ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Behzad HESHMATI

BAKTERİYOFAJLARIN BAZI GIDA VE KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Salmonella* spp. VE *Salmonella* BİYOFİLMİ ÜZERİNE ETKİSİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2019

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAKTERİYOFAJLARIN BAZI GIDA VE KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Salmonella* spp. VE *Salmonella* BİYOFİLMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Behzad HESHMATI

DOKTORA TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 18/03/2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

……	……	……
Prof. Dr. Işıl VAR	Prof. Dr. Fatih KÖKSAL	Prof. Dr. Burhan ARIKAN
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

…….	……...
Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ	Prof. Dr. Mehmet Sami SERİN
ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2016-7327

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

BAKTERİYOFAJLARIN BAZI GIDA VE KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Salmonella* spp. VE *Salmonella* BİYOFİLMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Behzad HESHMATI

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Işıl VAR
Yıl: 2019, Sayfa: 145
Jüri : Prof. Dr. Işıl VAR
: Prof.Dr. Fatih KÖKSAL
: Prof.Dr. Burhan ARIKAN
: Prof.Dr. Neslihan DİKBAŞ
: Prof. Dr. Mehmet Sami SERİN

Salmonella ve *Salmonella* biyofilmi dünya genelinde öncelikle gıda sektörü ve klinikde gastrointestinal rahatsızlıklara neden olmaktadır. Son yıllarda antibiyotikler ve dezenfektanlar patojenlere ve onların biyofilm yapılarına karşı etkili olamamaktadır. Bu nedenle bakteriyofaj terapisi gibi yeni mücadele yöntemleri ortaya konmaktadır.

Bu çalışmada bakteriyofajların *Salmonella* spp. ve *Salmonella* biyofilmi üzerine etkisini araştırmak için 191 adet Gıda örneği (24'ü tavuk eti, 63'ü balık eti, 22'si kırmızı et, 72'si yer fıstığı ve 10'u çeşitli sebzeler), 37 adet gıda işletmesinden alınan tüm malzeme ve ekipman yüzey örnekleri, 9 adet su örneği (seyhan nehri, seyhan gölü, sulama kanalı, kanalizasyon suları ve süt işletmesi atık suları) ve klinik örnek olarak 43 safra taşı ve 25 diş örneği incelenmiştir. Bakteriyofaj olarak ise bu çalışmada 4 adet su örneğinden izole edilen fajlar ve ve Hollanda'dan temin edilen Salmonellex™ fajı kullanılmıştır. Sonuç olarak 37 gıda işletme yüzeyinin 12'sinde, 24 tavuk etinin 22'sinde, 22 kırmızı etin 12'sinde, 9 su örneğinin 3'ünde ve 25 diş örneğinin 2'inde toplamda 51 *Salmonella* spp. izolatı elde edilmiştir. Şüpheli bu *Salmonella* spp. izolatların PCR ve API 20E test kiti ile doğrulanmaları yapıldığında 48 izolatın *Salmonella* spp. olduğu belirlenmiştir. *Salmonella* bakteriyofajı izolasyonunda da analize alınan 8 su örneğinin sadece 4'ünden izolasyon gerçekleştirilmiştir. İzole edilen bu fajlar TEM ile hücre morfolojisi ve PFGE yapılarak genom büyüklüğü değerlendirilmiştir. PSCs1, PSDs1, PSSr1 ve PSMc1 olarak kodlanmış olan fajların *Miyoviridae* ailesine, PSCs2'nin ise *Siphoviridae* ailesine ait olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ticari olarak kullanılan Salmonellex™ faj preparatının içeriği incelendiğinde *Miyoviridae* ailesinden iki farklı bakteriyofaj bulundurduğu gözlenmiştir. Analize alınan örneklerden izole edilen seçilmiş 5 *Salmonella* spp.ve referans suşa mikroplakada,çelik yüzeyde safra taşında ve diş örneklerinde biyofilm oluşturulmuştur. Mikroplaka'da oluşturulmuş olan *Salmonella* biyofilm üzerine izole edilen fajların ve Salmonellex™ fajının azalma etkisi incelendiğinde PSDs1 bakteriyofajı 10^{11} PFU/mL'lik bir titrede, % 65.6 olarak en yüksek etkiyi göstermiştir. Safra taşları ve diş örnekleri ve çelik yüzeyinde oluşturulan aynı suşlara ait biyofilmler üzerine ise araştırmada kullanılan 6 faj'ın hepsinin yine10^{11} PFU/mL'lik faj titresinde etkili olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Salmonella*, *Salmonella* biyofilm, *Salmonella* bakteriyofajı

ABSTRACT

PhD THESIS

THE EFFECT OF BACTERIOPHAGES ON *Salmonella* spp, and *Salmonella* BIOFILMS WHICH WERE ISOLATED FROM SOME FOOD AND CLINICAL SAMPLES

Behzad HESHMATI

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Işıl VAR
Year: 2019, Page: 145
Jury : Prof. Dr. Işıl VAR
: Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
: Prof. Dr. Burhan ARIKAN
: Prof.Dr. Neslihan DİKBAŞ
: Prof. Dr. Mehmet Sami SERİN

Salmonella and *Salmonella* biofilms cause gastrointestinal disturbances in the food sector and clinics worldwide. In recent years, antibiotics and disinfectants have not been effective against pathogens and their biofilm structures. Therefore, new methods of struggle, such as bacteriophage therapy, are introduced.

In this study, *Salmonella* spp. and 191 food samples to investigate the effect on *Salmonella* biofilms (24 chicken meat, 63 fish meat, 22 red meat, 72 peanuts and 10 various vegetables), all food taken from 37 food enterprises and equipment surface samples, 9 water samples (seyhan river, seyhan lake, irrigation canal, sewage water and milk processing wastewater) and 43 gallstones and 25 dental samples were examined as clinical samples. In this study, phages isolated from 4 water samples and Salmonellex ™ phage obtained from Holland were used as bacteriophage. As a result, a total of 51 *Salmonella* spp isolates were obtained in 12 of the 37 food operating surfaces, 22 of the 24 chicken meat, 12 of 22 red meat, 3 of 9 water samples and 2 of 25 tooth samples. When the suspected *Salmonella* spp isolates were confirmed by PCR and API 20E assay, 48 isolates were identified as *Salmonella* spp. Isolation from only 4 of the 8 water samples analyzed for *Salmonella* bacteriophage isolation was performed. These isolated phages were evaluated by cell morphology and PFGE by TEM. PSCs1, PSDs1, PSSr1 and PSMc1 were coded as *Miyoviridae* family, PSCs2 was determined to belong to *Siphoviridae* family. In addition, the content of the commercially used Salmonellex ™ phage preparation revealed two different bacteriophages from the *Miyoviridae* family. In the microplate, on the gallstone, on the steel surface and in the dental samples the biofilms were generated from the reference strain, with the selected 5 *Salmonella* spp which were isolated from the analyzed samples. When examined the effect of Salmonellex™ phage, and isolated phages on the *Salmonella* biofilm in microplates,PSDs1 bacteriophage showed the highest effect at a titer of 10^{11} PFU / mL,as 65.6%. In the phage titre of 10^{11} PFU / mL of all 6 phages used in the study were found to effect the biofilms which were generated on gallstones, on dental samples, and on steel surface.

In this study, it was determined that other *Salmonella* bacteriophages, including the commercial *Salmonella* phage preparation, limited effect, or had no effect on for all *Salmonella* species and subspecies and that cocktails containing different *Salmonella* phages were required to be diversified.

Keywords: *Salmonella*, *Salmonella* biofilm, *Salmonella* bacteriophage

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Bakteriyofajların bazı gıda işletmeleri ve klinik örneklerden izole edilen *Salmonella* spp. ve *Salmonella* biyofilmi üzerine etkisinin çalışıldığı bu çalışmada; *Salmonella* izolasyonu için Adana'da tüketime sunulan farklı bölgelerden 191 adet Gıda örneği (24'ü tavuk eti, 63'ü balık eti, 22'si kırmızı et, 72'si yer fıstığı ve 10'u çeşitli sebzeler), 37 adet gıda işletmesi (işletmede bulunan tüm malzeme ve ekipman yüzeyleri), 9 adet su örneği (seyhan nehri, seyhan gölü, sulama kanalı, kanalizasyon suları ve süt işletmesi atık suları) ve Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi genel cerrahi bölümü ve diş hekimliği bölümünden temin edilen 68 adet klinik örneği (43'ü safra taşı ve 25'i diş örneklerinden) olmak üzere toplamda 296 örnek materyal olarak soğuk zincir altında laboratuvara getirilmiş ve aynı gün içinde analize alınmıştır.

Analize alınan gıda örnekleri olarak, 24 tavuk eti örneğinin 24'ünde, 22 kırmızı et örneğinin 22'sinde, gıda işletmesi olarak yüzeylerden alınan 37 örneğin 15'inde, su örnekleri olarak 9 örneğin 3'ünde ve klinik örnekleri olarak 25 diş örneğinin 14'ünde *Salmonella* spp. şüpheli koloniler bulunduğu tespit edilmiştir. *Salmonella* spp. şüpheli koloniler olarak değerlendirilen 78 izolatın byokimyasal tanımlanmalarında 51 izolatın *Salmonella* spp. olduğu gözlenmiştir. *Salmonella* spp. pozitif bulunan örneklerin hepsinin *inv*A genini hedeflemekte olan 139 ve 141 primer çiftleri kullanarak *Salmonella*'nın sp. düzeyde doğrulanması amacıyla PCR yapılmıştır ve biyokimyasal testler ile tanımlanan izolatların hepsinde pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Moleküler tanımlamasının devamında pozitif çıkan 51 izolatın spesifik olarak *Salmonella* Typhimurium için *fil*C genini hedeflemekte olan Fli 15 ve Typ04 primer çiftleri ve *S.* Enteritidis, *S.* Gallinarum ve *S.* Pullorum içinse *sef*A genini hedeflemekte olan A058 ve A01 primer çifti kullanılarak tür düzeyinde tanımlaması yapılmıştır. Tür düzeyinde tanımlanan izolatların 1'i *Salmonella* Typhimurium ve 1'inin de *Salmonella* Enteritidis olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan bakteriyofajların bir kısmı (5 tanesi) izole edilmiş ve tanımlanmış faj örnekleridir. Bunun yanı sıra Salmonellex™ fajı ticari olarak Micreos Food Safety (Hollanda) firmasından temin edilmiştir. *Salmonella* bakteriyofaj izolasyonu için Adana'da bulunan Seyhan nehri, Seyhan baraj gölü ve kanalizasyon suları olmak üzere 8 farklı yerden temin edilen su örnekleri alınmıştır. *Salmonella* bakteriyofaj izolasyonunda alınan 8 farklı kaynağın 4'ünde 5 farklı tip bakteriyofaj (PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1 ve PSMc1) izole edilmiştir. Tanımlanması yapılan bu fajlar PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1 ve PSMc1 olarak adlandırılmıştır. *Salmonella* bakteriyofajlarının hücre morfolojisini incelemek amacıyla Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) kullanılmıştır. TEM sonuçlarına dayanarak bu fajları sınıflandırmak için uluslararası virüs taksonomisi (ICTV) kılavuzları kullanılmıştır. PSCs1, PSDs1, PSSr1 ve PSMc1 olarak adlandırılan 4 fajın kasılabilen kuyrukları ve icosahedral yapıları nedeniyle *Myoviridae* familyasının morfolojik özelliklerini taşıdığı gözlemlenmiştir. PSCs2 fajının ise uzun kuyruklu ve icosahedral yapısında olduğu gözlenmiş ve bu nedenle *Siphoviridae* familyasına ait bir faj olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ticari bakteriyofaj olarak food safety firmasından temin edilmiş olan Salmonellex™ bakteriyofajının TEM'de hücre morfolojisi incelemesi yapılmıştır ve bu bakteriyofaj solüsyonunda *Miyoviridae* ailesinden olan iki tür bakteriyofaja rastlanmıştır ve hücre morfoloji açısından iki bakteriyofajdan birisinin PSCs1 ve diğerinin PSMc1 bakteriyofajlarına benzediği tespit edilmiştir. TEM yardımıyla morfolojik tanımlanması yapılan *Salmonella* bakteriyofajlarının Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) Yöntemi ile genom boyutları belirlenmiştir. Genom boyutları PSCs1 fajı için 298.25 kb, PSDs1 fajı için 294.12 kb, PSCs2 fajı için 114.48 kb, PSSr1fajı için 292.47 kb ve PSMc1 fajı için 114.55 kb olarak belirlenmiştir. İzole edilmiş ve tanımlanmış olan bakteriyofajların ilk önce *Salmonella* vejetatif hücreleri üzerine etkisine bakılmıştır ve kırmızı etlerden izole edilmiş olan *Salmonella* spp.'ler hariç diğer tüm *Salmonella* spp. üzerine tek tek etkili oldukları tespit edilmiştir.

Salmonella biyofilmleri üzerine faj etkisini incelemek amacıyla 96 kuyucuklu mikroplaka'da *Salmonella* biyofilmleri oluşturulmuş ve 6 bakteriyofajın

(PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1, PSMc1 ve Salmonellex™) her birinin farklı titrelerde (10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10} ve 10^{11} PFU/ml) bu oluşturulan biyofilmler üzerine etkisi 6. ve 24. saatte incelenmiştir. *Salmonella* bakteriyofajlarının *Salmonella* biyofilmler üzerine azalma etkisi yüzde olarak hesaplanmıştır.

Çalışmada izole edilmiş olan tüm bakteriyofajlar ve ticari olarak temin edilen Salmonellex bakteriyofajı, tavuklardan izole edilmiş olan *Salmonella* spp. izolatı ile oluşturulan biyofilm üzerine farklı titrelerde etkiler göstermiştir. Biyofilm üzerine en yüksek etkiyi 10^{11} PFU/ml'lik titrede Salmonellex™ bakteriyofajı 6. saatte (%45.7 azalma) ve PSDs1 bakteriyofajı 24. saatte (%65.6 azalma) gostermiştir. PSSr1 bakteriyofajı ise biyofilm üzerine en az etkiyi 10^5 PFU/ml'lik titrede 6. saatte (%10.1 azalma) ve PSCs2 bakteriyofajı 24. saatte (%25.1 azalma) göstermiştir.

Ticari olarak temin edilen bakteriyofaj dahil çalışmada kullanılan tüm fajların etkileri referans suş olarak temin edilen ATCC®13076™ kodlu *Salmonella* spp. ile yapılan biyofilmi üzerine de araştırılmış ve bu biyofilm üzerine en yüksek etkinin 10^{11} PFU/ml'lik titrede PSCs1 bakteriyofajının %39.7 azalma ile 6. saatte PSDs1 bakteriyofajının %68.4 azalma ile 24. saatte olduğu görülmüştür. Salmonellex™ bakteriyofajının oluşturulan bu biyofilm üzerine 10^5 PFU/ml'lik titrede 6. saatte %4.2 azalma ile ve 24. saatte %16.5 azalma ile en az etkili bakteriyofaj olduğu tespit edilmiştir.

Klinik örnek olarak alınan safra taşı ve diş örneklerinde biyofilm yapılarının varlığı SEM ile araştırılmıştır. Hem safra taşları hem de diş örneklerinde biyofilmlerin varlığı tespit edilmiş fakat inceleme sonucunda bu biyofilmlerin *Salmonella* biyofilmi olmadığı gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra her iki örnekte *Salmonella* vejetatif hücreye de rastlanmamıştır.

Ayrıca, Salmonellex™ fajı ve diğer izolasyonu yapılan çalışmada kullanılan tüm fajların kırmızı et örnekleri ve doğrama tahtası yüzeyinden izole edilmiş *Salmonella* Pullorum olarak tanımlanan izolatlara etkili olmadığı da görülmüştür.

Sonuç olarak; hem gıda endüstrisinde hem de kliniklerde sorun yaratan ve birçok antibiyotiğe dirençli olduğu bilinen *Salmonella* spp.ve onların oluşturabildikleri biyofilmlerle biyolojik mücadelede *Salmonella* bakteriyofajlarının etkilerinin yüksek olduğu görülmüştür. Fakat bu çalışmada ticari *Salmonella* faj preparatı dahil diğer *Salmonella* bakteriyofajlarının tüm *Salmonella* tür ve alt türlerine etkilerinin olmadığının tespit edilmesi farklı *Salmonella* fajlarını içeren kokteyllerin çeşitlendirilerek hazırlanmasının gerekli olduğunu göstermiştir.

TEŞEKKÜR

Bana bu tez konusunu veren ve çalışmalarım süresince en iyiyi ortaya koymak için her türlü desteği veren, bilgi ve tecrübesiyle beni bu hususta yönlendiren ve tezimin değerlendirilmesinde ve yazımında engin deneyimlerinden yararlandığım değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Işıl VAR'a, teşekkürü bir borç bilirim.

Analizlerin yapılması sırasında laboratuvar ve desteklerini esirgemeyen sayın Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU, Prof. Dr. Fatih KÖKSAL, Prof. Dr. Ebru KAFKAS, Prof. Dr. Sait POLAT'a ve tez analizleri ve hazırlama aşamasında değerli arkadaşlarım Havvanur SAĞLAM, Çağrı ÇELİK ve Seda Yılmaz'a Çukurova Üniversitesi Merkez laboratuvarına ve analizlerim sırasında her türlü olanağı sağlayan Biyoteknoloji merkezi ekibine teşekkür ederim.

Beni yetiştiren ve yaşamım boyunca bana maddi ve manevi destek veren sevgili babam, annem, kardeşlerime ve değerli eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR VII
İÇİNDEKİLER VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ XIV
ŞEKİLLER DİZİNİ XVI
SİMGELER VE KISALTMALAR XX
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 29
2.1. Çeşitli Gıda ve Klinik Örneklerden *Salmonella* spp. İzolasyonu Üzerine Yapılan Çalışmalar 29
2.2. Çeşitli Gıda ve Klinik Örneklerden İzole Edilen *Salmonella* Biyofilmi İle İlgili Yapılan Çalışmalar 32
2.3. Çeşitli Fajların Konakçıları Üzerine Etkilerinin Araştırıldığı Çalışmalar 34
3. MATERYAL YÖNTEM 39
3.1. Materyal 39
3.1.1. Besiyerleri 39
3.1.1.1. Tamponlanmış Peptonlu Su 40
3.1.1.2. Rappaport-Vassiliadis *Salmonella* broth 40
3.1.1.3. Selenite Cystine Enrichment broth 40
3.1.1.4. Hektoen Enteric agar 40
3.1.1.5. Xylose Lysine Deoxycholate agar 41
3.1.1.6. Tryptic Soy Agar (TSA) 41
3.1.1.7. Triple Sugar Iron Agar 42
3.1.1.8. Lysine Iron Agar 42
3.1.1.9. Simmons Citrate Agar 42

3.1.1.10. SIM Medium 43
3.1.1.11. Üre broth 43
3.1.1.12. Luria Bertani (LB) Broth ve Agar 43
3.1.1.13. Tuzsuz (NaCl'siz) Luria Bertani (LB) Broth ve Agar 44
3.1.2. Çözelti ve Solusyonlar 44
3.1.2.1. PBS (Fosfat Salin Tamponu) 44
3.1.2.2. SF (Serum Fizyolojik) 44
3.1.2.3. Alkol/Aseton Çözeltisi 45
3.1.2.4. %0.8 Agaroz jel 45
3.1.2.5. %10'luk SDS çözeltisi 45
3.1.2.7. Tris-EDTA 45
3.1.2.8. %2.5 Glutaraldehide 46
3.1.2.9. %1'lik Uranyl acetate 46
3.1.2.10. TBE Buffer 46
3.1.2.11. Gel Loading Buffer 47
3.1.3. PCR 47
3.2. Yöntem 48
3.2.1. *Salmonella*'nın Klasik Yöntem İle İzolasyonu ve Tanımlanması 48
3.2.1.1. Gıda Örneklerinden, Gıda İşletme Yüzeylerinden, Safra Taşlarından ve Diş Örneklerinden *Salmonella* İzolasyonu 48
3.2.1.2. İzole Edilen *Salmonella'* ların Tanımlaması 49
3.2.1.2.(1). Biyokimyasal Tanımlama 49
3.2.1.2.(1).a. Gram Boyama 49
3.2.1.2.(1).b. Hareket Testi 50
3.2.1.2.(1).c. İndol Testi 50
3.2.1.2.(1).d. Sitrat Testi 50
3.2.1.2.(1).e. Üre Testi 51
3.2.1.2.(1).f. Triple Sugar Iron Agar (TSI) Testi 51
3.2.1.2.(1).g. Lysin Iron Agar Testi 51

3.2.1.2. (2). API 20E Testi 51
3.2.1.2.(3). Moleküler Tanımlama 52
3.2.1.2.(3).a. Kaynatma Yöntemi ile Kolonilerden DNA İzolasyonu 52
3.2.1.2.(3).b. DNA İzolatlarının amplifikasyonu 52
3.2.2. *Salmonella* Biyofilm İzolasyonu ve Tanımlanması 53
3.2.2.1. Safra Taşları ve Diş Örneklerinden *Salmonella* Biyofilm İzolasyonu 53
3.2.2.2. *Salmonella* spp.'lere Biyofilm Oluşturulması 53
3.2.2.2.(1). Milroplaka Metodu ile *Salmonella* spp.'lerin Biyofilm Oluşturulması 53
3.2.2.2.(2). Safra Taşları ve Diş Örnekleri Üzerinde *Salmonella* spp.'lere Biyofilm Oluşturulması 54
3.2.2.2.(3). *Salmonella* biyofilmlerin tanımlanması 55
3.2.2.2.(1).a. Scaning Elektron Mikroskobuyla (SEM) Biyofilmlerin Tanımlanması 55
3.2.3. *Salmonella* Bakteriyofaj İzolasyonu ve Tanımlanması 56
3.2.3.1. *Salmonella* Bakteriyofaj İzolasyonu 56
3.2.3.2. Çift Tabaka Agar Metodu İle *Salmonella* Bakteriyofaj Titresinin Hesaplanması 56
3.2.3.3. İzolasyonu Yapılan *Salmonella* Bakteriyofajının Saflaştırması 57
3.2.3.4. Saflaştırılmış *Salmonella* Bakteriyofajının Tanımlanması 58
3.2.3.4.(1). Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) İle Bakteriyofajların Tanımlanması 58
3.2.3.4.(2). Faj genom büyüklüğünün belirlenmesi 59
3.2.4.1. *Salmonella* Vejetatif Hücreleri Üzerine Bakteriyofajların Etkisi 60
3.2.4.2. *Salmonella* Biyofilmi Üzerine Bakteriyofajların Etkisi 60

3.2.4.2.(1). Mikroplakada Geliştirilen *Salmonella* Biyofilm Üzerine *Salmonella* Bakteriyofajlarının Etkisi 60
3.2.4.2.(2). Safra Taşı ve Diş Plakları Üzerinde *Salmonella* Biyofilm Geliştirilmesi ve *Salmonella* Bakteriyofajlarının Oluşturulan Biyofilmler Üzerine Etkisi 61
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 63
4.1. *Salmonella*'nın Klasik Yöntem İle İzolasyonu ve Tanımlanması 63
4.1.1. Gıda, Klinik ve Su Örneklerinde *Salmonella* İzolasyonu 63
4.1.1.1. Şüpheli *Salmonella* spp.'lerin Koloni Morfolojileri 63
4.1.1.2. Gıda, Klinik ve Su Örneklerinden İzole Edilen Şüpheli *Salmonella* spp.'lerin Hücre Morfolojileri 65
4.1.1.3. Gıda, Klinik ve Su Örneklerinden İzole Edilen Şüpheli *Salmonella* spp.'lerin Biyokimyasal Olarak Tanımlanmaları 67
4.1.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İle *Salmonella* spp.'lerin Tür Bazında Tanımlanması 69
4.1.1.4.(1). *Salmonella* spp.'lerin *inv*A Genini Hedeflemekte Olan 139 ve 141 Primer Çifti Kullanılarak Tanımlanması 69
4.1.1.4.(2). *fil*C genine özgü Fli 15 ve Typ 04 Primer çifti kullanılarak *Salmonella* Typhimurium'un Tanımlanması 70
4.1.1.4.(3). *sef*A genine özğü A058 ve A01 Primer Çifti Kullanılarak *S.* Enteritidis, *S.* Gallinarum ve *S.* Pullorum 'un Tanımlanması 71
4.1.1.5. Gıda, Klinik ve Su Örneklerinden İzole Edilen Şüpheli *Salmonella* spp.'lerin API 20E Test Kiti İle Tanımlanması 73
4.2. *Salmonella* Bakteriyofaj İzolasyonu ve Tanımlanması 76
4.2.1. *Salmonella* Bakteriyofaj İzolasyonu 76

