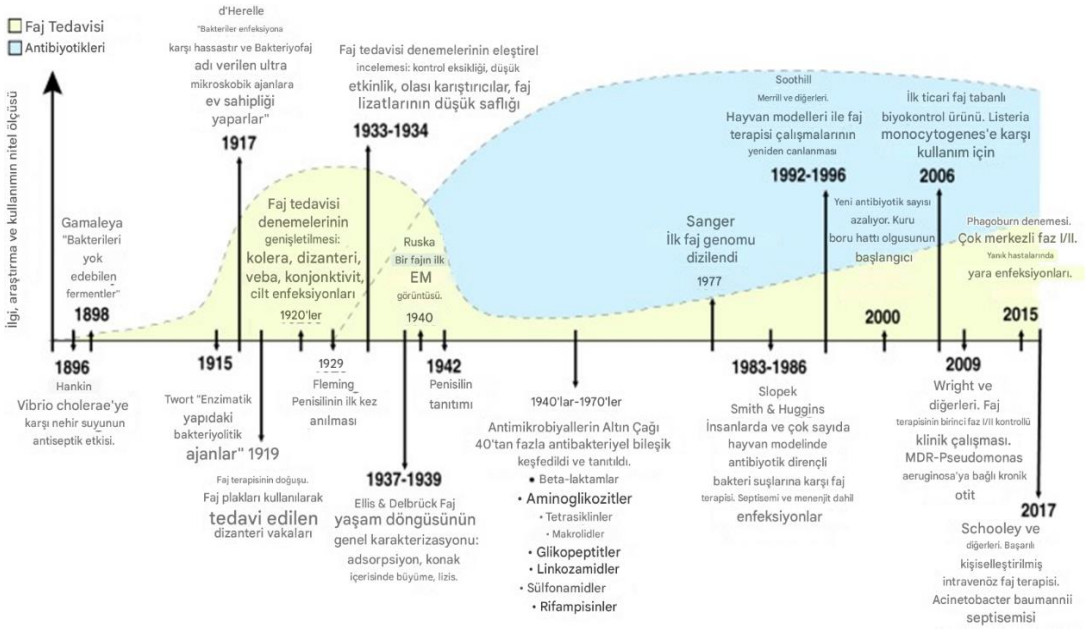
Bu çalışmada atık su kaynağı olarak; antropojenik yani toplum kaynaklı lağım suları kullanıldı. Rize ili atık su örneklerinden izole edilen fajların; izole edildikleri atık su kökenli, American Type Culture Collection (ATCC) tip suşları ve antibiyotik dirençli klinik orijinli patojen bakterileri enfekte eden litik fajlar izole

edilerek, faj terapisinden potansiyel kullanımlarına yönelik kısmı olarak karakterizasyonları yapılarak stoklanmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Bakteriyofajlar

Bakteriyofajlar bakterilere spesifik sadece onları enfekte edebilen virüslerdir. Bakteri hücre metabolizmasını bozarak, hücreyi parçalar ve yeni fajların oluşmasını sağlar. Bakteriyofajlar, yalnızca konak bakteri hücresinde üreyebilen, bakteri hücresi içinde veya ortamda serbest olarak bulunabilen, ışık mikroskobu ile görülemeyip ancak geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile görüntülenebilen bakteri virüsleridir (Bradley, 1967). İngiliz bakteriyolog Frederick Twort'tan (1877-1950) önce hiçbir bilim insanı bu fenomeni açıklayan bir görüş ortaya atmamıştır. Twort 1915 yılında antibakteriyel etkinliğin virüs kaynaklı olabileceğini iddia etmiştir (Gündoğdu vd.,2018). Fransız-Kanadalı mikrobiyolog Felix D'Herelle 1917'de ilk kez dizanteri bakteriyofajını izole etti, onu ultramikroskobik bir bakteri paraziti olarak nitelendirdi ve ona "bakteri yiyen" anlamına gelen bakteriyofaj adını verdi (Bradley, 1967). Fajlar, faj terapisi ve antibiyotikler üzerine araştırma tarihindeki önemli olayların zaman çizelgesi Şekil 1'de gösterilmiştir (Gordillo ve Barr, 2019).

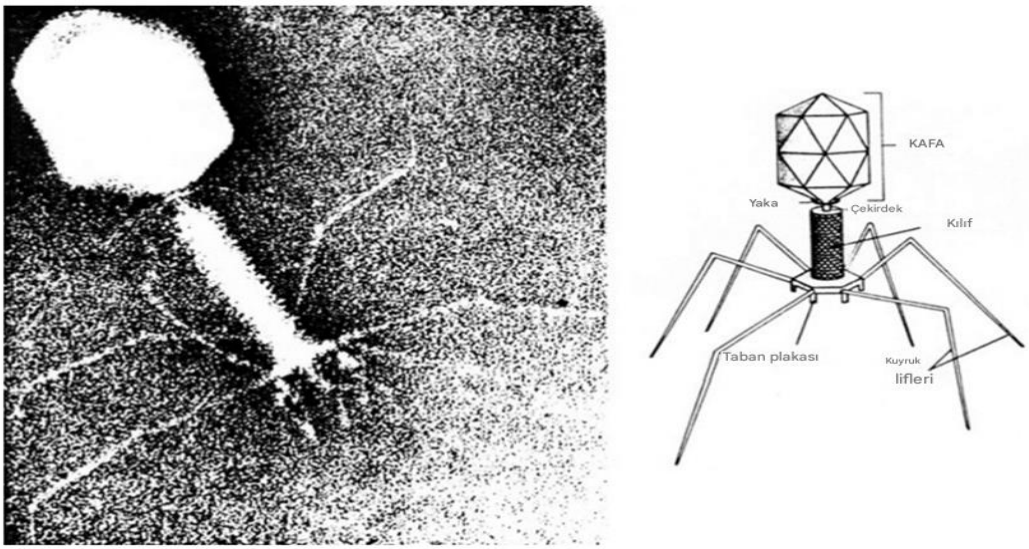


Şekil 1. Fajlar, faj terapisi ve antibiyotikler üzerine araştırma tarihindeki önemli olayların zaman çizelgesi (Gordillo ve Barr, 2019)

1.1.1. Fajların Yapısı ve Sınıflandırması

Fajlar birbirinden farklı morfolojiye sahiptirler. Genel olarak baş, kuyruk kısmı, kuyruk fibrilleri ve tutunma levhası gibi yapısal elemanları vardır. Baş kısmında, nükleik asit vardır nükleik asidi çevreleyen kapsid olarak isimlendirilen protein bir kılıfla çevrilidir. Kapsid yapısı, polipeptit tekrarlarından ve kapsomer adı verilen protein alt birimlerinden oluşur. Kapsomerlerin sayısı, şekli, büyüklüğü ve diziliş düzenlerindeki farklılık bakteriyofajın tipine bağlıdır. Kuyruk yapısı bakteriyofaj tiplerine göre farklılıklar gösterir (Kılıç vd., 1996).

Bakteriyofajların büyüklükleri ve yapısal formlarına bakıldığında 1959 yılından beri incelenen fajların çoğunun büyüklüğü 24-200 nm arasında olduğu bildirilmiştir. Bakteriyofajların büyük çoğunluğu nükleik asit olarak çift zincirli DNA içerir. Fajların geri kalanındaki nükleik asit, tek zincirli DNA, çift zincirli RNA veya tek zincirli RNA şeklinde görülmektedir. Kuyruk ile ilgili oluşumlar ise, protein yapıdan oluşur. Ancak bunlar kapsid proteinlerinden farklı olarak antijenik yapılarında farklı özelliklere sahiptirler (Akman, 1977). Fajlar kuyruklu, polihedral, filamentöz ve pleomorfik yapıda olabilmektedir. Bunların %96'sının kuyruklu yapıda olduğu, %4'ünün ise filamentöz, polihedral ve pleomorfik yapıda olduğu görülmüştür (Karasartova, 2009). Şekil 2'de kuyruklu bir bakteriyofajın elektron mikroskop görüntüsü ve anatomik yapısı gösterilmiştir (Todar, 2019).



Şekil 2. Bir bakteriyofajın elektron mikroskoptaki görüntüsü ve anatomik yapısı (Todar, 2019)

Bakteriyofajların ilk fiziksel ve kimyasal araştırmaları 1960'lı yıllarda başlamıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda üzerinde en çok çalışılan fajlar T ve lambda (λ) tipi fajlardır. T fajları benzerliklerine göre T-Even; T2, T4 ve T6 bakteriyofajları olarak isimlendirilmiştir (Ustaçelebi vd., 2008). Lambda fajının litik ve lizojenik döngüler arasında gidip gelebilen özellikte olması çalışmalara hız kazandırmıştır. Bakteriyofajların sınıflandırılmasında öncü kabul edilen bilim insanı, 1937'de fajların boyut ve fizikokimyasal ajanlara karşı direnç farklılıkları gösterdiğini kanıtlayan Avustralyalı mikrobiyolog Sir Macfarlane Burnet'tir (Karaynir, 2021). Faj taksonomi çalışmalarının uluslararası yürütülmesini sağlamak için "Provisional Committee on Nomenclature of Viruses" 1965 yılında kuruldu ve daha sonra ismi "International Committee on Taxonomy of Viruses" (ICTV) olarak değiştirildi. Faj sınıflandırmasında Bradley (1967) tarafından yapılan çalışmalar ICTV komitesi tarafından kabul edildi. Bradley, fajları sahip oldukları nükleik asit ve morfolojik yapılarına göre A'dan F'ye, altı temel morfolojik tip olarak sınıflandırdı (Tablo 1). Bu sınıflandırmaya göre T-even bakteriyofajları grup A, T1 ile T5 bakteriyofajları grup B, T3 ile T7 bakteriyofajları grup C, kuyruksuz bakteriyofajlar baş büyüklüğüne göre grup D ile grup E ve ipliksi bakteriyofajlar ise grup F içinde araştırılmıştır (Ustaçelebi ve Dürdal, 2008).

Tablo 1. Bradley'e göre tiplendirme (Bradley, 1967)

Tip	Fajın morfolojik özelliği	Nükleik asit	Örnek
A	Polihedral baş, kasılabilen kuyruklu	dsDNA, lineer	T2, T4, T6
B	Polihedral baş, uzun ve kasılamayan kuyruklu	dsDNA, lineer	T1, T5, λ
C	Polihedral baş, kısa ve kasılamayan kuyruklu	dsDNA, lineer	T3,T7, P22
D	İkozahedral baş, kuyruksuz, büyük kapsomerli	ssDNA, sirküler	ΦX174 S13
E	İkozahedral baş, kuyruksuz, küçük kapsomerli	ssRNA, lineer	F2R17 Fr, MS2
F	Başsız, ipliksil filamantöz	ssRNA, lineer	FE, fd, M13

Ackermann sınıflandırmasında ise bakteriyofaj büyüklükleri, şekilleri, kuyruk yapıları, zarf içerikleri yönünden familyalar (Tablo 2) belirlenmiştir (Ackermann, 2009).

Tablo 2. Bakteriyofaj familyaları (Ackermann, 2009)

Morfoloji	Nüklei k Asit	Takım ve Familyalar	Cins	Örnek	Üye Sayısı	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	ΦX17 4	40	Lipid İçeren Kompleks
	ds, C, T	Tectiviridae	1	PM2	3	Kapsid
	ds, L	Corticoviridae	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	Inoviridae	2	fd	57	Uzun veya Kısa Filament
	ds, L	Lipothrixviridae	1	TTV1	6	Lipid Zarf
	ds, L	Rudiviridae	1	SIRV1	2	TMV Benzeri Yapı
Pleomorfik	DNA, ds, C, T	Fuselloviridae	1	L2	6	Kapsid Yok, Lipid Zarf
	ds, C, T	Plasmaviridae	1	SSV1	8	Kapsid Yok, Limon Formlu

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

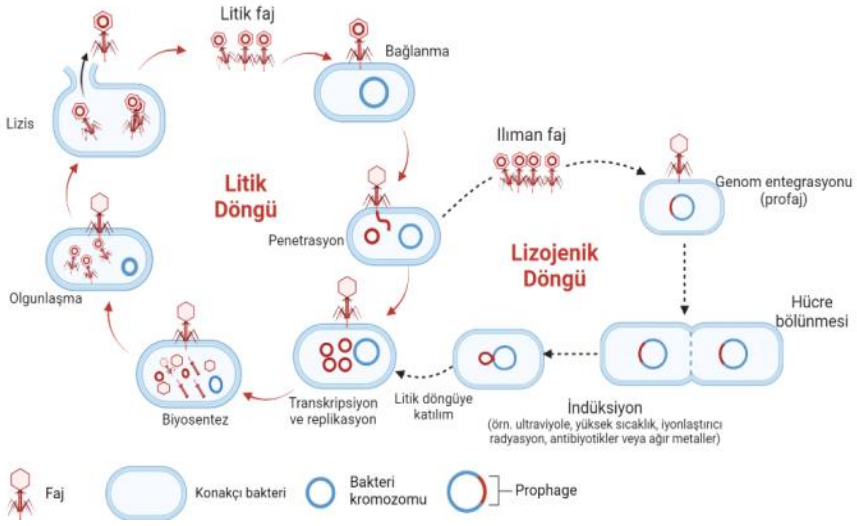
1.1.2. Bakteriyofaj ve Bakteri İlişkisi

Bakteriyofajlar, faj olarak da bilinir. Yalnızca bakteri hücrelerini enfekte eden ve çoğalan virüslerdir. Tüm virüsler gibi, bakteriyofajlar da konakçıları konusunda türe özgüdür ve genellikle yalnızca tek bir bakteri türünü veya hatta bir tür içindeki belirli suşları enfekte eder (Kasman ve Porter, 2022).

Bakteriyofajlar konak bakterilerde litik ve lizojenik olarak iki farklı şekilde yaşam döngüsüne sahiptirler (Şekil 3). Litik döngüde, bakteriyofaj DNA'sı konak hücre içinde kendini replike ederek yeni virüsleri oluşturur ve hücreyi parçalar ve böylece yeni litik fajlar ortamda serbest kalır. Konak hücre parçalanması durumuna lizis, hücrenin parçalanmasına sebep olan bakteriyofaja, litik bakteriyofaj ya da virulant bakteriyofaj ismi verilir (Ustaçelebi ve Dürdal,2008). Litik enfeksiyonlara neden olan litik fajlar konakçı bakteri hücresinin hızlı bir şekilde parçalanmasına ve ölümüne neden olur (Hanlon, 2007).

Lizojenik döngüde, bakteriyofaj DNA'sı konak bakteri hücresinin içine girdikten sonra replikasyon oluşmaz, bunun yerine faj nükleik asidi bakteri DNA'sına entegre olur. Bakterinin bölünüp çoğalması ile bakteriyofaj DNA'sı bununla birlikte çoğalır. Bakteride bu yolla enfeksiyon oluşturan faja ılımlı faj, bakteri kromozomuna entegre olan faj nükleik asidine profaj, profajın bakteride oluşturduğu duruma lizojeni denir. Bu şekilde DNA'sında profaj taşıyan bakteriye lizojenik bakteri denir (Ustaçelebi ve Dürdal, 2008).

Profajlar, bulundukları bakteriye yeni özellikler kazandırabilir. Fajlar profaj halindeyken, bakterilerde oluşturdukları karakter değişikliklerine ise lizojenik konversiyon adı verilir. Lizojenik konversiyon bazı bakterilere virulans özelliği kazandırabilir. Virülans genlerine örnek olarak, konakçıya bağlanma, istila ve hayatta kalma genleri ile toksin üretimi verilebilir (Hanlon, 2007).



Şekil 3. Fajın bakterideki litik ve lizojenik döngüsü (Karanir, 2021)

1.1.3. Litik Döngü

Litik yaşam döngüsü sırasında, bir faj duyarlı bir konak bakterisine bağlanır, genomunu konak hücre sitoplazmasına sokar ve proteinlerini üretmek için konak ribozomlarını kullanır. Konak hücre kaynakları hızla viral genomlara ve kapsid proteinlerine dönüştürülür ve bunlar orijinal fajın birden fazla kopyasını oluşturur. Konak hücre öldüğünde liz edilir ve yeni bakteriyofajlar hücre dışına çıkar. Serbest kalan bakteriyofajlar başka bir konak hücreyi enfekte eder (Kasman ve Porter, 2022).

Litik döngüyü 3 başlık altında incelersek;

Adsorbsiyon: Bakteri yüzeyinin antijenik yapısına ve sözü edilen faja özgü reseptörlerin varlığına bağlı olarak bakteriyofajların, bakteri hücre duvarına yapışmasına adsorbsiyon denir (Törümküney, 1996). Tüm bakteriyofajlar adsorbsiyon için özel yapıları vardır ve bu yapılar bakteriyofajın konak bakterilere olan özgünlüğünü belirler. Bakteri duvarında bulunan özgül reseptörler bakteriyofajın tutunması sağlar. Kuyruklu bakteriyofajlarda yapışma bölgesi olarak kompleks kuyruk fiberleri ya da dikenleri, ikozahedral kuyruksuz bakteriyofajlarda birçok yapışma proteinleri, flamentöz bakteriyofajlarda bakteriyofajın uç kısımları ve RNA bakteriyofajlarında ise basit protein molekülleri bulunmaktadır. Konak bakteri hücreleri üzerindeki bakteriyofaj reseptörleri, sıklıkla kompleks yapıda polisakkarit, lipid veya F pilileri olup güçlü antijenik özelliklere sahip bakteriyofajlardır. Ayrıca bakteriyofaj adsorbsiyonu için ortamda Mg^{+2}, Ca^{+2} gibi inorganik iyonlarının varlığına ihtiyaç vardır (Akan, 1994; Ustaçelebi ve Dürdal, 2008).

Bakteriyofaj genetik materyalinin bakteri hücresi içine girmesi: Bakteriyofaj kuyruk kısmında yer alan endolizin enzimi yardımı ile hücre duvarının delinmesi ve faj tarafından genetik materyalin bakteri hücresi içine enjekte olmasıdır (Törümküney, 1996).

Faj genetik materyelinin bakteri hücresi içine girmesi bakteri kromozomunun nükleazlar ile parçalanmasına neden olur. Parçalanmış kromozomun ortaya çıkardığı ürünlerden faj nükleik asit replikasyonu gerçekleşir (Ustaçelebi ve Dürdal,2008).

Konak bakteri hücresi içerisinde bakteriyofaj DNA'sı oluşturulduktan sonra yapısal bileşenleri sentezlenir ve sentezlenen bakteriyofaj bileşenleri genetik materyal etrafında birleştirilerek olgun fajlar oluşturulur (Arda, 2011).

Yeni sentez edilen bakteriyofajların salınımı: Bakteri hücresinin parçalanması ile ortama progen fajlar salınmaktadır. Hücre dışı ilk bakteriyofaj partikülünün görüldüğü bu olaya patlama (*burst*) ve bir hücreden salınan bakteriyofaj partikül sayısına patlama sayısı ya da büyüklüğü (*burst size*) adı verilir. In vitro ortamda, hücre dışı bakteriyofaj sayısının arttığı periyoda yükselme periyodu, bakteriyofajın salındığı süspansiyona lizat denir. *Burst*, filamentöz bakteriyofajlarda gözlenmez ve bu bakteriyofajlar hücreyi parçalamaksızın hücre duvarı porlarından dışarı çıkar. *Burst* sayısı her bakteriyofaj türünde farklıdır (Freifelder, 1987). In vitro olarak yükselme periyodu sıvı besiyerinde, bulanık bakteri kültürlerinin berraklaşması ile, katı besiyerinde ise üst agardaki konak bakteri kültürlerinin enfeksiyon bölgesinde plak adı verilen liz olmuş alanların oluşmasıyla belirlenir (Lewin, 1994).

Bakteriyofajların yaşam evrelerinin üremesinin saptanmasında önemli klasik yöntemlerden biri üreme eğrisinin saptanmasıdır. Bakteriyofaj üremesinin izlenmesi ve progeni virüs sentezi için bir basamaklı üreme (*one step growth curve*) deneyleri yapılır ve konak bakterinin enfeksiyonu için belirli sayılarda bakteriyofaj (10-300) kullanılır. Pratik olarak kültürde bulunan her hücrenin aynı anda enfekte olabilmesi için enfeksiyon sıklığının (*multiplicity of infection*: moi) yani hücre başına düşen enfektif bakteriyofaj partikül sayısının ayarlanması gerekir. Enfeksiyon sıklığı (moi) enfektif bakteriyofaj sayısının hücre sayısına bölünmesi ile belirlenmektedir. Lizat içindeki enfektif bakteriyofaj sayısı (pfu/ml), plak oluşturma metodunda sayılarak tespit edilebilmektedir (Yokokura vd., 1974; Lewin, 1994).