4.2.2. İzolasyonu Yapılan *Salmonella* Bakteriyofajının Saflaştırması 77
4.2.3. Çift Tabaka Agar Metodu İle *Salmonella* Bakteriyofaj Titresinin Hesaplanması 78
4.2.4. İzole Edilen *Salmonella* Bakteriyofajının Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) İle Moleküler Tanımlanması 85
4.3. Diş ve Safra Taşlarından Biyofilm İzolasyonu 86
4.4. Gıda ve klinik Örneklerden İzole Edilen *Salmonella* spp.'lerin Biyofilm Oluşturma Yetenekleri 88
4.4.1. Mikroplaka Metodu İle *Salmonella* spp.'lerin Biyofilm Oluşturulması 88
4.4.2. Safra taşları ve Diş Örnekleri üzerinde *Salmonella* spp.'lere biyofilm oluşturulması 89
4.5. *Salmonella* Vejetatif Hücreleri ve *Salmonella* Biyofilmi Üzerine Bakteriyofajların Etkisi 91
4.5.1. *Salmonella* Vejetatif Hücreleri Üzerine Bakteriyofajların Etkisi 91
4.5.2. *Salmonella* Biyofilmi Üzerine Bakteriyofajların Etkisi 95
4.5.2.1. Mikroplakada Geliştirilen *Salmonella* Biyofilm Üzerine *Salmonella* Bakteriyofajlarının Etkisi 95
4.5.2.2. Safra Taşı, Diş Örnekleri, Paslanmaz Çelik ve LB Agar Üzerinde *Salmonella* Biyofilm Geliştirilmesi ve *Salmonella* Bakteriyofajlarının Oluşturulan Biyofilmler Üzerine Etkisi 109
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 127
KAYNAKLAR 129
ÖZGEÇMİŞ 143
EKLER 144

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Mevcut *Salmonella* sınıflandırmasına genel bakış..... 4
Çizelge 1.2. Yüzeylerde *Salmonella* Biyofilm Oluşumu İçin Önemli Yapısal Belirleyiciler 20
Çizelge 3.1. PCR işleminde kullanılan primerler..... 47
Çizelge 4.1. Örneklerden izole edilen şüpheli *Salmonella* spp. izolatlarının örneklere ve alınan yerlere göre dağılımı 64
Çizelge 4.2. Gıda, Klinik ve Su Örneklerinden izole edilen ve gram boyama sonucu şüpheli *Salmonella* spp. olarak belirlenen örnekler ve izolasyon kaynakları 66
Çizelge 4.3. Şüpheli *Salmonella* izolatlarına uygulanmış bazı biyokimyasal tanımlama testleri..... 67
Çizelge 4.4. PCR yöntemi ile tanımlanan şüpheli *Salmonella* spp. izolatlarının API 20E test kiti ile doğrulanması..... 74
Çizelge 4.5. *Salmonella* bakteriyofajlarının izole edildiği kaynaklar ve faj plak sayım sonuçları. 79
Çizelge 4.6. İzole edilen beş *Salmonella* bakteriyofajının morfolojik ve yapısal özellikleri. 83
Çizelge 4.7. PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1, PSMc1 ve ticari olarak temin edilen Salmonellex™ bakteriyofajlarının farklı kaynaklardan izole edilen bazı *Salmonella* spp. ler üzerine lizis etkisi..... 92

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. İnsanda *Salmonella* enfeksiyonunun patogenesisi. 7
Şekil 1.2. Biyofilmin Yaşam Döngüsü. 13
Şekil 1.3. *Salmonella*'nın safra taşları üzerinde biyofilm oluşturma mekanizması 18
Şekil 1.4. Kuyruklu faj aileleri 23
Şekil 1.5. Litik döngü ve lizogeni. 25
Şekil 3.1. Kaplama cihazı (Q150R Plus), Scaning Elektron Mikroskobu 55
Şekil 3.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) için bakteriyofaj preparatının hazırlanması. 59
Şekil 4.1. XLD Agar'da şüpheli *Salmonella* spp. kolonilerinin görüntüsü 63
Şekil 4.2. *inv*A'ya özgü 139 (1) ve 141 (1) primer çifti kullanılarak yapılan *Salmonella* spp.'nin pozitif örneklere ait jel görüntüsü..... 70
Şekil 4.3. *fil*C' genine özgü Fli 15 (2) ve Typ04 (2) primer çifti kullanılarak *Salmonella* Typhimurium'un pozitif örneklere ait jel görüntüsü. 71
Şekil 4.4. *sef*A'ya özgü A058(3) ve A01(3) primer çifti kullanılarak *S.* Enteritidis, *S.* Gallinarum ve *S.* Pullorum'un pozitif örneğe ait jel görüntüsü. 72
Şekil 4.5. Kanalizasyon sularından, yüksek devirde santrifüj yapılarak, *Salmonella* bakteriyofaj izolasyonu. 76
Şekil 4.6. Saflaştırılmış olan *Salmonella* faj plaklarının çift tabaka agar üzerinde görüntüsü. 77
Şekil 4.7. PSCs1 bakteriyofajının hücre morfolojisi. 80
Şekil 4.8. PSDs1 bakteriyofajının hücre morfolojisi. 80
Şekil 4.9. PSCs2 bakteriyofajının hücre morfolojisi. 81
Şekil 4.10. PSSr1 bakteriyofajının hücre morfolojisi. 81
Şekil 4.11. PSMc1 bakteriyofajının hücre morfolojisi. 82

Şekil 4.12. Salmonellex™ bakteriyofajının hücre morfolojisi 83
Şekil 4.13. Pulsed-field gel electrophorezi (PFGE) kullanarak bakteriyofaj genom büyüklüğünün görüntüsü.. 85
Şekil 4.14. Safra taşı yüzeyinde görüntülenen biyofilm yapısı. 87
Şekil 4.15. Diş örnekleri yüzeyinde görüntülenen biyofilm yapısı. 87
Şekil 4.16. Mikroplaka üzerinde *Salmonella* biyofilm oluşturması. 88
Şekil 4.17. 96 kuyucuklu mikroplaka üzerinde yaptırılan *Salmonella* biyofilmi 89
Şekil 4.18. Safra taşı yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilm görüntüsü..... 90
Şekil 4.19. Diş örnekleri yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilm görüntüsü..... 90
Şekil 4.20. Lam yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilm görüntüsü. 91
Şekil 4.21. GKKi3 kodlu *Salmonella* spp. vejetatif hücresi üzerine bakteriyofajların lizis etkisinin damlatma tekniği ile gösterilmesi 93
Şekil 4.22. PSCs1 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde *Salmonella* biyofilmine etkisi..... 95
Şekil 4.23. PSDs1 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde *Salmonella* biyofilmine etkisi..... 96
Şekil 4.24. PSCs2 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde *Salmonella* biyofilmine etkisi..... 97
Şekil 4.25. PSSr1 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde *Salmonella* biyofilmine etkisi..... 98
Şekil 4.26. PSMc1 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde *Salmonella* biyofilmine etkisi..... 99
Şekil 4.27. Salmonellex™ bakteriyofajının mikroplaka üzerinde *Salmonella* biyofilmine etkisi..... 100
Şekil 4.28. PSCs1 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde ATCC®13076™ biyofilmine etkisi..... 102

Şekil 4.29. PSDs1 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde ATCC®13076™ biyofilmine etkisi..... 103
Şekil 4.30. PSCs2 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde ATCC®13076™ biyofilmine etkisi..... 104
Şekil 4.31. PSSr1 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde ATCC®13076™ biyofilmine etkisi..... 105
Şekil 4.32. PSMc1 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde ATCC®13076™ biyofilmine etkisi..... 106
Şekil 4.33. Salmonellex™ bakteriyofajının mikroplaka üzerinde ATCC®13076™ biyofilmine etkisi. 107
Şekil 4.34. Safra taşı yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. bu biyofilm üzerine PSCs1 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi..... 110
Şekil 4.35. Diş örnekleri yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. bu biyofilm üzerine PSCs1 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi 111
Şekil 4.36. Safra taşı yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. bu biyofilm üzerine PSDs1 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi..... 112
Şekil 4.37. Diş örnekleri yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. bu biyofilm üzerine PSDs1 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi..... 113
Şekil 4.38. Safra taşı yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. bu biyofilm üzerine PSCs2 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi..... 114
Şekil 4.39. Diş örnekleri yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. bu biyofilm üzerine PSCs2 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi 115
Şekil 4.40. Safra taşı yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. bu biyofilm üzerine PSSr1 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi 116
Şekil 4.41. Diş örnekleri yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi bu biyofilm üzerine PSSr1 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi..... 117
Şekil 4.42. Safra taşı yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi bu biyofilmin üzerine PSMc1 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi..... 118

Şekil 4.43. Diş örnekleri yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. bu biyofilm üzerine PSMc1 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi 119
Şekil 4.44. Safra taşı yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. bu biyofilm üzerine Salmonellex™ bakteriyofajının 24. Saatte etkisi..... 120
Şekil 4.45. Diş örnekleri yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. bu biyofilm üzerine Salmonellex™ bakteriyofajının 24. Saatte etkisi 121
Şekil 4.46. Paslanmaz çelik yüzeyinde oluşan GBTT1 kodlu *Salmonella* biyofilmi ve bu biyofilm üzerine izole edilmiş olan PSDs1 bakeriyofajın etkisi. 123
Şekil 4.47. Paslanmaz çelik yüzeyinde oluşan ATCC®13076™ kodlu *Salmonella* biyofilmi ve bu biyofilm üzerine izole edilmiş olan PSDs1 bakeriyofajın etkisi. 124
Şekil 4.48. LB agar yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi ve bu biyofilm üzerine bakeriyofajların etkisi. 126

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
µg	Mikrogaram
µl	Mikro Litre
AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Ag	Antijen
Bcf	Bovine Cholonization Factor (Sığır Kolonizasyon Faktörü)
BIMs	Bacteriophage Insensitive Mutants (Bakteriyofaja Duyarsız Mutantlar)
Bp	basepair (Baz Çift)
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi)
Kob	Koloni Oluşturan Birim
cm^2	Santimetre Kare
CR	Congo red (Kongo Kırmızısı)
Csg	Curli Fimbriae (Curli fimbrialar)
DAL	Double Agar Layer (Çift Agar Tabaka)
ddH_2O	Distile Deyonize Su
dH_2O	Distile Su
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dsDNA	Double strand DNA (Çift İplikli Deoksiribo Nükleik Asit)
EDTA	Etilendiamintetra Asetikasit
EPS	Exopolysaccharide (Ekzopolisakkarit)
Fim	Fimbriae
FTS	Fiziyolojik Tuzlu Su

g	gram
GC	Gallbladder Cancer (Safra Kesesi Kanseri)
H_2O_2	Hidrojen Peroksid
H_2S	Hidrojen Sülfür
HCl	Hidroklorik Asit
HEA	Hektoen Enteric Agar
ISO	International Organization for Standardization (Uluslararası Standardizasyon Örgütü)
Kbp	Kilo Baz Çift
L	Litre
LB	Lauril Bertani
Lpf	Long Polar Fimbriae (Uzun Polar Fimbria)
LPS	Lipopolisakkarit
M	Molar
Mg	mili gram
Ml	Mili Litre
Mm	Mili Metre
MR	Metil Red
NA	Nurient Agar
NaCl	Sodyum Klorür (Tuz)
Nm	Nano Metre
^oC	Derece Santigrad
OD	Optical density (Optik Yoğunluk)
OM	outer membrane (Dış Membran)
ONPG	O-nitrophenyl-beta-D-galactopyranside
PBS	Phosphate-buffered saline (Fosfat Tamponu)
PCR	Polymerase chain reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
Pef	Plasmid Encoded Fimbriae (kodlanmış plazmid fimbria)

pfu	plaque formation unit (Plak oluşturma birimi)
PVC	Polivinilklorid
rdar morphotype	Red, Dry and Rough morphotype (kırmızı, kuru, pürtüklü koloni yapısı)
RNA	Ribo Nükleik Asit
rpm	Revolutions per minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
RVS	Rappaport-Vassiliadis Enrichment Broth
SDS	Sodyum Dodesil Sulfat
SEM	Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskop)
SH	Sodyum Hipoklorit
TEM	Transmission Electron Microscope (Geçirimli Elektron Mikroskop)
TSA	Triptik Soya Agar
TSB	Triptik Soya Broth
TSI	Triple Sugar İron
v/v	volume/volume
VP	Voges Proskaur
$^{W/o}$ NaCl	Tuzsuz
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate agar

1. GİRİŞ

Salmonella dünya genelinde gıda kaynaklı gastrointestinal enfeksiyona neden olan insanlar için en önemli enfeksiyon nedenlerinden biridir (Wang ve ark, 2015;Lertworapreecha ve ark, 2013; Chen ve ark, 2013).

Salmonella ilk olarak Daniel Elmer Salmon tarafından 1885'te tanımlanmıştır. Bu patojen ilk olarak domuzlardan izole edildiği için domuz kolerası olarak düşünülmüş ve "Domuz-cholerabacillus" adı verilmiştir. Bugün ise bu tür *Salmonella cholera-suis* diye adlandırılmaktadır (Brands, 2006).

Salmonella cinsi *Enterobacteriaceae* familyasındaki *Salmonelleae* türünde yer alan gram negatif, fakültatif anaerob, spor yapmayan, *Salmonella* Pullorum ve *Salmonella* Gallinarum hariç peritriş flagellaları ile genellikle hareketli, çubuk şekilli (0.7-1.5x2.0-5.0 μm) bakterilerdir (GÖK, 2005; Corcoran, 2013).

Salmonella mezofilik bir bakteri olup üreme sıcaklık aralığı 5-47^{o}C arasında olmasına rağmen en iyi optimum üreme sıcaklığı 35-37^{o}C'dir. Sıcaklık limitlerinde pH, su aktivitesi, tuz konsantrasyonu, organizmanın bulunduğu ortamın besin bileşenleri gibi üreme üzerine etkili diğer faktörlerle birlikte serotipe bağlı olarak farklılıklar gözlenebilir. *Salmonella* üremesi için optimum pH: 6.5-7.5 arasında olup minimum pH: 4, maksimum pH: 9'dur. pH değerleri sıcaklıkta olduğu gibi diğer faktörlere ve serotipe bağlı olarak değişiklik gösterir. *Salmonella* fakültatif aerob bir organizma (*Salmonella* oksijen olmayan ortamda üreyebilse bile oksijen bulunan ortama göre daha yavaş üreyebilmektedir) olmakla birlikte üremesinin -30 mV oksido-redoks potansiyel değerinin altında inhibe olduğu bilinmekte olup, D-glukoz ve diğer karbonhidratları (arabinoz, mannitol, mannoz, ramnoz, sorbitol, trehaloz, dulsitol ve ksilitol) fermente ederek asit ve gaz oluşturmaktadır (*S.*Typhi, *S.* Gallinarum gaz oluşturamazlar). Ayrıca oksidaz negatif, katalaz pozitif, sitratlı besiyerinde üreyebilen, genel olarak hidrojen sülfür üreten, lisin ve ornitini dekarboksile edebilen ve üreyi hidroliz edemeyen, malonat

kullanımı suşlar arasında değişiklik gösteren bir bakteridir (Karapınar ve Aktuğ Gönül., 1998).

Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi (CDC), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve bazı makalelere göre sınıflandırmada *Salmonella* cinsi altında *S. enterica ve S. bongori* olmak üzere 2 tür yer almaktadır. *Salmonella enterica*'nın Kauffmann-White sıralamasına göre altı alt türü vardır: (*S. enterica* subspecies *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV), *S. enterica* subsp. *indica* (VI). *Salmonella*'nın tür ve altür ile ilgili sıralaması Çizelge 1.1'de verilmiştir (Issenhuth-Jeanjean ve ark., 2014; Castelijn, 2013; Nalbantsoy, 2008).

Kauffman-White sınıflandırmasına bakıldığında O-polisakkarit (ayrıca O antijen veya Oside-zinciri), H-antijeni (flagella) ve Vi (kapsüler antijenler) oluşturmakta olup *Salmonella* ların serotiplere göre gruplandırılmasını sağlar (Kurtböke, 2012).

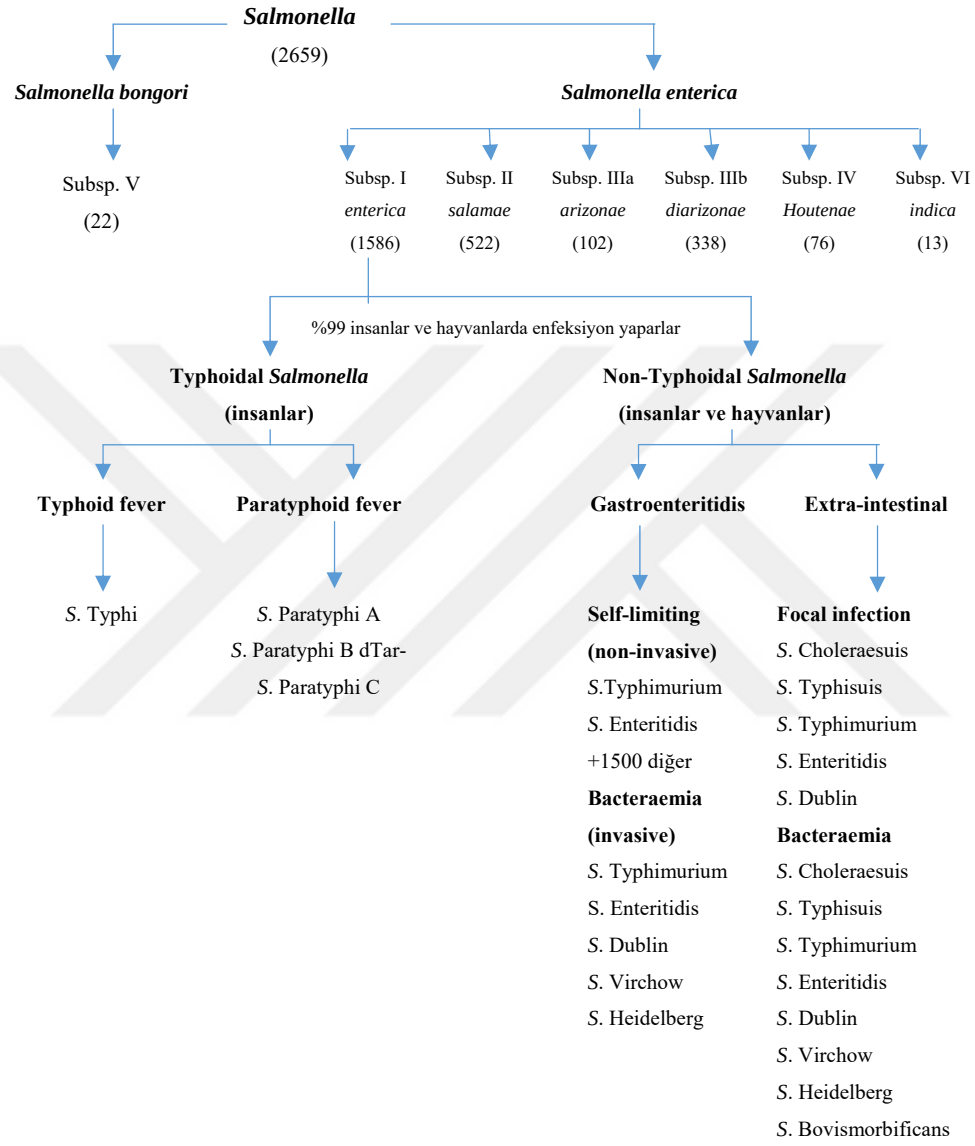
Salmonella bakterilerinin alt türlerine bakıldığında içerisinde antijen yönünden farklı yaklaşık 2659 serotip tanımlanmakta ve her yıl bu sayı artmaktadır. Bu serotipler antijen formüllerindeki farklılıklar temel anılarak ayırt edebilmekte olup sadece biyokimyasal testler ile bu ayrım yapılmaktadır (Issenhuth-Jeanjean ve ark., 2014; Castelijn, 2013; Nalbantsoy, 2008).

Salmonella türleri arasındaki ayrım homolog antiserumlar vasıtasıyla oluşan aglütinasyon reaksiyonlarıyla antijenik olarak ayırt edilebilmektedir. Her bir *Salmonella* türünün sahip olduğu antijen kombinasyonları *Salmonella* serotiplerinin her biri için o türe özeldir. Bakteriyel hücrelerin yüzeyindeki antijenlerin farklılıkları üzerine yaygın çalışmalar mevcuttur. Kaufmann-white sisteminde *Salmonella*'ların gruplandırılması, birinci derecede tanısal (diagnostik) önemi olan antijenlere (somatik, O: kapsüler, V: kamçı veya flagellar, H) numara ve harfler verilmek suretiyle yapılır ve 90'lı yılların sonlarında *Salmonella* türlerinin 2300 den fazla serotipinin tanımlanmış olduğu rapor edilmiştir.

Salmonella'lar çoğunlukla 2 genotipik (Faz 1, Faz 2) kamçı yapısına sahiptir. *Salmonella* türleri somatik O antijenik yapılarına göre A, B, C1, C2, C3, C4, D1, D2, D3, E1, E2, E3, E4, F, G1, G2, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, Y, Z, O51, O52, O53, O54, O55, O56, O57, O58, O59, O60, O61, O62, O63, O64, O65, O66, O67 olmak üzere harfler ve rakamlarla gösterilen 51 grupta toplanmaktadır (Karapınar ve Aktuğ Gönül., 1998; Schatten ve Eisenstark, 2007; Eng ve ark., 2015).

Çok sayıda alt türü bulunan *Salmonella*'nın başlıca kontaminasyon kaynaklarına bakıldığında vahşi ve evcil hayvanların (çiftlik hayvanları, kuşlar, kemirgenler) ve insanların bağırsak sistemleri olduğu görülür. Fakat zaman zaman bağırsaklar dışında vücudun diğer bölgelerinde de bulunabilmektedir. *Salmonella* hayvanların dışkısı ile doğada birçok yere yayılarak, su ve gıdaların kontamine olmasına neden olup insanların kontamine olmuş gıdaları tüketmesi sonucu zehirlenme ve hastalıklar görülmektedir. *Salmonella* türlerinin neden olduğu gastroenteric rahatsızlıkara genel olarak Salomonellosis enfeksiyonları denilmektedir (Antunes ve ark., 2016). Yumurta, kümes hayvanları, et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri Salmonellosis enfeksiyonlarına en yaygın neden olan ürünlerdir. Bunun yanı sıra hayvansal kaynaklı olmayan hindistan cevizi, toz biber, susam ve ürünleri (tahin ve tahin helvası), arpa, kakao tohumları ve çikolata, yanısıra soya fasülyesi sosu, elma suyu gibi bitkisel kaynaklı gıdalarda da *Salmonella* enfeksiyonlarına rastlandığı bildirilmektedir (GÖK, 2005). Çizelge 1.1'de Mevcut *Salmonella* sınıflandırması verilmiştir.

Çizelge 1.1. Mevcut *Salmonella* sınıflandırmasına genel bakış (Issenhuth-Jeanjean ve ark., 2014;Achtman ve ark, 2012)



Genel olarak *Salmonella*'ların neden olduğu hastalıklar Salmonellosis olarak adlandırılmaktadır. Salmonellosis tüm dünyada yaygın olarak görülen ve milyonlarca kişiyi etkileyen, aynı zamanda belirgin düzeyde ölümlere yol açan önemli bir halk sağlığı sorunudur (Castelijn., 2013).

Salomonellosis de *Salmonella*'ların değişik serotiplerine göre konakçılarına yerleşme eğilimine göre üç sınıfa ayrılmaktadır:

Birinci grup *S*. Typhi, *S*. Paratyphi A, *S*. Paratyphi B, *S*. Paratyphi C'yi içermekte olup sadece insanlarda enfeksiyon yapmaktadırlar. *S*. Typhi (tifoid ateş) ve *S*. Paratyphi (paratifoid ateş) insanlarda enterik ateş yapan serotiplerdir. Tifo ve paratifonun kliniği genellikle aynı olmakla birlikte, paratifo tifodan daha hafif seyretmektedir. Tifo değişik komplikasyonlarla seyreden ağır, uzun bir hastalıktır. Tifoid ateş geçirenlerin %1.5'u, non-tifoid enfeksiyon geçirenlerin ise %1'inde 1 yılı aşkın süreyle dışkı veya nadiren idrar ile bakteriler atılır ve taşıyıcılık 40-60 yaş arasında ve kadınlarda daha sık görülmektedir.

S.Typhi ve *S*. Paratyphi enfeksiyonlarının çoğunlukla hasta veya asemptomatik kronik taşıyıcıların dışkısıyla kontamine olmuş gıda veya su kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Bayhan ve ark., 2014).

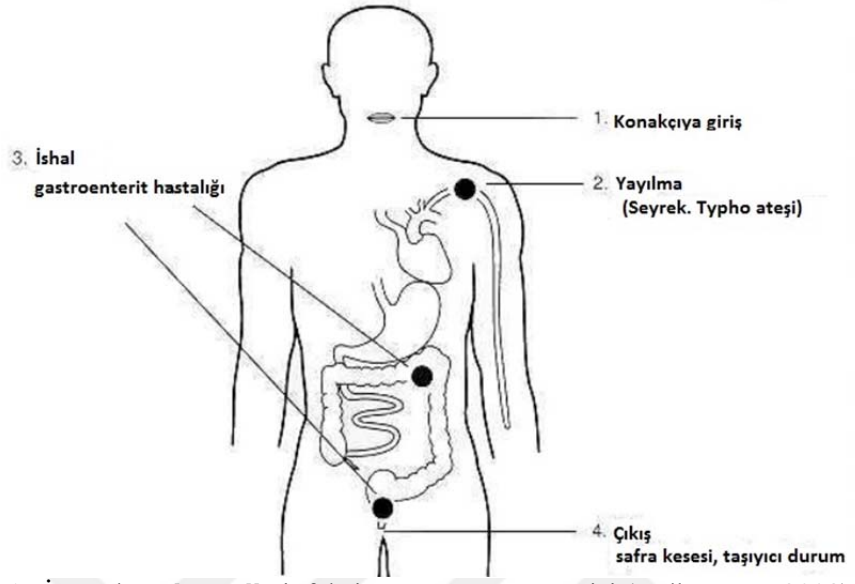
Salmonellosis enterik enfeksiyon olup iki farklı hastalık şeklinde meydana çıkar. Tifo (enterik humma) ve paratifo hastalıklarına neden olan *Salmonella* Typhi ve *Salmonella* Paratyphi grubunun konakçısı insan olup bu iki tür yalnızca insanda hastalık yapmaktadır. Tifo ve paratifo belirtileri klasik gıda zehirlenmelerinden farklı olup yaygın hastalıklar arasındadır. Bu türlerin insandan insana geçişi fekal kontaminasyona maruz kalmış su, çiğ süt vs. aracılığı ile oral yoldan gerçekleşip, ince bağırsağa yerleşen hücreler epitel dokudan geçerek lenf dokusuna yerleşir ve kan sistemine geçerek (septisemi) vücudun değişik bölgelerine (karaciğer, dalak, safra kesesi, böbrek, kemik iliği, kalp, akciğer ve gastrointestinal sistemdeki lenf dokusu) yerleşir.Vucut ısısı yavaş yavaş 40^{o}C'ye yükselir ve özellikle göğüs ve bedende pembe lekeler ve baş ağrısı görülür.

İkinci grup ise insan dışındaki özel konakçılara yerleşme eğilimi gösteren serotipler olup kümes hayvanlarında *S*. Pollorum ve *S*. Gallinarum, sığırlarda *S*. Dublin, atlarda *S*. Abortusequi, koyunlarda *S*. Abortusovis, domuzlarda *S*. Choleraesuis'i içermektedir.

Üçüncü grupta konakçısı değişkenlik gösteren serotipler yer almaktadır. Insanlarda ve diğer hayvanlarda enfeksiyon yapan, gıdalarda bulunan serotiplerdir. Çoğu *Salmonella* serotipi bu grup içerisinde bulunmaktadır. Bu serotipler konakta belirtisiz taşıyıcılıktan, sistemik enfeksiyonlara kadar değişen klinik tablolara yol açmakla birlikte, en sıklıkla gastro enteritidis oluşturmaktadırlar. Gıda kaynaklı serotiplerin başında *S*. Typhimurium (antimikrobiyel direnci en üst seviyededir) ve *S*. Enteritidis gelmektedir.

Salmonella ile kontamine olmuş gıda tükedildiğinde genellikle 12-36 saat sonra bulantı, kusma, ürperme, baş ve karın ağrısı ile birlikte ishal görülen semptomlar başlamaktadır. Inkübasyon süresi 5 saatten 5 güne kadar değişiklik göstermektedir. Hastalık, 2 ile 5 gün arasında sürmektedir (Karapınar ve Aktuğ Gönül., 1998; GÖK, 2005).

Gastrointestinal belirtiler hastalığın geç döneminde kabızlık, kanlı ishal, kusma ve karın ağrısı da gözlemlenebilir. Birkaç gün içinde bu hafif belirtiler görülse de kişiden kişiye değişiklik göstermektedir. Özellikle genç, yaşlı, hamile ve bağışıklık sistemi zayıf kişilerde belirtiler daha şiddetli olup, vücuttaki suyun kaybedilmesiyle insan hayatını tehdit etmektedir (Castelijn, 2013). Tedavi görmeyenlerde ölüm oranı %10-15'tir. Bazı kişiler taşıyıcı olabildiği gibi bazı kişilerde daha hafif seyredebilir. Hastalık kontamineli su veya gıdanın tüketiminden 1-8 hafta sonra ortaya çıkar ve tanısı kan, dışkı ve idrarda patojen tespiti yoluyla yapılır (Karapınar ve Aktuğ Gönül., 1998).



Şekil 1.1. **.**İnsanda *Salmonella* infeksiyonunun patogenesisi (Nalbantsoy, 2008).

Dünyada yaklaşık 94 milyon insanda tifoid olmayan Salmonellozis vakası görüldüğü tahmin edilmektedir (Castelijn, 2013).

Avrupa Birliği tarafından 2010 yılında toplam belirtilen Salmonellozis vaka sayısı 99.020 olup, aynı yıl Hollanda' da 2205 vaka rapor edilmiştir. Ayrıca 2010 yılında, sadece AB' de %30.5 (±1700 kişi) (Majowicz ve ark., 2010) ve Amerika Birleşik Devletlerinde görülen yaklaşık 1.4 milyon Salmonellozis vakasının %95' inin gıdalardan kaynaklandığı bildirilmiştir (Wang ve ark, 2015).

Yıllar boyunca *S.* Typhimurium, Avrupa'da ve Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) insan kaynaklı salmonellosis'in en öenmeli nedeni olmuştur. Bununla birlikte, 1970-1980'lerde *S.* Enteritidis'in besin zincirine girmesinden bu yana dominant serovarların önemli ölçüde yer değiştirmiş ve *S.* Enteritidis birçok Avrupa ülkesinde *S.* Typhimurium'dan daha sık anılır olmuş ve enfeksiyonları bildirilmiştir. Avrupa birliği bünyesinde bulunan Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesinin (EFSA) 2011 yılında yayınladığı rapora göre *Salmonella*'nın gıda kaynaklı salgınlarla ilgili en çok tanınan ajan olduğu belirtmiştir (ESFA, 2012).

Belirli serovarların belirli gıdalar ve hayvansal kaynaklarda baskın olduğu görülmüştür. Bu nedenle bulaşmaya neden olan serovarın tanımlanması, gıda kökenli kaynak salgınlarını belirlemede önemlidir. Özellikle serovarların bulunduğu kaynakların spesifik olabileceği de görülmektedir. Örneğin *S.* Gallinarum'un kanatlılarda, *S.* Abortusovis'in koyunlarda, *S.* Abortusequi'nin atlarda spesifikliği gibi (Corcoran, 2013).

Salmonellosis yüzyıllar boyunca insan sağlığı sorunu olmuştur. 1880'de Carl Eberth, ilk önce kirletilmiş bir dalağın patolojik incelemesiyle "tifo basili" ni keşfetti. Bunu izole edip çoğaltmanın ardından *Salmonella enterica* serovar Typhi olarak anılan "*Bacillus typhosus*", Georg Gaffky tarafından 1884'te izole edildi. *Salmonella enterica* Typhi serovarı dünya çapında 200.000 'den fazla kişinin ölümüyle sonuçlanan yılda tahminen 21 milyon enfeksiyona neden olmaktadır. İnsanda spesifik bir hastalık ve gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık sorunudur (Gonzalez ve Gunn, 2013).

Typhi ve non-typhi *Salmonella*'nın ampisilin, trimetoprim / sülfamexazole ve chloramphenicol'e karşı direnci 1970'ler ve 1990'lar arasında ortaya çıkmıştır. Dayanıklı tifo suşları en çok Güney Amerika, Hindistan kıtası ve Afrika'da bulunmuştur. Alternatif bir siprofloksasin *Salmonella* enfeksiyonları, yani enterik ateş için tercih edilen antibiyotik olmuştur. Artan sayıda *Salmonella enterica* serotipleri (Typhi ve non-typhi suşlarının) antibiyotik tedavisine rağmen siprofloksasin'e duyarlılığının azaldığı gösterilmiştir. Buna ek olarak, nalidixik asite dirençli *Salmonella*'nın büyük bir çoğunluğunun siprofloksasine karşı duyarlılığın da azaldığı gözlemlenmiştir (Somily ve ark, 2012).

Tifoidal salmonellosis'in %90-95'inde, kümes hayvanları ve diğer et ürünleri de dahil olmak üzere kirlenmiş gıda maddelerinin tüketilmesinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Bu nedenle, taşıyıcı olan canlı hayvanların aşılanması, kesim sonrası etdeki patojenin azalmasına neden olabilir.

Tavuklarda *S.* Enteritidis gibi yaygın olarak ilişkili serovarlara karşı aşılama programının hayata geçirilmesi geçmişte başarılı bir şekilde kanıtlanmıştır.

Bununla birlikte, bir aşı programının kullanımın da dezavantajlar vardır. Öncelikle bazı hayvanlar sağlıklı taşıyıcılar veya asemptomatik olabilirler, bu nedenle aşılama, sürüdeki tüm hayvanlarda başarılı olmak için ihtiyaç duyulmaktadır. Bu, sıkça kullanılan geniş çaplı veya yoğun tarım uygulamaları nedeniyle çiftçilere daha fazla maliyetler getirebilir. Ek olarak aşılanan hayvanlar patojeni aşıdan sonraki haftalarda atabilirler, dolayısıyla çapraz bulaşma yoluyla besin zincirine girme olasılığı hala vardır. Üstelik, *Salmonella* aşısı üretimi serovara özgü niteliğinden dolayı pahalıdır ve bu nedenle gelişme az sayıda serovar ile sınırlandırılmıştır (Corcoran, 2013).

Tifoid olmayan *Salmonella'*nın 2.600'den fazla serovarı bulunmaktadır. Bildirilen *Salmonella* vakalarının %90'ının 30 *Salmonella* serovarı içerdiği rapor edilmektedir. 2010 yılında non typhoidal *Salmonella* türleri olan *S*. Typhimurium ve *S*. Enteritidis, İrlanda'da rapor edilen Salmonellosis vakalarının sırasıyla %45'ini ve %22'sini oluşturmuştur (Anonımus, 2017). Tifo olmayan Salmonellosisin belirtileri ishal, mide krampları, baş ağrısı ve mide bulantısı olabilmektedir. Bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda enfeksiyonlar dahil olmak üzere ciddi septisemi, menenjit ve ölüme neden olmaktadır (Corcoran, 2013). Tifoid olmayan *Salmonella* türleri insanlara; kabuklu deniz hayvanları, kümes hayvanları, su kaplumbağası, iguana ve kertenkele gibi egzotik sürüngen hayvanlarla temasta bulunulması; kontamine olmuş su, yumurta, pastorize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi; kontamine olmuş lahana, marul gibi ürünlerin yeterince yıkanmadan tüketilmesi yoluyla bulaşabilmektedir (Bayhan ve ark., 2014).

Hayvanlarda asemptomatik *Salmonella* infeksiyonları yaygın olup, evcil hayvanların %1-3'ün üzerinde bazı türlerde daha yüksek bir prevalansla *Salmonella* taşıyıcısı oldukları bilinmektedir. Sürüngenlerde taşıyıcı oranlarının %36-90 arasında değiştiği tahmin edilmektedir. Hayvanlarda çok farklı serovarlar görülmektedir. Bazı otoriteler sürüngenlerin çoğunun veya tümünün *Salmonella* taşıyıcısı olduğunu kabul etmektedir. Yüksek prevalans oranları memeli ve kuşlarda da görülmektedir. Kaliforniya'da hindilerden %41 oranında,

Massachusetts'te %50 oranında tavuklardan *Salmonella* izole edilmiştir. Yine çeşitli çalışmalarda sağlıklı köpeklerden %1-16 oranında, %1-18 oranında sağlıklı kedilerden ve %6 oranında sığır etinden, atlardan ise %2-20 oranında *Salmonella* izole edilmiştir (Nalbantsoy, 2008).

Salmonellosis insanlarda yaygın olarak görülmekte olup Amerika Birleşik Devletleri'nde artan insidense sahip olduğu bilinmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki hastalık kontrol merkezi tarafından yaklaşık olarak yıllık 30.000–40.000 arasında vaka rapor edilmektedir fakat, bildirilmeyenlerle bu sayının 1.4–4 milyon arasında olduğu düşünülmektedir (Nalbantsoy, 2008).

Son yüzyılda dünyadaki tifo vakalarının azalması içme suyunun arıtımındaki artış, süt ürünlerinin pastörize edilmesi ve besin zincirindeki dışkı atıklarıyla temastan kaçınmak için önlemlerin alınmasıyla ilişkilindirlmiştir. Gelişmiş ülkelerde tifo hastalığı artık endemik değildir; ancak çoğunlukla tifo olmayan *Salmonella* olarak adlandırılan *Salmonella enterica*'nın diğer serovarları ile enfeksiyon büyük bir halk sağlığı sorunu olarak kalmaya devam etmektedir (Corcoran, 2013).

Biyofilm: Biyofilmler kısaca yüzeylerde ve bazı materyallerde meydana gelen kolonize olmuş bir grup bakteri olarak tanımlanmasına rağmen sadece bakteri içermeyip ayrıca matriks içinde sıkışmış ekstraselüllerin tamamı olarak tanımlanır (Hood ve Zottola, 1995). Yani biyofilmler bir yüzey üzerinde ve belli bir şekli olmayan ekstraselüler kapalı bir matriks içinde büyüyen mikrobiyal hücrelerin popülasyonudur (Rodrigues ve ark, 2010). İlk olarak biyofilmler 17.yy'da Hollandalı bir bilim insanı Van Leeuwenhoek tarafından diş plağında tespit edilmiş ve "animacules" olarak tanımlanmıştır. Bu keşif, 1978'de bir biyofilm içerisindeki bakterilerin, bir yüzeye sıkıca bağlanmalarını ve planktonik hücrelerinin farklı şekilde davranmalarını sağlayan bir matriks içinde büyüdükleri tespit edildiğinde daha da araştırılmış ve karakterize edilmiştir (Corcoran, 2013).

Biyofilmi irreversibl olarak bir substrata, ara yüze veya birbirlerine tutunmuş, kendi ürettikleri ekstrasellüler polimerik maddelerden (EPS) olusan bir

matriks içerisinde gömülü, büyüme hızları ve gen transkripsiyonları açısından serbest dolaşan türdeşleri ile aralarında farklılıklar bulunan mikrobiyal hücrelerden oluşan hareketsiz bir topluluk olarak tanımlamıştır (Gün ve Ekinci,209). Biyofilm kütlesinin %97 gibi büyük bir kısmını su oluşturur. Matriks içindeki diğer bileşenler ise; %1-2 EPS, %1-2 globuler glikoproteinler **ve** diğer proteinler, %1-2 nükleik asit, lipit, fosfolipitlerdir. Ancak bu oranlar mevcut organizmaların çeşidine, fizyolojik özelliklerine, gelişme ortamının doğasına, akışkanın tipine, genel fiziksel özelliklere göre değişebilmektedir (Giaouris ve ark, 2012).

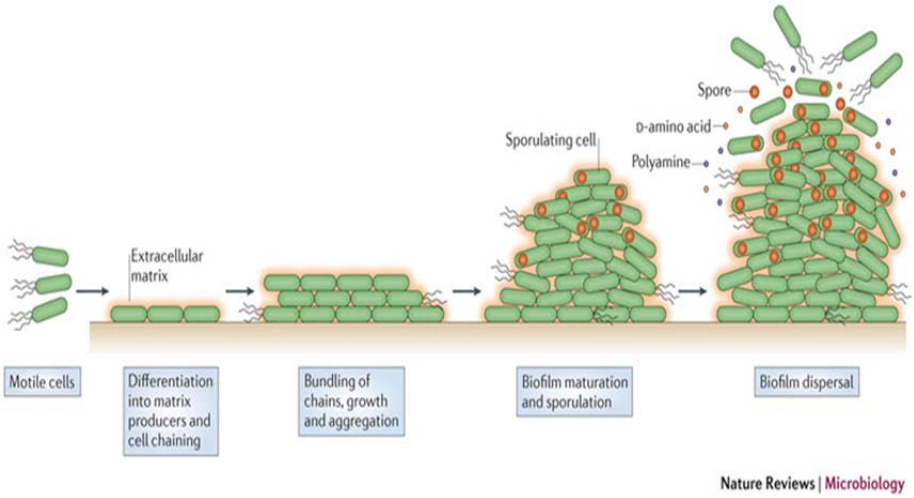
EPS matriksi Biyofilm içinde difüzyon sınırlaması ve / veya kimyasal etkileşim yoluyla hücre dışı proteinler ve polisakkaritler kullanılarak antimikrobiyallerin hedef mikroorganizmalara ulaşmasını geciktirir veya önler (Var ve Sağlam, 2017) EPS matriksi bir bariyer gibi biyofilm mikroorganizmalarını olumsuz koşullara karşı koruyucu etkisini sağlar. Bu özelliği sayesinde EPS, hücre dışı protein ve polisakkaritlerle birlikte antimikrobiyal maddelerin hedef mikroorganizmaların etki etmesini veya kimyasal etkileşimine girmesini veya nüfuz etmesini engeller (Simões ve ark, 2010). Oluşan bu biyofilmlerdeki EPS varlığı mikroorganizmayı planktonik hücre hallerine göre çevresel koşullarına (dezenfektan, sanitizerler vb.) daha dirençli hale getirmekte olduğu bilinmektedir (Tammakritsada ve Todhanakasem, 2012; Wong ve ark, 2010).

Polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan ekstraselüler matriks biyofilm hücrelerinin yüzeylere tutunmasını sağlar. Bakteriyel tutunmada, proteinler gibi organik moleküllerin yüzeye tutunmasının önemli bir rolü vardır. Yüzey proteinleri, biyofilm matriksi içinde düzenli bir şekilde oluşur. Bu proteinlerin bazıları, EPS varlığında biyofilm oluşumunu teşvik edebilmektedir (Gün ve Ekinci, 2009).

Bir biyofilmin oluşumu ve yapısı, türler, yüzeyler, mevcut besin maddeleri ve diğer çevresel koşullar dahil birçok değişkenden etkilenir. Biyofilm geliştirme süreci tek bir hücrenin bir yüzeye veya birbirine yapışmasıyla başlatılır, bunu

kümelenmiş hücrelerin veya mikro kolonilerin oluşturması izler. Mikro koloni, hücre dışı polimerik maddeler (EPS) olarak adlandırılan protein açısından zengin maddelerin koruyucu bir tabakası ile çevrilidir. Biyofilm büyüdükçe biyofilm matriksi, biyofilmin daha az maruz kalan bölgelerinde besin sağlamak için bir destek sistemi görevi gören ve atıkların yok edilmesini sağlayan su kanallarını geliştir

1. Mikroorganizmanın yüzeye tutunması: Yüzeye organik ve/veya inorganik maddelerin yapışmasını takiben mikroorganizmalar bu yüzeye geri dönüşür özellikte tutunur. Bakterinin hareketi veya bakteri yüzeyi ile tutunulan yüzey arasındaki elektrostatik veya fiziksel etkileşimler bu evrede rol oynamaktadır.
2. Geri dönüşümsüz tutunma: Yüzeye tutunan hücreler bakteri hücre zarındaki proteinlerin uyarımı sonucunda ekzopolisakkarid yapıda materyal sentezlemeye başlar ve bu da hücrelerin birbirine ve yüzeye tutunmasını sağlar.
3. Kolonizasyon: Yüzeye tutunan bakteriler bölünüp çoğalarak biyofilmin en küçük organizasyon birimi olan mikrokolonileri oluşturur. Bu mikrokolonilerin üzerine ortamdaki planktonik bakteriler de yapışarak kolonizasyon sağlar.
4. Kopma: Biyofilmin üst kısımlarından kopan hücreler yeni odaklarda biyofilm oluşturur (Bayındır Bilman, 2010).



Şekil 1.2. Biyofilmin Yaşam Döngüsü (Vlamakis ve ark., 2013).

Biyofilmler invivo (safra taşları, implantler, damar vb.) ve invitro (ekipman yüzeyleri, borular vb.) ortamlarda oluşabilmektedirler. Biyofilmlerin yoğunlaşması konakçı savunmasını ve yüksek konsantrasyonlarda antimikrobiyal ajanları daha uzun sürede bile tolere edebilmektedirler (Bjarnsholt ve ark., 2013).

Biyofilmler bakterileri nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki değişimlerin ve ultraviyole ışığa maruz kalmanın doğuracağı zararlardan korur (Gün ve Ekinci, 2009). Biyofilm oluşumu gıda bozulmaları ve patojen bakterilerin biyofilm formunda sanitasyon uygulamalarına karşı kuvvetli direnç gösterdikleri için kontaminasyon kaynağı olmasından dolayı özellikle gıda endüstrisinde önemlidir (Rodrigues ve ark, 2010).

Gıda endüstrisi açısından patojenler büyük bir sorun oluştururken, patojenlerin biyofilm oluşturması sadece gıda proseslerinin yüzeyleri ve çevreleri değil gıdaların ve işlem sonrası ürünlerinin de kontamine olmasına neden olmaktadır (Brooks ve Flint, 2008). Gıda hijyeni ve halk sağlığı açısından büyük risk oluşturan gıda patojenlerinin biyofilmleri, gıda işletmelerinde kullanılan sistemlerin zaman içinde aşınmaya uğraması, gıda işletmelerinin ıslak yapıda olması, gıda kalıntılarının yüzeylerde mikroskobik olarak bulunması ve gıda

mikroflorasına ham madde ve personel yoluyla işletmelerde oluşumu kaçınılmazdır (Koluman ve Özdemir, 2017). Bunun yanında, biyofilmin yüzeylerde bulunması ile ekipman zararı, ürün kontaminasyonu, enerji kayıpları ve medikal enfeksiyonlar gibi sonuçlar da gözlenebilmektedir (Trachoo, 2003).

Biyofilm oluşumu açısından en sık karşılaşılan gıda patojenleri arasında *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes* yer almaktadır (Cramer, 2012). Bu patojenler oluşturdukları biyofilm tabakası içerisinde beslenerek dezenfektanların ve olumsuz dış faktörlerin etkilerinden korunarak uzun süre yaşamlarını sürdürebilmektedir. Böylece patojenlarin saptanması ve kontrolü zor olmakla birlikte mücadele yöntemlerinin etkinliği de azalmaktadır (Ceylan, 2009).

Biyofilmi kontrol altına almak için konvansiyonel yöntem olarak fırçalama, ısıtma, sonikasyon, ultrason kullanımı, yüksek basınç, ozon, hipoklorit, hipobromit, kloraminler, tribütilin, bakır bileşikleri, antibiyotikler ve dezenfektanlar gibi antimikrobik kimyasal maddelerden yararlanılmaktadır. Bununla birlikte mekanik, kimyasal veya antimikrobiyal temizleme yöntemleri genellikle etkisiz ve zararlı yan etkilere neden olmaktadırlar. Örneğin mekanik kuvvetler yüzeylere zarar vererek maddi kayıplara sebep olabilir. Öte yandan, bir yüzeyde bulunan biyofilm yapısını yok etmek için gereken yüksek miktarda antimikrobiyal, çevre açısından istenmeyen, tıbben pratik olmayan ve ciddi sağlık problemlerini ortaya çıkarmaktadır. Buna ek olarak, biyofilmler üzerine antimikrobiyal ajanların tekrar tekrar kullanılması, biyofilm içerisindeki bakterilere, antimikrobiyal ajanlara karşı artan bir direnç geliştirmesine neden olabilir (Abu Sayem, 2014).

Son yıllarda biyofilmlerin mekanik ve kimyasal temizleme yöntemlerinin dezavantajları ve antimikrobiyal ajanlara karşı dirençli bakterilerin ortaya çıkması faj tedavisine olan ilgiyi artırmıştır. Faj uygulamasının en önemli avantajı, konakçısına sentezlettirdiği enzimler yardımıyla ekzopolisakaritlerin yapısını

degrade etmesi ve bir konakçı hücrenin içine nüfüz etmesidir (Knezevic ve Petrovic, 2008).

Biyofilm önleme ve yok etme yöntemlerinin bir standartta olmamasının bir sebebi de biyofilm yapısında bulunan patojen mikroorganizma çeşitlerinin heterojen bir yapıya sahip olmasıdır (Gün ve Ekinci, 2009). Sutherland (2001) yaptığı çalışmada biyofilmlerin değişkenlik gösterdiğini bundan dolayı da hiçbir biyofilmin diğerine benzemediğini belirtmiştir (Koluman ve Özdemir, 2017).

Biyofilmin yapısı, saf kültürler için türe, çoklu kültürler için substrata özgüdür ve heterojenik biyofilmlerde yapı çoğunlukla düzensizdir (Gün ve Ekinci, 2009).

Buna göre biyofilm matriksindeki uzamsal ilişki ona bağlı olarak topluluk içinde iyi çalışabilmekte olup; Örneğin, biyofilm matriksi içine gömülü bir bakteri hücresi, daha az besleyici madde ve daha düşük oksijen ortamında hayatta kalabilmektedir (Corcoran, 2013).

***Salmonella* Biyofilm:** Son zamanlarda, *Salmonella enterica* gibi gıda kaynaklı patojenler de dahil olmak üzere bakterilerin, doğal ortamlarında genellikle planktonik hücrelerden daha çok biyofilm olarak gelişmekte oldukları görülmektedir (Giaouris ve ark, 2012).

Gıda kaynaklı bir patojen olan *Salmonella enterica* da, diğer *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri gibi doğal yaşam döngülerinde canlı ve cansız yüzeylerde biyofilm oluşturabilmektedir (Jonas ve ark, 2007).