1.1.4. Lizojenik Döngü

Lizojenik bakteriyofajlar, nükleik asitlerini konak hücre içerisine girdikten sonra, konak hücreyi enfekte etmelerine rağmen nükleik asit replikasyonu gerçekleşmez. Bakteriyofaj DNA'sı bakteri kromozomuna entegre olur ve bakterinin bölünmesiyle yeni bakterilere genetik olarak aktarılmaktadır. Bakteride bu şekilde enfeksiyon oluşturan fajlara ılımlı faj, bakteri kromozomuna entegre olan faj nükleik asidine profaj, profajın bakteride oluşturduğu olaya lizojenik enfeksiyon denir (Ustaçelebi ve Dürdal, 2008).

Ilımlı fajların konak hücreyi liz etme yeteneği yoktur. Lizojenik hücre mutajenik ajanlara maruz bırakma ya da ultraviyole ışığa maruz bırakma dış

faktörlerle liz etmeye teşvik edilebilir. Bu şekilde lizojenik faj litik enfeksiyon yapabilir. Profaj kendi genlerinin veya yakından ilişkili bakteriyofajların genlerinin transkripsiyonunu bloke eden baskılayıcı protein sentezini kontrol etmektedir. Bu sayede profajın varlığı, konak hücreye başka fajların neden olabileceği enfeksiyonlara karşı koruma sağlayabilir (Hanlon, 2007).

1.1.5. Fajların Kullanım Alanları

Fajlar insanlara yönelik tedavilerdeki kullanımları dışında birçok farklı uygulamalarda kullanılmaktadır. Örneğin gıda ve tarımda biyolojik kontrol olarak fajlar, işlenmiş ürünlerdeki ve taze sebze meyvelerdeki dekontaminasyonları azaltmak, ayrıca ekipmanlarda ve temas yüzeylerinde dezenfeksiyonu sağlamak, bozulabilir gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmak amacıyla doğal koruyucu olarak kullanılabilir. Fajlar, gen terapisinde, aşı ve proteinlerin nakil aracı olarak, patojenik bakterilerin tespitinde, protein, peptit ya da antikor kütüphanelerinin taranmasında araç olarak kullanılabilirler. Moleküler biyoloji alanındaki çalışmalarda fajlar, günümüz immun teknikleriyle gen teknolojisinin değerlendirildiği faj gösterim teknolojisi, yeni kuşak rekombinant antikorların geliştirilmesinde de kullanılmaktadır. Bakterilerin identifikasyonunda fajlar, gıda kaynaklı ve klinik bakteriyel patojenlerin direkt tespit ve identifikasyonunda araç olarak kullanılmaktadır (Aydoğan ve Hadımlı, 2016).

1.1.6. Fajların Moleküler Biyolojisi ve Faj Terapi

Bakteriyofajların biyoteknoloji, araştırma ve tedavi amaçlı kullanım alanları mevcuttur. Fajların uygulama alanları beş başlık altında toplanabilmektedir (Nicastro vd., 2016).

Moleküler biyolojide model sistem olarak kullanımları; Rekombinant DNA teknolojisinde vektör olarak kullanılıp bakterilerde istenilen genlerin ekspresyonu sağlanmaktadır.

Faj tiplendirme için kullanımları; Bakteri tanımlanmasında ve patojen bakterilerin gıdalarda olup olmadığının belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Faj terapisi olarak kullanımları; Hayvan ve insanlarda bakteriyel enfeksiyonlara karşı antibiyotiklere alternatif olarak önerilmektedir.

Biyokoruyucu olarak kullanımları; Gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakterilere karşı, gıda ekipmanlarının yüzey dekontaminasyonunda ve biyofilm oluşumunu engellemek amacıyla kullanılmaktadır.

Faj Display (gösterim) olarak kullanımları; Faj gösterimi, proteinleri kodlayan genetik bilgilerle proteinleri birbirine bağlamak için bakteriyofajları kullanan, protein-protein, protein-peptit ve protein-DNA etkileşimlerinin incelenmesi için bir laboratuvar tekniğidir.

Antibiyotiklerin keşfi ile faj terapisi çalışmaları azalmıştır. Ancak, onlarca yıl göz ardı edildikten sonra, antibakteriyel ajanlara dirençli bakterilerin ortaya çıkması ile bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için faj kullanımı ile ilgili çalışmalar yeniden odak noktası olmuştur (Fujiki vd., 2023). Faj terapisine adanmış en uzun süredir faaliyet gösteren kurumlardan bazıları, Gürcü mikrobiyolog George Eliava tarafından 1923 yılında kurulan Eliava Bakteriyofaj, Mikrobiyoloji ve Viroloji Enstitüsü ile 1952 yılında Polonya'nın Wroclaw kentinde kurulan Ludwik Hirszfeld İmmünoloji ve Deneysel Terapi Enstitüsü'dür (Gordillo ve Barr, 2019).

Dünya Sağlık Örgütü ve birçok ülkenin Sağlık Bakanlıklarına göre antibiyotik direnci yüzünden dünya çapında yaklaşık 700.000 kişi her yıl doğrudan AMR bakterilerinden ölmektedir ve bu sayının 2050 yılına kadar 10 milyona çıkması muhtemeldir (Mancuso vd., 2021).

AMR ile mücadele için ortaklaşa "Tek Sağlık" yaklaşımını başlatmışlardır. Besin zinciri ile çevre arasındaki karşılıklı bağımlılık, dirençli bakterilerin bitkilerde, hayvanlarda, yiyeceklerde ve insanlarda yaygınlaşmasına neden olur ve "Tek Sağlık" yaklaşımı üçlü modeli AMR'yi ele almak için idealdir (Tang vd.,2023).

Bakteriyofaj (faj) terapisi, enfeksiyona neden olan bakteriyel patojeni lize etmek için doğrudan bir hastaya bütün litik fajın veya saflaştırılmış faj parçacıklarının uygulanması olarak tanımlanır. Faj terapisinde litik döngüyü kullanan fajlar tercih edilir. Faj terapisi uygulaması antibiyotiğin keşfinden önce bile var olmasına rağmen, fajları bakteriyel enfeksiyonlara karşı terapötik olarak kullanma fikri, antibiyotik dirençli patojenlerin ortaya çıkmasının ardından tekrar gündeme gelmiştir. Fajları tedavi olarak kullanmanın avantajları;

Birçok fajın yalnızca tek bir bakteri türünü enfekte etmesiyle yüksek özgüllük,

Hedeflenen bakterileri konakçının normal florasını veya insan hücrelerini bozmadan öldürdükleri için düşük doğal toksisite,

Antibiyotiklere karşı çapraz direnç oluşturma olasılıklarının düşük olması,

Birçok antibiyotiğin mevcut biyofilmlere nüfuz edip dağıtabilmesine ve bazı durumlarda daha fazla biyofilm oluşumunu önleyebilmesine karşın bakteriyofajlarla anti-biyofilm aktivitesi,

Birçok tedavi seçeneği ve potansiyel kombinasyon kokteylleri sunan çeşitli bakteriyofajların büyük, dokunulmamış doğal repertuarının varlığı, faj terapisini avantajları olarak sıralanabilir.

Aynı zamanda faj terapisi hem antibiyotik direncine hem de antibiyotiğe duyarlı patojenlere karşı etkilidir. Aktiviteleri sadece bakteriyostatik değil, aynı zamanda bakterisidaldir. Böylece hedef patojenlerini ortadan kaldırır ve böylece direnç yönünde bakteriyel evrimi önler (Al-Ishaq vd., 2020).

Faj terapisinde en önemli noktalardan biri seçilen fajın lizojenik faj olmamasıdır. Bu lizojenik fajlar konak kromozomuna entegre olur ve bakteriyi antibiyotiklere karşı dirençli hale dönüştürebilir (Fujiki vd., 2023).

1.1.7. Bakterilerde Fajlara Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları

Bakteriler virüslerle ya da başka organizmalarla enfeksiyon süreci boyunca mücadele etmek için farklı stratejiler geliştirmiştir. Bu savunma mekanizmaları kısaca; hücre reseptörlerine faj adsorpsiyonu, süperenfeksiyon dışlama (Sie) sistemleri, restriksiyon-modifikasyon sistemi, CRISPR-Cas sistemi ve abortif enfeksiyon (Abi) sistemlerdir.

Adsorpsiyon enfeksiyonun ilk aşamasıdır. Bazı bakteri suşları bu bağlanma aşamasını önlemek için mekanizmalar geliştirmiştir. Adsorpsiyon blokaj mekanizmaları tarafından kullanılan en az üç yol vardır. Bunlar; reseptör blokajı, hücre dışı matris üretimi ve rekabetçi inhibitör üretimidir.

Süperenfeksiyon dışlama (Sie) sistemleri, fajın hücreye adsorpsiyonundan sonra DNA materyalinin konak hücreye girmesini önleyerek, süperenfekte eden fajlara karşı bakteriyel bağışıklık kazandırır, böylece faj bakteriyi enfekte edemez.

Bakterilerin çoğunda restriksiyon-modifikasyon sistemleri vardır. Bu sistem fajın genomik DNA'sını parçalayarak enfeksiyonu engeller.

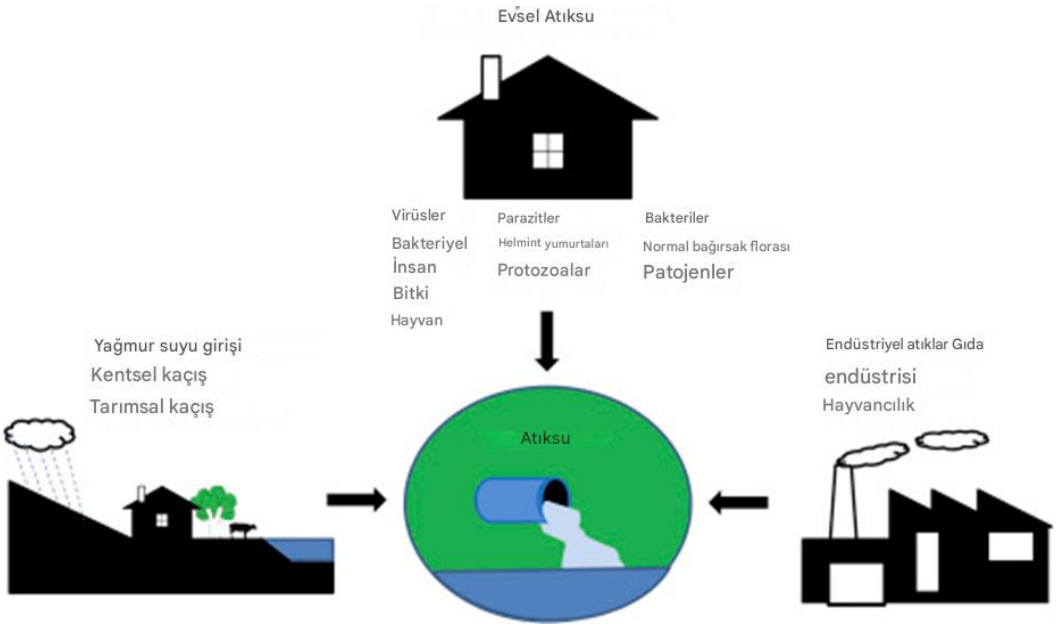
Bakteri kromozal geninde düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*=CRISPR), bakterinin daha önce karşılaştığı faj veya plazmit kalıntılarındandır. Bakterinin yabancı genetik materyallere karşı bir savunma sistemi olarak bilinmektedir.

Abortif enfeksiyon (Abi) sistemi; Konak bakteri hücresi, faj tarafından enfeksiyona uğrar ama bu sistem enfekte edilmiş bakteri hücresinin programlı olarak ölümüne yol açar, böylece fajın bakteri içinde çoğalması engellenir. (Labrie vd., 2010).

1.1.8. Atık Sular

Atık su ortamı hem patojenik hem de patojenik olmayan birçok mikroorganizma için ideal ortamdır (Chahal vd., 2016).

Atık su ortamı, bakteriler, virüsler başta olmak üzere çok çeşitli mikroorganizmalar için uygun bir ortamdır. Çoğunluğu zararsızdır ve biyolojik kanalizasyon arıtımında kullanılabilir, ancak kanalizasyon aynı zamanda hasta kişiler tarafından büyük sayılarda atılan ve semptomatik bir taşıyıcı olan patojenik mikroorganizmalar da içerir. (Abdel-Raouf vd., 2012). Atık suların karıştığı kanalizasyonlar bakteriyofajların bakterilerden daha fazla bulunduğu karmaşık bir mikrobiyal topluluk içerir (Ballesté, E. Vd., 2022). Atık su kirliliğinin başlıca kaynakları Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Atık su kirliliğinin başlıca kaynakları (Chahal vd., 2016)

1.1.9. Atık Sularda Bulunan Patojen Bakteriler

Atık sular bakteriyel konakçı çoğalması ve faj izolasyonu için uygun yerlerdir. Fajlar, bakteriyel konakçının bulunduğu her yerde bulunabilir (Alharbi ve Ziadi, 2021).

1.1.9.1. *Enterobacterales* Familyası

Enterobacterales familyası tıbbi olarak önem taşıyan gram negatif çomak, çok yaygın olarak doğada, sularda, toprakta, insan ve hayvan bağırsak mikrobiyotasında rastlanmaktadır. Bu familyanın bakterileri enfeksiyon hastalıklarına yol açabilirler. *Enterobacterales* familyasındaki hastalık yapan bakteriler ya zorunlu patojen ya da fırsatçı patojendir. Zorunlu patojenlere örnek olarak *Salmonella typhi* (tifo etkeni), fırsatçı patojenlere örnek olarak *Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Proteus vulgaris* verilebilir (Murray vd., 2010.).

1.1.9.2. *Pseudomonadaceae* Familyası

Pseudomonadaceae familyası daha çevresel yerleşimli olan her yerde bulanabilen gram negatif çomaklardır. Klinik olarak en önemli cins *Pseudomonas'*tır. *Pseudomonas* türleri sporsuz, zorunlu aerob olarak üreme gösterirler. Bugüne kadar 200'den fazla *Pseudomonas t*ürü tanımlanmıştır. *Pseudomonas* enfeksiyonları primer fırsatçı enfeksiyonlardır (Murray vd., 2010.).

1.1.9.3. *Moraxellaceae* Familyası

Moraxellaceae familyasının en önemli cinsi *Acinetobacter* ‘dir. *Acinetobacter* türleri aerobik, gram negatif kokobasil, oksidaz negatif, hareketsizdir. İnsan derisinde normal mikrobiyota elemanıdır. Doğada yaygın bir şekilde bulunur. İnsan enfeksiyonlarında en sık rastlanan türü *Acinetobacter baumannii*’dir. *Acinetobacter* türleri fırsatçı patojenlerdir (Murray vd., 2010).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Araç Gereç ve Yöntemler

Çalışmada; 37°C'lik etüv (Daihan WiseCube), biyogüvenlik kabini (Class II Safety Cabinet, Scanl), mikrosantrifüj°C (Boch), derin dondurucu -20°C (Bosch), derin dondurucu -80°C (New Brunswick), pastör fırını (MMM Group Ecocell), Vorteks (VELP), dikey model otoklav (Daihan WiseClave), çalkalayıcı su banyosu (Memmert GFL 1086), çalkalayıcı inkübatör (IKA), Heat Block , UV Görüntüleme , Elektroforez, pH metre (Hanna HI 2210), manyetik karıştırıcı (Daihan WiseStir MSH-20A), mikrodalga fırın (Boch), Buz makinesi (ITV IQ85C), hassas terazi (Ohaus Pinoeer), distile su cihazı (Barnstead), soğutmalı santrifüj (Hettich Rotina 380R), mikrosantrifüj (Beckman-Coulter Microfuge 16), Toraks Cerrahi Aspiratör (Üzümcü,Türkiye), Orbital Çalkalayıcı (Allsheng, MX100-4A), drigalski spatülü (ISOLAB, Almanya), mikrosantrifüj tüpü, vida kapaklı cam tüp cihazları kullanıldı.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Türleri

Çalışmada 13 farklı American Type Culture Collection (ATCC) tip suşu kullanıldı. Deneylerde kullanılan ATCC tip suşları Tablo 3' de gösterilmektedir. Tüm suşlar Tıbbi mikrobiyoloji anabilim dalı araştırma laboratuvarlarındaki -80°C'lik derin dondurucuda stok halindedir.

Tablo 3. ATCC tip suş listesi

No	Suş Adı- Kodu
1.	*Acinetobacter haemolyticus* ATCC 19002
2.	*Bacillus subtilis* subsp. *spizizeni* ATCC 6633
3.	*Enterobacter aerogenes* ATCC13048
4.	*Enterococcus faecalis* ATCC 29212
5.	*Escherichia coli* ATCC 25922
6.	*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883
7.	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
8.	*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028

Tablo 3 (Devam). ATCC tip suş listesi

9.	***Staphylococcus aureus* ATCC 779**
10.	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923
11.	*Staphylococcus aureus* ATCC 43300
12.	*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
13.	*Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984

Tez Çalışması 1 (İbik, 2022)'den elde edilen klinik bakteri listesi Tablo 4'te gösterilmiştir. Tüm suşlar Tıbbi mikrobiyoloji anabilim dalı araştırma laboratuvarlarındaki -80°C'lik derin dondurucuda stok halindedir.

Tablo 4. Tez çalışması 1'den elde edilen klinik bakteriler

No	**Suş Adı- Kodu**
1	*Klebsiella pneumoniae* S10
2	*Klebsiella pneumoniae* S21
3	*Klebsiella pneumoniae* S30
4	*Klebsiella pneumoniae* S31
5	*Klebsiella pneumoniae* S34

İstanbul Medipol Hastane orjinli klinik suş listesi Tablo 5'te gösterilmiştir. Tüm suşlar Tıbbi mikrobiyoloji anabilim dalı araştırma laboratuvarlarındaki -80°C'lik derin dondurucuda stok halindedir.

Tablo 5. İstanbul Medipol hastane orjinli klinik suşları listesi

No	**Suş Adı- Kodu**
1	Pseudomanas 1
2	E.coli 2
3	E.coli 3
4	E.coli 5
5	Klebsiella 2

Tez Çalışması 2 (Rakıcı, 2022)'den *Pelophylax* cinsi kurbağaların kloakal sürüntü örnekleri stoklarından LB Broth besiyerine ekildi, bir gece inkübasyon

sonrası 10.000 rpm de 15 dk santrifüjlenerek faj lizatı izole edildi; ΦkZ lizatı olarak stoklandı ve kullanıldı.

2.1.3. Besiyerleri

Çalışmada bakterilerin ve fajların üretilmesinde, Brain Heart Infision Agar (BHIA, Biolife, İtalya), Eozin Metilen Mavisi (EMB, Himedia, Almanya), Tryptone Soya Agar (TSA), Tryptone Soya Broth (TSB, Biolife, İtalya), Kanlı Agar (RTA, Türkiye), LB Broth (Condolab, Türkiye) ve Muller Hinton Agar (MHA, Himedia, Almanya) besiyerleri kullanıldı.

2.1.4. Kimyasal ve Biyokimyasallar

Magnezyum sülfat (Himedia, Hindistan), Tris-HCl (Himedia, Hindistan), Agar (Biolife, İtalya), Sodyum Klorür (Merck, Denmark), Yeast Extract (Pronadisa, İspanya), Tripton (LabM, İngiltere), EDTA (Himedia, Hindistan), SDS (Merck, Almanya), Agarose (Lonza,USA), Sodyum Asetat (Merck, Almanya), Etidyum bromür (Sigma, ABD), Kloroform (Merck, Almanya), Tamponlu Fenol (Sigma, ABD), Izoamil alkol (Merck, Almanya), NaOH (Himedia, Hindistan), Tris Base (Merck, Almanya), Glacial asetik asit (Merck, Almanya), Restriksiyon endonükleaz enzimleri (Vivantis,Malezya): *HindIII*, *PstI*, *XbaI*, *BamHI*, *EcoRI*, 100bp DNA marker (Vivantis,Malezya) kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Çözelti ve Besiyerlerinin Hazırlanması

Tüm ticari besiyerleri üretici firmaların talimatına göre cam şişelerde veya erlenmayerde hazırlandı. 121°C'de 1.1 atm basınçta 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Agar besiyerleri otoklav işlemi bittikten sonra 55°C'lik su banyosuna alındı ve steril petri plaklarına yaklaşık 25 ml döküldü. Daha sonra deneylerde kullanılıncaya kadar besiyerleri 4°C buzdolabında saklandı. Sıvı besiyerleri ise otoklavdan sonra oda sıcaklığında kapalı bir ortamda saklandı.

EDTA (0,5 M): 73.05 g etilen diamin tetra asetik asit (EDTA, MW: 292,2 g/mol) tartılıp distile su ile 500 mL'ye hazırlandı. Solüsyonun berraklaşması için

manyetik çalkalayıcı üstündeki solüsyona NaOH peleti ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Solüsyonun pH'sı 8,0'a ayarlanarak 121 °C'de 1 atm'de 15 dk otoklavda steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

TAE Elektroforez Tamponu: 50X konsantre olarak hazırlandı. %24,2 Tris base, %5,71 glacial asetik asit, %3,72 EDTA (pH~8.5) olacak şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlandı. pH ayarlamak için, NaOH peletleri kullanıldı. Çalışma solüsyonu olarak distile veya deiyonize su ile sulandırılarak 1X solüsyon kullanıldı. Çalışma solüsyonunda 40 mM Tris-asetat, 2 mM EDTA içerik sağlanmış oldu.

%1'lik SDS (Sodyum dodesil sülfat): 10 gr SDS tartılır ve 900 ml distile suda çözülür. ph HCl ile 7.2'ye ayarlanır. Çalışmalarda kullanılana kadar oda sıcaklığındaki dolapta saklandı.

%1'lik Agarose Jel: 1gr agarose tartılır ve 100 ml 1X Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE) tamponu eklenir. Mikrodalga fırında iyice homojen hale getirildikten sonra 50-60 ˚C'ye kadar soğuması beklenir. 6 µl etidyum bromür eklenir ve karıştırılır. Agaroz, jel kalıbı içine dökülerek tarak yerleştirilir ve katılaşıncaya dek beklenir. Katılaşınca kullanıma hazırdır.

TE (Tris/EDTA) Tamponu: 1 M Tris-HCl solüsyonundan son konsantrasyonu 10 mM Tris-HCl olacak şekilde (5 mL) alındı. 0.5 M EDTA solüsyonundan son konsantrasyonu 1 mM EDTA olacak şekilde (1 mL) alındı. Ardından distile su ile (494 mL) hacim 500 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

PBS (Phosphate Buffered Saline): Thermo (USA) markasına ait 0.1 M sodyum fosfat, 0,15 M sodyum klorid içeren ve pH 7.2 olan toz içerik 500 ml distile su ile hazırlandı ve otoklavda 121° C'de 15 dakika süre ile sterilize edildi.

Luria-Bertani (LB) Broth: Maya ekstraktı 5,0 g/L; pepton (kazein) 10,0 g/L; NaCl 10,0 g/L olacak şekilde hazırlanan karışım yeterli miktara distile su ile çözdürüldükten sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edilir.

Luria Bertani (LB) -Yumuşak Agar (0,5 % w/v agar): Maya ekstraktı 5,0 g/L; tripton 10,0 g/L; NaCl 10,0 g/L, 5 gr/L agar agar karışımı yeterli miktara distile su ile çözdürülür. Hazırlanan LB-Yumuşak Agar besiyeri 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilir.

1 M Tris-HCl: Ticari Tris-HCl'den 78.8 g tartıldı (MW:157.60 g/mol) distile su ile 500 ml'ye tamamlandı. Solüsyonun pH 'si HCl ile 7.5'e ayarlandı ve

otoklavlanarak sterilize edildi. Otoklavdan sonra oda sıcaklığındaki dolapta muhafaza edildi (Ausubel F., 2008.).

Saline Magnesium Buffer (SM Çözeltisi): Faj tamponu hazırlamak için 5.8 g NaCl, 2 g $MgSO_4.7H_2O$, 50 ml 1M Tris HCl (pH 7.5) ve 5 ml %2 jelatin çözeltisi, 1000 ml distile su içerisinde çözüldü ve otoklavlanarak sterilize edildi. Otoklavdan sonra oda sıcaklığındaki dolapta saklandı (Sambrook & Russell, 2006).

2.2.2. Atık Su Örneklerinin Toplanması ve Stoklanması

Atık su örnekleri Rize Belediyesinin, Kanalizasyon Daire Başkanlıklarının konu ile ilgili izniyle (bkz. Ek Belgeler bölümü) Ocak 2024'te Rize ilindeki daha önceden belirlenen 5 ayrı atık su kaynağından alındı. Birinci örnek; Fındıklı bölgesindeki derenin denize karıştığı atık su çıkışından, ikinci örnek; Rize merkez sahil dolgu alanındaki kanalizasyon çıkışının denize karıştığı bölgeden, üçüncü örnek; İslampaşa bölgesindeki araştırma hastanesinin atık sularının denize karıştığı kanalizasyon çıkışından, dördüncü örnek; Rize İtfaiyesinin ve Rize balıkçı halinin de atık sularının denize karıştığı kanalizasyon çıkışından, beşinci örnek; Güneysu bölgesindeki üniversite lojmanlarının atık sularının dereye karıştığı kanalizasyon çıkışından alındı.

Atık su örneklerinin alındığı yer, alındığı tarih ve koordinatları Tablo 6'da gösterilmektedir.

Tablo 6. Atık su örneklerinin alındığı yer, alındığı tarih ve koordinatları

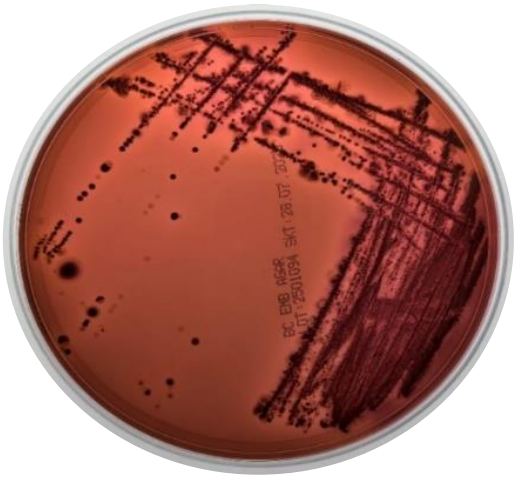
No	Örnekleme Yeri	Örnekleme Tarihi	Koordinat
1.	Fındıklı Dere-Deniz Ağzı	29.11.2023	41 2.6923" K 41 1.3728" D
2.	Rize Merkez Deniz Dolgu Alanı	24.01.2024	41 1'45.3768''K 40 31'19.8963''D
3.	İslampaşa Sahil	06.02.2024	41 2' 20.4264''K 40 33' 54.8388''D
4.	Rize Merkez Cumhuriyet Meydanı Karşısı (İtfaiye)	06.02.2024	41° 1' 49. 4410''K 40° 31' 3.4803''D
5.	Rize Güneysu Deresi	07.02.2024	40° 59 49.1276''K 40° 35' 55.0316''D

Örnekler non-steril cam bir kap yardımı ile en az 200 ml olacak şekilde alındı. Buz üzerinde laboratuvara getirilen su örnekleri gazlı bez ile süzüldükten sonra %20 gliserol oranıyla 50 ml falcon tüplerinde -80°C ‘de stoklandı.

2.2.3. Atık Su Örneklerinden Bakteri ve Faj Zenginleştirmesi, İzolasyonu, Replika Ekimler ve Stoklama

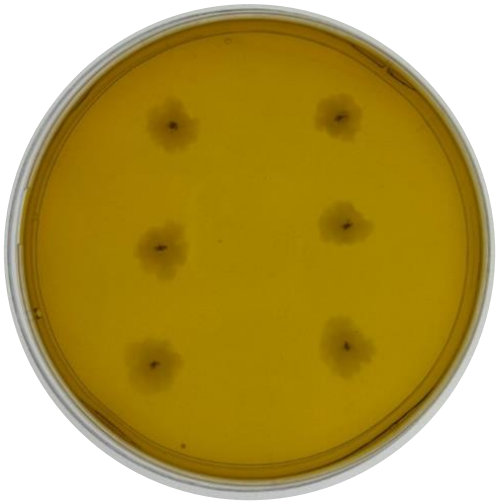
Belirlenen bölgelerden alınan atık su örnekleri gazlı bez ile süzüldükten sonra 125 ml olacak şekilde erlen’e koyuldu ve üzerine 125 ml 2xLB (Luria-Bertani Broth) eklendi. Erlen içerisindeki örneği 37° C’de 180 rpm de bir gece çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası zenginleştirme örnekleri 1ml %20 gliserol oranıyla -80°C de saklaması yapıldı.

Üreme olan örneklerin her biri EMB Agar ve Kanlı Agar besiyerlerine tek koloni yöntemi ile ekimi yapıldı ve 37°C’de bir gece inkübe edildi. EMB Agar besiyeri üzerinde zenginleştirme tek koloni ekim plağı Şekil 5’te gösterilmiştir. Kanlı Agar besiyerine yapılan ekim plağında *proteus spp.* üreme sonucu deneylerde kullanılmadı.



Şekil 5. Zenginleştirme tek koloni ekim plağı (EMB Agar, Rize Dolgu Deniz zenginleştirme ekim)

EMB ve Kanlı agarlarda birbirinden farklı koloni morfolojisine sahip tek koloniler işaretlendi. İşaretlenen koloniler, steril kürdan kullanılarak sırasıyla EMB ve BHIA besiyerlerine replika ekimleri yapıldı. Ekim yapılan örnekler 37°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı. Replika ekim yöntemi örneği Şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 6. Replika ekim yöntemi örneği (TSB Agar, Rize Dolgu Deniz replika ekim)

Replika ekim plaklarındaki saf koloniler 5ml sıvı besiyerine (TSB veya LB) pasajlandıktan sonra 37°C 180 rpm'de bir gece çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün sıvı bakteri kültürü %20'lik gliserol oranıyla -80°C' de stoklandı.

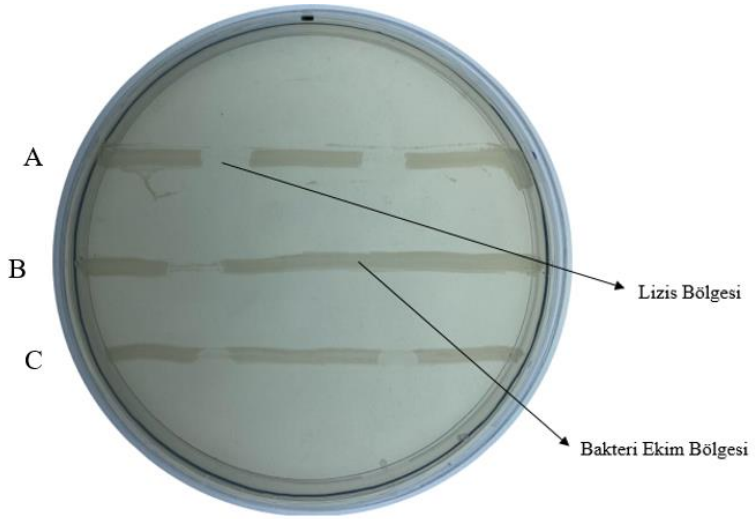
2.2.4. Fajların Atık Sulardan Zenginleştirilmesi ve İzolasyonu

Zenginleşme örneği; 50 ml'lik 5 falcon tüpüne, her bir tüpte 45ml olacak şekilde bölündü. Tüpler 9000 rpm +4°C'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonucu tüplerdeki süpernatant kısmı vakuum filtration 500 rapid filtermax (TPP, İsviçre) (steril) tüplerine cerrahi aspritör (Üzümcü, Türkiye) ile vakumlanarak filtrelendi. Filtrelenmiş örnek zenginleştirme lizatı olarak kullanılmak üzere +4°C saklandı. Ayrıca -80°C'de 2 ml'lik vial tüplerde %20 gliserol oranıyla saklaması yapıldı (Beaudoin vd., 2007). Elde edilen lizatlar alındığı bölgenin ismine göre; Rize Dolgu Deniz örneğini ΦDZ, İslampaşa örneğini ΦİSZ, İtfaiye örneğini ΦİTZ, Güneysu örneğini ΦGZ ve Fındıklı örneğini ΦFZ olarak isimlendirildi.

2.2.5. Agar Spot-Test ile Faj Varlığının Taranması

Agar spot-test ile faj varlığının taranması için; katı besiyeri (BHIA, TSA, MHA) plaklarına bakteri sayısı kadar çizgi çizildi. Çizgi boyunca steril pamuklu çubuk ile bakteri ekimi yapıldı. Faj lizatları; beklenen bakteri üreme alanı üzerine 5µl

damlatılarak uygulandı. Lizat, besiyeri üzerinde kuruduktan sonra 37°C'de 1 gece inkübe edildi (Kutter ve Sulakvelidze, 2004). Ertesi gün inhibisyon(lizis) bölgeleri değerlendirildi. Lizat damlatılan bölgede bakteri üremesi olmaması potansiyel olarak litik bir fajın varlığının göstergesidir. Faj Konak Tarama Ekim Plağı Örneği (Şekil 7).



Şekil 7. Faj konak tarama ekim plağı örneği (A: it3, B: İt3, C: d5 bakteri, lizis bölgelerindeki fajlar sırasıyla ΦT3D, ΦT3T, ΦT3S, ΦD5D, ΦD5T)

İzole edilen beş zenginleştirme lizatı; önce kendi bölgesinden izole edilen bakteriler üzerinde, sonra diğer bölgelerden izole edilen bakteriler üzerinde daha sonra laboratuvarımızın koleksiyonunda yer alan ATCC tip suşları üzerinde, son olarak da stoklarımızdaki klinik orijinli patojen bakteriler üzerinde faj varlığının belirlenmesi için konak taramaları yapıldı.

2.2.6. Litik Faj Enfeksiyonunun Yapılması

Faj varlığının taranması için yapılan konak tarama sonucu lizis görülen bakterilerin litik faj enfeksiyonu ikili agar kaplama yöntemi ile yapıldı (Kropinski vd, 2009).

Bunun için konak bakterinin katı besiyerindeki örneğinden; 5ml LB sıvı besiyerine ekimi yapıldı ve çalkalayıcı inkübatörde 6 saat 37°C'de inkübe edildi.

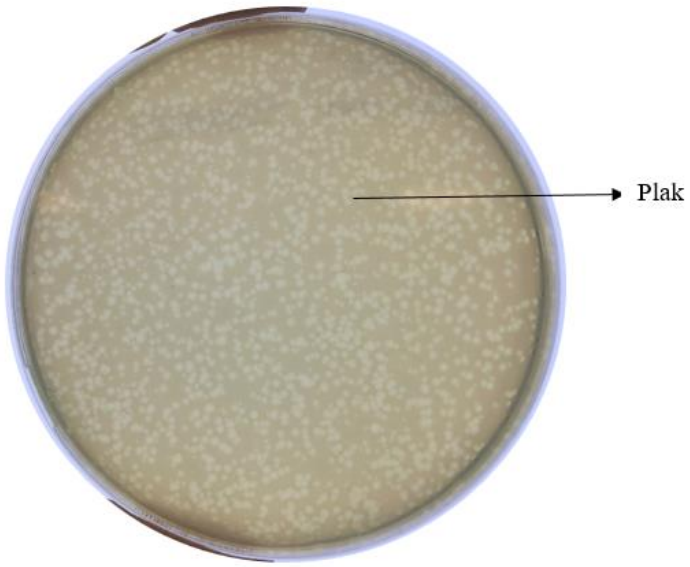
İndikatör bakteri logaritmik fazdayken (3-6x10^8 cfu/ml) kullanıldı. LB Soft Agar 50°C'ye ayarlanan su banyosunda sıvı halde hazır olarak bekletildi. Steril cam vidalı kapaklı tüplerin her birine 20µl $MgSO_4$ (1M) eklendi. Bu tüplerin her birine

sıvı haldeki LB soft agar'dan 4ml su banyosunun içinde eklendi. Class 2 biyogüvenlik kabin içerisinde; Cam tüp'e 300µl indikatör bakteri kültürü, 100 µl lizat eklendi ve vortekslendi. Cam tüp katı besiyeri plaklarımıza (BHIA, TSA, MHA, LBA) homojen şekilde döküldü ve agar üzerine yayıldı. Yumuşak agar katılaştıktan sonra ters çevrilen plaklar 37°C'de bir gece inkübasyona kaldırıldı**.**

2.2.7. Fajların Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Stoklanması

Fajların çoğaltılması ve stoklanmasında kullanılan yöntemler literatürlerde tarif edildiği şekilde ve bazı küçük modifikasyonlar eklenerek yapıldı (Bozdoğan, 2023).

Sıvı besiyerinde fajların neden olduğu lizis bulanıklığın kaybolmasına neden olurken, katı besiyerinde ise fajların bakterileri parçaladığı bölgeler açık kalır ve plak olarak adlandırılır. Katı ortamda görülen güçlü fazın lizisinin göstergesidir (Vladimir, M., vd 2025). Litik faj enfeksiyon sonucu gözlenen faj plak örneği Şekil 8'de gösterildi.



Şekil 8. Faj plak görünümü (Pseudo 1, ØT6D)

Faj saflaştırması için litik faj plaklarının olduğu petrilere 5ml SM Buffer eklendi ve 1 saat orbital çalkalayıcıda çalkalandı. Fajların yumuşak agardan ayrılmaları sağlandı. Petri plağı üstündeki soft agar drigalski çubukları ile 50 ml'lik falcon tüplerine sıyrıldı. Falcon tüpleri 10000 rpm'de 15 dk +4°C'de santrifüjlendi.

Tüplerdeki süpernatant kısım önce 0,45µm filtreden süzüldü. %20 gliserol katkılı 1ml faj lizatı -80°C'de stoklandı. Faj lizatları kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.

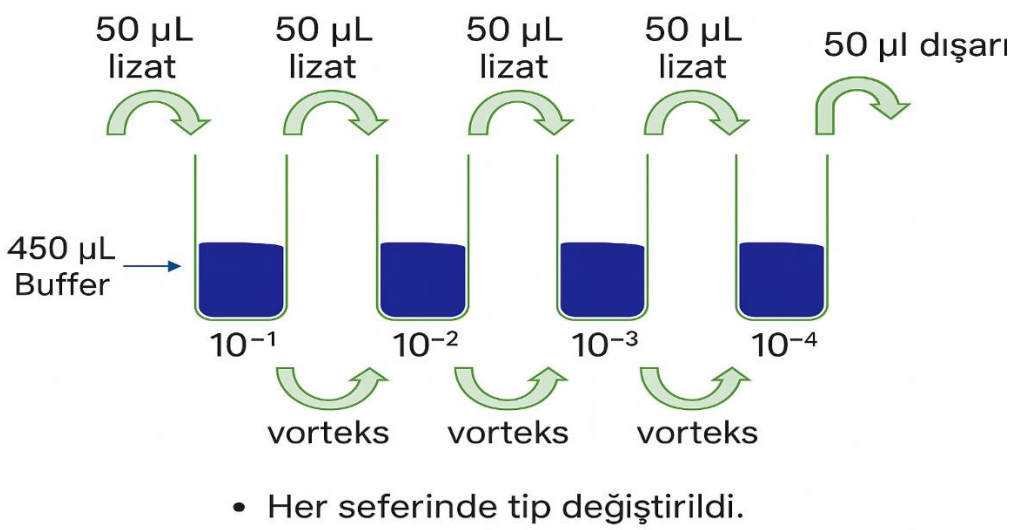
Tek plak izolasyonu ile faj saflaştırma için; İkili agar kaplama sonrası tek plak oluşumu gözlemlenen petrilerden kesik pipet ucu yardımıyla sınırları belirgin bir plak seçilip alındı. Plak, 10 ml steril LB-Broth içeren falkon tüpe aktarıldı ve vortekslendi. Fajın besiyerine difüzyonu için 10 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Plak içeren LB-Broth tüpüne 100 µl gecelik indikatör bakteri kültürü eklenir. Kültür içerisine 50 µl $MgSO_4$ (1M) solüsyonu eklenir. Vorteks yardımıyla iyice karıştırılır. 37°C'de gecelik inkübasyona bırakılır. Ertesi gün kültürü 10.000 rpm de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant kısmı, 0.45 µm por çapına sahip şırınga uçlu filtreden geçirilerek steril ependorf içerisine alınır. Elde edilen faj filtratı +4 °C'de saklanır (1. Plak saflaştırma).

Fajın saf olarak izole edilebilmesi için, ikili agar kaplama ve plak saflaştırma işleminin en az 3 kez tekrar edilmesi tavsiye edilir.