Gıda ile temas eden yüzeylerdeki biyofilm, gıda işleme endüstrisi için büyük bir endişe kaynağıdır ve son yıllarda önemli çalışmalara konu olmuştur. *Salmonella*, cam, beton, paslanmaz çelik, silastone, granit, teflon, silikon ve çeşitli sentetik plastikler dahil olmak üzere gıda işleme ortamlarında bulunan birçok yüzeyde biyofilm oluşturabilmektedir. Çok çeşitli yüzeylerde gösterilmiş olan bu Biyofilmlerde; yüzey materyali ve mikrotopografisi biyofilm fenotipini, yapısını ve yoğunluğunu etkileyebilmektedir. Yüzey özellikleri, hidrofobiklik (ve nem muhafaza etme kabiliyeti) yüzey pürüzlülüğü, çatlaklar ve temizlenebilirlik gibi

özelliklerin biyofilm oluşumunu destekleyebildiği ve biyofilm bağlanmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Chia ve ark. (2009) malzemenin yüzey yükü ile *Salmonella*'nın (*S*. Sofia, *S*. Typhimurium, *S*. Infantis ve *S*. Virchow) teflon, paslanmaz çelik, cam, lastik ve poliüretan gibi yüzeylere tutunmasındaki farklılıkları epifloresans mikroskobu ile incelemiştir. Ortega ve ark. (2010) aynı zamanda derin çatlaklar (muhtemelen aşındırıcı kimyasal kullanımından kaynaklanan korozyondan sonra) bakteriyel sıkışmaya izin verdiği, kesme kuvvetine ve stres koşullarına karşı koruma sağlayan bir niş sağlayan yüzey pürüzlülüğünün bakteri bağlantısına katkıda bulunabileceğini belirtmiştir. Korbrer ve ark. (1997) dezenfektanlara karşı koruma sağlayan kontak yüzeylerindeki çatlakların varlığını göstermişlerdir. Yüzeyler üzerindeki bakteriyel bağlanma derecesi, bir yüzey üzerinde zamanla biyofilm oluşumunu tetiklemektedir (Corcoran, 2013).

Norveç'in Osla şehrinde bulunan yem ve balık unu fabrikasında 2009 yılında yapılan çalışmada *S*. Agona, *S*. Montevideo ve *S*. Typhimurium'un ,işletmedeki çeşitli yüzeylerde bir biyofilm oluşumunun önemli olduğu vurgulanmıştır (Vestby ve ark., 2009). Yoğun temizliğe rağmen çevre içinde *Salmonella*'nın yaşamını sürdürebildiği tespit edilmiştir. *Salmonella* pozitif örneklerin daha çok filtreler, drenler, temas yüzeyleri ve gıda ürünlerinden alınan örnekler olduğu görülmüştür (Corcoran, 2013).

Stocki ve ark. (2007) Kanada'nın Alberta şehrinde bir yumurta fabrikasındaki taşıyıcı bantlarda yaptıkları çalışmada *Salmonella* kolonizasyonu ve kalıcılığı incelenmiştir. Bantların yapılmış olduğu malzemelere bakıldığında vinil ve plastik yüzeylerde yıkama ve dezenfeksiyondan sonra bile *Salmonella* biyofilmi gözlendiği bildirilmiştir (Corcoran, 2013).

Salmonella biyofilmlerinin dezenfektan maddelere daha dirençli olduğu bilinirken, olgun biyofilmlerin dezenfektanlara karşı direnç mekanizmasının daha az olduguda belirtilmektedir (Wong ve ark., 2010). Gıda endüstrisinde biyofilmler, ciddi sanitasyon problemlerine ve aynı zamanda gıda bozulmalarından dolayı ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Gıda işletmelerinde yeterli düzeyde temizlenmemiş yüzeyler ortamda suyun varlığı ile *Salmonella* gibi patojenik

mikroorganizmalar içeren bakteriyel biyofilmlerin gelişimine katkı sağlamaktadır. Bugüne kadar gıda işleme ortamlarında bulunan biyofilmlerde *Salmonella* varlığının tespiti ile ilgili sınırlı sayıda bilgi bulunmaktadır. Ancak laboratuvar koşullarında yapılan birçok çalışma, çeşitli gıda içeren yüzeylere (örneğin paslanmaz çelik, plastik ve beton gibi) *Salmonella*' nın kolay bir şekilde tutunabiliceğini göstermiştir (Prouty ve ark, 2002).

Son zamanlarda *Salmonella* biyofilmlerinin insanlarda pek çok enfeksiyona neden oldugu ve bu enfeksiyonların genellikle implant edilen cihazlarla (kateterler, prostetikler ve temas edilen lensler) ilişkilendirildigi bildirilmektedir (Prouty ve ark, 2002).

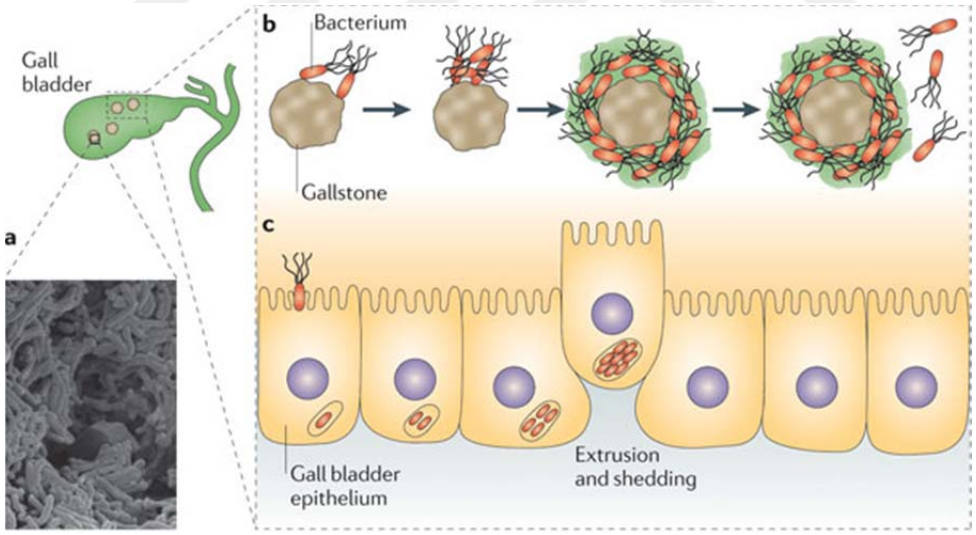
Salmonella biyofilminin oluşumunda farklı yüzeylerde ve farklı koşullar altında biyofilmlerin yapısal varyasyonları dikkate alınarak yapısal bileşenlerin (curli ve diğer fimbria, BapA, kamçı, selüloz, kolanik asit, anyonik O-antijen kapsül ve yağ asitleri) önemi tanımlanmıştır. Birçok çalışmada *Salmonella* türlerinin biyofilm oluşumunun plastik, cam ve paslanmaz çelik gibi abiyotik yüzeylerde olduğu gözlenmiştir. Bu oluşumlara ayrıca çiftliklerde, kesimhanelerde, gıda işleme endüstrisinde, mutfaklarda, tuvaletlerde ve banyolarda rastlanmıştır. Aynı zamanda *Salmonella* biyofilmleri bitki yüzeylerinde, hayvan epitel hücrelerinde, insanların safra taşlarında, akciğerde, intestinal ve vajinal mucus tabakasında, diş ya da medical implant yüzeylerde de görülebilmektedir (Sillankorva ve Azeredo, 2013).

Örneğin; insanlarda tifoya neden olan *Salmonella enterica* serovar Typhi bağırsak epitel tabakasını geçerek makrofajları işgal eder. Makrofajlar bu organizmayı bakterilerin çoğaldığı düşünülen karaciğere, pankreasa ve dalağa taşırlar.

Karaciğerden, aktif enfeksiyon (kolesistit) veya kronik enfeksiyon olarak gelişebilen bakteriler safra kesesine geçiş yapabilir. Taşıyıcılığı enfekte kişilerin yaklaşık % 3-5'inde görülür ve safra taşları gibi safra kesesi anormallikleriyle sıklıkla ilişkilendirilir. Bu enfeksiyon çoğunlukla asemptomatiktir ve konakçı üzerinde çok az veya hiç zararlı etkisi olmadan uzun yıllar sürebilir. Ayrıca, safra taşı olan *Salmonella* taşıyıcılarının safra kesesi kanseri gelişimi için 8.47 kat daha

fazla riske sahip olduğu kanıtlandığı gibi, hepatobiliyer karsinom gelişimi için kronik taşıyıcı durumunun tek önemli risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Safra kesesi safranın depolandığı ve taşındığı yerdir, Safra karaciğerde üretilir ve safra tuzları, kolesterol ve bilirubin gibi birçok bileşenden oluşur. Safra tuzları, lipidlerin bozunmasına ve dağılmasına yardımcı olan deterjanlardır. Bu nedenle safra için iyi bir antimikrobiyal ajan oluştururlar. Bununla birlikte, *Salmonella*, yüksek konsantrasyonda safra ve bireysel safra tuzlarına dirençlidir (Prouty ve ark., 2002).

Safra taşı olan *Salmonella* taşıyıcılarında antibiyotik tedavisi etkisiz olabilir ve bu kişilerde safra kesesi enfeksiyonunun ortadan kaldırılması genellikle cerrahi müdahale gerekebilir. Dolayısıyla, *Salmonella*'nın safra taşı ile kurabileceği mekanizmaları belirlemek ve muhtemelen en önemlisi safra taşı varlığında bunu nasıl yapacağını belirlemek önemlidir. Çünkü *Salmonella* spp. safra kesesi ve safra taşlarının kronik enfeksiyonları, taşıyıcı durumunun oluşumunu etkileyen önemli bir faktördür (Prouty ve ark., 2002).



Şekil 1.3. *Salmonella*'nın safra taşları üzerinde biyofilm oluşturma mekanizması

S. Typhi, safra kesesinde kolonileşir ve asemptomatik bir kronik enfeksiyona neden olur. Bununla birlikte, bu asemptomatik taşıyıcılar hastalığın daha da yayılması için bir hazne oluşturmaktadır. *S.* Typhi'nin endemik olduğu bölgelerde yapılan epidemiyolojik çalışmalar, kronik olarak enfekte olmuş taşıyıcıların çoğunun da safra taşı taşıdığını ve safra kesesi kanseri (GC) ilk evrelerinde hastalığı başlatan birincil faktör olarak gösterildiğini ortaya koymuştur. Son zamanlarda *S.* Typhi'nin, DNA hasarına neden olan kanserojen potansiyele sahip, zehirlenmiş hücrelerde hücre döngüsü değişikliklerine ve DNA hasarınına neden olan bir tifo toksini ürettiği bilinmektedir (Di Domenico ve ark., 2017).

Biyofilmler olarak bilinen yüzeyle ilişkili bakteri toplulukları, birçok kronik enfeksiyonun patogenezinde rol oynar. Tıbbi açıdan bakıldığında, hem eşsel hem de patojenik mikroorganizmalar, epitel veya endotel dokusu ile ilişkili biyofilm konsorsiyumu oluşturur; akciğer, barsak veya vajinal mukus tabakasına gömülü; dişlere veya tıbbi implant yüzeylerine tutunurlar. Ağız boşluğunda dişlerde oluşan biyofilmler diş çürümesine neden olan asitleri üretir ve diş eti sulkusunda (diş yüzeyi ile çevresindeki diş eti dokusu arasındaki doğal boşluk) gelişen biyofilmler periodontitis (dişi çevreleyen dokular) patogenezine (hastalıklara) neden olabilmektedir. Vücudun diğer organlarında oluşan biyofilmler, kistik fibroz pnömonisi ve kateterle ilişkili endokardit gibi çoğu zaman hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olur. Biyofilmlerin mikrobiyal enfeksiyonların %60'ından fazlasında sorumlu olabileceği varsayılmaktadır (Kaplan, 2010; Sillankorva ve Azeredo, 2013).

Salmonella biyofilmlerinin farklı yüzeylerde oluşma mekanizmalarına bakıldığında yapısal farklılıklar gözlenmiştir. Örneğin hayvan epitel hücrelerinde Type 1 fimbriae (fim), Plasmid encoded fimbriae (pef), Curli fimbriae (csg), Long polar fimbriae (lpf), Bovine colonization factor (bcf), Sth fimbriae (sth), Colanic acid (wca genes ve wza, wzb ve wzc), Selüloz (bcsABZC–bcsEFG) yapısal belirleyiciler belirlenmişken cam yüzeylerinde LPS, Type-three secretion apparatus (TTSS), Flagella yapısal belirleyicileri tespit edilmiştir (Steenackers ve ark, 2012).

Çizelge 1.2'de Yüzeylerde *Salmonella* Biyofilm Oluşumu İçin Önemli Yapısal Belirleyiciler verilmiştir.

Çizelge 1.2. Yüzeylerde *Salmonella* Biyofilm Oluşumu İçin Önemli Yapısal Belirleyiciler (Steenackers, 2012)

Yüzey	**Yüzeylerde *Salmonella* biyofilm oluşumu için önemli yapısal belirleyiciler**
Agar plates (rdar morphotype)	Curli (csgDEFG-csgBAC) BapA (bapABCD) Cellulose (bcsABZC-bcsEFG) o-Ag-capsule (yihU-yshA and yih VW) other capsular polysaccharide LPS
Epitelial hücreler	Type 1 fimberiae (fim) Plasmid encoded fimberiae (pef) Curli fimberiae (csg) Long polar fimberiae (lpf) Bovine colonization factor (bef) Sth fimberiae (sth) Colanic acid (wca genes and wza, wzb and wzc) Cellulose (bcsABZC-bcs EFG)
Safra taşı	Flagella o-Ag-capsule (yihU-yshA and yihVW Type I fimberiae (fim)
Cam	Cellulose (bcs ABZC-bcs EFG) LPS Type-three secretion apparatus (TTSS) flagella
Yonca tohumları	Curli (csg genes) Cellulose (bcs ABZC-bcs EFG) o-Ag-capsule (yihU-yshA and yihVW

Salmonella biyofilminin hücre dışı polimerik matriksinin oluşumu büyümesine bağlı olarak değiştirmekte olup, curli, EPS ve selüloz gibi ince yapıları içermektedir. Araştırmacılar, biyofilm oluşumunda yer alan bileşenleri, congo kırmızısı (CR) agarda koloni morfolojik özelliklerini değerlendirerek tespit

etmiştir. Bu yöntem, test organizmalarının Luria-Bertani Agar plakalarında gösterge boyaları (kahverengi kırmızı, coomassie parlak mavi ve calcofluor) ilave edilerek incelenir. Gösterge boyaları, *Salmonella* biyofilm üretiminde önemli rol oynayan selüloz ve curli fimbriaların saptanmasını kolaylaştırır (Corcoran, 2013).

Bakteriyofaj: Bakteriyofajlar' ın (veya fajlar) ilk gözlemi 1896 yılında Hankin tarafından yapılsa bile Twort (1915) ve D 'Herelle (1917) tarafından bağımsız olarak keşfedilmiştir. Her ne kadar D'Herelle, fajların virüs olduğuna inanmasına rağmen birçok bilim adamı, bakterisidal etkisinin bir enzim sonucu olduğuna inanıyordu. Bordet ve Gratia gibi önde gelen mikrobiyologlar D 'Herelle'in virüs hipotezine şiddetle karşı çıkmışlardır (Kiros, 2016).

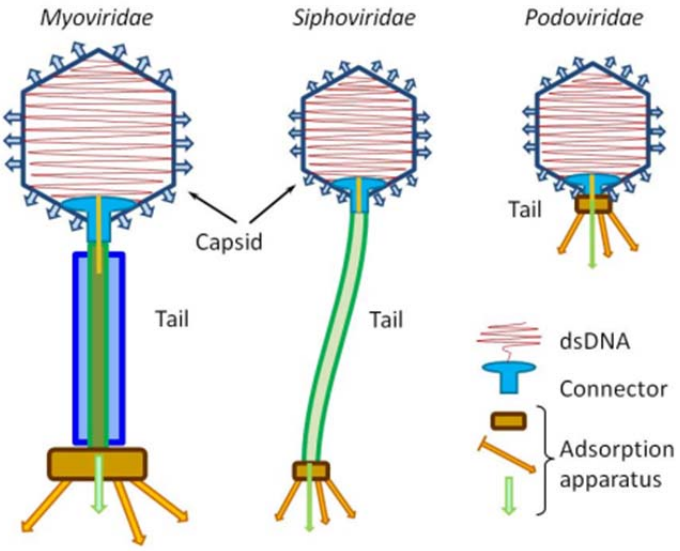
Bakteriyofajlar bakterilerin doğal virüsleridir (Bao ve ark., 2011). Fajlar her bakterinin bulunduğu yerde mevcuttur ve konakçı olduğu bakteri ile ortak bir ekolojiyi paylaşmaktadırlar (McLaughlin ve ark, 2006). Bakteriyofajlar, diğer virüslerde olduğu gibi konakçıya özgüllük söz konusudur. Türlere özgül fajlar çoğunluktadır, ancak aynı tür içindeki suşların faj spektrumlarında da farklılıklar bulunmaktadır. Belli bir türe ait suş o türe özgül birçok farklı bakteriyofaj tarafından enfekte edilebilir veya bir faj homolog konakçısının dışında o türe ait birçok duyarlı (heterolog konakçı) suşu da enfekte edebilir. Bazen bir başka türe ait suş da faj tarafından heterolog konakçı olarak kullanılabilir. Ancak fajların farklı türlerden heterolog konakçı kullanmaları daha ender görülür. Virüsü bulunmayan bakteri yok gibidir (Tunail, 2009).

Virüs partiküllerinde iki temel madde nükleik asit (RNA veya DNA) ile protein üniteleri bulunmaktadır. Nükleik asidin protein bir kılıf (Kapsit) ile çevrelenmiş haline nükleokapsit denir. Kapsitler, alt üniteler olan kapsomerlerden oluşmuştur. Kapsomerler, virüs genomunda kodlu bir veya birkaç proteinin çok sayıdaki kopyasıdır. Oldukça büyük olan kapside ilişkin bilginin tek bir gende veya birkaç gende kodlanması anlamlıdır, bu durum sınırlı uzunluğa sahip viral genomun ekonomik kullanıldığının gostergesidir. Virüs kapsitleri temel olarak helikal simetri veya kübik simetri (ikosahedral, polihedral) gösterirler. Bazıları

sadece nükleokapsitten (çıplak form) oluştuğu halde bazıları fosfolipit bir zarfla sarılmıştır. Bakteriyofaj'lar, 24 ila 200 nanometre arasında değişen çok küçük bir organizmadır. En büyük bakteriyofaj gruplarından biri T4 bakteriyofajıdır. 200 nanometre uzunluğunda ve 80 ile 100 nanometre (nm) genişliğindedir. Nükleik asitin büyüklüğü farklı bakteriyofajlar arasında değişir. Küçük DNA veya RNA iplikçikleri, üç ila beş ürün üretmek için yeterli genetik bilgi içerebilir. Daha büyük iplikler 100'den fazla gen için yeterli genetik bilgi içerebilmektedir (Anonimus 2018; Tunail, 2009)

Genellikle faj olarak adlandırılan bakteriyofajlar, duyarlı bakterileri enfekte edip çoğaltabilen virüsler olarak tanımlanır. Çevrede her yerde bulunurlar, son tahminler biyosferdeki faj sayısına bakıldığında dünyada en fazla bulunan biyolojik varlıklar olduğu bildirilmektedir. Günümüzde morfolojik özelliklerine ve nükleik asit içeriğine bağlı olarak on yedi faj familyası kabul edilmektedir. Bununla birlikte, en sık rastlanan bakteriyofajlar, çift iplikçikli DNA'lı genomlara sahip kuyruklu fajlar olup, bunlar, şimdiye kadar, elektron miskroskobu kullanılarak karakterize edilen fajların yaklaşık %96'sını oluşturur. Daha az karşılaşılan bakteriyofajlar, tek başına DNA veya RNA içeren genomlara sahip olabilir ve çeşitli morfolojik formları, örneğin polihedral, flamentous ve pleomorfik fajları içerebilir (Lacroix, 2011).

Bilinen tüm bakteriyofajların çoğunluğu virion kapsidinin içinde çift iplikli bir DNA genomu sergilemektedir. Kuyruklu fajlar *Caudovirales* gurubuna aittir. Kuyruklu fajlar üç aileye ayrılabilir: *Podoviridae* çok kısa kuyruklarla karakterize edilir, *Myoviridae* daha uzun, düz ve kasılma kuyrukları gösterir ve *Siphoviridae* uzun ve esnek kuyruklarıyla tanımlanabilmektedir (Lacroix, 2011). Şekil 1.4'te kuyruklu faj aileleri verilmiştir.



Şekil 1.4. Kuyruklu faj aileleri (Kurtböke, 2012)

Elektron mikroskobu ve fajları incelmek için geliştirilen preparasyon teknikleri faj partiküllerinin bileşenlerinin yapısını ayrıntılı olarak ortaya koymuştur. Fajın ana bölümleri baş (kapsit) ve kuyruk olarak tanımlanmışsa da, kuyruksuz kübik Simetri gösteren kapsitler ve kapsitsiz helikal simetriye sahip filamentöz fajlar da bulunmaktadır. Kübik baş yapısına sahip olan fajlar, kapsitte içerdikleri oturma yüzeyi **(hedron**) sayısına göre **oktahedral** (8) , **dodekahedral** (12) ve **ikosahedral** (20) Olarak adlandırılırlar. Polihedral baş yapısı çok sayıda oturma yüzeyi bulunan kapsit anlamında kullanılır. Oktahedral kapsidi iki dörtgen piramidin taban tabana birleşmiş formu olarak düşünmek gerekir. İkosahedral kapsit birbirine eşit 20 birim eşkenar üçgen oturma yüzeyine ve 12 tepeye sahiptir (Tunail, 2009).

Bakteriyofajlar virion kuyruğu bulunan bir bakteriye bağlanarak bakteriyel hücre duvarına nüfuz etmekte, bunu takiben bakteriyofaj replikasyonu için DNA materyallerini bakteri hücre içine panetrasyonu gerçekleştirmektedir (Higgins ve ark., 2018).

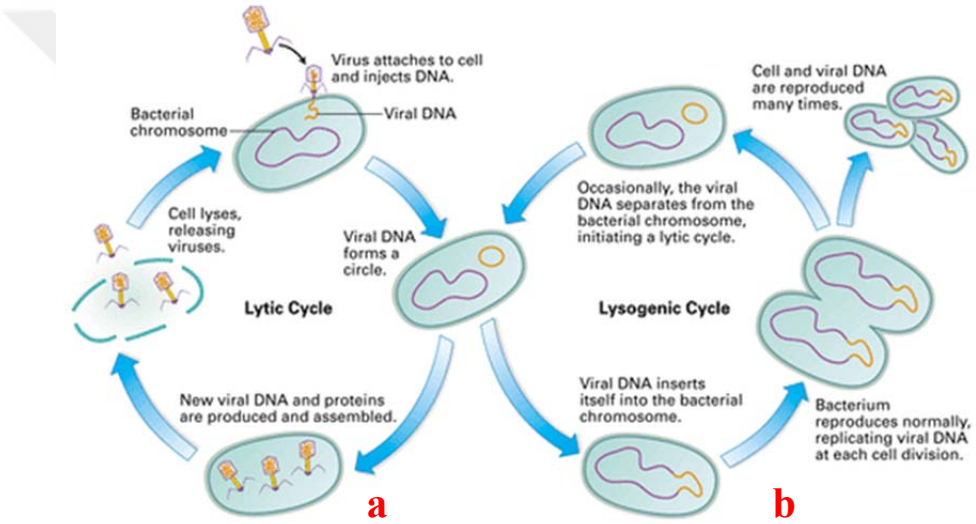
Faj-Konakçı İlişkileri: Bakteriyofajlar özgül konakçılarında genellikle üç tür enfeksiyona neden olurlar. Litik enfeksiyonda hücrelerin kurtulmaları söz konusu değildir, buna karşılık lizojenik enfeksiyon ve non-litik enfeksiyon hücreye yaşama şansı tanır.

Litik enfeksiyon: Virulant fajlar (T2, T4, T7,ϕx174, MS2 ve daha birçok faj) kendilerine duyarlı konakçı bakterilere adsorbe olduktan sonra genetik materyallerini hücrelere enjekte ederler. Faj DNA veya RNA'si içeri girdikten hemen sonra derhal konakçı genomunu kontrol altına alır ve hücrenin tüm olanaklarını kullanarak kendi replikasyonunu gerçekleştirir. Belli bir süre sonunda çok sayıda olgun faj hücre duvarını parçalar (lizis) ve yeni faj soyu olarak ortama geçer. Konakçı bakterinin lizizi ve olgun fajların dışarıya çıkması ile son bulan bu yaşam çemberi litik döngü olarak adlandırılır. Ortama salınan fajlar tekrar aktif konakçılarına adsorbe olarak ikinci litik döngüyü başlatırlar. Bu süreç ortamda sağlam konakçı bakteri kalmayıncaya kadar tekrarlanır (Tunail, 2009).

Lizogenik (Latent) enfeksiyon: Bazı fajlarda konakçı bakteriye geçen faj DNA'sı hücreye girince bakteri genomuna katılır. Bu birleşme süreci integrasyon veya insersiyon olarak anılır. Birleşme ürünü, konakçı genomunu ve faj DNA'sını içeren dairesel formlu DNA sarmalıdır. Belli koşullar altında integrasyona yönelebilen böyle fajlara, litik enfeksiyon oluşturmayan, ılımlı fajlar anlamında temperent fajlar denir. Temperent fajın konakçı genomuna katılmış formu profaj adını alır. Profaj taşıyan bakterinin lizogen karakter kazandığı görülür ve bu olgu lizogeni olarak adlandırılır. Lizogenin oluşumu, faj DNA'sında kodlu ve hücre içinde sentezlenen çeşitli represör proteinlerin düzeyleriyle ilgilidir. Profajlar, bazı özel koşullarda mutajenik ajanların (UV, Mitosin C, sıcaklık, basınç vb.) etkisiyle veya spontan olarak indüklenirler ve bakteri genomundan ayrılırlar (eksisyon). Bu ayrılış temperent fajın virulant faja dönüşümü demektir. Mutajen ajanlardan herhangi birinin etkisiyle hücrede hasar meydana gelmesi, konakçı hücrenin yaşamını sürdürdüğü koşulların tehlikeye girdiğinin işaretidir. Hücredeki hasar profajın indüksiyonu ve faj litik genlerinin ekspresyonu ile sonuçlanır. Hücre

yaşamının zora sokulduğu bu güç koşullarda; faj varlığının devamlılığı, litik üreme döngüsü başlatılarak garanti altına alınmış olur (Tunail, 2009).

Nonlitik enfeksiyon: *E. coli*'ye özgül M13 ve fd fajları adsorbsiyonun ardından bakteriye panetre olduktan sonra replikasyonlarını gerçekleştirirler. Çok sayıda faj kopyası bakterinin lizizine neden olmaksızın iç ve dış membranları geçerek dış ortama çıkar. Konakçının beslenmesinde ve çoğalmasında bozulma olmamakla beraber hem hücre gelişmesi hem de bölünme yavaş seyreder. Nonlitik enfeksiyon filament şeklindeki filamentöz fajlarla sınırlıdır (Tunail, 2009).



Şekil 1.5. Litik döngü ve lizogeni. a) Litik enfeksiyon ve viral replikasyon (Litik döngü), b) Lizogenik enfeksiyon ve profajın bakteri genomu ile birlikte replikasyonu (Lizogeni)

Bakteriyofajlar, bakterilerin doğal antibiyotikleri ve çevrede yaklaşık 1:10 oranında bol miktarda bulunmaktadırlar. Fajlar konakçı hücre içerisinde çoğalma yeteneğine sahip oldukları için bakteri üzerine faj uygulamalarında bakterilerin parçalanmasına ve sonunda bakterilerin ölümüne neden olurlar (Wong ve ark, 2014; Xu ve ark, 2015). Bugüne kadar faj uygulamalarının güvenli olduğu ve insanlar için toksik olmadığı bilinmektedir. Hatta hazır gıdalarda biyosanitasyon

ajanları olarak kullanılan faj ürünlerinin birçoğu ABD'de genellikle güvenilir olarak kabul edilmektedir (Wong ve ark, 2014).

Bazı fajlar sadece belirli bir serovar grubunu enfekte eden çok dar bir konak aralığı sergileyebilirken, diğerleri belirli konak türlerinin tüm mevcut suşlarının %95'ine bulaşabilir. Temel olarak, farklı fajlar, alıcı hücre yüzeyinde çeşitli molekülleri reseptör bağlanma proteinleri ile tanır. Gram-pozitif bakteriler için, hedefler teikoik ve lipoteik asitler, hücre duvarı ile ilişkili proteinler veya peptidoglikan olabilir. Gram-negatif bakterilerde ise lipopolisakkarid bileşenleri, kapsül antijenleri, pili ve flagella gibi hücresel uzantılar veya porinler veya taşıyıcılar gibi yüzeyle ilişkili proteinler faj reseptörleri tarafından tanınabilmektedir (Lacroix, 2011).

Günümüzde çok gelişmekte olan ülkeler için Enterobacteriaceae familyasında bulunan bakterilerin antimikrobiyallere ve özellikle ilaca karşı direnç göstermeleri büyük bir problem olmaya başlamıştır. İnsan sağlığında ve tarımsal uygulamalarda gereksiz antibiyotik kullanımı nedeniyle antibiyotiklere karşı dirençli mikroorganizmalar ortaya çıkmıştır. (Gonzalez-Escobedo ve Gunn, 2013).

Bakteriyofaj terapisinin 20. yüzyılın başlarında ortaya çıktığı rapor edilmiştir. Mikrobiyal hastalıkların tedavisinde Penicillin ve diğer antibiyotiklerin kolay kullanımı ve olumlu etkilerinden dolayı yarım yüzyıl boyunca bakteriyofaj tedavisine çok az ilgi gösterilmiştir (Xu ve ark., 2015). Bakteriyofaj terapisi, son yıllarda ön plana çıkan bir yöntemidir. Konağa özgü bakteriyofajların kullanımı, zoonotik bakterileri kontrol etmek için uygun maliyetli ve uygulanabilir bir yaklaşım olarak görülmektedir. Fajlar antibiyotiklerle kıyaslandığında birçok avantaja sahiptirler. Genellikle geniş spektrumlu antibiyotiklerin neden olduğu komensal bağırsak florasının (dysbiosis) dengesizliğini önleyerek yalnızca hedeflenen alt grupta çoğalırlar. Ayrıca, hedeflenen bakteri mevcut olduğu sürece çoğalır ve doğal olarak kendilerini sınırlandırırlar. Bir çok çalışmada canlı hayvanlarda ve gıda yüzeylerinde zoonotik patojenlere karşı fajlar kullanılmıştır. Hem *Campylobacter* hem de *Salmonella* fajları kanatlı hayvan dışkı ve tavuk

çiftliği ortamından kolayca izole edilebildiği gibi terapötik olarak kullanıldığında besin zincirine herhangi bir katkısı yoktur. Bakteriyofaja duyarsız mutantların (BIMs) ortaya çıkışı, uzun süre faj tedavisinin kısıtlı kullanımına neden olmuştur. Bununla birlikte, antibiyotik gibi kemoterapötik ajanlardan farklı olarak fajlar kendilerini konakçılarının savunmalarına karşı sürekli geliştirirler ve dirençli bakteriler genellikle duyarlı olan bakterilere göre fajlara daha az uygun ve öldürücü etkisi daha az olur (Atterbury ve ark., 2007).

Bakteriyofajların antibiyotiklerden daha avantajlı oldukları düşünülmektedir. Bakteriyofajlar sadece kendilerine özgü patojenleri hedef almakta ve bu nedenle normal bağırsak mikroflorası etkilenmemektedir. Özellikle bakteriyofajlar, konakçı bakteri içinde kendi kendini kopyalayarak bakteriyi öldürebilmektedir. Bakteriyofajlar, canlı hayvanlarda zoonotik patojenlere karşı kullanılmış ve bu durumda, bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde faj terapisinin antibiyotikler kadar etkili olabileceği gösterilmiştir (Bao ve ark., 2011).

Hayvancılıkta da yaygın olarak tedavi ve büyümeyi teşvik etmek amacıyla antibiyotik kullanımı antibiyotiklerin hayvanlar ve onlardan da insanlara geçişi ile zaman içinde mikroorganizmaların antibiyotiklere direncinin artmasına neden olmuştur. Bakteriyofaj uygulaması ile bakteriyel enfeksiyonların kontrolü antibiyotik tedavisinden daha üstün bulunmuştur (Xu ve ark, 2015). Fajlar (bakteriyel virüsler) antibiyotiklere karşı potansiyel ve güvenli bir alternatif olarak değerlendirilmekte ve önerilmektedir (Augustine ve ark, 2013).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Çeşitli Gıda ve Klinik Örneklerden *Salmonella* spp. İzolasyonu Üzerine Yapılan Çalışmalar

Mcbride ve ark (1980) tavuk kesimhanelerinde kontaminasyona neden olan en önemli aşamalardan birinin tanklardaki haşlama işlemi olduğunu belirtmiş ve haşlama tankı girişinde tavuklarda %3-96, iç organlar çıkarıldıktan sonra %0-69, soğutma tankı çıkışında %0-96 düzeylerinde *Salmonella* spp. tespit etmişlerdir. Bu sonuçlara göre tavukların kesimhaneye gelmeden önce *Salmonella*'lar ile yüksek oranda kontamine olduklarını ve bu durumun kesimhanede de devam ettiğini belirtmişlerdir.

Var ve Evliya (1995) Adana'da yaptıkları bir çalışmada tavuk, bıldırcın ve ördek yumurtalarının kabuğu, akı ve sarısında *Salmonella* taraması yapmışlar ve tavuk ve ördek yumurtalarının sadece kabuğunda bu mikroorganizmaya rastlamışlardır. Bıldırcın yumurtasında ise yumurta kabuğunun yanısıra sarısı ve akında da *Salmonella* izole etmişlerdir.

Bekar ve ark. (1993) 1990-1993 yılları arasında Ankara, İstanbul, İzmir ve Adana bölgelerindeki "Tavuk Mezbahalarının *Salmonella* Yönünden Taranması", çalışması kapsamında Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü'nde 1704 adet örnek çalışmışlardır. Çalışma kapsamında toplam 86 adet *Salmonella* suşu izole edilmiş ve bunların da 55'inin *Salmonella* Enteritidis olduğu bildirilmiştir.

Veldman ve ark (1995) yaptıkları çalışmada, çoğu paketlenmiş 646 kanatlı ve gıda ürününde %12.7 oranında *Salmonella* spp. izole etmişlerdir.

Ergün ve ark. (1997) 1993-1996 yılları arasında kesim şartları, teknik ve hijyenik açıdan birbirinden farklı, biri kamu, 3'ü özel sektöre ait 4 tavuk mezbahasında yaptıkları çalımada 465 örneği gıda kaynaklı patojenler yönünden incelemişlerdir. Bu örneklerde %5.16 oranında *Salmonella* spp. tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Guerra ve ark.'nın (2000) 1989-1998 yılları arasında yaptıkları çalışmada İspanyol Asturias eyaletinden izole edilen en sık nontifoidal serotipleri temsil eden 333 *Salmonella* suşunun 15 antimikrobiyal madde için direnç profilleri çıkarılmıştır ve 9 referans suş analiz edilmiştir. Bütün suşların amikasin, seftazidim, siprofloksasin ve imipeneme antibiyotiklerine duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. En sık görülen direnç tipleri sülfadiazin, tetrasiklin, streptomisin, spektinomisin, ampisilin ve kloramfenikol (%46'dan %22'ye) olduğunu tespit etmişlerdir.

Carlı ve ark. (2001) broiler ve yumurtacı tip piliçlerde yaptıkları çalışmada *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Agona, *Salmonella* Thompson, *Salmonella* Sarajane suşlarını izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Aksakal (2003) Van Bölgesinde yaptığı çalışmada tavuk dışkı örneklerinden izole ettikleri 28 (%7) *Salmonella* suşunun 10 (%35.71)'unu *Salmonella* Gallinarum, 10 (%35.71)'unu *Salmonella* Enteritidis, 6 (%21.43)'sını *Salmonella C*orvallis, 1 (%3.57)'ini *Salmonella* Typhimurium ve 1 (%3.57)'ine de *Salmonella* Agona olarak tanımlamıştır. Hindi dışkı örneklerinden ise 20 (%5) *Salmonella* suşu izole ettiklerini, izole edilen suşların 9 (%45)'unun *Salmonella* Enteritidis, 4 (%20)'ünün *Salmonella* Augustenborg, 3 (%15)'ünün *Salmonella* Anatum var. O15+, 2 (%10)'sinin *Salmonella* Gallinarum, 1 (%5)'inin *Salmonella* Virchow, ve 1 (%5)'inin de *Salmonella* Cambridge olduğunu belirtmiştir. Bıldırcın dışkı örneklerinde sadece bir adet (%0.05) *Salmonella* Gallinarum suşu izole edildiğini devekuşu dışkılarından ise *Salmonella* izole edilemediğini belirtmiştir.

Uyanık ve Yazgi (2009) yaptıkları araştırmada, Mayıs 2004-Eylül 2007 tarihleri arasında Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji laboratuarına gönderilen kan ve dışkı örneklerinden izole edilen 35 *Salmonella* suşunun serotiplendirilmesi ve çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi kousunda çalışmışlarıdr. İzole edilen 35 suşun *Salmonella* antiserumları (Denka Seiken, Japonya) ile tiplendirilmesi yapılmıştır. Bu suşların trimetoprim-sülfametoksazol, ofloksasin, ampisilin, kloramfenikol, seftriakson ve nalidiksik aside karşı duyarlılıkları disk

diffüzyon yöntemiyle değerlendirilmiştir. Uzun zamandır salmonellozis tedavisinde kullanılan kloramfenikol, trimetoprim-sülfametoksazol ve kinolon grubu antibiyotiklerin tedavi seçenekleri arasındaki yerini koruduğunu belirtmişlerdir.

Lertworapreecha ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada Güney Tayland'daki domuz etlerinden, tavuklardan ve sebzelerden izole edilen *Salmonella enterica*'nın antimikrobiyal dirençliliğini araştırmışlardır. *Salmonella*'nın yaygınlığını domuz için %82, tavuk için %67.5 ve taze sebzeler için %46 olarak belirtmişler, sebze ve domuzlardan elde edilen *Salmonella*'nın en yüksek dirençliliği tetrasikline gösterdiğini, tavuk etinden elde edilen izolatın en yüskek dirençliliği ise streptomisine gösterdiğini bildirmişlerdir. 31 domuz ve 32 tavuk örneğinden elde edilen izolatın MDR (Multidrug resistant) yani birden çok ilaca dirençli suşlar olduğunu ancak sadece sebzelerden izole edilen 7 izolatın 2 veya daha fazla antimikrobiyal ilaca dirençli olduğunu belirtmişlerdir.

Ahmed ve Shimamoto (2014) Mısır'daki et ve süt ürünlerinde yaptıkları çalışmada *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Shigella* spp. izolasyonu yapmışlar ve moleküler karekterizasyonu ortaya koymuşlardır. 800'ü et ve 800'ü süt ürünü olmak üzere 1600 gıda ürünü kültürel ve PCR yöntemi ile araştırmış. 69'unda *S.enterica*, 54'ünde *E.coli* O157:H7 ve 27'sinde *Shigella* spp. bulunduğunu belirtmişlerdir. *S.enterica* ve *Shigella* spp.'nin et ürünlerinde *E.coli*'nin ise süt ürünlerinde daha çok bulunduğu bildirilmiştir.

Kaushik ve ark., (2014) Hindistan Patna'daki yerel marketlerden toplanan tavuk etleri ve inek sütlerinde *Salmonella* varlığını araştırmışlar, 228 tavuk eti ve 142 süt ürünü olmak üzere 370 örnekten 65'inde (tavuk eti için 54/228, inek sütü için 11/142) *Salmonella* pozitif olarak bulunmuştur. Tavuk etlerinden elde edilen izolatların serotiplemesi yapıldığında %6.1'i *S*. Typhimurium, %2.6'sı *S*. Newport, %1.7'si *S*. Gallinarum ve %0.4'ü *S*. Enteridis, *S*. Infantis ve *S*. Worthington olduğu belirtilmiştir. İnek sütünden elde edilen izolatların %2.1'nin ise *S*. Galinarium, %1.4'ünün *S*. Newport olduğunu bildirmişlerdir.

Bayhan ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada hastaların dışkı, kan ve idrar kültüründe üreyen *Salmonela* türlerinin serotip dağılımı ve antibiyotik direnç durumu değerlendirilrmiştir. *Salmonella* suşları akut gastroenteritin neden olduğu dehidratasyon dışında hastaneye yatış ve intravenöz antibiyotik tedavisi gerektiren değişik klinik tablolara neden olmaktadır. *Salmonella* serotip dağılımı ve antibiyotik direnci izleminin sürdürülmesinin, *Salmonella* suşlarının neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinin planlanmasında yararlı olabileceği vurgulanmıştır.

Tarabees ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada 100 adet çiğ tavuk eti örneğinde *Salmonella* spp. izolasyonu yapmışlar. İzole ettikleri *Salmonella* izolatlarını biyokimyasal ve serolojik testler ile tanımlamışlar. Ayrıca, izole edilmiş serovarlar, enfeksiyonda rol oynadığından şüphelenilen virülans genlerinin varlığının tespiti için multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak incelediklerinde *S*. Enteritidis iki örnekte (% 2) izole edilirken, *S*. Typhimurium üç örnek (% 3) tavuk etinden izole edildiğini bildirmişlerdir.

2.2. Çeşitli Gıda ve Klinik Örneklerden İzole Edilen *Salmonella* Biyofilmi İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Joseph ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmada gıda işletmelerindeki farklı yüzeylerde (paslanmaz çelik, plastik vb.) *Salmonella*'nın biyofilm oluşturma yeteneği ve iodofor ve hipoklorit gibi sanitizerlere olan direncinin planktonik hücrelerle karşılaştırması yapılmıştır. *Salmonella* biyofilm yapısında bulunan hücrelerin planktonik hücrelerle karşılaştırıldığında sanitizerlere daha dirençli olduğu bildirilmiştir.

Prouty ve ark. (2002) *Salmonelle* spp.'nin safra taşı yüzeyi ile etkileşimini ve biofilm oluşturma yeteneğini araştırmışlardır. Araştırmaları sonucunda *Salmonella*'nın 14 gün içinde ekzopolisakkarit tabakası oluşturarak safra taşı yüzeyine yapıştığı ve biyofilm yapısı oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Stepanovic ve ark. (2004) 122 *Salmonella* spp. ve 48 *Listeria monocytogenes* suşunun plastik yüzeylerinde biofilm oluşturma kabiliyetini araştırmışlardır. Araştırmalarının sonucunda bütün *Salmonella* spp. ve *L.monocytogenes* suşlarının uygun ortamda biyofilm oluşturduğunu ancak *Salmonella* spp.'nin *L.monocytogenes* suşlarına göre daha çok biyofilm oluşturduğunu belirtmişlerdir. *Salmonella*'nın zayıf besi ortamlarda ve *L.monocytogenes* suşlarının ise zengin besi ortamlarda daha fazla biyofilm oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Janssens ve ark. (2008) kırmızı alglerin sentezlemiş olduğu bromlu furanonların *S. enterica* serovar Typhimurium biyofilmi oluşumuna karşı aktivitelerini test etmişlerdir. Farklı konsantrasyonlarda, furanonun *Salmonella* biyofilm oluşumunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Wong ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada 3 günlük bir biyofilm ve planktonik *Salmonella*'nın farklı maruz kalma sürelerinde dezenfektanlara duyarlılığını karşılaştırmışlar ve 3 günlük *Salmonella* biyofilmlerinin, planktonik *Salmonella*'ya kıyasla, benzalkonyum klorür, klorheksidin glukonat, sitrik asit, kuaterner amonyum bileşikleri, sodyum hipoklorit (SH) ve etanol dezenfektanlarına karşı daha az duyarlı olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca düşük SH konsantrasyonlarının, yüksek konsantrasyonlarda SH ile karşılaştırıldığında, 3 günlük bir biyofilm karşısında daha etkili olduğunu gösterdiğini bildirmişlerdir.

Klug ve ark. (2011) diş ve implantlardan kazıma yöntemiyle biyofilm izolasyonu yaptıkları ve confocal laser scanning mikroskop altında inceledikleri çalışmada ağız yoluyla giren çeşitli biyofilmleri tespit etmişlerdir.

Abdallah ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, insan ve tavuklardan izole ettikleri *Salmonella* serotiplerinin hidrofobik polistiren, polivinilklorid (PVC) ve cam yüzeylerinde biyofilm oluşturmalarını değerlendirmiştir. Kantitatif biyofilm analizleri farklı *Salmonella* serotiplerinin %54.54 oranında güçlü bir biyofilm üretimi ile polistiren üzerinde biyofilm oluşturmanın mümkün olabileceğini göstermişlerdir. Sonuç olarak *Salmonella* serotiplerinin, hidrofobik ve hidrofilik

endüstriyel yüzeylerde biyofilm oluşturabildiğini ve bu yüzeylerde *Salmonella* biyofilm oluşumunun gıda güvenliği açısından sakıncalı bulunduğunu ve halk sağlığı riskini artırdığını bildirmişlerdir.

Nunez ve ark. (2014) biyofilm gelişmesinde önemli bir sinyal olan (p)ppGpp'nin bloke edilmesiyle çalışan güçlü bir anti-biyofilm 1018 peptidi tanımlamışlardır. Peptit tedavisinin biyofilm oluşumunu tamamen önlediği ve *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Acinetobacter baumannii, Klebsiella pneumoniae* dahil olmak üzere hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakteriyel patojenlerin temsili suşlarında olgun biyofilmlerin giderilmesine yol açtığını bildirmişlerdir. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus, Salmonella* Typhimurium ve *Burkholderia kenocepacia* üzerine peptitin düşük seviyelerinin biyofilm yayılmasına yol açtığı gözlenirken daha yüksek dozların biyofilm içerisinde bulunan hücrelerin ölümünü tetiklediğini tespit etmişlerdir.

Isoken (2015) taze lahana ve ıspanaktan toplam 82 *Salmonella* spp. izole etmiş ve bu *Salmonella* spp. izolatlarının birçok antibiyotiğe karşı direnç gösterdiğini tespit etmiş ve bu izolatların aynı zamanda biyofilm oluşturma yeteneğinin bulunduğunu bildirmiştir.

2.3. Çeşitli Fajların Konakçıları Üzerine Etkilerinin Araştırıldığı Çalışmalar

Goode ve ark. (2003) *Salmonella enterica'nın* Enteritidis alt türü ve *Campylobacter jejuni* ile kontamine edilmiş tavuk derisinde yaptıkları çalışmada *Salmonella enterica'nın* P22, HT*int* ve *Campylobacter jejuninin* 29C bakteriyofajlarının inoküle edilen mikroorganizmalar üzerine etkisini gözlemişlerdir. Antibakteriyel faj aktivitesini 4 °C'de saptamışlar ve hedef hücrelerin %95' inin öldüğünü belirlemişlerdir.

Flynn ve ark. (2004), Tokyo Enstitüsü'nden temin ettikleri litik pp01 fajı ile büyükbaş hayvan çiftliğinden izole ettikleri e11/2 ve e4/1c olmak üzere 3 bakteriyofaj ile oluşturdukları faj kokteylini kullanarak etlerde *E. coli* O157:H7

kontaminasyonunu azaltmak için yaptıkları çalışmada, bu kokteylin 9 örneğin 7'sinde etkili olduğunu bulmuşlardır.

Higgins ve ark. (2005), yaptıkları bir çalışmada, belediye atık sularından *Salmonella enteritidis* PT 13A varlığında PHL4 fajı izole etmişlerdir. Tavuk karkaslarının yıkama sularına ve tavuk karkaslarına 10^0, 10^1, 10^2 ve 10^3 kob/ml konsantrasyonlarında *S. enteritidis* inokülasyonunu takiben, yıkama sularına 10^6 ve 10^{10} pob/ml, tavuk karkaslarına 10^2, 10^4, 10^8 ve 10^{10} pob/ml konsantrasyonunda PHL4 fajı ilave etmişlerdir. Tavuk yıkama suları ve tavuk haşlama suları ile gerçekleştirilen uygulamalarda 10^2, 10^4 ve 10^6 pob/ml konsantrasyonları herhangi bir azalma sağlamazken 10^8 ve 10^{10} pob/ml konsantrasyonlarının *Salmonella* miktarında azalma sağladığını gözlemişlerdir.

Mclaughlin ve ark. (2006) Misisipi'de atık sulardan ve domuz gübrelerinden *Salmonella* bakteriyofajları izole etmişlerdir ve çift agar tabakası (DAL) plak yöntemi ile test ettikten sonra bakteriyofajları *Salmonella* Enteritidis ve Typhimurium suşları, *Citrobacter, Escherichia, Proteus, Providencia ve Serratia* izolatlarına etkilerini incelemişler ve *Salmonella* Enteritidis ve Typhimurium suşlarında plak oluşumu gözlemişler ve bakteriyofajın *Salmonella* suşlarına etki ettiklerini belirtmişlerdir.

Atterbury ve ark. (2007) 2004-2005 yılları arasında tavuk çiftikleri, kesimhane ve atık sulardan 232 *Salmonella* bakteriyofajı izole etmişler ve en fazla konakçı aralığında olan 3 bakteriyofajın tavuk etinde bulunan üç çeşit *Salmonella* türünün: *Salmonella enterica* serotipleri: *S.* Enteritidis, *S.* Hadar ve *S.* Typhimurium kolonizasyonunu azaltmak için etkisine bakmışlar. İlk faj 24 saat içinde *S.* Enteritidis kolonizasyonu üzerinde >4.2 $\log_{10}$ kob ile hepsinden daha fazla etkisini gösterirken ikinci faj 24 saat içinde sadece *S.* Typhimurium kolonizasyonu üzerinde >2.19 $\log_{10}$ kob azalma gerçekleştirmiş ve üçüncü faj ise *S.* Enteritidis kolonizasyonu üzerine 2.52 $\log_{10}$ kob etki, *S.*Typhimurium kolonizasyonu üzerine 3.48 $\log_{10}$ kob etkili ve sadece *S.* Hadar üzerinde etkisiz olduğunu tespit etmişlerdir.

Kocharunchitt ve ark. (2009) yaptıkları bir çalışmada izole ettikleri iki *Salmonella* bakteriyofajının (SSP5 ve SSP6) yonca tohumlarına aşılanmış olan *Salmonella* Oranienburg üzerindeki etkisine baktıklarında 3 saat sonra aşılanan *Salmonella* Oranienburg üzerinde 1 log10 kob g^{-1} azalma gösterdiğini tespit etmişler. Ancak 3 saatten fazla muamele edilen *Salmonella*'ların büyümesi üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca fajların kalıcı olarak dirençli olan *Salmonella* gelişiminin, tohumda veya in vitro mücadelede belirgin olmadığını ve spesifik olmayan bir fajın biyolojik kontrol için kullanımını zorlaştırabileceğini bildirmişlerdir.