2.2.8. Faj Titresinin Belirlenmesi

Fajların çoğaltılması ve stoklanmasında kullanılan yöntemler literatürlerde tarif edildiği şekilde ve bazı küçük modifikasyonlar eklenerek yapıldı (URL-4, 2023).

İndükatör bakteri kültürleri 5 ml sıvı kültür (BHI broth,LB, TSB)'de gece boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Her bir faj için 6 ependorf tüp hazırlandı ve seyreltme sırasına göre numaralandırıldı. Ependorflara 450 µl SM buffer eklendi. Her bir faj ve bakteri için 6 petri hazırlandı. Faj solüsyonları 10 kat seri dilüsyona tabi tutulmuştur. Seri dilüsyonlarda 50 µl'lik faj örneği 450 µl'lik SM buffer'a aktarılarak seyretlemeler 10^{-5} 'e kadar gerçekleştirildi. Gece boyunca inkübe edilen indikatör bakteri kültürlerinden 300 µl ve faj seyreltmelerinden 100 µl alınarak; 20µl $MgSO_4$ ve 4 ml LB softa yumuşak agar içeren tüplere aktarıldı ve vorteksle karıştırıldı. Karışım önceden hazırlanmş katı besiyerine (BHIA, TSA ve MHA) dökülüp yayıldı ve donması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Petriler ters çevrilerek 37°C'de plaklar görünür hale gelene inkübasyona bırakılmıştır. Onda bir seri dilüsyonlar hazırlandı (Şekil 9).



Şekil 9. Faj lizatının SM buffer ile hazırlanan on kat seri dilisyon

İnkübasyon sonrası 300-30 plak sayılabilir şekilde plak oluşturmuş petrilerdeki plaklar sayılarak kaydedildi. Oluşan faj plakları sayılarak mililitredeki faj partikül sayısı hesaplandı.

Faj plakları sayıldı ve mililitredeki faj partikül sayısı [plaque forming unit/ mililitre (PFU/mL) = agar besiyerindeki plak sayısı/ ekilen faj miktarı x dilüsyon miktarı] hesaplandı (Luzon-Hidalgo vd., 2021).

Stok solüsyondaki faj düzeyi (pfu/ml); "plak sayısı x 10 x seyreltme düzeyi" şeklinde hesaplandı.

2.2.9. Fajların Farklı Sıcaklık ve pH Koşullarına Karşı Stabilitelerinin Saptanması

Fajların farklı sıcaklık koşullarındaki stabilitesine gözlemlemek için; 4, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C'de 60 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası fajların biyolojik aktivitesi gözlemlemek için ikili agar kaplama yöntemi kullanılarak oluşan plak sayısı hesaplandı.

Fajların farklı pH koşullarındaki stabilitesi gözlemlemek için; 2,3,4,5,7,9,10,11 ve 12 pH'lara ayarlanmış fosfat tamponunda (PBS) 60 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası fajların biyolojik aktivitesi gözlemlek için ikili agar kaplama yöntemi kullanılarak oluşan plak sayısı hesaplandı (Jin vd., 2012).

2.2.10. Fajların Optimum Enfektivite Değerlerinin Belirlenmesi

Fajın enfekte ettiği konak bakteriye oranı veya enfeksiyonun derecesi (multiplicity of Infection, MOI) fajın enfektivitesini en verimli şekilde gösterebildiği optimum MOI değeri belirlendi. MOI 0,1, 1 ve 10 olacak şekilde üç farklı MOI (faj/bakteri oranı) test edildi. Uygulama sırasında, konak bakterinin optik yoğunluğu ($OD_{600\ nm}$) 0,4–0,5'e (yaklaşık 10^8 CFU/mL) ulaştığında, her MOI değerine karşılık gelecek şekilde hesaplanan miktarda faj, bakteri süspansiyonuna ilave edildi. Faj-bakteri karışımı 37 °C 1 saat inkübe edildi ve faj süspansiyonları seri dilüsyonlarla seyreltildi ve çift tabakalı agar yöntemi kullanılarak faj titreleri (PFU/mL) belirlendi. En yüksek faj titre değerinin elde edildiği MOI, optimum MOI olarak kabul edildi (Qi vd., 2020).

2.2.11. Fajların Tek Aşamalı Gelişme Grafiklerinin Belirlenmesi

Tek aşamalı gelişme eğrisi (One-Step Growth Curve) analizinde, absorbans değeri 0,5'e ulaşan logaritmik fazdaki bakteri (10^8 cfu/mL) kültürleri ve faj MOI değeri 10 olacak şekilde eşit hacimde (1:1) karıştırıldı ve adsorbsiyon işlemi için 37°C'de 15 dk inkübe edildi. Adsorpsiyon süresinin ardından, ortamda kalan serbest faj partiküllerini uzaklaştırmak amacıyla karışım 8,000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen faj-bakteri peleti, 10 mL taze LB sıvı besiyerinde süspanse edilmiş edildi ve 180 rpm'de çalkalanarak 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun başlangıcından itibaren 90 dakika boyunca her 15 dakikada bir 50 µL örnek alınarak SM buffer ile 10 kat seri dilüsyonları hazırlandı ve ardından çift tabakalı agar yöntemiyle plak sayımı yapılarak faj titreleri (pfu/mL) belirlendi (Liao vd., 2023).

2.2.12. Faj ve Lizat Örneklerinin ATCC Tip Suşlarındaki Konak Aralığının Belirlenmesi ve Litik Faj Enfeksiyonu

İzole edilen 10 adet çevre kökenli faj ve beş zenginleştirme lizatı, 13 adet ATCC tip suşu ile önce faj konak aralıkları tespit edildi. Bu amaçla uygulanan yöntem 2.2.6. bölümünde tarif edildiği şekilde yapıldı. Daha sonrasında konak olarak belirlenen bakterilere litik faj enfeksiyonu yapıldı. Bu amaçla uygulanan yöntem 2.2.7. bölümünde tarif edildiği şekilde yapıldı.

2.2.13. Faj ve Lizat Örneklerinin Çeşitli Klinik Bakterilerde Konak Aralığının Belirlenmesi ve Litik Faj Enfeksiyonu

İzole edilen 10 adet çevre kökenli faj ve beş zenginleştirme lizatı 70 farklı klinik bakteri (İbik YE., 2022; İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Kararı – 22/12/2022, 1149 nolu karar; bkz. EKLER) üzerinde konak aralıklarına bakıldı. Bu amaçla uygulanan yöntem 2.2.6. bölümünde tarif edildiği şekilde yapıldı. Konak olarak belirlenen bakterilerde litik faj enfeksiyonu yapan faj varlığına bakılmak için litik faj enfeksiyonu yapıldı. Bu amaçla uygulanan yöntem 2.2.7. bölümde anlatılan şekilde yapıldı.

2.2.14. Bakteri Suşlarının Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Faja duyarlı indikatör bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi; Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında yapıldı. Bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi otomatize sistem olan VITEK-2 (Biomerieux, Fransa) cihazı "GN ıdentification card" ile tespit edildi.

2.2.15. Bakteriyofaj DNA Ekstraksiyonu

Bakteriyofaj DNA izolasyonunda kullanılan yöntemler literatürlerde tarif edildiği şekilde ve bazı küçük modifikasyonlar eklenerek yapıldı (Köchl vd.,2005). İzolasyonu yapılan faj lizatının en az 10^9 pfu/ml titresine sahip olması gerekir. Faj DNA izolasyonu için fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. 500 µl faj örneği 500 µl lizis tamponuyla (40 mM Tris-HCl, pH 7.5 ;20 mM Sodyum Asetat; 1mM EDTA, pH 8.0 ve %1'lik SDS) ortalama bir saat 50-55°C'de inkübasyona bırakıldı. Faj lizatına kendi hacmi kadar fenol:kloroform:izoamil alkol(25:24:1) eklendi ve hafifçe karıştırıldı. Faj lizatı 12000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı steril ependorf tüplerine aktarıldı ve kloroform:izoamilalkol (24:1) eklendi. Ependorftaki örnekler 12000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant steril ependorf tüplerine aktarıldı ve hacmin 2 katı olacak şekilde %95'lik soğuk etil alkol ilave edildi. Ependorf tüpündeki örnek -20°C'de 30 dk bekletildi, sonrasında 12000 rpm'de beş dk santrifüj edilerek DNA prespite edildi. Süpernatan kısmı

atıldıktan sonra presipitat bir miktar %70'lik etanol ile yıkandı ve etanol kalıntısı kalmaması için 55°C'de pastör fırınında kurutuldu. Tüp'teki DNA TE tamponu ilave edildi. İzole edilen DNA %1'lik agaroz jelde 50 voltta yürütüldü ve UV illüminatörde görüntülendi. İzole edilen DNA'lar kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

2.2.16. Bakteriyofaj DNA'sının Rekstriksiyon Enzimleri ile RFLP Profilinin Belirlenmesi

İzole edilen fajların aynı fajlar olup olmadığını moleküler düzeyde belirlemek için restriksiyon enzimi ile kestikten sonra elektroforez profilleri belirlendi. Bu yöntemin adı *Restriction Fragment Lenghth Polimorphism* (RFLP). Bu çalışmada *Eco*R I, *Hind* III, *Pst* I, *Xba* I ve *BamH* I enzimleri kullaıldı. Bu amaçla enzim, enzime özel tampon, DNA ve distile su kullanıldı. Reaksiyon karışımının oranları aşağıdaki gibi hazırlandı.

5-2 µl Faj DNA
1 µl Rekstrikyon Enzimi
2 µl Tampon
3-5 µl Distile su ; Toplam Hacim: 10 µl

2-16 saat inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 1 µl Loading tamponu eklenerek 65°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Örnekler %1'lik agaroz jelde 2 saat 45 voltta yürütüldü ve UV illüminatörde görüntülendi.

2.2.17. Fajların Elektron Mikroskobi Morfolojileri

Faj örneklerinden 10 µL (10^{10}–10^{11} PFU/mL) miktar, formvar kaplı 200 mesh bakır gridler (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) üzerine damlatılarak 3 dakika bekletildi. Ardından gridler, 1 dakika boyunca iki kez 10 µL ultra saf su ile yıkandı. Preparatlar, %2 uranil asetat (pH 4.5) ile 3 dakika boyunca negatif boyamaya tabi tutuldu ve hava ile kuruması sağlandı. Gridler, 100 kV hızda çalışan Hitachi 7800 transmisyon elektron mikroskobunda (TEM) incelendi ve fotoğraflandı.

3. BULGULAR

Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı.

3.1. Atık Su Örneklerinden Bakteri İzolasyonu

Rize Dolgu Deniz replika ekimindeki kolonilerden 9 tane bakteri seçildi ve d1, d2, d3, d4, d5, d6, d7, d8, d9 şeklinde numaralandırıldı. İslamlaşa replika ekimindeki kolonilerden 16 tane bakteri seçildi ve is1, is2, is3, is4, is5, is6, is7, is8, is9, is10, is11, is12, is13, is14, is15, is16 şeklinde numaralandırıldı. İtfaiye replika ekimindeki kolonilerden 14 tane bakteri seçildi ve it1, it2, it3, it4, it5, it6, it7, it8, it9, it10, it11, it12, it13, it14 şeklinde numaralandırıldı. Güneysu replika ekimindeki kolonilerden 15 tane bakteri seçildi ve g1, g2, g3, g4, g5, g6, g7, g8, g9, g10, g11, g12, g13, g14, g15 şeklinde numaralandırıldı. Fındıklı replika ekimindeki kolonilerden 11 tane bakteri seçildi ve f1, f2, f3, f4, f5, f6, f7, f8, f9, f10, f11 şeklinde numaralandırıldı. Toplamda atık sulardan 65 adet bakteri izole edildi.

3.2. Fajların Konak Aralıkları

Atık sulardan izole edilen 65 adet bakteri, 5 zenginleştirme lizatı olan ΦDZ, ΦİSZ, ΦİTZ, ΦGZ, ΦFZ ile çaprazlama konak aralığı belirlendi.

3.3. Litik Faj Enfeksiyon ve Faj Saflaştırması

Konak olarak belirlenen bakteriler ile fajlar enfeksiyon yapıldı. Yapılan enfeksiyon sonucunda faja duyarlı olan beş adet indikatör bakteri belirlendi. Bu bakterilerin tanımlaması otomatize sistem olan VITEK-2 (Biomerieux, Fransa) cihazı "GN ıdentification card" ile tespit edildi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında yapıldı. İndikatör bakterilerin tanımlama sonuçları Tablo 7'de verildi.

Tablo 7. Atık sulardan izole edilen bakterilerin tanımlanması

Suş no	**Bakteri Türü**
d2	*Acinetobacter baumanii*
d5	*Escherichia coli*
d9	*Enterobacter asburiae*
it3	*Escherichia coli*
it6	*Escherichia coli*

Tanımlaması yapılan bu beş adet bakteri konak olarak kullanılarak, 5 zenginleştirme lizatı ile yaptığımız litik faj enfeksiyon sonucu Tablo 8'de gösterildi.

Tablo 8. Zenginleştirme lizatlarının çevre bakterilerine litik etkisi

Bakteri / Lizat	**ΦDZ**	**ΦİSZ**	**ΦİTZ**	**ΦGZ**	**ΦFZ**
Acinetobacter baumanii d2	+	-	-	-	-
Enterobacter asburiae d9	+	-	-	-	-
E.coli d5	+	-	+	-	-
E.coli it3	+	+	+	-	-
E.coli it6	+	-	-	-	-

Tablo 8'da yapılan çaprazlama litik faj enfeksiyon sonucu elde edilen saflaştırılmış konakçı sekiz adet faj ile atık sulardan izole edilen konak bakterilerin konak aralığına bakıldı. Konak olarak belirlenen bakteriler ile litik faj enfeksiyonu yapıldı. Sonuçlar Tablo 9'da gösterildi.

Tablo 9. Atık sulardan izole edilen konak bakteriler ve konakçı fajları

Bakteri/Faj	ΦD2D	ΦD5D	ΦD9D	ΦD5T	ΦT3D	ΦT6D	ΦT3T	ΦT3S
Acinetobacter baumaniae d2	+	-	+	-	-	-	-	-
Enterobacter asbriae d9	+	-	+	-	-	-	-	-
E.coli d5	-	+	-	+	-	-	-	-
E.coli it3	-	-	-	-	+	-	+	+
E.coli İt6	-	-	-	-	-	+	-	-

3.4. Faj Titreleri

İzole edilen sekiz adet fajın faj titrasyon deney sonuçlarına göre; oluşan faj plakları sayılarak mililitredeki faj partikül sayısı [plaque forming unit/ mililitre (PFU/mL) = agar besiyerindeki plak sayısı/ ekilen faj miktarı x dilüsyon miktarı] hesaplandı. Titrasyon sonucunda; Dilisyon oranlarına göre oluşan faj plaklarının sayımı yapıldı. Fajların litik enfeksiyon döngüsü incelendiğinde faj titreleri Tablo 10'da gösterildi.

Tablo 10. Fajların titrasyon değerleri

(pfu/ml)	ΦT3T	ΦT3S	ΦD5D	ΦD9D	ΦD5T	ΦT3D	ΦT6D	ΦD2D
Faj Titrasyon Değeri	$1,3x10^9$ pfu/ml	$1,35x10^9$ pfu/ml	$4x10^7$ pfu/ml	$1,03x10^8$ pfu/ml	$1,4x10^9$ pfu/ml	$9,8x10^7$ pfu/ml	$1,3x10^9$ pfu/ml	$1,3x10^9$ pfu/ml

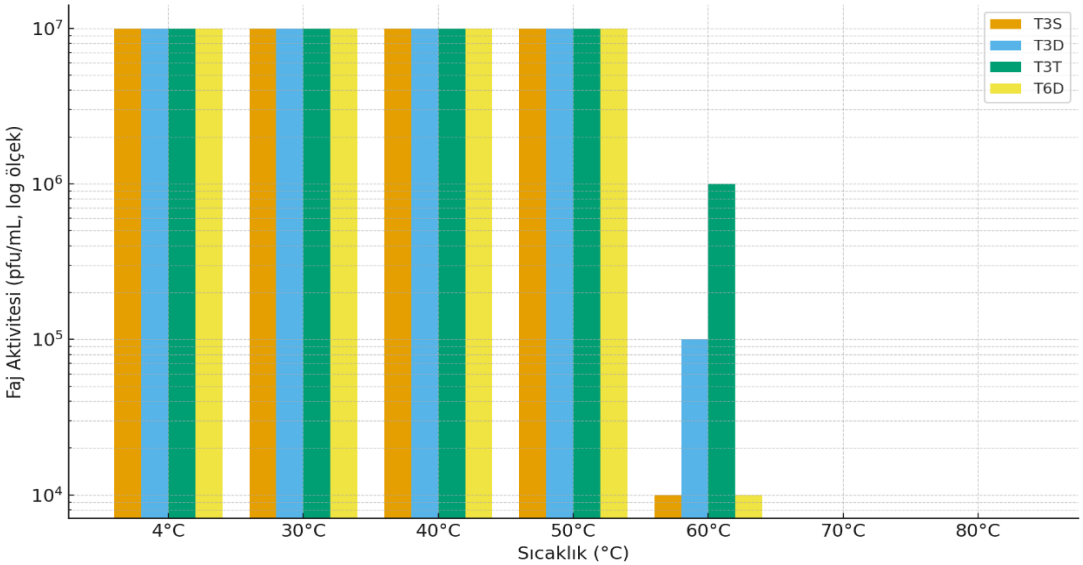
Faj titrasyon deneyi sonucunda görülen faj plaklarının örneği Şekil 10'da gösterildi.



Şekil 10. Faj titrasyon plağı (ΦD9D fajı 10^{-5} dilüsyon plağı)

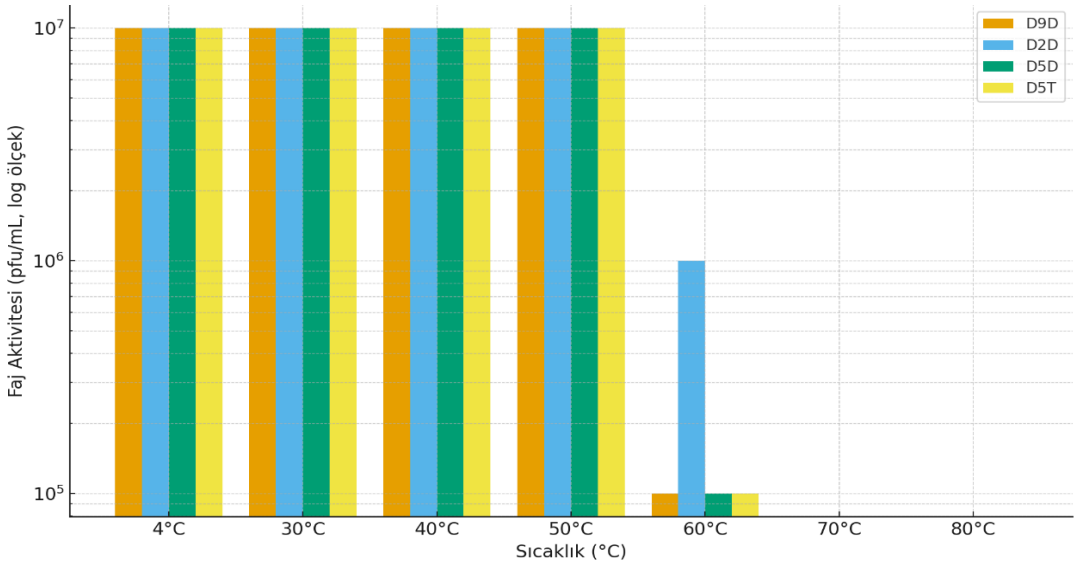
3.5. Fajların Farklı Sıcaklık ve pH Koşullarına Karşı Stabiliteleri

Elimizdeki 8 faj lizatını 4, 30, 40, 50, 60,70,80 derecede 1 saatlık inkübason sonucu stabiliteleri belirlendi. Fajlar 70 ve 80 derece yüksek sıcaklıklarda aktivite göstermedi. Fajlar 60 derecede aktivitesi belirgin şekilde düştü ama 50,40,30 ve 4 derecelerde faj aktivitesinin sabit kaldığı gözlendi. Fajların sıcaklık karşısında stabilite aktivitesini gösteren grafik Şekil 11 ve Şekil 12'de gösterildi.