Heringa ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada *Salmonella* suşlarına özgü bakteriyofajlarını kanalizasyon atıklarından izole ve karakterize etmişler. *Salmonella enterica* serotip Typhimurium ile aşılanmış sütlerde beş tür bakteriyofaj karışımı uygulamışlar ve 4 saat içerisinde *Salmonella*'nın 2-log azalmasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Bao ve ark. (2011) tavuk işletmelerinin su atıklarından çift tabakalı agar yöntemiyle izole ettikleri iki farklı *Salmonella* Pullorum'un spesifik bakteriyofajlarını sırasıyla PSPu-95 ve PSPu-4-116 13'ün *Salmonella* Pullorum klinik örnekleri üzerinde antimikrobiyal etkisine bakmışlardır. PSPu-95 fajının *Salmonella* Pullorum izolatının 17'sinde (% 85) litik etkiye sahip olduğu ve PSPu-4-116, 14 izolat üzerinde bir litik etki (% 70) gösterdikleri bildirilmiştir.

Hungaro ve ark. (2013)'nın tavuk derisinde *S. enteritidis* sayısını azaltmada bakteriyofajları ve klasik kimyasal ajanları kullandıkları çalışmalarında, tavuk dışkılarından 5 adet faj izole edilmiş, tanımlanmış ve biyosanitizer olarak seçilmiştir. Bu bakteriyofajların *Podoviridae* familyasına ait oldukları tespit edilmiştir. *S. enteritidis* ile kontamine edilen tavuk derisi örnekleri ($1x10^5$ kob/cm^2), faj kokteyli ve biyokimyasal ajanlarla muamele edilmiş, her iki durumda ortalama 1 log kob/cm^2 azalma olduğu belirtilmiştir.

Augustine ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada tavuk sindirim sistemi *Salmonella* faj izolasyonu için kaynak olarak kullanılmış ve izole ettikleri

ΦSP-1 fajını çalışmalarında kullanmak üzere seçmişler ve transmission elektron (TEM) mikroskobunda görüntüleyerek *Podoviridae* ailesine ait olduğunu bildirmişlerdir. Sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonu gibi farklı fiziksel ve kimyasal koşullarda, seçmiş oldukları ΦSP-1 fajının üretimi ve bu fajın yaşayabilirliğinin koşullarını optimize etmek için analiz etmişlerdir. 40°C sıcaklık, 8 pH değeri ve 0,25 M NaCl varlığının faj adsorpsiyonu için optimum koşullar olduğunu ve 50 °C'de 3 dakikaya kadar *Salmonella* ΦSP-1 fajının canlı kalabildiğini bildirilmişlerdir.

Wong ve ark. (2014) tavuklarda *Salmonella enterica*, *S.* Typhimurium serovarının biyolojik kontrolü için kullanılan ve litik bir bakteriyofaj olan Φst1 fajını tavuk dışkısından başarılı bir şekilde izole etmişlerdir.

Kumar ve ark. (2017) *Salmonella*'ya özgü bakteriyofajları domuz ve kümes hayvanlarının farklı örneklerinden izole etmişlerdir, Bu çalışmada, kısıtlama enzim analizi ve transmisyon elektron mikroskobu yardımıyla 5 farklı bakteriyofajdan PSP 4, PSP 5 ve PSP 7 olarak adlandırılan fajların *Siphoviridae* ailesine ve PSP 1/ PSP 6 olarak adlandırılan fajların *Podoviridae* ailesine ait olduklarını tespit etmişler ve tanımlanan tüm faj genomlarının yaklaşık 42 kbp uzunluğunda olduğunu bildirmişlerdir.

Gong ve Jiang (2017) yaptıkları bir çalışmada çelik üzerinde *Salmonella* hücreleri ve biyofilmlerinin azaltılması için bakteriyofaj etkinliğini değerlendirmişlerdir. Bakteriyofaj ile muamelenin etkinliği (10^4-10^8 PFU / mL) başlangıçta 96 kuyucuklu mikroplakada oluşturulmuş olan güçlü *Salmonella* biyofilmlerine karşı değerlendirilmiştir. Ardından, laboratuvar koşullarında paslanmaz çelik yüzeylere yapışan *Salmonella*'yı azaltmak için bakteriyofaj ile muamele (10^9 PFU / mL) 7 gün boyunca uygulanmıştır. Bakteriyofaj muamelesi ile 96-kuyucuklu mikroplakada biyofilm oluşumunun inhibisyonu ve önceden oluşturulmuş biyofilmin azaltılması, sırasıyla % 90 ve % 66 olarak bulunmuştur. Araştırmacılar bakteriyofajların hem laboratuvar hem de sera koşullarında sert

yüzeylerde bulunan *Salmonella* vejetatif hücresi ve oluşan biyofilmlerinin azaltılmasında etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Duc ve ark. (2018) yaptıkları bir çalışmada tavuk derisinden *Myoviridae* and *Siphoviridae* ailesinde yer alan 18 litik faj izole edip bunların 5 tanesinini kokteyl şeklinde *S*. Enteritidis ve *S*. Typhimurium ile kontamine edilmiş çiğ tavuk göğüsü üzerinde 8^{o} C ve 25^{o} C 'da muamele etmişler. Sırasıyla 8^{o} C 'da aşılanan *Salmonella* bakterisinde 1.41 ve 1.86 log kob/parça azalma ve 25^{o} C 'da sırasıyla 3.06 ve 2.21 log kob/parça azalma gösterdiğini bildirmişlerdir.

Huang ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada *Salmonella* suşlarına özgü umut verici bir faj adayı taramişlar ve süt, sosis ve marul gibi bazı yiyeceklerde *Salmonella'*nın azaltmasını araştırmışlardır. Bir atıksu arıtma tesisinden, nehrin yakınındaki bir kanalizasyondan, bir gölün yakınındaki çiftlik hendeklerinden ve kümes hayvanı çiftliğinden toplam 58 *Salmonella* fajı izole etmişler. Bunların arasında, LPST10, LPST18 ve LPST23 olarak adlandırılan fajların *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028'i yok etmede oldukça etkili olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle, faj LPST10, tüm test edilen *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Enteritidis suşlarına güçlü bir şekilde etki ettiğini bildirmişlerdir.

3. MATERYAL YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada *Salmonella* izolasyon için Adana ilinde satışa sunulan farklı bölgelerden 191 adet gıda örneği (but, kanat ve göğüs olmak üzere 24 tavuk örneği, kas, deri ve bağırsak olmak üzere 63'ü balık örneği, kuş başı ve dana kıyması olmak üzere 22 kırmızı et örneği, 72'si yer fıstığı ve 10'u çeşitli sebze olarak marul ve maydonoz), 37 adet gıda işletmesinden örnekler (işletmede bulunan tüm malzeme ve ekipman yüzeyleri), 9 adet su örnği (Seyhan nehri, Seyhan baraj gölü, sulama kanalı, kanalizasyon suları ve süt işletmesi atık suları) ve Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi genel cerrahi bölümü ve diş hekimliği bölümünden 68 adet klinik örneği (43'ü safra taşı ve 25'i diş plağı), toplamda 296 örnek materyal olarak kullanılmıştır.

Salmonella bakteriyofaj izolasyonu için Adana'da bulunan Seyhan nehri, Seyhan baraj gölü ve kanalizasyon suları olmak üzere 8 farklı yerden temin edilen su örnekleri alınmıştır. İzole edilen bakteriyofajlar tanımlanmış ve araştırmada faj örnekleri olarak kullanılmıştır. Bunun yanı sıra Salmonellex™ fajı ticari olarak Micreos Food Safety (Hollanda) firması ile imzalanan protokolün ardından temin edilmiştir. Ç.Ü. Balcalı hastanesi genel cerrahi bölümünden alınan safra taşları ve diş hekimliği polikliniğinden alınan diş örnekleri *Salmonella* biyofilm izolasyonu için kullanılmıştır.

Araştırmamızda kullanılmak üzere temin edilen klinik örnekler için etik raporu da alınmıştır.

Referans suş olarak *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (ATCC® 13076™) temin edilmiştir.

3.1.1. Besiyerleri

Kullanılan tüm katı ve sıvı besiyerleri piyasadaki firmalarda temin edilmiş ve uygulamadan hemen önce hazırlanmış ve taze olarak kullanılmıştır.

3.1.1.1. Tamponlanmış Peptonlu Su (Merck 1.07228.0500)

Tamponlanmış Peptonlu Su, ISO tarafından önerilen metotta ön zenginleştirme amacıyla kullanılmıştır. Besiyerinden 5.73 g alınarak 225 ml distile suda çözündürülmüştür. Daha sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir (Merk, 2000).

3.1.1.2. Rappaport-Vassiliadis *Salmonella* broth (Merck 1.07666.0500)

Rappaport-Vassiliadis *Salmonella* broth, *Salmonella*'ya özgü seçici sıvı besiyeridir. *Salmonella*'nın 43°C'da gelişmesini sağlamak için bu besiyeri kullanılmaktadır.

Dehidre besiyeri, 42.5 g/L olacak şekilde damıtık suya ilave edilmiştir ve eriyince 10 ml olarak uygun tüplere dağıtılmıştır, 115 °C'da 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve koyu mavı renktedir. 25°C'da PH'sı 5.2±0.2 olarak ayarlanmıştır (Merk, 2000).

3.1.1.3. Selenite Cystine Enrichment broth (Merck 1.07717.0500)

Selenite Cystine Enrichment broth, *Salmonella*'ya özgü seçici sıvı besiyeri olup enterik koliform bakteri ve enterokokların gelişmesini inkübasyonunun ilk 6-12 saatinde baskılarken, *Salmonella*, Proteus, ve Pseudomonas'ı etkilememektedir.

Dehidrate besiyeri, 23 g/L olacak şekilde oda sıcaklığındaki damıtık suya ilave edilip karıştırılmıştır ve eriyince 9 ml uygun tüplere dağıtılmıştır. Besiyerini erimesi ve sterilizasyonu için kısa süre 60°C'da tutulmuştur. Hazırlanmış besiyeri berrak olup sarımsı renktedir, 25°C'da PH'sı 7.0±0.2 olarak ayarlanmıştır (Merk, 2000).

3.1.1.4. Hektoen Enteric agar (Merck 1.10230.0500)

Hektoen Enteric agar, *Salmonella*'ya özgü seçici katı besiyeridir. Besiyerinden 75 g/L olacak şekilde oda sıcaklığındaki damıtık suya ilave edilip

topaklanma olmayıncaya kadar karıştırılmıştır. Sonra agar eriyinceye kadar kaynar su banyosunda tutulmuştur. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda besiyeri eritilirken yapılmıştır. Besiyeri 42-43^{o} C'ye soğuduktan sonra steril petri kutularına yaklaşık 13-15 ml olarak dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve koyu yeşil renktedir, 25°C'da PH'sı 7.7±0.2 olarak ayarlanmıştır (Merk, 2000).

3.1.1.5. Xylose Lysine Deoxycholate agar (Merck 1.05290.0500)

Xylose Lysine Deoxycholate agar, *Salmonella*'ya özgü seçici katı besiyeridir. Besiyerinden 55 g/L olacak şekilde oda sıcaklığındaki damıtık suya ilave edilip topaklanma olmayıncaya kadar karıştırılmıştır. Sonra agar eriyinceye kadar kaynar su banyosunda tutulmuştur. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda besiyeri eritilirken yapılmıştır. Besiyeri 42-43^{o} C'ye soğuduktan sonra steril petri kutularına yaklaşık 13-15 ml olarak dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve koyu yeşil renktedir, 25°C'da PH'sı 7.4±0.2 olarak ayarlanmıştır (Merk, 2000).

3.1.1.6. Tryptic Soy Agar (TSA)

In vitro (canlı hücre dışında) yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde genel katı besiyeri olarak kullanılır. Bu çalışmada, faj titresi hesabında (base) agar olarak tercih edilmiştir. Tryptic Soy Agar, 15 g Tryptic Soy Broth (Merck 1.05459) ve 7.5 g agar (Merck 1.01613) karıştırılması ile 500 ml olarak hazırlanmıştır.

Bileşenler damıtık su içinde çalkalanarak eritilmiş ve otoklavda 121^{o} C'de 15 dakika sterilize edilip, steril petri kutularına yaklaşık 13-15 ml olacak şekilde dökülmüştür (Merk, 2000).

3.1.1.7. Triple Sugar Iron Agar (Merck 1.03915.0500)

Dehidrate besiyeri, 65 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak (kaynar su banyosunda 5-10 dakika tutularak ve sürekli karıştırılarak ya da mikrodalga fırın kullanılarak) tam olarak çözündürülmüştür. Çözünmüş besiyeri standart 16x160 mm tüplere 7'şer ml olarak dağıtılıp, tüpler 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav çıkışında hemen tüpler 1-1.5 cm yüksekliğinde olacak şekilde yatırılmış (tüpün dibinde 2-2.5 cm yüksekliğinde bir besiyeri kalınlığında olacak şekilde) besiyerinin katılaşması beklenmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak kırmızı renkli olup 25°C'da PH'sı 7.4±0.2 olarak ayarlanmıştır (Merk, 2000).

3.1.1.8. Lysine Iron Agar (1.11640.0500)

Dehidrate besiyeri, 32 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak kaynar su banyosunda 5-10 dakika tutularak ve sürekli karıştırılarak ya da mikrodalga fırın kullanılarak tam olarak eritilmiş ve standart 16x160 mm tüplere 7'şer ml olarak dağıtılıp, tüpler 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav çıkışından hemen sonra tüpler 1-1.5 cm yüksekliğinde olacak şekilde (tüpün dibinde 2-2.5 cm yüksekliğinde bir besiyeri kalınlığı olacak şekilde) besiyerinin katılaşması beklenmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak mor renkli olup 25°C'da PH'sı 6.7±0.2 olarak ayarlanmıştır (Merk, 2000).

3.1.1.9. Simmons Citrate Agar

Dehidrate besiyeri, 25.5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak kaynar su banyosunda 5-10 dakika tutularak ve sürekli karıştırılarak ya da mikrodalga fırın kullanılarak tam olarak eritilmiş ve standart 16x160 mm tüplere 7'şer ml olarak dağıtılıp, 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav çıkışından sonra tüpler düz olacak şekilde tutulmuş ve besiyerinin katılaşması beklenmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak mor renkli olup 25°C'da PH'sı 6.6±0.2 olarak ayarlanmıştır (Merk, 2000).

3.1.1.10. SIM Medium (Merck 1.05470.0500)

Dehidrate besiyeri, 30 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak kaynar su banyosunda 5-10 dakika tutularak ve sürekli karıştırılarak tam olarak eritilmiş ve standart tüplere 5'şer ml olarak dağıtılıp, tüpler 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav çıkışından sonra tüpler dik konumda yerleştirilerek besiyerinin katılaşması beklenmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak renkli olup 25°C'da PH'sı 7.2±0.2 olarak ayarlanmıştır (Merk, 2000).

3.1.1.11. Üre broth (Merck 1.08483.0500)

Dehidrate besiyeri, 38.5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde topaklanma olmayıncaya kadar karıştırılmıştır. Besiyeri, standart tüplere 5'şer ml olarak dağıtılıp, tüpler 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak renkli olup 25°C'da PH'sı 6.8±0.2 olarak ayarlanmıştır (Merk, 2000).

3.1.1.12. Luria Bertani (LB) Broth ve Agar (Merck, Germany)

İçerik	g/L
Tripton	10 g
Maya ekstraktı	5 g
Sodyum klorid	10 g
Agar	15 g

Yukarıda verilen içerik distile su ile 1000 ml‘ye tamamlanmış ve sterilizasyondan önce pH 7.0 ± 0.2‘ye ayarlanmıştır. Luria Bertani Broth cam tüplere dağıtıldıktan, Luria Bertani Broth ise agar ilave edilerek hazırlanan agar otoklavda 121 °C / 15 dakika sterilize edilmiştir. LB agar 55 °C ‘ye kadar soğutulduktan sonra petrilere dökülmüştür.

3.1.1.13. Tuzsuz (NaCl'siz) Luria Bertani (LB) Broth ve Agar

İçerik	g/L
Tripton (Neogen MC005)	10 g
Maya ekstraktı (Neogen MC001)	5 g
Agar (Biolife)	15 g

Yukarıda verilen içerik distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve sterilizasyondan önce pH 7.0 ± 0.2'ye ayarlanmıştır. Luria Bertani Broth besiyeri cam tüplere dağıtıldıktan ve yine erlen içerisinde Luria Bertani broth'a agar ekleyerek elde edilen Luria Bertani agar otoklavda (121 °C / 15 dakika) sterilize edilmiştir. Katı besiyerleri 55 ^{o}C'ye kadar soğutulduktan sonra petrilere dökülmüştür.

3.1.2. Çözelti ve Solusyonlar

3.1.2.1. PBS (Fosfat Salin Tamponu)

PBS (Fosfat Salin Tamponu)	g/L
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na2HPO4	1,44 g
KH2PO4	0,24 g

Yukarıda verilen içerik distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dk sterilizasyon işlemi yapılmıştır.

3.1.2.2. SF (Serum Fizyolojik)

8.5g NaCl 1000 ml distile su içinde çözündürülüp 121 °C'de 15 dk sterilizasyon işlemi yapılmıştır.

3.1.2.3. Alkol/Aseton Çözeltisi

Alkol/Aseton çözeltisinin hazırlanmasında temiz bir mezür kullanarak 30 ml aseton üzerine 70 ml saf etanol ekleyerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra çözelti kapaklı şişe içerisine konularak kullanılmıştır.

3.1.2.4. %0.8 Agaroz jel

%0.8 Agaroz jel hazırlanmasında 0.8 g agaroz jel tartılmış ve üzerine 100 ml TAE tampon eklenip eritme işlemi mikrodalga'da çözülme gerçekleşene kadar ara ara karıştırılarak çözülmüştür.

3.1.2.5. %10'luk SDS çözeltisi

%10'luk SDS çözeltisi hazırlanmasında 10 g SDS tartılmıştır ve üzerine 100 ml saf su eklenip çözülene kadar karıştırılmıştır.

3.1.2.6. Tris (1M)

Tris (1M) hazırlanması için 121g Tris Base 800 ml distile suda eritilip, yaklaşık olarak 60 ml HCl asit ilave edilerek pH: 7.6'ya ayarlanarak karışım 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 121 °C'de 15 dk steril edilmiştrir.

3.1.2.7. Tris-EDTA

Tris-EDTA	**g/L**
Tris	1,21 g
EDTA	0,37 g

Tris-EDTA hazırlanmaı için yukarıda verilen içerik distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Sterilizasyondan önce pH 7.0±0.02 ayarlanmıştır. 121 °C'de 15 dk steril edilmiştrir.

3.1.2.8. %2.5 Glutaraldehide (%25'ten)

%2.5 glutaraldehide hazırlanmasında %25 olarak satın alınan glutaraldehide'ten 20 ml alınmıştır ve 180 ml PBS ile 200 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.2.9. %1'lik Uranyl acetate

%1'lik uranyl acetate hazırlanması için 0.1 g toz halinde satın alınan uranyl acetate tartılıp distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. pH 3.5±0.02 ayarlanmıştır. Daha sonra 0.22 por büyüklüğünde filtreden geçirilip kullanmak için hazır hale gelmiştir. (Filtrat oda sıcaklığında uzun süre karanlık ortamda saklanabilmektedir).

3.1.2.10. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer

TBE Stok Solusyonu	**10X**
Tris Base	121.1 g
Borik Asit	61.83 g
EDTA	5.84 g

10X'lik TBE buffer stok solusyonu hazırlanmasında yukarıda verilen içerik distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanıp 121 °C'de 15 dk otoklav da steril edilmiştir. Ph 8.0 ayarlanarak buzdolabında saklanmıştır.

TBE Kullanma Solusyonu	**0.5X**
10X TBE	50 ml
dH2O	950 mL

0.5X TBE kullanım solusyonu hazırlanmasında stok solusyondan (10X) 50 ml alınıp 950 ml saf su ile karıştırılarak solusyon hazırlanmıştır.

3.1.2.11. Gel Loading Buffer (6X)

Gel Loading Buffer	6X
Bromfenol Mavisi	25 mg
Sükroz	4 g
H2O	10 ml

6X gel loading buffer yukarıda verilen içerik karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.1.3. PCR

1.1.1.1 Kullanılan Cihazlar

PCR işlemi 96 örnek kapasiteli Veriti Applied Biosystems (PCR) 9700 termal döngüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

1.1.1.2 Primerler

Biyokimyasal identifikasyon sonucu *Salmonella* genusuna ait olduğu doğrulanan suşların PCR ile tanımlanmasında kullanılan primerler Tablo 9'da belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. PCR işleminde kullanılan primerler

Primer	Hedef gen	uzunluk	Primer sequence (5′⟶ 3′)	Amplifikasyon ürünü (bp)
139 (1)	*inv*A	26	GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA	284
141 (1)	*inv*A	22	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	
Fli15 (2)	*fli*C	22	CGGTGTTGCCCAGGTTGGTAAT	620
Typ04 (2)	*fli*C	16	ACTGGTAAAGATGGCT	
A058 (3)	*sef*A	21	GATACTGCTGAACGTAGAAGG	
A01 (3)	*sef*A	24	GCGTAAATCAGCATCTGCAGTAGC	488

Salmonella sp. aranması (1), *S*. Typhimurium tanımlaması (2), ya *S*. Enteritidis, *S*. Gallinarum ve *S*. Pullorum (3) için kullanılmıştır.

1.1.1.3 Elektroforez

Elektroforez işlemi Thermo marka, elektroforez tankında, görüntüleme işlemi Cleaver (nano PAC-300P) marka görüntüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

1.1.1.4 Agarose Jel Hazırlanışı

%1.5 agaroz jel hazırlanması için 1.5 g agaroz (Sigma) tartılıp temiz bir erlen içerisine aktarılmıştır. Daha sonra Agaroz üzerine 100 ml TBE (0.5X) buffer eklenerek karıştırılmıştır ve 700 watt mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dk kaynatılan karışım, 40-50 °C'ye kadar soğutulmuştur. Hazırlanmış olan agaroz jel donmadan dikkatli bir şekilde kullanılmıştır.

1.1.1.5 Marker

Salmonella tanımlaması için marker olarak 100 bp'lik DNA ladder (Thermo) kullanılmıştır.

Bakteriyofaj tanımlaması için 0.1-200 kb ve 48.5-1,018 kb aralığında olan iki ayrı lambda ladder (Biolabs) PFG (pulsed field jel elektroforezi) işleminde kullanılmıştır.

1.1.1.6 Ethidium Bromid

Elektroforez işleminden sonra görüntüleme için jelin boyanmasında kullanılmış olan %1'lik Ethidium Bromid (Sigma) 500 ml 0.5X TBE ile hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. *Salmonella*'nın Klasik Yöntem İle İzolasyonu ve Tanımlanması

3.2.1.1. Gıda Örneklerinden, Gıda İşletme Yüzeylerinden, Safra Taşlarından ve Diş Örneklerinden *Salmonella* İzolasyonu

Çalışılan gıda örnekleri 25 g olarak tartılıp parçalanıp ön zenginleştirme amacıyla 225 ml tamponlanmış peptonlu su (Merck) içeren erlenlere koyulmuştur.

Yüzeyden alınan örneklerde ise steril eküvyon çubukları yüzeylerle temas ettrildikten sonra içerisinde 5 mL tamponlanmış peptonlu su bulunan tüplere yerleştirilmiştir. Laboratuvar ortamında en az on defa eküvyon ucundaki pamuk tamponlanmış peptonlu suya batırılmıştur. Ön zenginleştirme aşamasının devamında hem gıda hem de yüzey örneklerinden *Salmonella* spp. izolasyonunda ISO 6579 yöntemi kullanılmış ve klasik izolasyon üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Tamponlanmış peptonlu su içerisinde homojen bir şekilde karıştırılmış olan örnekler 37 °C 'da 16–20 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürden 0,1 ml alınarak 10 ml Rappaport Vassiliadis Soy broth (RVS) (Merck) içeren tüplere konulup 42 °C'de 7 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aynı kültürden 1 ml daha alınarak 9 ml Selenite–Cystine Medium (Merck) içeren tüplere aktarılarak 37 °C'de 7 saat inkübasyona bırakılmıştır (Piknová ve ark., 2002). İnkübasyonun akabinde iki ayrı sıvı besiyerinden Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar (Merck) ve Hektoen Enteric Agar besiyerine sürme ekim yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. XLD agar besiyerinde gelişen merkezi siyah koloniler veya tamamen siyah koloniler ve Hektoen Enteric Agar (Merck) besiyerinde gelişen merkezi siyah koloniler veya yeşil ila mavimsi-yeşil koloniler *Salmonella* şüpheli olarak kabul edilmiştir. Daha sonra doğrulama amacıyla saf halde izole edilen şüpheli kolonilerin biyokimyasal testleri gerçekleştirilmiştir (GÖK, 2005; Anonimous, 2002; Piknová ve ark., 2002).