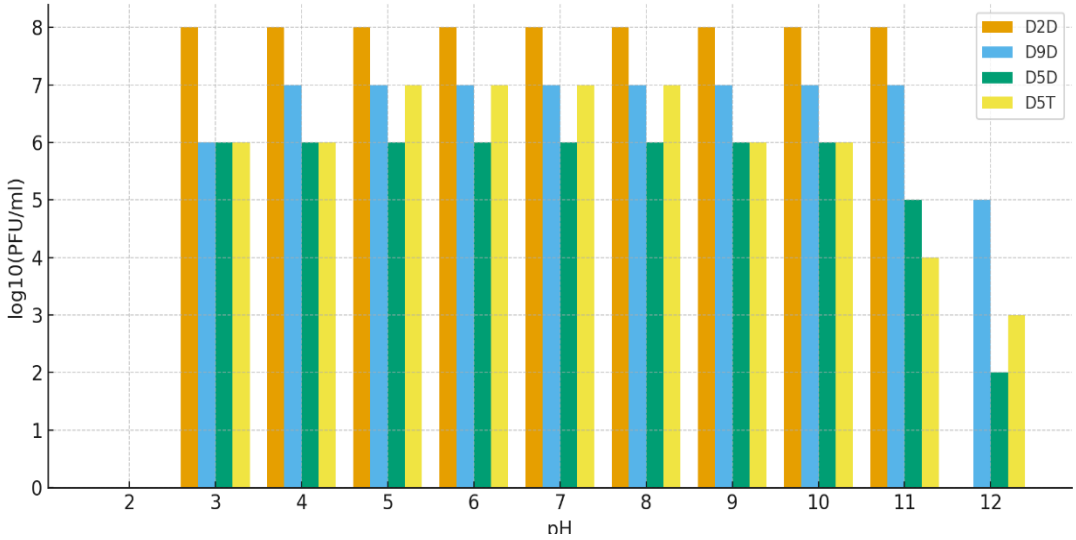
Şekil 11. ΦT3D, ΦT3T, ΦT3S ve ΦT6D Fajlarının sıcaklık stabilite aktivitleri

Tablodaki dört fajın sıcaklık stabilitesi incelemelerinde, 50 °C'ye kadar titrede anlamlı bir değişim gözlenmedi. 50 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise faj titresinde belirgin bir azalma ortaya çıktı ve artan sıcaklıkla birlikte inaktivasyon hızının yükseldiği tespit edildi. 70 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda faj aktivitesinin tamamen sona erdiği gözlendi.



Şekil 12. ΦD9D, ΦD2D, ΦD5D ve ΦD5T Fajlarının sıcaklık stabilite aktiviteleri

Çalışmadaki 8 adet faj lizatının farklı pH değerleri karşısında 1 saatlik inkübasyon sonucu stabilitesi analiz edildi. Faj lizatları 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 ve 12 pH aralıklarındaki stabilitesi incelendi. Fajların stabilitesine bakıldığında pH 2 'de hiçbir faj aktivite göstermedi. Bazı fajlar pH 12'de düşük aktivite gösterdi. Genel olarak bakıldığında faj lizatlarının pH 4 ile pH 10 arasında stabilitesinin sabit kaldığı gözlendi. Fajların pH değerleri karşısında stabilite aktivitelerini gösteren grafik Şekil 13 ve Şekil 14' de gösterilmiştir.

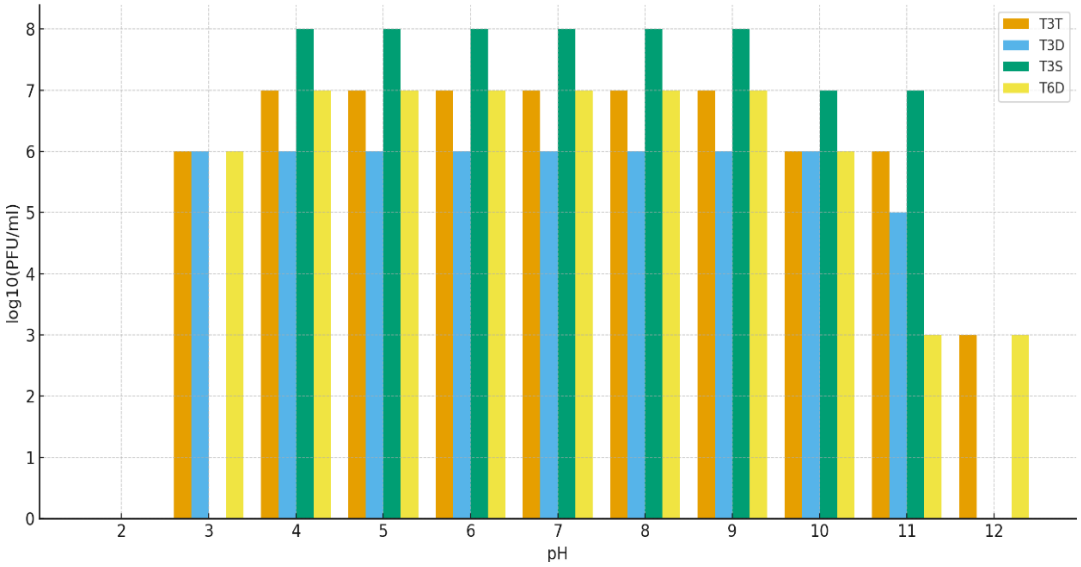


Şekil 13. ΦD9D, ΦD2D, ΦD5D ve ΦD5T Fajlarının pH stabilite aktiviteleri

ΦD2D fajı pH 3–11 aralığında yaklaşık 10^8 pfu/ml titresinde sabit kaldı. Bu fajın belirgin asidik (pH 3) hem de belirgin bazik (pH 11) pH'larda stabilitesinin sabit kaldığı gözlendi.

ΦD9D fajı pH 4–11 aralığında 10^7 pfu/ml titresinde sabit kaldı. ΦD9D fajı pH 3'te titresi 10^6'pfu/ml 'ye, pH 12'de ise titresi 10^5 pfu/ml 'ye düştüğü gözlendi. ΦD5D fajı pH 3–10 aralığında 10^6 pfu/ml titresinde sabit kaldı. Bu fajın pH 11'de 10^5 pfu/ml titresine, pH 12'de ise titresi 10^2 pfu/ml titresine kadar ciddi düşüş gözlendi.

ΦD5T fajı pH 5–8 aralığında 10^7 pfu/ml titresinde sabit kaldı. Bu fajın pH 3–4 aralıklarında 10^6 pfu/ml titresinde, pH 9–10 aralıklarında 10^6 pfu/ml titresinde, pH 11–12 ise kademeli olarak 10^4–10^3 pfu/ml titresine düşüş gözlendi.



Şekil 14. ΦT3D, ΦT3T, ΦT3S ve ΦT6D Fajlarının pH stabilite aktiviteleri

ΦT3S fajı, pH 4–9 aralığında yaklaşık 10^8 pfu/mL seviyesinde kalarak diğer fajlara kıyasla en geniş ve yüksek stabilite aralığında olduğu gözlendi. ΦT3T ve ΦT6D fajları orta pH aralıklarında stabil seyretti; ΦT3D ise daha düşük titrelerde olmakla birlikte geniş bir pH aralığında titre korunumunu sürdürdü.

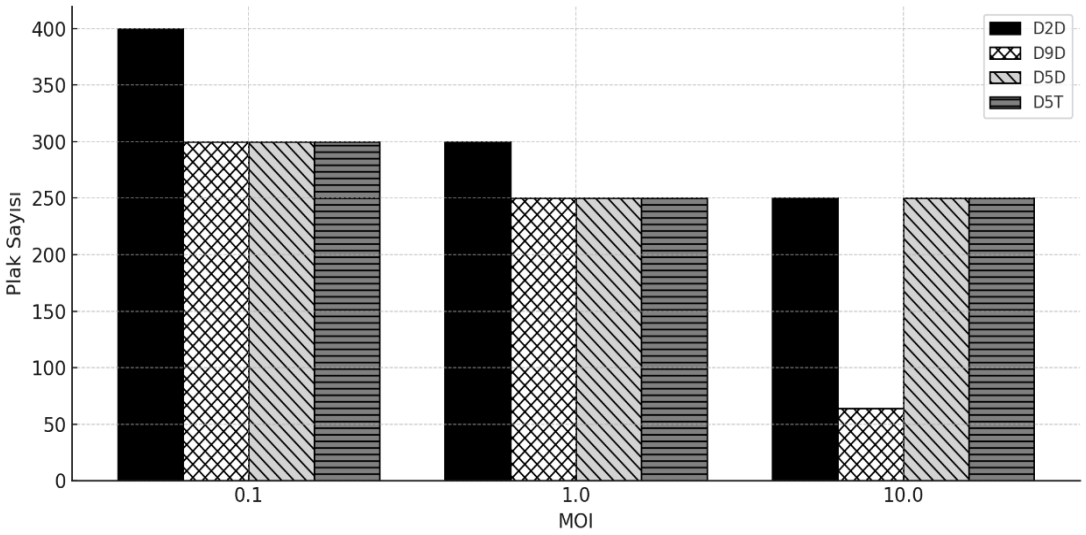
Asidik koşullarda (pH 2–3) ΦT3S fajının titrelerinde belirgin azalma gözlendi.

Bazik pH değerlerinde (pH 11–12) ise ΦT3T ve ΦT6D fajlarının titrelerinde kısmi stabilite devam ettiği gözlendi.

3.6. Fajların Optimum Enfektivite Değerleri

ΦD2D, ΦD9D, ΦD5D, ΦD5T, ΦT3T, ΦT3D, ΦT6D ve ΦT3S fajlarının optimum enfektif değerlerini belirlemek için konak bakterileri farklı MOI değerleriyle enfekte edildi ve 37 ° C'de inkübasyona tabi tutuldu. Daha sonra çift agar kaplama yöntemi kullanılarak plak sayımı yapıldı.

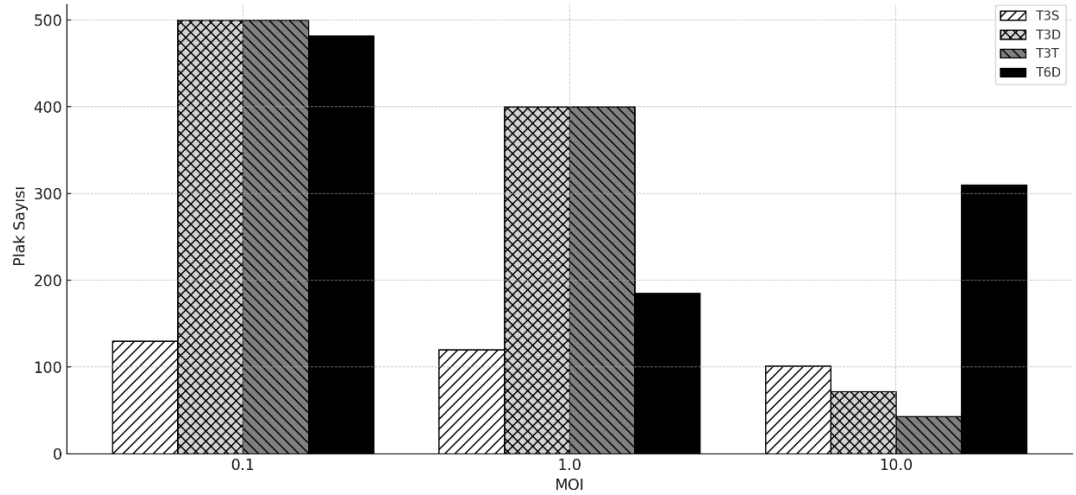
ΦD2D, ΦD9D, ΦD5D, ΦD5T Fajlarının optimum bakteriyolojik aktivitelerinin farklı MOI değerlerinin grafiği Şekil 15'te gösterildi.



Şekil 15. ΦD2D, Φ D9D, ΦD5D ve ΦD5T Fajlarının optimum MOI değerlendirmesi.

Bu dört faj arasında en yüksek enfektivite MOI 0.1'de gözlendi. MOI 1'de enfeksiyon verimliliği orta düzeyde azaldı ve MOI 10'da tüm fajlarda, özellikle ΦD9D'de belirgin düşüşler gözlemlendi. Bu durum yüksek MOI'nin 'lysis from without' etkisi ile faj çoğalmasını baskıladığını gösterdi.

ΦT3T, ΦT3D, ΦT6D ve ΦT3S Fajlarının optimum bakteriyolojik aktivitelerinin farklı MOI değerlerinin grafiği Şekil 16'te gösterildi.



Şekil 16. ΦT3T, ΦT3D, ΦT6D ve ΦT3S Fajlarının Optimum MOI değerlendirmesi

ΦT3S, ΦT3D, ΦT3T ve ΦT6D fajları için yapılan enfeksiyon deneylerinde, tüm fajlarda en yüksek plak oluşumu MOI 0,1'de gözlenmiş, MOI 1'de enfektivite

orta düzeyde azaldı ve MOI 10'da özellikle ΦT3D ve ΦT3T'de belirgin düşüşler ortaya çıktı. Bu bulgular, söz konusu fajlarda optimum enfektivite için düşük MOI'nin (0,1) tercih edilmesi gerektiğini ve yüksek faj yükünün 'lysis from without' benzeri mekanizmalarla faj replikasyon verimini azalttığını gösterdi.

3.7. Fajların Tek Aşamalı Gelişme Grafikleri

Fajların tek aşamalı gelişme grafikleri, yaşam döngüsü ve adsorpsiyon yeteneklerini gözlemlemek amacıyla yapıldı. Bu grafiklerde serbest faj sayılarının latent dönem ve patlama büyüklüğü hesaplandı.

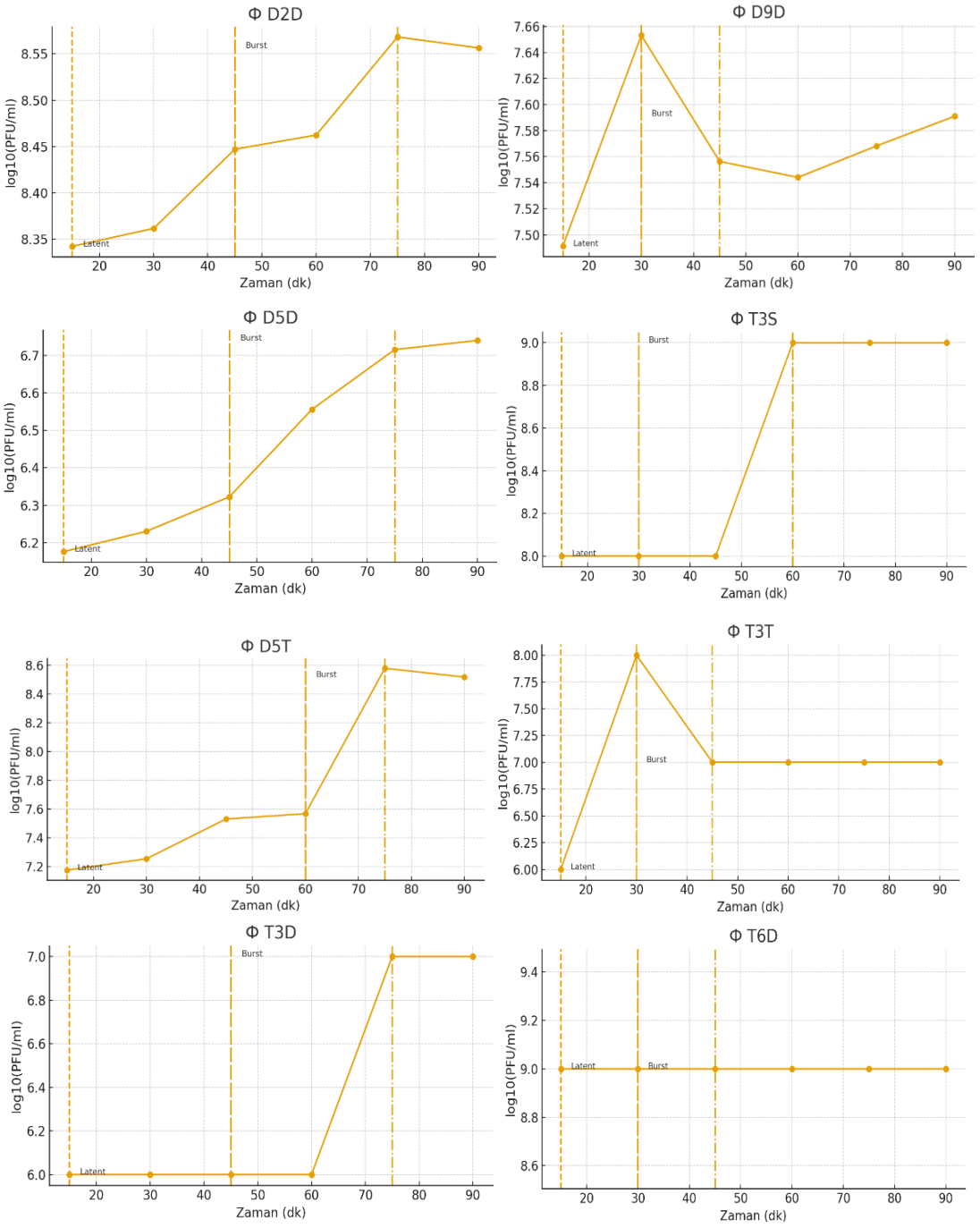
Latent dönem, çoğu faj için yaklaşık 30–60. dakikalar arasında; yükselme dönemi ise buna hemen ardından geldi.

Φ D2D ve Φ D5T'de latent dönemin 30–45 dakika arasında tamamlandığı ve 45.–75. dakikalarda yükselme fazının gerçekleştiği görülmüştür. Özellikle Φ D5T'de 60.–75. dakikalar arasında belirgin bir artış gözlendi.

Φ D9D ve Φ D5D'de hem latent dönemin daha uzun sürdüğü hem de artış eğrisinin daha sınırlı olduğu saptanmıştır. Φ D9D'nin yükselme fazına erken geçmesine rağmen düşük maksimum titre üretmesi, replikasyon kapasitesinin sınırlı olduğunu göstermektedir. Φ D5D ise sekiz faj içinde en düşük burst size'a sahip faj olarak değerlendirildi.

ΦT3T, ΦT3D, ΦT6D ve ΦT3S fajları genel olarak daha yüksek replikasyon hızına ve belirgin burst fazlarına sahip fajlar olduğu tespit edildi. Φ T3S ve Φ T3T'de latent dönem yaklaşık 15–30 dakika arasında seyretmiş; özellikle Φ T3S'de 60. dakikada çok keskin bir titre artışı gözlendi. Φ T3T'de yükselme fazı daha yumuşak olup 30–45. dakika arasında başlamış ve 60.–90. dakikalarda stabil bir plato fazı gözlendi. Φ T3D, diğer fajlara kıyasla daha geç bir yükselme fazı göstermiş; 45. dakikadan sonra belirgin bir titre artışı ile 75.–90. dakikalarda maksimum seviyeye ulaştı. Φ T6D, sekiz faj içinde en hızlı çoğalma eğrisine sahip faj olarak öne çıktı. İlk 15. dakikada yüksek titre ile başlaması ve 30–45. dakikalarda güçlü bir burst fazı göstermesi, bu fajın kısa latent dönemli ve yüksek verimli bir faj olduğunu gösterdi. 75. dakikadan sonra gözlenen titre düşüşü ise yüksek faj üretimine bağlı yoğun hücre lizisine işaret ettiği anlaşıldı.

ΦD2D, ΦD9D, ΦD5D, ΦD5T, ΦT3T, ΦT3D, ΦT6D ve ΦT3S fajlarının tek aşamalı grafiği Şekil 17'de gösterilmektedir.



Şekil 17. Fajların tek aşamalı gelişme Grafikleri. Sırasıyla; ΦD2D, ΦD9D, ΦD5D, ΦD5T, ΦT3S, ΦT3T, ΦT3D ve ΦT6D.

3.8. Faj ve Lizat Örneklerinin ATCC Bakterilerinde Konak Spektrumları ve Litik Faj Enfeksiyonları

Elde edilen 5 zenginleştirme lizatı ve Tez çalışması 2 (Rakıcı, 2022) için *Pelophylax* cinsi kurbağaların kloakal sürüntü örneklerinden izole edilen ΦKZ lizatı, 13 adet ATCC bakterisi üzerinde önce konak aralığı belirlendi daha sonrasında konak olarak belirlenen ATCC tip suşları ile litik faj enfeksiyonu yapıldı. Sonuçlar Tablo 11'de gösterildi.

Tablo 11. Faj Lizatlarının ATCC Tip Şuşlarındaki Plak Etkileri Etkileri (ΦKZ lizatı; *Pelophylax* cinsi kurbağaların kloakal sürüntü örneklerin zenginleştirme kültürlerinden izole edildi) (Rakıcı E., 2022)

	Lizat					
Suş	**ΦDZ**	**ΦİSZ**	**ΦİTZ**	**ΦGZ**	**ΦFZ**	**ΦKZ**
Staphylococcus epidermidis ATCC 35984	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus ATCC 779	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus ATCC 43300	-	-	-	-	-	-
Acinetobacter haemolyticus ATCC 19002	-	-	-	-	-	-
Enteroccus feacalis ATCC 29212	-	-	-	-	-	-
Enterobacter aerogenes ATCC 13048	-	-	-	-	-	-
Bacillus subtilis ATCC 6633	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosae ATCC 27923	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus ATCC 25923	-	-	-	-	-	-
E.coli ATCC 25922	+	-	-	-	-	-
Klebsiella pneumoniae ATCC 13883	+	-	-	-	-	-

Tablo 12 (Devam). Faj Lizatlarının ATCC Tip Şuşlarındaki Plak Etkileri Etkileri (ΦKZ lizatı; *Pelophylax* cinsi kurbağaların kloakal sürüntü örneklerin zenginleştirme kültürlerinden izole edildi) (Rakıcı E., 2022)

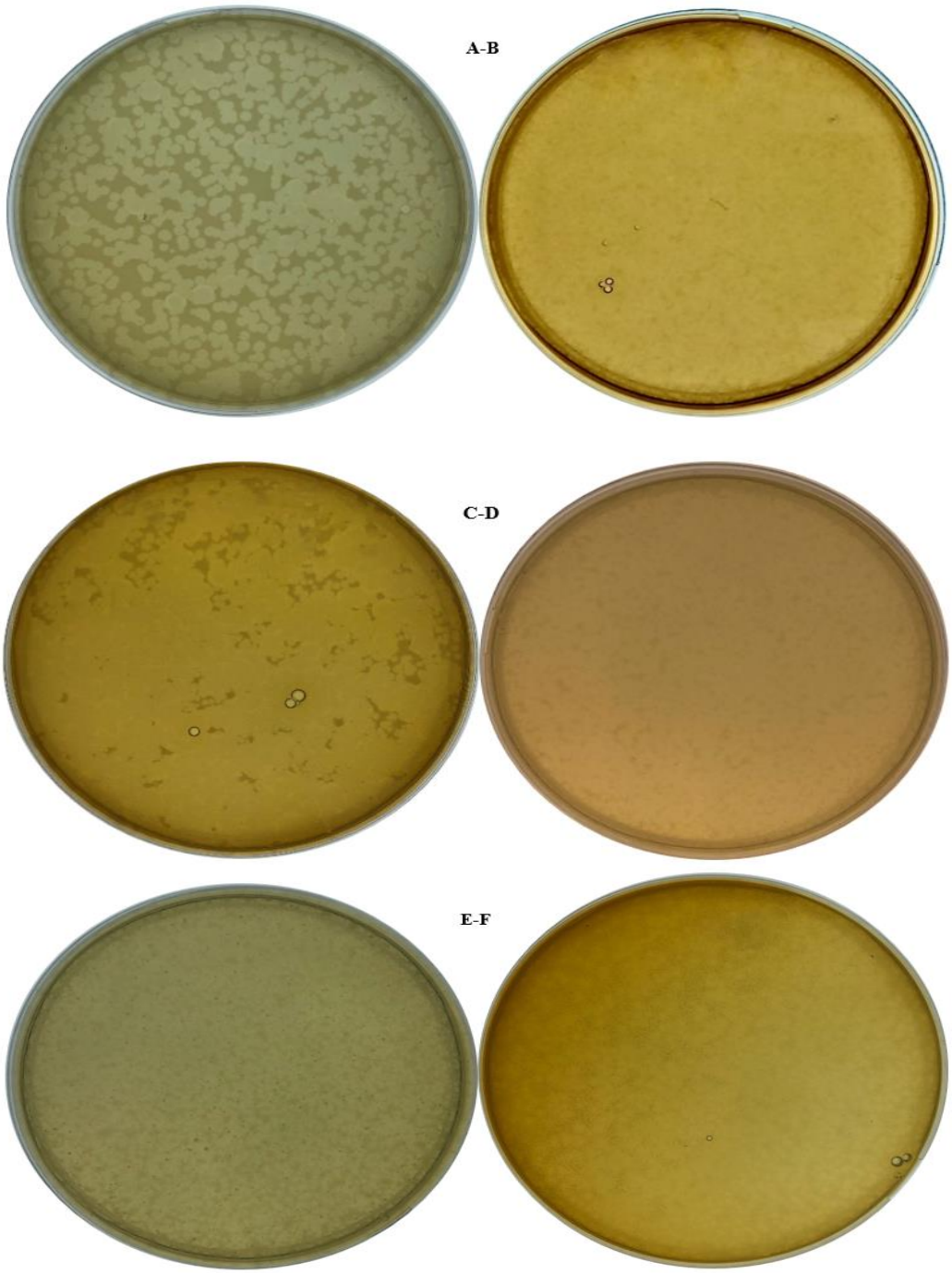
Salmonella Typhimurium ATC14028	+	-	-	-	-	-
Staphylococus epidermidis ATCC 12228	-	-	-	-	-	-

Atık sulardan izole edilen sekiz adet fajın ATCC tip suşlarında konak aralığı belirlendi. Konak olan ATCC tip suşları ile yapılan litik faj enfeksiyon sonuçları Tablo 12'de verildi.

Tablo 13. Atık sulardan izole edilen fajların ATCC tip suşlarındaki plak

Faj/ Bakteri	***Acineto haemolyticus ATCC 19002***	***Enterobacter aerogenes* ATCC 13048**	***Pseudomanas* aeruginosae ATCC 27853**	***Ecoli* ATCC 25922**	***Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883**	***Salmonella typhimurium* ATCC 14028**
ΦD2D	-	-	-	+	+	-
ΦD5D	+	-	-	+	-	-
ΦD9D	-	-	-	+	+	-
ΦD5T	-	-	-	+	-	-
ΦT3D	-	-	-	+	-	-
ΦT6D	+	-	-	+	-	-
ΦT3T	-	-	-	+	-	-
ΦT3S	-	-	-	-	-	-

ATCC tip suşları ile yapılan litik faj enfeksiyonu sonrasında gözlenen faj plakları Şekil 18'de gösterildi.



Şekil 18. ATCC Tip Suşlarında Meydana Gelen Farklı Morfolojideki Litik Faj Plakları (A: *Acineto haemolyticus* ATCC 19002 suş-Φd6t, B: *E. coli* ATCC 25922 suş-Φd5d, C: *Acineto haemolyticus* ATCC 19002 suş- Φd5d, D: *E. coli* ATCC 25922 suş- Φd6t, E: *E. coli* ATCC 25922 suş- Φt3t, F: *E. coli* ATCC 25922 suş- Φd3t.)

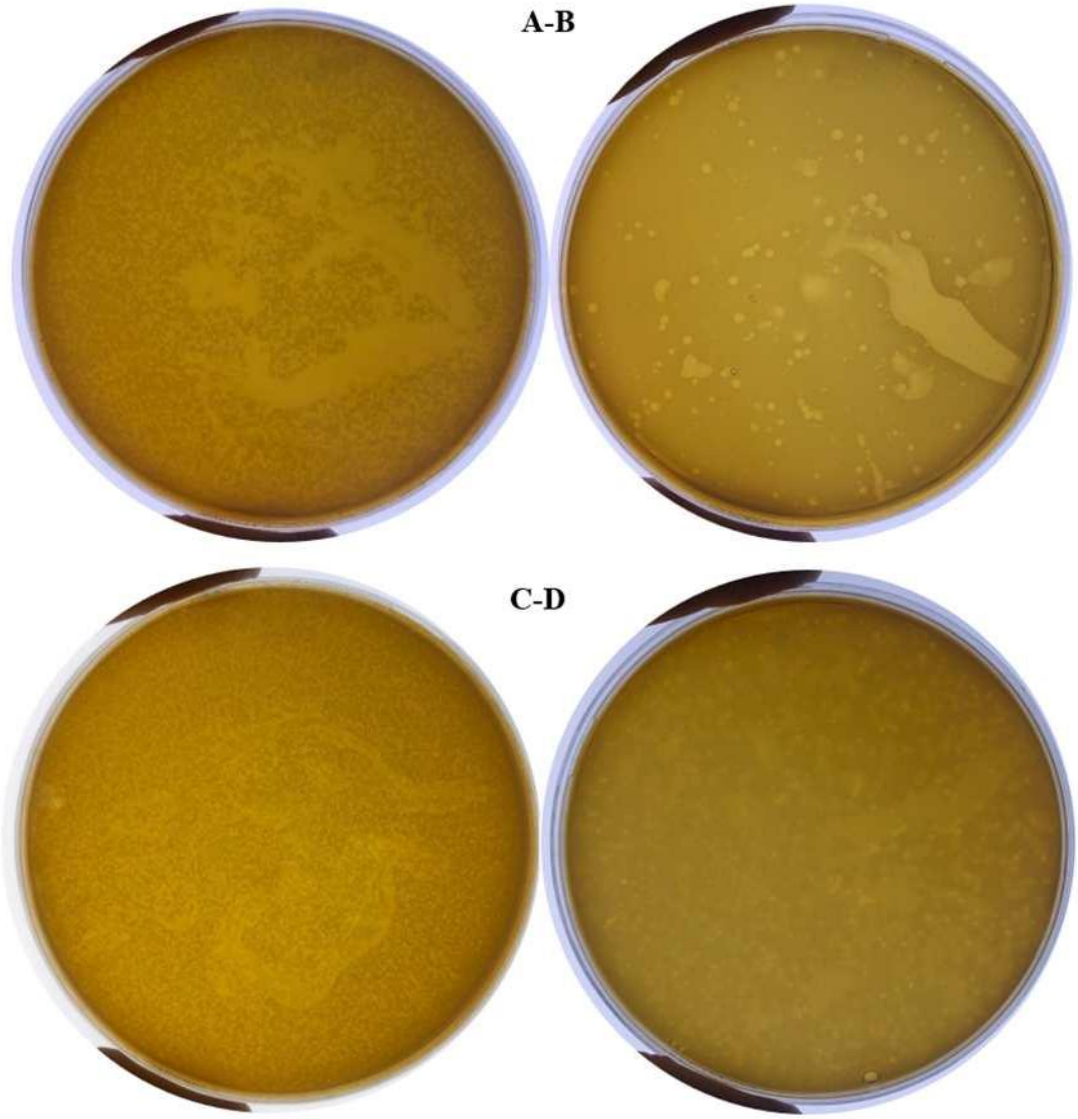
3.9. Faj ve Lizat Örneklerinin Çeşitli Klinik Bakterilerde Konak Spektrumları ve Litik Faj Enfeksiyonları

Çeşitli türlerden klinik kökenli 32 adet bakteri örneğinin (Tez Çalışması 1) konak aralığı belirlendi ve konak olarak belirlenen suşlarının faj enfeksiyonun sonuçları Tablo 13'te gösterildi.

Tablo 14. Zenginleştirme lizatlarının, tez çalışması 1'den elde edilen karbapenem duyarlı *klebsiella pneumoniae* bakterilerine litik etkileri

BAKTERİ	LİZAT ΦDZ	ΦİSZ	ΦİTZ	ΦGZ	ΦFZ
Klebsiella pneumoniae S10	+	-	-	-	-
Klebsiella pneumoniae S21	+	-	-	-	-
Klebsiella pneumoniae S30	+	+	+	-	-
Klebsiella pneumoniae S31	+	-	-	-	-
Klebsiella pneumoniae S34	-	+	-	-	-

Tez Çalışması 1'den Elde Edilen bakteriler ile yapılan litik faj enfeksiyon sonucu gözlenen faj plakları Şekil 19'da gösterilmiştir.



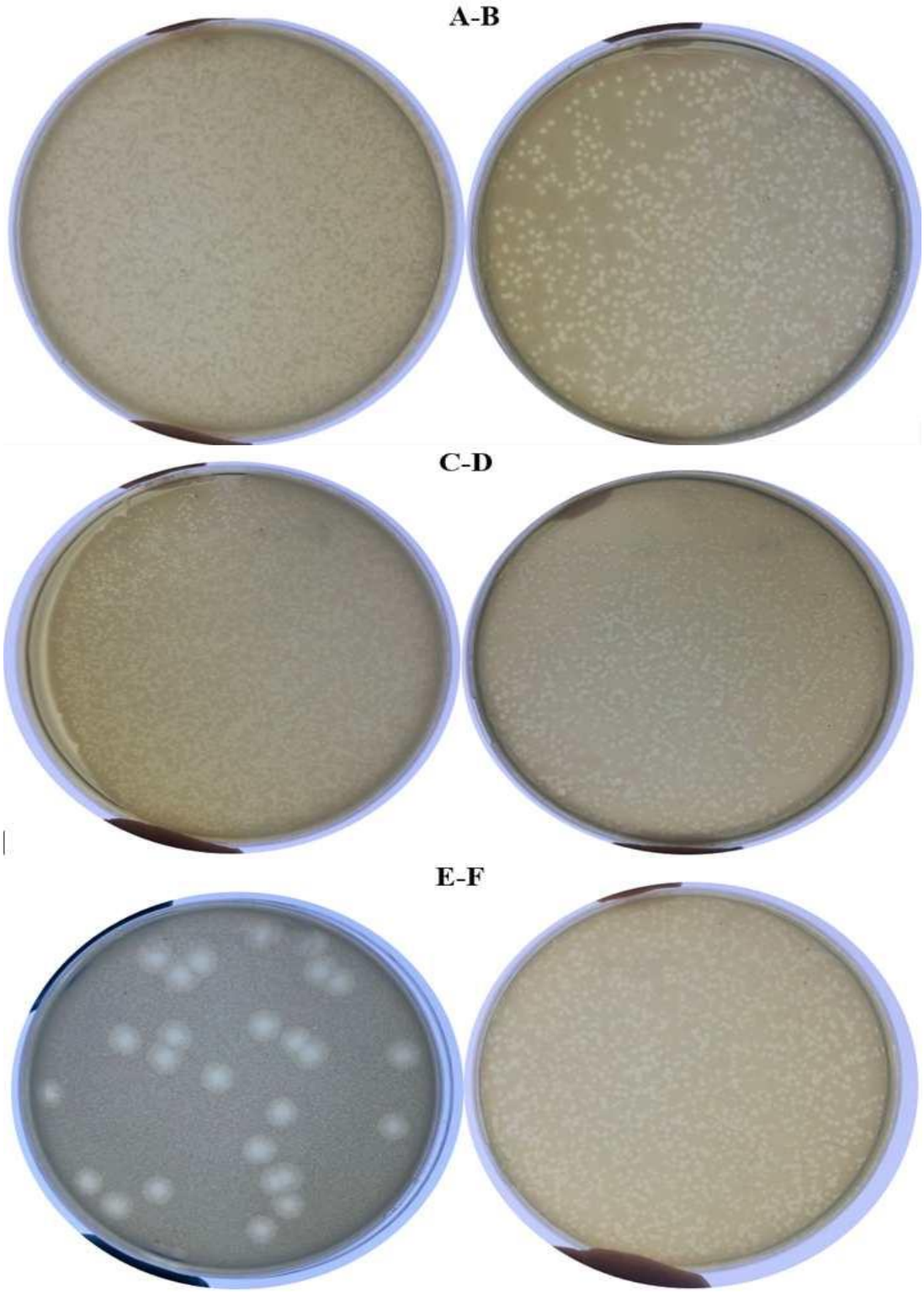
Şekil 19. Farklı morfolojiye sahip tez çalışması 1'den elde edilen klinik bakterilere ait enfeksiyon plakları (A: S31 suş – ΦdZ faj: Φs31dZ, B: S21 suş – ΦdZ faj: vs21dZ, C: S30 suş – ΦdZ faj: Φs30dZ, D: S10 suş – ΦdZ faj: Φs10dZ)

Çeşitli klinik kökenli 38 adet bakteri örneğin (İstanbul Medipol Hastane Suşları) konak aralığı belirlendi ve konak olarak belirlenen suşlar ile yapılan litik faj enfeksiyonun sonuçları Tablo 14'te gösterildi.

Tablo 15. Çevre faj ve lizatlarının İstanbul Medipol hastane suşlarına etkisi

Bakteri	**ΦdZ**	**ΦisZ**	**ΦitZ**	**ΦgZ**	**Φd2d**	**Φd5d**	**Φt3d**	**Φt3t**	**Φt6d**
Pseudomonas 1	+	-	-	-	+	-	+	-	+
E.coli 2	-	-	-	-	-	+	-	+	-
E.coli 3	-	-	-	-	-	-	+	-	-
E.coli 5	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Klebsiella 2	+	-	-	-	-	-	-	-	-

İstanbul Medipol Klinik Orijinli Bakteriler ile yapılan litik faj enfeksiyon sonucu gözlenen faj plakları Şekil 20'de gösterilmiştir.



Şekil 20. Farklı Morfolojiye Sahip İstanbul Medipol Klinik Orijinli Bakterilerdeki Enfeksiyon Plakları (A: *E. coli* 5 suş- ΦD5D, B: *Pseudomonas* 1 suş – ΦD3T, C: *E. coli* 2 suş - ΦD5D, D: *Pseudomonas* 1 suş - ΦD2D, E: *Klebsiella* 2 suş – ΦDZ, F: *Pseudomonas* 1 suş – ΦD6T).

3.10. Klinik Kökenli Konak Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılıkları

Klinik kökenli 70 adet bakteriden; 10 adet bakteri konak olarak belirlendi. Bu 10 adet bakterinin antibiyotik duyarlılıklarına VITEK-2 cihazı ile Recep Tayyip Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda belirlendi. İstanbul Medipol Hastane suşlarının antibiyotik duyarlılıkları Tablo 15'te gösterildi.

Tablo 16. İstanbul Medipol hastane suşları antibiyogram sonuçları

	Antibiyotikler											
Suş Kodu	**AMP**	**TZP**	**AMC**	**CXM**	**CAZ**	**FEP**	**GN**	**CİP**	**MXF**	**IMP**	**MEM**	**SXT**
Pseudomanas1	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R
Klebsiella 2	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S
E.coli 2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R
E.coli 3	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S
E.coli 5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R

S: Duyarlı I: Orta Duyarlı R: Dirençli

(AMP:Ampisilin, TZP:Piperasilin/Tazobactam, AMC:Amoksisilin/Klavulonat, CXM:Sefuroksim, CAZ:Seftazidim, FEP:Sefepim, GN:Gentamisin, CİP:Siprofiloksasin, MXF:Moksifiloksasin, IMP:İmipenem, MEM:Meropenem, SXT:Trimetoprim sulfametaksazol)

Tez Çalışması 1'den (İbik, 2022) sağlanan suşların antibiyotik duyarlılıkları Tablo 16'da gösterilmiştir.