3.2.1.2. İzole Edilen *Salmonella'* ların Tanımlaması

3.2.1.2.(1). Biyokimyasal Tanımlama

3.2.1.2.(1).a. Gram Boyama

Şüpeli koloni öze yardımıyla alınıp temiz bir lam üzerine yayıldıktan sonra bek alevi üzerinde 3 kez fiksasyon yapılmıştır. Bir kaç damla Kristal Violet damlatılıp 1 dakika boyunca bekletilmiştir ve sonra saf su ile yıkanmıştır. İkinci aşamada bir kaç damla lugol çözeltisi damlatılıp 1 dakika beklenip saf su ile yıkanmıştır. Üçüncü aşamada 15 saniye boyunca %96'lık Etil Alkolde bekletilip

saf su ile yıkanmıştır**.** Son aşama olarak 15 saniye boyunca Sulu Fuksin Çözeltisi damlatılıp saf su ile yıkandıktan sonra kurutulup, immersiyon yağıyla 100' lük objektif altında incelenmiştir. Gram (-) ve çubuk hücreler değerlendirmeye alınmıştır (Tammakritsada ve Todhanakasem, 2012).

3.2.1.2.(1).b. Hareket Testi

Şüpheli kolonilere yumuşak agar besiyeri içeren dik konumda duran tüpler içinde hareketlilik testi uygulanmıştır. İğne uçlu öze yardımı ile şüpheli koloniden alınıp 5 ml SIM medium besiyerine ekim yapılmıştır. 18-24 saat süre ile 37 °C'de inkübasyona bırakılmış besiyerleri, inkübasyonun sonunda değerlendirmeye alınmıştır. İnokülasyon hattının yanlarına doğru yayılmış, şemsiye görünümlü bulanıklık bakterinin hareketliliğinin pozitif olduğunu göstermiştir (Merk, 2000).

3.2.1.2.(1).c. İndol Testi

Hareket testi sonrasında SIM medium besiyerinde gelişmiş olan bakterinin indol testini uygulamak amacıyla 1 ml KOVACS' (Merck) indol çözeltisi eklenip, karıştırılmıştır ve tüp kendi haline bırakılmıştır. En geç 1-2 dakika içinde tüpün üzerinde vişne çurüğü renkli halka oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Merk, 2000).

3.2.1.2.(1).d. Sitrat Testi

Şüpeli koloniden öze yardımıyla alınıp Simon sitrat agar besiyeri yüzeyine ekim yapılmıştır. Besiyeri bir gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Pozitif sonuçta besiyeri yeşil renkten mavi renge dönüşmüştür. *Salmonella* Sitrat negatif olduğundan Sitrat (-) sonuçlar değerlendirmeye alınmıştır (Tammakritsada ve Todhanakasem, 2012).

3.2.1.2.(1).e. Üre Testi

Bir öze dolusu koloni alınıp Urea Broth besiyerine inoküle edilmiştir. 37 °C'de 48 saate kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüp rengi kontrol edilmiştir. Kırmızı renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu ise testin negatif olduğunu göstermiştir. *Salmonella* Üre negatif olduğundan Üre (-) sonuçlar değerlendirmeye alınmıştır (Merk, 2000).

3.2.1.2.(1).f. Triple Sugar Iron Agar (TSI) Testi

İğne öze yardımıyla şüpheli koloniden alınıp önce besiyerinin dip kısmına kadar saplanıp ve sonra besiyerinin yüzey kısmına sürme yöntemiyle ekim yapılıp 37 °C'de 24 saate kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda dip kısımda besiyerinin renginin sarıya dönüşmesi, orta kısımda siyah renk oluşumu H_2S pozitif ve yüzey kısımda besiyeri renginin kırmızı dönüşmesi *Salmonella* pozitif olarak değerlendirilmiştir (Merk, 2000).

3.2.1.2.(1).g. Lysin Iron Agar Testi

Yatık agar olarak tüplerde hazırlanmış Lysin Iron Agarın sadece yüzeyine sürme yöntemiyle ekim yapılıp 37 °C'de 24 saate kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyerinin dip kısmında menekşe rengi, yüzey kısmında menekşe rengi ve orta kısımda siyah rengin oluşması (H2S pozitif) *Salmonella* pzitif olarak değerlendrilmiştir (Merk, 2000).

3.2.1.2. (2). API 20E Testi

Çalışmamızda izole edilen *Salmonella* spp. şüpheli suşlar API 20E (BioMérieux, Fransa) hızlı test kitleri kullanılarak incelenmişlerdir. *Salmonella* spp. şüpheli suşlar TSA besiyerine ekildikten sonra 37°C sıcaklıkta 18-24 saatlik inkübasyona bırakıldılar. Aktif hale gelen kültürler öze yardımı ile alınarak %0,85'lik fizyolojik tuzlu su içinde homojenize edilmişlerdir. Her bir kuyucuğa aşılama yapıldıktan sonra API 20 E hızlı test kiti ile tanımlama için test kartları

tekrar 37°C sıcaklıkta 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar https://apiweb.biomerieux.com/jsp/ident/index.jsp sitesinde yer alan yazılıma göre değerlendirilmiştir. İzolatların gösterdiği enzim aktivitelerine göre her bir kuyucuktaki renk değişimi gözlenerek oluşan rengin koyuluğuna göre 0-5 arasında arasında değerlendirme yapılmıştır (Biomerieux, 2002).

3.2.1.2.(3). Moleküler Tanımlama

3.2.1.2.(3).a. Kaynatma Yöntemi ile Kolonilerden DNA İzolasyonu

Biyokimyasal testlerle doğrulanan *Salmonella* spp. izolatları, XLD agarda üremiş olan kolonilerden bir öze yardımıyla alınıp Triptic Soy broth'a ekim yapılmıştır ve 24 saat süreyle 37 ° C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra 1.5 ml sıvı kültürden ependorf tüpe alınıp 5 dakika boyunca 10,000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Supernatant kısım atılmıştır ve pelet olarak adlandırılan çökelti kısım iki kez steril saf su ile yıkandıktan sonra 200 µl steril saf su ilave edilerek çökeltilerin (pelet) homojenize edilmesi için vorteks yardımıyla karıştırılmıştır ve 100°C'de 10 dakika boyunca su banyosunda kaynatılmıştır. Kaynatma işleminin ardından vortekslenen tüpler 12,000 rpm 'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. DNA'yı içeren süpernatant başka bir tüpe aktarılıp -20 ° C'de saklanmıştır. Ekstre edilen DNA'nın miktarı ve saflığı bir NanoDrop spektrofotometresi kullanılarak ayarlanmıştır (Anejo-Okopi ve ark., 2016).

3.2.1.2.(3).b. DNA İzolatlarının amplifikasyonu

PCR'da kullanmak amacıyla 2 µl DNA izolatı, 2.5 mM MgCl, 10 mM Tris-HCl, PH: 8.0, 5 mM KCl, her bir nukleotit'ten 0.2 mM, her pimer'den 0.8 pmol/ml ve 1 U Taq DNA polimeraz'dan oluşan toplam 25 ml bir master miks karışımı hazırlanmıştır. Her DNA örneği için ayrı ayrı primer kullanılmıştır. Amplifikasyonlar, Oliveira ve ark. tarafından modifiye edilmiş yöntem ile Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler PCR kullanarak yapılmıştır. İlk denatürasyon 5 dakika boyunca 94 °C'de, ardından 1 saniye boyunca 94 °C'de 35 devir

denatürasyon, 1 saniye boyunca 55 °C'de sertleştirme ve 21 dakika boyunca 72 °C'de son bir uzatma yapılmıştır. Son olarak da 72 °C'de 7 dakika uzatmaya bırakılmıştır. Amplifikasyon ürünlerinin elektroforezlerinde (Cleaver; nano PAC-300P) moleküler ağırlık markörü olarak 100 bp'lik bir ladder'den 4 µl ve her numune karışımından 6 µl her bir kuyucuğa yüklenmiştir ve %1.2'lik agarose jel için elektroforez cihazında TBE tamponu kullanılarak 40 Voltaj'da 1 saat yürütülmüştür. İşlem tamamlandıktan sonra 5 mg/ml etidyum bromür ile 15 dakika boyunca boyanmıştır ve fragmanlar UV ışığı kullanılarak görselleştirilmiştir (Oliveira ve ark., 2002).

3.2.2. *Salmonella* Biyofilm İzolasyonu ve Tanımlanması

3.2.2.1. Safra Taşları ve Diş Örneklerinden *Salmonella* Biyofilm İzolasyonu

Çukurova Üniversitesi genel cerrahi bölümünden safra taşları ve diş hekimliğinden temin edilmiş olan diş örneklerinin *Salmonella* biyofilm yapısını Scaning Elektron Mikroskobu (SEM) yardımıyla görüntülemek için fiksasyon işlemi yapılmıştır. Safra taşları PBS ile yıkanıp %2.5 glutaraldehide içeren PBS'de 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra preparat çıkarılıp sırasıyla (25%, 50%, 75%, ve 100%) etanolda kurutulup üzerine altın-palladium tozu eklenmiştir. Fiksasyonu yapılan safra taşları SEM mikroskobunda incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir (Yele ve ark., 2012).

3.2.2.2. *Salmonella* spp.'lere Biyofilm Oluşturulması

3.2.2.2.(1). Milroplaka Metodu ile *Salmonella* spp.'lerin Biyofilm Oluşturulması

Gıda ve Klinik örneklerinden izole edilmiş *Salmonella* spp. izolatları Lauryl Bertani Agar (LB) ve Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD)'la sürme ekim yapılmış olup 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. LB agar üzerinde üreyen belirgin bir koloni seçilerek, 10 ml tuzsuz LB broth içinde seyreltilmiştir. Tuzsuz LB broth içinde seyreltilmiş olan *Salmonella* spp. McFarland yardımıyla

0.5 değerinde ayarlanmıştır. LB broth'da bulunan *Salmonella* spp.'nin 30 mikrolitresi, 96 kuyucuklu mikroplakanın her bir kuyucuğunda bulunan 100 µl LB w/o NaCl üzerine transfer edilmiştir. Mikroplakalar 37°C'da 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. 7 gün içerisinde her 48 saatte bir steril kabin içerisinde oda sıcaklığında dinlenmeye bırakılmıştır. Daha sonra üzerine steril çok uçlu pipet yardımıyla mikroplaka kuyucuklarına 130 µl steril taze tuzsuz LB broth eklenmiştir. 37°C'da 7 gün inkübasyondan sonra mikroplakalar boşaltılıp, nazikçe steril distile su ile yıkanmıştır. Kuyucuklarda oluşan biyofilm 130 µl 1% crystal viole ile boyanmıştır. Mikroplakalar boya giderilene kadar 3 kere steril distile su ile yıkanmıştır. 100 µl etanol ve 30 µl aseton (70:30 v/v) solüsyonları kuyucukların içerisinde Kristal viyole boyası ile karıştırılmış ve petriler 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra optik yoğunluk mikroplaka okuyucu cihazında (Thermo Scientific) OD590 ölçülüp değerlendirilmiştir (Corcoran, 2013).

3.2.2.2.(2). Safra Taşları ve Diş Örnekleri Üzerinde *Salmonella* spp.'lere Biyofilm Oluşturulması

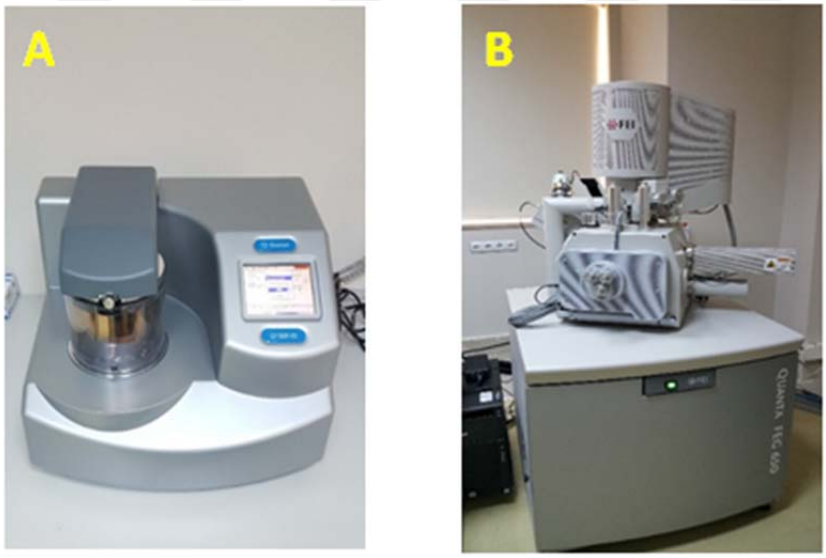
Çukurova Üniversitesi genel cerrahi bölümünden temin edilen safra taşları ve diş hekimliğinden temin edilmiş olan diş örnekleri üzerinde *Salmonella* spp.'nin biyofilm oluşturma işleminde; steril cam petri içine yerleştirilmiş temiz bir lam üzerine koyulan Safra taşları ve diş örnekleri, klinik ve gıda örneklerinden izole edilen *Salmonella* spp. suşları ile aşılanmıştır. Daha sonra safra taşları için % 30 OX safra içeren Lauryl Bertani (LB) broth ve dişler için tuzsuz LB broth besiyeri kullanılmış ve kullanan örnekler 37 ^{o}C'de inkübasyona bırakılmıştır. Her 24 saatte bir safra taşları ve dişler 1x fosfat buffer salin (PBS) ile iki kez yıkanmıştır ve kullanılan LB broth besi ortamları değiştirilmiştir. Her besiyeri değişiminde refakatçı mikroorganizmaları baskılamak amacıyla yeni LB broth'a 50 µg/ml ampicillin, 25 µg/ml chloramphenicol, 10 µg/ml tetracyclıne ve 45 µg/ml kanamycin antibiyotikleri ilave edilmiş ve gece boyunca 37 ^{o}C'de çalkalanarak

inkübe edilmiştir. Biyofilmlerin gelişme dönemleri 4 ile 18 gün arasında değişmekte olduğundan işleme 18 gün devam edilmiştir (Prouty ve ark., 2002).

3.2.2.2.(3). *Salmonella* biyofilmlerin tanımlanması

3.2.2.2.(1).a. Scaning Elektron Mikroskobuyla (SEM) Biyofilmlerin Tanımlanması

Safra taşı ve diş örnekleri fiksasyon amacıyla PBS ile yıkanıp %2.5 glutaraldehide içeren PBS'de 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra preparat çıkarılıp sırasıyla (25%, 50%, 75%, ve 100%) etanolda kurutulup üzerine altın-palladium tozu kaplamak için kaplama cihazına (Q150R Plus) koyulmuştur. Fiksasyonu yapılan safra taşları SEM mikroskobunda (Quanta FEG 650) incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir (Yele ve ark., 2012; Uchida ve ark., 2014; Qin ve ark., 2014; Wong ve ark., 2010; Gonzalez-Escobedo ve Gunn, 2013).



Şekil 3.1. A: kaplama cihazı (Q150R Plus). B: Scaning Elektron Mikroskobu (SEM) (Quanta FEG 650).

3.2.3. *Salmonella* Bakteriyofaj İzolasyonu ve Tanımlanması

3.2.3.1. *Salmonella* Bakteriyofaj İzolasyonu

Salmonella bakteriyofaj izolasyonu için Adana'da bulunan Seyhan nehri, Seyhan baraj gölü, sulama kanalı ve kanalizasyon suları olmak üzere 8 farklı yerden su örnekleri alınmıştır. Alınan su örnekleri en kısa zamanda laboratuvara getirilmiştir. Getirilen örneklerden 25 ml su örneği analize alınmış ve 4°C'de, 15 dakika boyunca 15,285x g devirde santrifüj (Beckman Coulter; Made in USA) edilmiş ve üstte kalan kısım 0,22 µm por büyüklüğündeki filtreden (Millex®- GP; Filter Unit) geçirilmiştir. Filtratın 5 ml'si, 5 ml TSB (Tryptic Soy Broth) ve 0,1 ml *Salmonella* spp. (daha önce gıda ve su örneklerinden izole edilmiş) örneği ile karıştırılmıştır. Bu karışım bir gece boyunca 37°C'de çalkalamalı inkübatör içerisinde homojenize bir şekilde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra bakteri 4°C'de, 10 dakika boyunca 15.285x g devirde santrifüjlenerek parçalanan bakterilerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Üstte kalan kısım 0.22 µm por büyüklüğündeki filtreden tekrar geçirilmiştir. Filtreden geçen bakteriyofaj aktivitesi *Salmonella*'nın bulunduğu TSA (Tryptic Soy Agar) üzerine 10 µl olacak şeklinde damlatılarak test edilmiştir. Petriler 37°C de 18 saatlık inkübasyon sonunda plak oluşumu için kontrol edilmiştir. Lizis pozitif plaklar izole edilip çift tabakalı agar metodu ile saflaştırılmıştır (Bao ve ark., 2011).

3.2.3.2. Çift Tabaka Agar Metodu İle *Salmonella* Bakteriyofaj Titresinin Hesaplanması

Besiyeri üzerinde yaygın bir şekilde tabaka oluşturan bakteri içerisinde plak üreten bir fajın, konakçısını lize edebilme yeteneği yani faj titresi genellikle klasik plak oluşturma denemesi olan çift tabaka agar tekniği kullanılarak ölçülmektedir.

Çalışma sırasında kullanılacak olan *Salmonella* spp. suşlarının 10 ml TSB (Tryptic Soy Broth) içinde 37 °C'de 18 saat süre inkübasyona bırakılarak McFarland 0.5 hücre konsantrasyonuna ulaşıncaya kadar yeniden üremeleri

sağlanmıştır. İstenen konsantrasyona ulaşmak için NaCl çözeltisi ile seri dilüsyonları hazırlanmıştır.

Bu çalışmada *Salmonella* bakteriyofajının 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 ve 10^{10} pob/ml olmak üzere 6 farklı konsantrasyonun etkisini incelemek amacıyla % 0.85 NaCl solüsyonu ile seri dilüsyonları hazırlanmıştır.

Çift tabaka agar tekniğinde yumuşak agar ve base agar kullanılmış olup alt agar olarak TSA, üst agar için % 0.75 agar içeren TSB ile hazırlanmış yumuşak agar kullanılmıştır. Otoklav sonrası donmaması için yumuşak agar, 45 °C'ye ayarlı su banyosunda kullanım öncesinde bekletilmiştir.

3 ml hacimli yumuşak agara önce 100 µl *Salmonella* spp. suşları ardından 100 µl 10^5 - 10^{10} aralığındaki farklı konsantrasyonlara seri olarak seyreltilen faj'dan 100 µl eklenerek vortekslenmiş ve faj ile bakterinin karışması sağlanmıştır. Daha önceden hazırlanan ve içerisinde TSA bulunan petriler üzerine yukarıda anlatıldığı şekilde yumuşak agar karışımı dökülmüş ve agarların katılaşmaları için petriler 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından petriler 37 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonun ardından fajın tek tek düştüğü noktalarda bakterinin lize olması sonucu oluşan çıplak gözle görülebilir sınırları belli, yuvarlak plaklar (şeffaf/berrak zonlar) sayılarak sayım sonucu PFU/ml olarak belirtilmiştir (McLaughlin ve ark., 2006).

3.2.3.3. İzolasyonu Yapılan *Salmonella* Bakteriyofajının Saflaştırması

Faj varlığı saptanan faj süspansiyonlarından bakteriyofajı saflaştırmak için 3.2.3.2'de anlatıldığı şekilde çift tabakalı agar metodu kullanılmış ve tek plak düşürülmüştür. Faj süspansiyonlarının 10^{-6}'ya % 0.85 NaCl solüsyonu kullanılarak 1:10 dilüsyonları hazırlandıktan sonra, her bir dilüsyondan 0.2'şer ml alınmış ve içerisinde 0.2'şer ml 4 saatlik konakçı bakteri bulunan steril eppendorf tüplere alınmıştır. Adsorpsiyon için oda sıcaklığında 10 dk beklendikten sonra, faj-bakteri karışımı 3 ml yumuşak agar (TSB+ % 0.75 agar-agar- 45 ºC'de bekletilmiş) içine

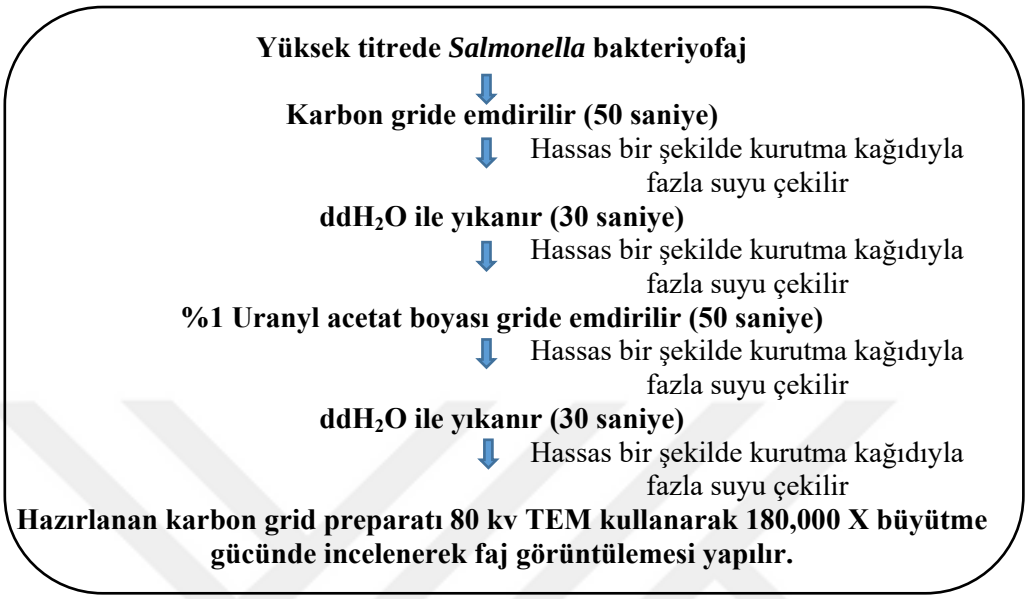
katılıp hafifçe karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım önceden petri kaplarında hazırlanmış TSA (Tryptic Soy Agar) üzerine dökülüp homojen bir dağılım sağlandıktan sonra 37 ºC'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında oluşan faj plaklarının tek tek düştüğü bir bölgeden tek bir faj plağı steril enjektör ucuyla kesilip, 5 ml TSB (Tryptic Soy Broth) içine alınmıştır ve vortekslenerek fajların TSB içine geçmesi sağlanmıştır. 4 saatlık konakçı kültürden tekrar 0.1 ml alınarak bu tüp içine pipetlenmiş ve adsorpsiyonun gerçekleşmesinden sonra 5 ml daha TSB eklenmiştir. 37º C'de 18 saat inkübasyonun ardından hücre artıklarını uzaklaştırmak için 5000 rpm'lik santrifüj işlemi 10 dk süre ile uygulanmıştır. Elde edilen süpernatant, 0.45 µm porlu filtrelerden geçirilip %10 kloroform eklenerek saf faj filtratı elde edilmiş ve diğer analizler için kullanılmıştır (Acar, 2007).

3.2.3.4. Saflaştırılmış *Salmonella* Bakteriyofajının Tanımlanması

3.2.3.4.(1). Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) İle Bakteriyofajların Tanımlanması

Salmonella bakteriyofajının hücre morfolojisinin incelenmesinde, negatif boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla Grid yüzeyi siyah bir zemin oluşturmak için karbon ile kaplanmıştır. İncelenecek bakteriyofaj yapısının daha belirgin görüntülenmesi için de % 1 uranil asetat kullanılarak Transmisyon Elektron Mikroskobunda (TEM)(JEOL; JEM-1400) Bar: 50-100 nm'de görüntülenmiştir (Augustine ve ark., 2013).

Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) için bakteriyofaj preparatının hazırlanması Şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) için bakteriyofaj preparatının hazırlanması.

3.2.3.4.(2). Faj genom büyüklüğünün belirlenmesi

Fajların genom boyutları, pulsed field jel elektroforezi (PFGE) ile ölçülmüştür. Saflaştırılmış faj DNA plugları (1:1), %1.4 (w /v) erimiş PFGE dereceli agaroz ile karıştırılarak yapılmıştır. Faj DNA'sını çıkarmak için DNA plugları proteinaz K (0.1 mg mL-1) ve lizis tamponu ile muamele edilmiştir. Daha sonra yapılacak analizler için 4 °C'de 0.5 x Tris EDTA'da (TE) depolanmıştır. İzole edilen faj DNA'sının saflığını sağlamak için PFGE ile test edilmiştir. Tüm pluglar görüntüleme sistemi kullanılarak PFGE jel üzerinde 18 saat boyunca 4.5 volt/cm kullanarak 5 ila 120 saniye 15^{o}C'te yürütülmüştür. İşlem tamamlandıktan sonra 5 mg/ml etidyum bromür ile 15 dakika boyunca boyanmıştır ve fragmanlar UV ışığı kullanılarak görselleştirilmiştir (Akhtar ve ark., 2014).

3.2.4.1. *Salmonella* Vejetatif Hücreleri Üzerine Bakteriyofajların Etkisi

Bakteriyofaj filtratı, Tryptone Soy Agar (TSA)'a 0.1 ml ekilen vejetatif *Salmonella* spp.'ler üzerine 10 µl miktarında nokta şeklinde damlatılmış ve petriler 37°C de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda bakteriyofajların lizis etkisi çıplak gözle kontrol edilmiştir (Tunail, 2009; Knezevic ve Petrovic, 2008).