Tablo 17. Tez çalışması 1'den sağlanan Karbapenem duyarlı olmayan *Klebsiella pneumoniae* suşları antibiyogram sonuçları

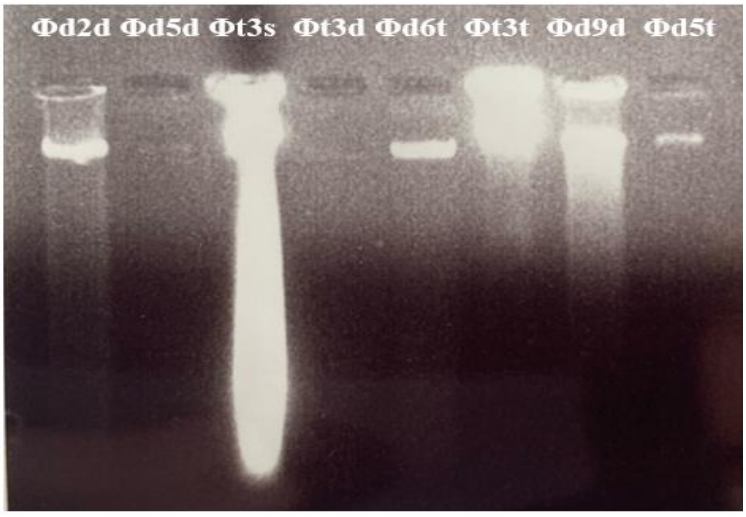
	Antibiyotikler											
Suş Kodu	**AK**	**GN**	**TOB**	**CIP**	**LEV**	**CAZ**	**IMP**	**MEM**	**FEP**	**TZP**	**SXT**	**COL**
S10	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S
S21	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R
S30	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S
S31	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
S34	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S

S: Duyarlı I: Orta Duyarlı R: Dirençli

(AK:Amikasin, GN:Gentamisin, TOB:Tobramisin, CİP: Siprofiloksasin, LEV: Levofloksasin, CAZ: Seftazidim, IMP: İmipenem, MEM: Meropenem, FEP: Cefepim, TZP: Piperasilin/tazobactam, SXT: Trimetoprim sulfametaksazol, COL:Kolistin)

3.11. Bakteriyofaj DNA Ekstraksiyonu

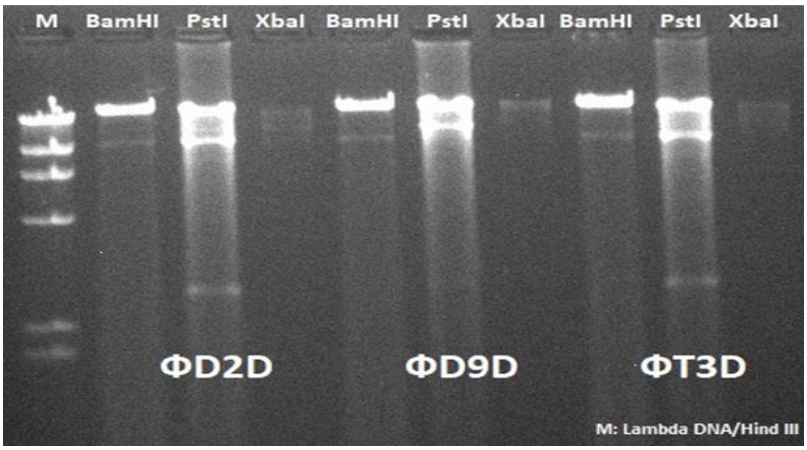
Fenol-Kloroform ile yapılan faj DNA izolasyonu sonucunda sekiz adet fajın DNA'sını elde edildi. Ekstraksiyonu yapılan faj DNA'sı %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve UV ile görüntülendi. Görülen bantlar UV transilluminatörde gözlendi ve jelin fotoğrafı jel görüntüleme cihazında çekildi. Faj DNA'sının agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 21'de gösterilmiştir.



Şekil 21. Faj DNA'larının agaroz jel elektrofores görüntüsü.

3.12. Bakteriyofaj DNA'sının Rekstriksiyon Enzimleri ile RFLP Profilleri

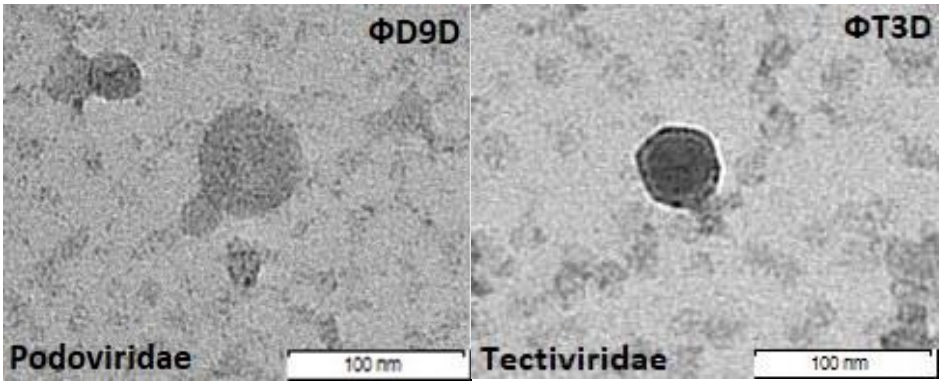
Faj DNA'ları için beş adet restriksiyon enzimi kullandık. RFLP için seçtiğimiz; *Pst* I, *Xba* I, *BamH* I, *Hind* III, *EcoR* enzimleri ile yapılan faj DNA'larının kesimi sonucunda fajlarımızın yakın akraba ya da aynı faj örnekleri olabileceğini belirlendi. RFLP sonucu agaroz jel eletroforez faj DNA profilleri Şekil 22'de gösterilmiştir.



Şekil 22. RFLP sonucu jel elektroforez faj profilleri

3.13. Fajların Elektron Mikroskobisi

Fajların morfolojik karakterizasyonu geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile gerçekleştirildi. Negatif boyama yöntemiyle elde edilen mikrograflarda, faj partiküllerinin baş yapıları net bir şekilde gözlemlendi. Görüntülenen faj örneklerinde ΦD9D fajı Podoviridae ve ΦT3D fajı Tectiviridae ailelerine ait fajlardır. Şekil 23'te faj partiküllerinin TEM görüntüsü gösterildi.



Şekil 23. ΦD9D ve ΦT3D fajlarının elektron mikroskop görüntüleri.

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Antibiyotiklerin keşfi ile antibiyotiklere dirençli bakteriler ortaya çıkmıştır. Dirençli bakteri profilinin artması sonucu bakterilere karşı yeni ve alternatif mücadele yöntemlerinin bulunmasını zorunlu hale getirmiştir.

Günümüzdeki özellikle de çoklu ilaca dirençli bakterilerin hızla artışı yeni antibiyotik keşfinin gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Ancak antibiyotik araştırmaları ve keşif hızı son yıllarda çok yavaşlamış ve yeni antibiyotik geliştirme çalışmalarının yetersizliği nedeniyle, patojen bakterilere spesifik bakteriyofajların kullanılabileceği tedavi yöntemleri gündeme gelmiştir.

Antibiyotik keşfi faj çalışmalarının önemini azaltmıştır ama faj terapisi ile ilgili yeni yöntemler ve teknolojilerin gelişmesiyle faj çalışmaları yeniden gündeme gelmiş ve faj çalışmasıyla ilgili araştırmalar hız kazanmıştır.

Sovyetler Birliği antibiyotiğin keşfine rağmen faj ile ilgili çalışmalara devam etmiş, hatta günümüzde Gürcistan Eliava Enstitüsü faj terapisi uygulamalarına halen kullanmaktadır.

Bu bilgiler eşliğinde enfeksiyon hastalıklarıyla mücadelede bakteriyofaj terapisi uzun bir süre sonra yeniden gündeme gelmiş ve birçok araştırmacının yeniden araştırma konusu olmuştur.

Bakteriyofaj terapisi, antibiyotik tedavisi ile karşılaştırdığımızda bazı avantajlara sahiptir. Örneğin, antibakteriyel ajanlara karşı direnç gösteren bakterilere karşı etkindirler ve hedef bakteriye özgün oldukları için normal mikroflorayı etkilemezler (Kutateladzeve Adamia, 2010). Bakteriyofaj keşfi ve karakterizasyonu antibiyotik geliştirme çalışmalarından daha az maliyetlidir.

Bu tez çalışmasında atık sulardan faj izolasyonu amaçlanmıştır. Kanalizasyon suyu, bakteriyel konakçı çoğalması ve faj izolasyonu için uygun yüksek miktarda organik ve inorganik madde içerdiğinden faj büyümesi için en alıcı ortamlardan biridir (Lobocka ve ark.,2014).

Bu tez çalışmasında atık sulardan sekiz farklı faj izole edilmiştir. İzole edilen fajların konak spektrumları klinik kökenli ve antibiyotik dirençli 70 adet suş üzerinde damlatma yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Konak olarak belirlenen suşlar ile İkili Agar kaplama yöntemi ile enfeksiyon yapıldı ve yeni konaklar belirlendi. Bu

çalışmadaki bazı bakteriyofajların çoklu antibiyotik dirençli Gram negatif (MDR) suşlar üzerinde etkili olması çalışmanın önemini artırtmaktadır.

Fajların çevresel stres koşullarında gösterdiği dayanıklılık hem doğadaki süreklilikleri hem de depolama–uygulama koşullarındaki stabiliteleri açısından kritiktir. Çalışmadaki ΦD2D ve ΦT3S fajların pH 3–11 aralığında yüksek aktivite göstermeye devam ettiği, buna karşın aşırı asidik veya bazik ortamların çoğu fajda aktivite kaybına yol açtığı görülmüştür.

MOI optimizasyonu deneylerinde fajların hepsi MOI 0,1'in MOI 1 ve MOI 10'dan daha yüksek enfektivite sağladığı belirlenmiştir. Bu bulgu fajlarda optimum enfektivite için düşük MOI'nin tercih edilmesi gerektiğini ve yüksek faj yükünün "lysis from without" benzeri mekanizmalarda faj replikasyonun verimini azalttığını göstermektedir. Bir başka deyişle; yüksek MOI değerlerinde görülen enfektivite azalması, birden fazla faj partikülünün aynı hücreye bağlanması sonucunda faj replikasyonunun başlamadan hücre duvarının mekanik olarak parçalanması ile açıklanabilir.

Sekiz fajın tek aşamalı gelişme karakteristikleri incelendiğinde, latent dönem, yükselme fazı ve burst size bakımından belirgin farklılıklar gözlenmiştir. ΦT6D ve ΦT3S, en kısa latent dönem ve en hızlı burst fazına sahip fajlardır; yüksek verimli çoğalma kapasitesi sergilemişlerdir. ΦT3D daha uzun latent dönemli olup geç bir burst fazı göstermiştir. ΦD5D ve ΦD9D en düşük burst kapasitesine sahip fajlardır yani replikasyon kapasitesinin sınırlı olduğunu gösterir. ΦD5T fajı ise en yüksek burst size değerine sahiptir.

ΦD2D, ΦT3D ve ΦD9D fajları; *Pst* I, *Xba* I, *BamH* I, *Hind* III enzimleri ile DNA'larının kesimi sonucu fajlarımızın yakın akraba ya da aynı faj örnekleri olabileceğini belirlendi.

Azerbaycan'da Mahdavi ve ark., 2023 yaptığı çalışmada; hastane atık sularından izole edilen 55 adet faj örneği RFLP analizi yapıldı, 26 alt tip için benzersiz profiller gözlemlendi. Çalışmada incelenen tıbbi merkezlerdeki *E. coli* faj popülasyonunun genetik çeşitliliğini ve kısıtlama desenlerinin farklılığını ortaya koymuştur.

Yapılan morfolojik karakterizasyon ile ΦD9D ve ΦT3D Fajlarının Podoviridae ve Tectiviridae ailelerinden olmaları, atık su kaynaklarından izole edilen fajların yapısal çeşitliliğini göstermektedir.

Baqer ve ark., 2022'de yaptıkları çalışmada Karbapenem Dirençli *K. pneumoniae*'ye karşı izole edilmiş sekiz potansiyel litik bakteriyofajın in vitro aktivitesini, stabilitesini ve moleküler özelliklerini detaylı bir şekilde karakterize etmiş, sıcaklık 30-60 °C arasında canlılıklarını korumuşlar ve pH 4-11 aralığına yüksek tolerans göstermişlerdir. Dört ay boyunca 4 °C'de saklandıktan sonra konsantrasyonlarında minimal bir azalma (0.18-1.2 log arasında) gözlenmiştir.

Dünya sağlık örgütünün örnek vaka olarak sunulan bir olguda; 84 yaşındaki çoklu ilaca dirençli *Klebsiella pneumoniae'nin* neden olduğu kronik bir idrar yolu enfeksiyonu olan hastanın antibiyotik tedavisine yanıt vermemiştir. Hastanın Gürcistan, Tiflis'teki Eliava Enstitüsüne ulaşması ile Mayıs 2017'de faj tedavisi uygulamasına başlanmıştır. Birkaç gün içinde durumunda gözle görülür bir iyileşme görülmüş, yaklaşık bir aylık süreç sonunda hasta herhangi bir yan etki gelişmeden tamamen iyileşmiştir (World Health Organization, 2024).

Bu çalışmada izole edilen fajlardan; ΦT3S dar spektrumlu faj olarak saptandı ve sadece bir bakteri suşunu enfekte ettiği tespit edildi. Bu faj sadece izole edilen konakçısı olan *E.coli* it3 suşunu enfekte etti.

Dar spektrumlu fajlar konak bakterileri fazla olmadığından faj terapisi için uygun değildirler. Aynı türde veya birkaç cins bakteriyi enfekte eden fajlar, faj terapisi için hazırlanan faj kokteyli için daha uygundur (He X, vd.,1992).

İki konağı enfekte edebilen fajlar ise; *E.coli* d5 ve *E.coli* ATCC 25922 suşlarını enfekte eden ΦD5T fajı olarak belirlendi.

Üç konağı enfekte edebilen faj; ΦT3T fajı *E.coli* it3, *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* 2 suşlarını enfekte etmektedir.

Başka bir çalışmada Mona ve ark., 2022 atık su örneklerinden izole ettikleri bakteriyofajların dört farklı türe ait suşları enfekte ettiğini belirlemiştir. İzole edilen dokuz faj bir veya iki türe ait 2-4 suş üzerinde litil aktivite gösterdiği ve üç fajın sadece izole edildikleri konaklara karşı etkili olduğu bildirilmiştir. Çalışmadaki konak suşlarının büyük çoğunluğu ampisilin, amoksisilin-klavulanik aside dirençli olduğu ve özellikle *Achromobacter xylosoxidans* TRAX 13 suşunun sefepim,

aztreonam, gentamisin, netilmisin ve siprofloksasine direnç göstererek çoklu ilaca dirençli bir fenotipe sahip olduğu belirtilmiştir.

Dört konağı enfekte edebilen geniş spektrumlu fajlardan; ΦT6D fajı *E.coli* it6, *Acinetobacter haemolyticus* ATCC 19002, *E.coli* ATCC 25922 ve *Pseudomanas* 1 suşlarını enfekte etmektedir. Faj ΦD9D; *Acinotebacter baumanii* d2, *Enterobacter asburiae* d9, *E.coli* ATCC 25922, Klebsiella pneumoniae ATCC 13883 suşlarının enfekte etmektedir.

Beş konağı enfekte edebilen geniş spektrumlu fajlardan; ΦD2D fajı *Acinotebacter baumanii* d2, *E. coli* d9, *E.coli* ATCC 25922, Klebsiella pneumoniae ATCC 13883 ve *Pseudomanas* 1suşlarını enfekte etmektedir. Φd5d fajı; *E.coli* d5, *Acinetobacter haemolyticus* ATCC 19002, *E.coli* ATCC 25922, *E.coli 2* ve *E.coli* 5 suşlarını enfekte etmektedir. ΦT3D fajı; *E.coli* it3, *E.coli* ATCC 25922, *Pseudomanas* 1, *E.coli* 3 ve *E.coli* 5 suşlarını enfekte etmektedir.

Nikhil ve ark., 2024 yılında Thane bölgesinden alınan kanalizasyon örneğinden izole ettikleri vB_kpnS-Kpn15 fajı geniş bir konakçı aralığına sahip ve *K. pneumoniae* çoklu ilaca dirençli suşlarının yaklaşık %46'sında litik etki gösterdiğini bildirmiştir.

Hastane enfeksiyonlarına neden olan ilaç dirençli bakterileri hedef alan başka bir çalışmada, Manohar ve ark., 2019 atık sudan üç farklı bakteriyofaj izole etmiştir. *Escherichia myPSH2311* fajı altı *E. coli* suşuna karşı aktivite göstermiştir. *Enterobacter myPSH1140* fajı dört farklı *Enterobacter* fenotipine karşı eklini bulunmuştur. *Klebsiella* myPSH1235 fajı *K. pneumoniae* üzerinde litik aktivite göstermiştir.

Rize merkez dolgu bölgesinden alınan atık sudan izole edilen zenginleştirme faj lizatı Φdz; *E.coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ve *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 suşlarını enfekte eden fajlar içerdiği tespit edilmiştir. Ayrıca S10, S21, S30 ve S31 kodlu *Klebsiella pneumoniae* suşlarını enfekte eden fajlar içerdiği tespit edilmiştir. Koleksiyonumuzdaki *Klebsiella* 2, *Pseudomonas* 1 ve *E. coli* 5 suşlarını enfekte eden fajlar içerdiği tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada; *K. Pneumoniae'nin neden olduğu* deneysel lober pnömoniyi tedavi etme potansiyeline sahip olan, bu bakteriye özgü litik bir faj, Tahran'daki bir kentsel atık su örneğinden izole edilmiştir. Bu faj tedavi amaçlı

uygulanan farelerdeki bakteri sayısında önemli oranda azalma gözlenmiştir (Soleimani ve Eftekhar, 2020).

Bu veriler değerlendirildiğinde; klinik patojen S21 suşunun antibiyogram duyarlılık sonuçlarına göre karbenem, kolistin ve kinolon dirençli olduğu görülmektedir. Bu nedenle S21 suşu çoklu ilaç dirençli (MDR) suş olarak tanımlanmaktadır. Bu çalışmadaki ΦdZ lizatı içinde S21 suşunu enfekte eden faj varlığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen geniş spektrumlu fajlar; ΦT3D, ΦD2D, ΦD5D fajları beş farklı konakta etki göstermişlerdir. Konak bakteri profillerine bakıldığında antibiyotik dirençli bakterilerin olduğu görülmektedir. Gelecekte faj terapisine uygunluğunun değerlendirilebilmesi için virülans genlerinin incelenmesi, antibiyotik direnç genlerinin varlığı belirlenmeli yüksek kontrastlı transmisyon elektron mikroskobu ile detaylı morfolojik sınıflandırmalarının yapılması ve tam genom analizlerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular literatürde rapor edilen litik faj enfeksiyonu yapan türlerle benzerlik göstermektedir. İzole edilen fajların literatüre yeni faj adayları olabileceğini düşündürmektedir. Bu fajların klinik patojen bakterileri enfekte edebilmesi, terapötik açıdan potansiyel taşıdıklarını ortaya koymaktadır. Bu nedenle, söz konusu fajların genetik olarak ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmesi ve faj terapisi amacıyla kullanılabilirliklerinin araştırılması önem arz etmektedir. Antimikrobiyal direncin küresel ölçekte hızla artması, mevcut tedavi seçeneklerinin etkinliğini ciddi biçimde sınırlamakta ve enfeksiyon hastalıkları alanında yeni biyolojik ajanlara olan ihtiyacı her zamankinden daha kritik hâle getirmektedir. Bu çalışma kapsamında izole edilen fajların, özellikle çoklu ilaca dirençli klinik suşları enfekte edebilmesi, bakteriyofaj temelli yaklaşımların gelecekte alternatif veya tamamlayıcı bir tedavi stratejisi olabileceğini göstermektedir. Elde edilen bulgular, fajların karakterizasyonunun derinleştirilmesi ve terapötik potansiyellerinin genomik, fenotipik ve in vivo düzeylerde değerlendirilmesinin önemini vurgulamaktadır. Sonuç olarak, bakteriyofaj araştırmalarının artan antimikrobiyal direnç baskısı karşısında önümüzdeki yıllarda enfeksiyon kontrolünde daha da ön plana çıkacağı öngörülmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü Antimikrobiyal Direncin giderek arttığını ve insanlığın karşı karşıya olduğu küresel bir halk sağlığı tehdidine dönüştüğünü bildirmiştir. Antimikrobiyal direnç nedeniyle 2050 yılında dünyada yılda 10 milyon kişinin hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir (T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, t.y.).

Dünya Sağlık Örgütü ilk defa 2025 yılında Bakteriyofaj terapisinin kullanımına yönelik kanıtların oluşturulması içeriğindeki ilk raporunu yayınladı (World Health Organization, 2025).

Bu araştırmanın, atık su kaynaklarının çoklu ilaca dirençli patojenlere karşı etkili olabilecek yeni faj adayları için önemli bir rezervuar olduğunu gösterdiğine inanılmaktadır. İzole edilen fajların geniş konak aralığı ve dirençli klinik suşları enfekte ve liz edebilme kapasitesiteleri, faj temelli yaklaşımların enfeksiyon hastalıklarında geleneksel tedavilere güçlü bir tamamlayıcı alternatif olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışması sonucunda, Rize ilindeki antropojenik atık sulardan toplam sekiz litik bakteriyofaj başarıyla izole edildi ve kapsamlı biyolojik karakterizasyonları yapıldı. Sonuçlar, fajların geniş pH aralığında stabil olduğunu, optimum MOI'in çoğu faj için 0,1–1 aralığında gerçekleştiğini, tek aşamalı gelişme eğrilerinin fajlar arasında belirgin kinetik farklılıklar olduğunu, ΦT6D, ΦT3S ve ΦD2D fajlarının terapötik uygulamalar için güçlü adaylar olduğunu gösterdi.

1. Bu çalışmada Recep Tayyip Erdoğan Üniversite'si Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün TSA-2023-1443 kodlu BAP projesi desteği ile Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Bu proje kapsamında atık sulardan toplam 65 bakteri izole edilmiş ve bunlardan beş'inin aynı sulardan izole edilmiş fajlara duyarlı oldukları tespit edildi. Bu beş bakterinin bir veya birden fazla faja duyarlılık gösterdiği saptandı.

2. İzole edilen beş konak bakteriyi enfekte eden toplam sekiz faj izole edildi. İzole edilen fajların çoğaltılması ve saflaştırılması için bu beş bakteri konak olarak kullanıldı. İzole edilen fajların konak aralığı birbirinden farklı profil göstermektedir. Bazı fajlar sadece tek konağı enfekte ederken bazıları da iki, üç, dört ve beş konağı enfekte etmektedir. Klinik suşları enfekte eden fajlar, konak aralığını artırmak için daha fazla klinik patojen bakteri üzerinde konakçı aralığı analizine tabi tutulmalıdır.

3. Faj Φd2d *Acinetobacter baumaniae* d2, *Enterocter asbriae* d9, *E.coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomanas* 1 suşlarını enfekte eden geniş spekturumlu bir fajdır. Bu fajın spektrum genişliğini saptamak için gram negatif klinik patojen suşlar ile test edilmesi önerilmektedir.

4. S21 suşunu enfekte eden Φs21dZ fajı daha fazla klinik patojen *Klebsiella spp*. ile konakçı aralığı analizine tabi tutulmalı. Virülans gen veya antibiyotik direnç geni barındırmamalı bunun için tam genom analizi yapılmalı, bu sayede faj terapiye uygun faj olup olmadığı tespit edilmelidir.

5. İzole edilen geniş spektrumlu fajların biyolojik yönlerden daha detaylı incelenmesi için fajların genom dizilemesi yapılmalıdır. Böylece ilerde yapılacak çalışmalarla faj terapisi için uygun fajlar olup olmadıkları tespit edilerek, faj terapi çalışmalarında kullanılabilir.

6. Bölgesel litik faj bankası oluşturulması için atık suların düzenli taranması önerilmektedir.

7. Benzer çalışmaların Gram pozitif bakterileri enfekte ve liz edebilecek faj rezervuarlarının ortaya çıkarılması için de yapılmalıdır.

KAYNAKÇA

Abdel-Raouf N, Al-Homaidan AA, Ibraheem IB 2012. Microalgae and wastewater treatment. Saudi Journal of Biological Science. 2012 Jul;19(3):257-75. doi: 10.1016/j.sjbs.2012.04.005. Epub 2012 May 3. PMID: 24936135; PMCID: PMC4052567.

Acar Soykut, E., & Tunail, N. (2009). Termofilik faj taksonomisi. *GIDA*, *34*(4), 251–258.

Akman, M., 1977. Bakteri Genetiği. Cumhuriyet Üniversitesi Yayını no:1, 179 s.

Alharbi NM, Ziadi MM 2021. Wastewater as a fertility source for novel bacteriophages against multi-drug resistant bacteria. Saudi Journal of Biological Science. 2021 Aug;28(8):4358-4364. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.04.025. Epub 2021 Apr 16. PMID: 34354420; PMCID: PMC8324929.

Al-Ishaq RK, Skariah S, Büsselberg D., 2020. Bacteriophage Treatment: Critical Evaluation of Its Application on World Health Organization Priority Pathogens. Viruses. 2020 Dec 30;13(1):51. doi: 10.3390/v13010051. PMID: 33396965; PMCID: PMC7823271.

Arda M., 2011. Bakteriyofajlar (Bakteriyel Viruslar). Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınevi-Ankara. 182-194.

Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Smith C (2008). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons Inc.

Ausubel F.,2008. Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Smith C (2008). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons Inc.

Awanish Kumar, Dharm Pal., 2018. Antibiotic resistance and wastewater: Correlation, impact and critical human health challenges, Journal of Environmental Chemical Engineering, Volume 6, Issue 1, 2018, Pages 52-58, ISSN 2213-3437, https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.11.059.

Aydoğan, D.Y. ve Hadımlı, H.H., 2016. Bakteriyofaj Tedavisi. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 27, 1, 38-47.

Baqer, A. A., Fang, K., Mohd-Assaad, N., Adnan, S. N. A., & Md Nor, N. S. (2022). In Vitro Activity, Stability and Molecular Characterization of Eight Potent Bacteriophages Infecting Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Viruses*, *15*(1), 117. https://doi.org/10.3390/v15010117

Beaudoin RN, Decesaro DR, Durkee DL, Barbaro SE (2007). Isolation of a bacteriophage from sewage sludge and characterization of its bacterial host cell. Rivier Academic Journal 3, p 1-8.

Bozdoğan, B. (Dü.). (2023). *I. Bakteriyofaj kurs kitabı*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti & Aydın Adnan Menderes Üniversitesi REDPROM Araştırma Merkezi. https://www.tmc-online.org/pdf/1.%20Bakteriyofaj%20Kurs%20Kitab%C4%B1.pdf

Bozidis, P., Markou, E., Gouni, A., & Gartzonika, K. (2024). Does Phage Therapy Need a Pan-Phage? Pathogens, *13*(6), 522. https://doi.org/10.3390/pathogens13060522

Bradley, D.E., 1967. Ultrastructural of bacteriophage and bacteriocin. Bacteriological Review., 31, 230-314.

Chahal C, van den Akker B, Young F, Franco C, Blackbeard J, Monis P., 2016. Pathogen and Particle Associations in Wastewater: Significance and Implications for Treatment and Disinfection Processes. Advanced in Applied Microbiology. 2016; 97:63-119. doi: 10.1016/bs.aambs.2016.08.001. Epub 2016 Sep 15. PMID: 27926432; PMCID: PMC7126130.

Comeau A., Hatfull G., Krisch H., Lindell D., Mann N., Prangishvili D., 2008. Exploring the prokaryotic virosphere. Research in Microbiology. 159 :306–13.

Eliava Institute, 2025. https://eliava-institute.org/en/phages. Erişim Tarihi: 24.11.2025

Fortier LC, Moineau S., 2009. Phage production and maintenance of stocks, including expected stock lifetimes. Methods in Molecular Biology. 2009; 501:203-19. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6_19. PMID: 19066823.

Fujiki J, Nakamura K, Nakamura T, Iwano H. Fitness Trade-Offs between Phage and Antibiotic Sensitivity in Phage-Resistant Variants: Molecular Action and Insights into Clinical Applications for Phage Therapy. International Journal of Molecular Sciences. 2023 Oct 26;24(21):15628. doi: 10.3390/ijms242115628. PMID: 37958612; PMCID: PMC10650657.

Gordillo Altamirano FL, Barr JJ., 2019. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. Clinical Microbiology Reviews. 2019 Jan 16;32(2): e00066-18. doi: 10.1128/CMR.00066-18. PMID: 30651225; PMCID: PMC6431132.

Gündoğdu A., Kılıç A., 2018. Bakteriyofaj Terapisi: Unutulmuş Bir Şifa Kaynağı. A rewiew. Klimik Dergisi, DOI: 10.5152/kd.2018.22.

Hanlon GW., 2007. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. International Journal of Antimicrobial Agents. 2007 Aug;30(2):118-28. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.04.006. Epub 2007 Jun 12. PMID: 17566713.

Hatfull GF, 2011. Hendrix RW. Bacteriophages and their genomes. Current Opinion in Virology. 2011 Oct;1(4):298-303. doi: 10.1016/j.coviro.2011.06.009. PMID: 22034588; PMCID: PMC3199584.

He XQ, Pan RN., 1992. Bacteriophage lytic patterns for identification of salmonellae, shigellae, Escherichia coli, Citrobacter freundii, and Enterobacter cloacae. Journal of Clinical Microbiology. 1992 Mar;30(3):590-4. doi: 10.1128/jcm.30.3.590-594.1992. PMID: 1551974; PMCID: PMC265115.

İbik YE., 2022. Karbapenem duyarlı olmayan klebsiella pneumoniae izolatlarının MLSt, maldı-tof, PFGE ile moleküler epidemiyolojisinin incelenmesi. Tıpta Uzmanlık. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye.

Jin, J., Li, ZJ., Wang, SW. *et al., 2012.* Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *BMC Microbiol* 12, 156 (2012). https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-156

Karasartova, D., 2009. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Staphylococcus Aureus Suşlarının Faj Tiplerinin ve Özelliklerinin Araştırılması. Doktora Tezi. Ankara Üniverstesi, Sağlık Bilimleri Enstiüsü, Ankara, Türkiye, s., 118, 21-22.

Karaynir, A., 2021. Çevresel Örneklerden Escherichia Coli Dh10b Suşuna Karşı Litik Bakteriyofaj İzolasyonu Ve Klinik Escherichia Coli Suşlarına Karşı Etkinliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye, s.,4,

Kasman LM, Porter LD., 2022. Bacteriophages. 2022 Sep 26. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 29630237.

Keen EC. 2015. A century of phage research: bacteriophages and the shaping of modern biology. Bioessays. 2015 Jan;37(1):6-9. doi: 10.1002/bies.201400152. PMID: 25521633; PMCID: PMC4418462.

Khorshidtalab M, Durukan İ, Tufekci EF, Nas SS, Abdurrahman MA, Kiliç AO., 2022. Isolation and Characterization of Lytic Bacteriophages from Wastewater with Phage Therapy Potentials Against Gram-Negative Bacteria. The Eurasian Journal of Medicine. 2022 Jun;54(2):157-164. doi: 10.5152/eurasianjmed.2022.21010. PMID: 35703524; PMCID: PMC9634901.

Kılıç, A.O., Pavlova, S.I., Ma, W. and Tao, L., 1996. Analiysis of Lactobacillus phages and bacteriocins in American dairy products and characterization of a phage isolated from yoğurt. Applied and Environmental Microbiology, 62, 2111- 2116.

Köchl S, Niederstätter H, Parson W. DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR. Methods in Molecular Biology. 2005; 297:13-30. doi: 10.1385/1-59259-867-6:013. PMID: 15570097.

Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. Methods in Molecular Biology. 2009; 501:69-76. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6_7. PMID: 19066811.

Kutateladze M, Adamia R., 2010. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. Trends in Biotechnology. 2010 Dec;28(12):591-5. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.08.001. Epub 2010 Aug 31. PMID: 20810181.

Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (Eds.). (2004). Bacteriophages: Biology and Applications (1st ed.). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9780203491751

Labrie SJ., Samson JE, Moineau S (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. Nature Reviews Microbiology., 8(5), 317-327.

Lewin, B., 1994. Phage strategies: Lytic cascades and Iysogenic repression. Genes V. Firsted. Chapter 17. Oxford University, New York, pp. 495-523.

Liao D, Zhang J, Liu R, Chen K, Liu Y, Shao Y, Shi X, Zhang Y, Yang Z., 2023. Whole-genome sequencing, annotation, and biological characterization of a novel Siphoviridae phage against multi-drug resistant *Propionibacterium acne*. Front Microbiol. 2023 Jan 4;13:1065386. doi: 10.3389/fmicb.2022.1065386. Erratum in: Front Microbiol. 2024 Mar 08;15:1390825. doi: 10.3389/fmicb.2024.1390825. PMID: 36687605; PMCID: PMC9846536.

Lin DM, Koskella B, Lin HC 2017. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics. 2017 Aug 6;8(3):162-173. doi: 10.4292/wjgpt.v8.i3.162. PMID: 28828194; PMCID: PMC5547374.

Lin J, Du F, Long M, Li P 2022. Limitations of Phage Therapy and Corresponding Optimization Strategies: A Review. Molecules. 2022 Mar 13;27(6):1857. doi: 10.3390/molecules27061857. PMID: 35335222; PMCID: PMC8951143.

Lin NT, ChiouPY, Chang KC, Chen LK, Lai MJ (2010). Isolation and characterization of AB2: A novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*. Research in Microbiology, 308-314.

Lobocka M., Hejnowicz M.S., Gagala U., Weber-Dabrowska B., Wegrzyn G., Dadlez M., 2014. The first step to bacteriophage therapy–how to choose the correct phage. Phage Therapy: Current Research and Applications (Edited by: Jan Borysowski, Ryszard Międzybrodzki and Andrzej Górski). Caister Academic Press, U.K., pp. 23–67.

Mahdavi, S., Sadeghi, M., Shokri, R., & Kalantari, M. (2023). Molecular characterization of PMQR carrying bacteriophages in effluent discharge samples of Azerbaijan hospitals. *Brazilian journal of microbiology :*

[publication of the Brazilian Society for Microbiology], *54*(3), 1769–1781. https://doi.org/10.1007/s42770-023-01084-1

Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C., 2021. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. Pathogens. 2021 Oct 12;10(10):1310. doi: 10.3390/pathogens10101310. PMID: 34684258; PMCID: PMC8541462.

Manohar P, Tamhankar AJ, Lundborg CS, Nachimuthu R., 2019. Therapeutic Characterization and Efficacy of Bacteriophage Cocktails Infecting *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter* Species. Frontiers in Microbiology. 2019 Mar 21;10:574. doi: 10.3389/fmicb.2019.00574. PMID: 30949158; PMCID: PMC6437105.

Murray PR., 2010. Murray PR, Rosenthal KS., Pfaller MA (2010). Tıbbi Mikrobiyoloji. Altıncı baskı. Çev. Edit. Başustaoğlu A, Atlas Kitapçılık, Ankara, 649-803.

Naureen Z, Dautaj A, Anpilogov K, Camilleri G, Dhuli K, Tanzi B, Maltese PE, Cristofoli F, De Antoni L, Beccari T, Dundar M, Bertelli M. 2020. Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations. Acta Biomedica. 2020 Nov 9;91(13-S):e2020024. doi: 10.23750/abm.v91i13-S.10819. PMID: 33170167; PMCID: PMC8023132.

Nicastro J, Wong S, Khazaei Z, Lam P, Blay J & Slavcev R.A., 2016. Bacteriophage Applications Historical Perspective and Future Potential 2016, Springer International Publishing.

Nikhil Sathe, Cenk Suphioglu, Eugene Athan, Arnab Kapat. Bacteriophage vB_kpnS-Kpn15: Unveiling its potential triumph against extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* - Unraveling efficacy through innovative animal alternate models. Microbial Pathogenesis. Volume 195,2024,106891,ISSN 0882-4010,https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106891.

Qi ZY, Yang SY, Dong SW, Zhao FF, Qin JH, Xiang J., 2020. [Biological characteristics and genomic information of a bacteriophage against pan-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* in a burn patient and its effects on bacterial biofilm]. Zhonghua Shao Shang Za Zhi. 2020 Jan 20;36(1):14-23. Chinese. doi: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2020.01.004. PMID: 32023713.

Rakıcı E., 2022. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yaşayan pelophylax SP. türlerinden izole edilen enterik bakterilerdeki antibiyotik direncinin belirlenmesi ve moleküler analizi. Doktora Tezi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye.

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Isolation of bacteriophage λ DNA from large-scale lysates. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2006*(1), pdb-rec466. https://doi.org/10.1101/pdb.rec466

Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Pruitt, K. D., Schoch, C. L., Sherry, S. T., & Karsch-Mizrachi, I. (2025). GenBank 2025 update. *Nucleic Acids Research*, *53*(D1), D92–D96. https://doi.org/10.1093/nar/gkae1058

Soleimani Sasani, M., Eftekhar, F., 2020. Potential of a Bacteriophage Isolated from Wastewater in Treatment of Lobar Pneumonia Infection Induced by *Klebsiella pneumoniae* in Mice. Current Microbiology., 77, 2650–2655 (2020). https://doi.org/10.1007/s00284-020-02041-z

Summers, W. C. 2011. In the beginning. 2. Bacteriophage, 1(1), 50–51. https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14070

T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. (t.y.). *Dünya antimikrobiyal direnç farkındalık haftası (18-24 Kasım)*. Erişim tarihi: 24 Aralık 2025, https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/component/content/article/duenya-antimikrobiyal-direnc-farkindalilk-haftasi-18-24-kasim.html?catid=17&Itemid=432

Tang KWK, Millar BC, Moore JE., 2023. Antimicrobial Resistance (AMR). British Journal of Biomedical Science. 2023 Jun 28;80:11387. doi: 10.3389/bjbs.2023.11387. PMID: 37448857; PMCID: PMC10336207.

Todar K., (2019). http://textbookofbacteriology.net/phage.html. Erişim Tarihi: 19.11.2019.

Törümküney, D., 1996. Çeşitli Muayene Maddelerinden İzole Edilen Staphylococcus Aureus Suşlarında Bakteriyofaj Tip Tayini.Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniverstesi, Sağlık Bilimleri Enstiüsü, İstanbul, Türkiye, s.,62. 3-12.

Ustaçelebi, Ş., Us A.Dürdal., 2008. Genel Viroloji. Pelikan Tıp ve Teknik Kitapçılık. Bakanlıklar, Ankara,s. 129-143.

Vladimir, M., Feng, C., Nguyen, A., & Li, Y. (2025). *Evaluating phage lytic activity: From plaque assays to single-cell methods*. Frontiers in Microbiology, 16, 1659093.

World Health Organization. (2024, 25 Haziran). *Building evidence for the use of bacteriophages against antimicrobial resistance*. https://www.who.int/europe/news/item/25-06-2024-building-evidence-for-the-use-of-bacteriophages-against-antimicrobial-resistance

World Health Organization. Regional Office for Europe. (2025). *Building the evidence for the use of bacteriophage therapy* (Rapor No. WHO/EURO: 2025-11441-51213-78039). https://www.who.int/europe/publications/i/item/WHO-EURO-2025-11441-51213-78039

Yokokura, T., Kodaira, S., Ishıwa, H. and Sakuria, T., 1974. Lysogeny in lactobacilli. Journal of General Microbiology, 84, 277-284.

EKLER

T.C.
RİZE BELEDİYE BAŞKANLIĞI
Su ve Kanalizasyon İşleri Müdürlüğü

Sayı :E- 74201860-314.07.06-232296
Konu : Bilimsel Proje Hk.

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı

İlgi : 04.11.2022 tarihli 10136 sayılı yazınız.

İlgi Yazınızda Belirtmiş olduğunuz Rize ve Çevresindeki Atık Sulardan Patojen Bakterileri Enfekte Eden Bakteriyofajların İzolasyonu adlı çalışma kapsamında tarafımızdan ihtiyaç duyulması halinde Belediyemiz atıksularından gözetimimiz altında su örneği alınmasında tarafımızdan herhangi bir sakınca görülmemektedir.Su örneği alacağınız tarihi tarafımıza bildirmeniz halinde konuyla ilgili personel desteği tarafınıza verilecektir.

Bilgilerinize rica ederim.

Muhittin Aydın BİLSEL
Başkan a.
Başkan Yardımcısı

Bu belge 5070 Sayılı Kanun gereğince E-imza ile imzalanmıştır.
Bu belgenin kontrolü 16678958687791#1 belge takip no ile http://www.rize.bel.tr e-belediye uygulaması üzerinden sağlanabilir.

Adres: Rize Belediyesi Piriçelebi Mah Menderes Bulv. No:182 Merkez\RİZE Bilgi İçin : ZEYNEP KASPAROĞLU
Tel : 444 50 53 Faks: () Dahili : 3319
Elektronik Ağ: www.rize.bel.tr, KEP Adresi: rizebelediyesi@hs01.kep.tr

ETİK KURUL KARARI

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Sayı : E-10840098-772.02-7780 26/12/2022

Konu: Etik Kurulu Kararı

BAŞVURU BİLGİLERİ	**ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI**	Rize ve Çevresindeki Atık Sulardan Patojen Bakterileri Enfekte Eden Bakteriyofaj İzolasyonu			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrağınızı https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys linkinden CEBB4AEBX3 kodu ile dogrulayabilirsiniz.

Sa

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
Değerlendirilen Belgeler	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
Karar Bilgileri	**Karar No: 1149**	**Tarih: 22/12/2022**		
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna **"oybirliği"** ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ	Tıp Tarihi ve Etik	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	E imzalıdır
Prof. Dr. Mete ÜNGÖR	Endodonti	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	E imzalıdır
Doç. Dr. Mehmet Kemal ÖZDEMİR	Elektrik ve Elektronik	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	E imzalıdır
Doç. Dr. İlknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	E imzalıdır
Doç. Dr. Devrim TARAKCI	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	E imzalıdır
Dr. Öğr. Üyesi Neziha HACIHASANOĞLU ÇAKMAK	Biyokimya	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	E imzalıdır
Dr. Öğr. Üyesi Pakize YİĞİT	Sayısal Yöntemler/ Biyoistatistik	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı

* :Toplantıda Bulunma

Girişimsel Olmayan Etik Kurulu Sekreteri
Bilge KAYA

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrağınızı https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys linkinden CEBB4AEBX3 kodu ile dogrulayabilirsiniz.