3.2.4.2. *Salmonella* Biyofilmi Üzerine Bakteriyofajların Etkisi

3.2.4.2.(1). Mikroplakada Geliştirilen *Salmonella* Biyofilm Üzerine *Salmonella* Bakteriyofajlarının Etkisi

Mikroplakalarda oluşturulan *Salmonella* biyofilmi üzerine bakteriyofajların etkileri incelenmiştir. Bu amaçla bir *Salmonella* bakterisi, en fazla üç günlük bir agar yüzeyinden tek bir koloni olarak alınıp Tryptic Soy Broth (TSB)'da 37°C' de, 120 rpm' de, 18 saat süreyle aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilmiş *Salmonella* bakterisi 1/100 oranında TSB ile sulandırılmıştır ve 96 kuyucuklu steril düz tabanlı mikroplakanın iki sırasına 0.2 ml konularak, 37 °C'de 24 saat aerobik olarak inkübe edilmiştir. Süre sonunda mikroplaklar OD590' da okutulup daha sonra bakteriyofajla muamele edilmiştir. Biyofilmin azalma etkisini görmek için *Salmonella* bakteriyofajı 6. saatte ve 24. saatte bir *Salmonell*a biyofilm ile muamele edilmiştir. İlk olarak, kuyucuklardaki planktonik bakteriler yeni bir mikroplakaya aktarılmış ve OD590'da absorbans değeri ölçülmüştür. Kuyucuklar daha sonra fosfat tamponlu salin (PBS) ile iki kez yıkanıp hem numune direnç testi hem de total kuyucuğa tutunmuş biyomasın miktarın belirlenmesinin yapılması amacıyla % 1 kristal viyole ile boyanmıştır. Biyofilmin OD590 değerinde kantitatif ölçümünün yapılabilmesi için, kuyucuktaki kristal viyolenin çözülmesi amacıyla susuz etanol kullanılmıştır. Her bir 6 ve 24 saatte, üstte kalan sıvı kısımdaki faj titresinin belirlenmesinde çift tabaka agar yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışma üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Her 24 saatte bir kuyucuktaki besiyeri (TSB)'nin yarısı kadar taze TSB eklenerek işleme devam edilmiştir. Bu işlem yapılırken biyofilme zarar verilmemesine dikkat edilmiştir. Aynı zamanda

bakteriyofaj etkisinin sınırlandırılması için yapılan kısıtlama işlemi için biyofilm yıkanma aşaması da dikkatle yapılmıştır.

Salmonella bakteriyofajının *Salmonella* biyofilm üzerinde etkisinin gösterilmesi analiz 96 kuyucuklu mikroplaka üzerinde iki ayrı günde ve en az 2 tekrar olacak şekilde yapılmıştır. Sonuçların ortalaması alınmıştır ve *Salmonella* bakteriyofajın *Salmonella* biyofilm üzerine etkisinin yüzdesi her faj seyreltisi için aşağıda yazılan formüle göre hesaplanmıştır;

Biofilm Azalma Etkisi% = (OD Kontrol – OD işlem görmüş) ÷ OD Kontrol × 100

(Hosseinidoust ve ark., 2013; Gong ve Jiang, 2017)

3.2.4.2.(2). Safra Taşı ve Diş Plakları Üzerinde *Salmonella* Biyofilm Geliştirilmesi ve *Salmonella* Bakteriyofajlarının Oluşturulan Biyofilmler Üzerine Etkisi

Çukurova Üniversitesi genel cerrahi bölümünden temin edilen safra taşları ve diş hekimliği polikliğinden temin edilmiş olan diş örneklerine 3.2.2.2(2)'de anlatıldığı şekilde biyofilm yaptırılmış ve sonrasında safra taşları ve diş örnekleri yüzeyinde yaptırılmış olan *Salmonella* biyofilm üzerinde inhibisyon etkisine bakmak üzere 100µl bakteriyofaj eklenmiştir. Her bir *Salmonella* bakteriyofjı ile muamele edilmiş olan safra taşları ve diş örnekleri 6 ve 24 saat olmak üzere 37°C'de, 120 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Safra taşları ve diş örnekleri 6 ve 24 saat inkübasyon sonunda fiksasyon amacıyla PBS ile yıkanıp %2.5 glutaraldehide içeren PBS'de 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra preparat çıkarılıp sırasıyla 25%, 50%, 75%, ve 100% etanolda kurutulup kaplama cihazında (Q150R Plus) üzerine altın-palladium tozu eklenmiştir. Fiksasyonu yapılan safra taşları SEM mikroskobunda (Quanta FEG 650) incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir (Prouty ve ark., 2002; Yele ve ark., 2012; Uchida ve ark., 2014; Qin ve ark., 2014; Wong ve ark., 2010; Gonzalez-Escobedo ve Gunn, 2013).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

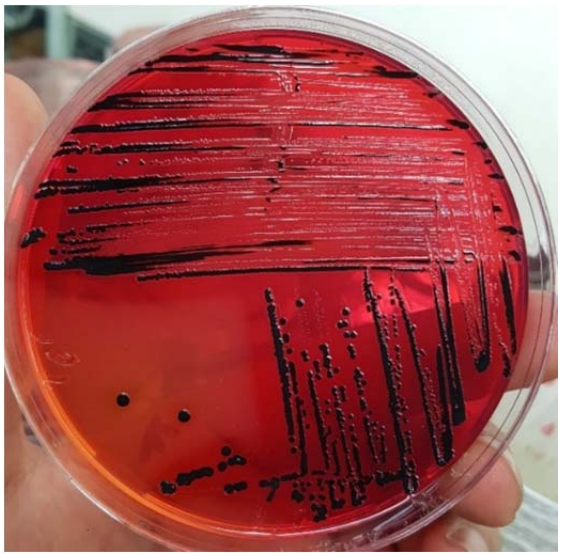
4.1. *Salmonella*'nın Klasik Yöntem İle İzolasyonu ve Tanımlanması

Araştırma kapsamında 2 tekerrürlü olarak çalışılan toplam 296 adet gıda işletmesi (işletmede bulunan tüm malzeme ve ekipman yüzeyleri), gıda (tavuk, balık, kırmızı et, yer fıstığı ve sebzelerden), su (Seyhan nehri, göl, kanalizasyon suları ve süt işletmesi atık suları) ve klinik (safra taşı ve diş plakları) örnekleri kullanılmıştır. Örnekler *Salmonella* türlerinin varlığı açısından incelenmiştir.

4.1.1. Gıda, Klinik ve Su Örneklerinde *Salmonella* İzolasyonu

4.1.1.1. Şüpheli *Salmonella* spp.'lerin Koloni Morfolojileri

Çalışmada, iki farklı seçici katı besiyeri olarak Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD) ve Hektoen Enteric Agar (HE) kullanılmıştır. XLD agar besiyerinde 2-4 mm çapında, tipik siyah merkezli ve şeffaf zonlu koloniler ve HE agar besiyerinde mavi-yeşil ve tipik siyah merkezli koloniler *Salmonella* spp. olarak değerlendirmeye alınmıştır. Şekil 4.1'de XLD Agar'da görülen şüpheli *Salmonella* spp.kolonileri verilmiştir.



Şekil 4.1. XLD Agar'da şüpheli *Salmonella* spp. kolonilerinin görüntüsü

Bu araştırmada incelenen 296 örnekten izole edilen şüpheli *Salmonella* spp. varlığı örnek dağılımına göre Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Örneklerden izole edilen şüpheli *Salmonella* spp. izolatlarının örneklere ve alınan yerlere göre dağılımı

Örnek Adı		**Örnek Sayısı**	***Salmonella* spp.**
Gıda	Gıda işletmesi	37	+ (12/37)
	Beyaz et	24	+ (22/24)
	Kırmızı et	22	+ (12/22)
	Balık	63	-
	Yer fıstığı	72	-
	Sebzeler	10	-
Göl, Kanal atık Sular	Atık su	9	+ (3/9)
Klinik	Safra taşı	43	-
	Diş plağı	25	+ (2/25)
Toplam		**296**	**(51/296)**

+: Pozitif, -: Negatif

Çalışılan örneklerden gıda işletme yüzeyleri, tavuk eti (göğüs, kanat, but ve tüm tavuk) ve kırmızı et (kıyma ve kuşbaşı) olmak üzere 78 örnekte şüpheli *Salmonella* spp. varlığı görülmüştür. Ayrıca, bazı su ve diş örneklerinde de şüpheli *Salmonella* spp. kolonileri görülmüşken, safra taşı, balık, yer fıstığı ve sebzelerde *Salmonella* spp. varlığına rastlanmamıştır.

Kaushik ve ark (2014) yaptıkları çalışmada 228 tavuk eti ve 142 pazar sütü örneğinden *Salmonella* izolasyonu yapmışlar ve toplam 370 örnekten biyokimyasal reaksiyonlara dayanarak *Salmonella,* tavuk etinde % 23.7 (54/228) ve süt örneklerinde % 7.7 (11/142) pozitif olarak bulunmuştur (Kaushik ve ark., 2014).

Heinitz ve Johnson (1998) balık ve su ürünlerinden oluşan toplam 156 örneğin sadece 5' (%3.2) inde *Salmonella* spp. tespit ettiklerini bildirmişlerdir (Heınıtz ve Johnson, 2016).

4.1.1.2. Gıda, Klinik ve Su Örneklerinden İzole Edilen Şüpheli *Salmonella* spp.'lerin Hücre Morfolojileri

Koloni görüntüleri beklenen özelliklere sahip olan şüpheli *Salmonella* spp.'lere hücre morfolojilerinin araştırılması için Gram boyama yapılmıştır ve yapılan gram boyama sonuçlarına bakarak çubuk şeklinde ve gram negatif hücre morfolojisine sahip *Salmonella* spp.'lerin izole edildiği yerler ve örnek kodları Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Gıda, Klinik ve Su Örneklerinden izole edilen ve gram boyama sonucu şüpheli *Salmonella* spp. olarak belirlenen örnekler ve izolasyon kaynakları

***GB:** Gıda Beyaz et Örneği, **G:** Göğüs, **K:** Kanat, **B:** But, **TT:** Tüm tavuk, **Ki:** Kıyma, **Ku:** Kuzuşbaşı, **İ:** İşletme,

İzolasyon kaynakları	Örnek kodu	İzolasyon kaynakları	Örnek kodu	İzolasyon kaynakları	Örnek kodu
Beyaz Et (Tavuk)	*GBK1	Kırmızı Et	*GKKi3	Gıda İşletme Yüzeyleri	*Gİyü25
	*GBK2		*GKKi4		*Gİyü26
	*GBK3		*GKKi5		*Gİyü27
	*GBK4		*GKKi6		*Gİyü28
	*GBK5		*GKKi7		*Gİyü29
	*GBK6		*GKKi8		*Gİyü33
	*GBK7		*GKKi9		*Gİyü34
	*GBK8		*GKKi10		*Gİyü35
	*GBB1		*GKKi11		*Gİyü37
	*GBB2		*GKKi12	Diş Örnekleri	**KDH3
	*GBB3		*GKKu1		**KDH4
	*GBB4		*GKKu2		**KDH5
	*GBB5		*GKKu3		**KDH6
	*GBB6		*GKKu4		**KDH9
	*GBB7		*GKKu5		**KDH10
	*GBB8		*GKKu6		**KDH11
	*GBB9		*GKKu7		**KDH12
	*GBB10		*GKKu8		**KDH14
	*GBTT1		*GKKu9		**KDH19
	*GBTT2		*GKKu10		**KDH20
	*GBTT3		*Gİyü1		**KDH22
	*GBTT4	Gıda İşletme Yüzeyleri	*Gİyü2		**KDH24
	*GBG1		*Gİyü11		**KDH25
	*GBG2		*Gİyü15	Su Örnekleri	***Sc.k1
Kırmızı Et	*GKKi1		*Gİyü16		***Sc.k2
	*GKKi2		*Gİyü23		***Sd.k

yü: Yüzey ****K:** Klinik Öeneği, **D:** Diş, **H:** Hasta, *****S:** Su Örneği, **c.k:** Cemalpaşa Kanalizasyon, **d.k:** Dilberler sekisi Kanalizasyon

Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi, koloni morfolojisi incelemesi sonucu 78 şüpheli *Salmonella* spp.'lere uygulanmış gram boyama sonucunda şupheli *Salmonella* spp. olarak 78 izolatın tamamının *Salmonella* spp. olduğu görülmüştür.

4.1.1.3. Gıda, Klinik ve Su Örneklerinden İzole Edilen Şüpheli *Salmonella* spp.'lerin Biyokimyasal Olarak Tanımlanmaları

Koloni morfolojisi ve hücre morfolojisi incelemeler sonucunda tespit edilen 78 şüpheli *Salmonella* spp. izolatının doğrulanması amacıyla izolatlara hareketlilik, indol, H_2S, sitrat, D-Glukoz gaz üretimi, D-Glukoz asit üretimi, laktoz ve üre testleri uygulanmış ve şüpheli *Salmonella* spp. izolatların 51'inin doğrulaması yapılmıştır. (Çizelge 4.3)

Çizelge 4.3. Şüpheli *Salmonella* izolatlarına uygulanmış bazı biyokimyasal tanımlama testleri

Örnek No.	Biyokimyasal Testler							
	Hareketlilik	**İndol**	**H_2S**	**Sitrat**	**D-Glukoz (Gas)**	**D-Glukoz (Asit)**	**Laktoz**	**Üre**
***GBK1**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBK2**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBK3**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBK4**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBK5**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBK6**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBK7**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBK8**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBB1**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBB2**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBB3**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBB4**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBB5**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBB6**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBB7**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBB8**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBTT1**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBTT2**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBTT3**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBTT4**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBG1**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GBG2**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GKKi3**	+	-	+	+	+	+	-	-
***GKKi4**	+	-	+	+	+	+	-	-

Çizelge 4.3. Şüpheli *Salmonella* izolatlarına uygulanmış bazı biyokimyasal tanımlama testleri (devamı)

*GKKi7	+	-	+	+	+	+	-	-
*GKKi8	+	-	+	+	+	+	-	-
*GKKi11	+	-	+	+	+	+	-	-
*GKKi12	+	-	+	+	+	+	-	-
*GKKu1	+	-	+	+	+	+	-	-
*GKKu2	+	-	+	+	+	+	-	-
*GKKu5	+	-	+	+	+	+	-	-
*GKKu6	+	-	+	+	+	+	-	-
*GKKu9	+	-	+	+	+	+	-	-
*GKKu10	+	-	+	+	+	+	-	-
*Gİyü1	+	-	+	+	+	+	-	-
*Gİyü2	+	-	+	+	+	+	-	-
*Gİyü16	+	-	+	+	+	+	-	-
*Gİyü25	+	-	+	+	+	+	-	-
*Gİyü26	+	-	+	+	+	+	-	-
*Gİyü27	+	-	+	+	+	+	-	-
*Gİyü28	+	-	+	+	+	+	-	-
*Gİyü29	+	-	+	+	+	+	-	-
*Gİyü33	+	-	+	+	+	+	-	-
*Gİyü34	+	-	+	+	+	+	-	-
*Gİyü35	+	-	+	+	+	+	-	-
*Gİyü37	+	-	+	+	+	+	-	-
**KDH4	+	-	+	+	+	+	-	-
**KDH5	+	-	+	+	+	+	-	-
***Sc.k1	+	-	+	+	+	+	-	-
***Sc.k2	+	-	+	+	+	+	-	-
***Sd.k	+	-	+	+	+	+	-	-

***GB:** Gıda Beyaz et Örneği, **G:** Göğüs, **K**: Kanat, **B:** But, **TT:** Tüm tavuk, **Ki:** Kıyma, **Ku:** Kuzuşbaşı, **İ:** İşleyme, **yü:** Yüzey **K:** Klinil Öeneği, **D:** Diş, **H:** Hasta, ***S:** Su Örneği, **c.k:** Cemalpaşa Kanalizasyon, **d.k:** Dilberler Kanalizasyon, **+ :** Pozitif, **- :** Negatif

Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi çizelge 4.2'de incelenen 78 adet şüpheli izolatın 51'inde hareketlilik pozitif, indol negatif, H_2S pozitif, sitrat pozitif, D-Glukoz gaz üretimi pozitif, D-Glukoz asit üretimi pozitif, laktoz negatif ve üre negatif oldukları görülmüş ve bunların sonucunda bu 51 izolatın *Salmonella* spp. doğrulanmıştır. Doğrulaması yapılan 51 *Salmonella* spp. izolatının 22'sinin beyaz et (8'i kanat, 8'i but, 4'ü tüm tavuk ve 2'si göğüs), 12'sinin kırmızı et (6'sı kıyma ve

6'sı kuş başı), 12'si gıda işletmesi ekipman yüzeyleri, 2'si diş ve 3'ü su örneğinden izole edildiği tespit edilmiştir.

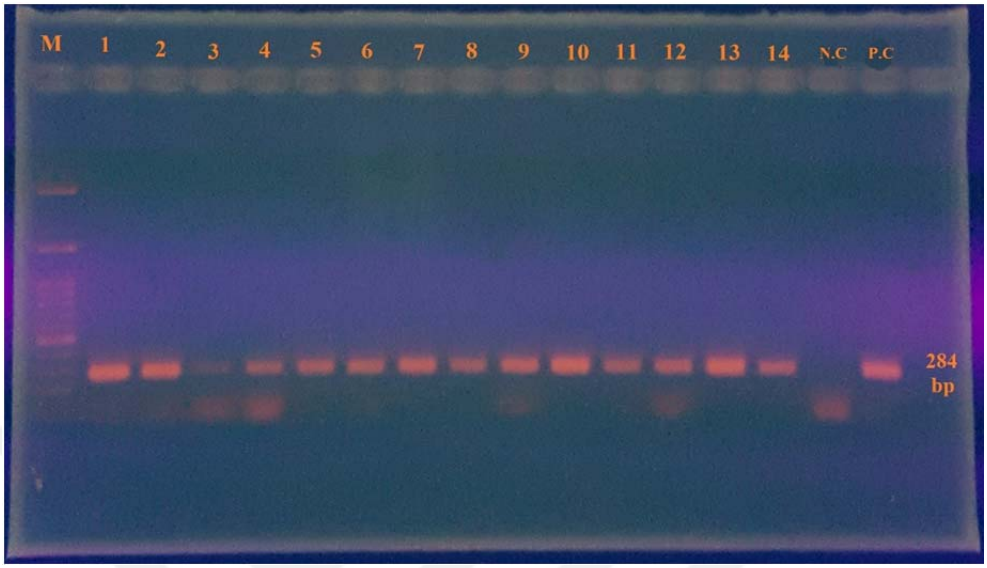
Örneklerden *Salmonella* spp. izolasyonunda 2 farklı selektif katı besiyerinde koloni morfolojisi *Salmonella* spp. gibi görünen fakat biyokimyasal test sonucunda *Salmonella* spp olarak doğrulanmamış 27 izolatın refakatçı mikroorganizmalar olduğu görülmüş ve bunlardan 4'ü *Shigella*, 3'ü *Klebsiella*, 6'sı *Proteus*, 4'ü *E.coli*, 8'i *Citrobacter* ve 2'si *Ps. aeruginosa* olarak tanımlanmıştır.

4.1.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İle *Salmonella* spp.'lerin Tür Bazında Tanımlanması

Araştırmamızda klasik PCR yöntemleri ile identifikasyonları yapılan 51 (% 17.22) *Salmonella* spp. izolatının PCR çalışmalarında *inv*A'ya özgü 139 (1) ve 141 (1) primer çiftleri kullanılarak *Salmonella* spp.'lerin moleküler tanımlanması yapılmıştır. DNA ekstraksiyon işlemleri Anejo-Okopi ve ark. (2016) tarafından bildirilen protokole göre yapılmıştır.

4.1.1.4.(1). *Salmonella* spp.'lerin *inv*A Genini Hedeflemekte Olan 139 (1) ve 141 (1) Primer Çifti Kullanılarak Tanımlanması

Yapılan testler sonucunda *inv*A'ya özgü primer çifti kullanılarak izolatların sp. düzeyinde PCR'ı yapılarak doğrulanmıştır ve 284 bp büyüklüğünde moleküler ağırlıklı bant görüntüleri Şekil 4.2.'de verilmiştir.

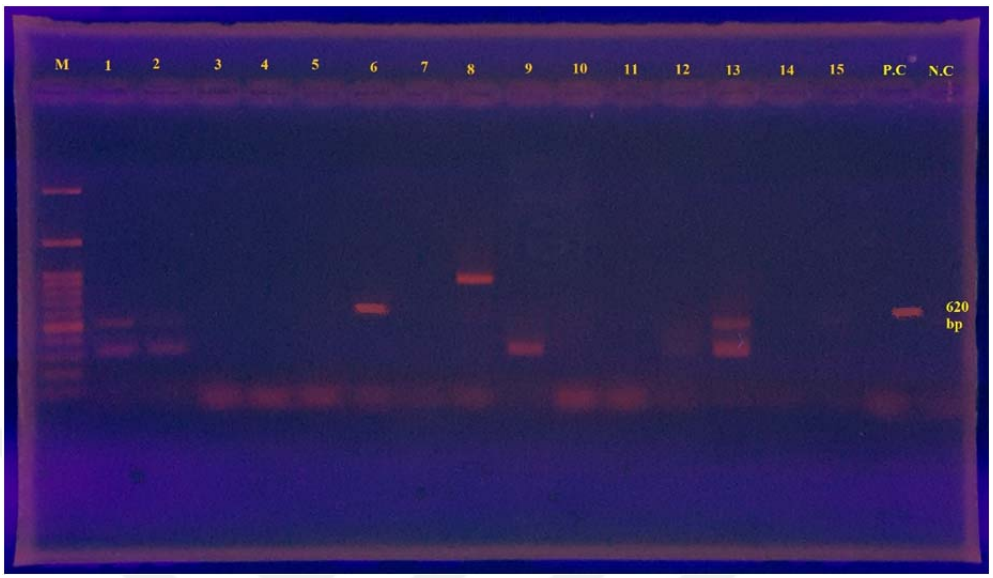


Şekil 4.2. *inv*A'ya özgü 139 (1) ve 141 (1) primer çifti kullanılarak yapılan *Salmonella* spp.'nin pozitif örneklere ait jel görüntüsü. M:100 bp DNA ladder, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14: *Salmonella* spp. pozitif örnekler. N.C : Negatif Kontrol, P.C : Pozitif Kontrol.

Şekil 4.2.'de görüldüğü gibi *inv*A'ya özgü primer çifti kullanılarak tanımlanan 51 izolatın tamamı *Salmonella* spp. olarak tespit edildikten sonra aynı izolatların alt türlerinin saptanması için ayrıca *Salmonella* Typhimurium, *S.* Enteritidis, *S.* Gallinarum ve *S.* Pullorum için iki ayrı primer çifti kullanılmıştır. Çalışmada *Salmonella* Typhimurium için *fil*C genine özgü Fli 15 (2) ve Typ04 (2) primer çifti ve *S.* Enteritidis, *S.* Gallinarum ve *S.* Pullorum içinse *sef*A genine özgü A058 (3) ve A01 (3) primer çifti kullanılmıştır.

4.1.1.4.(2). *fil*C genine özgü Fli 15(2) ve Typ04(2) Primer çifti kullanılarak *Salmonella* Typhimurium'un Tanımlanması

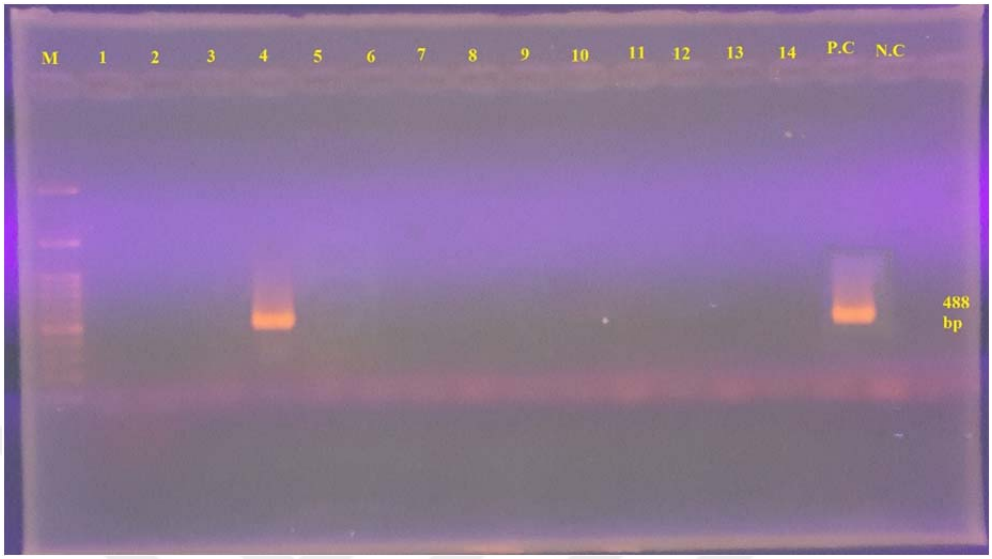
Yapılan testler sonucunda *fil*C'ye özgü Fli 15 (2) ve Typ04 (2) primer çifti kullanılarak izolatların PCR'ı yapılmış ve *S.*Typhimurium varlığı doğrulanmıştır. Büyüklüğü 620 bp olan moleküler ağırlıklı bant görüntüleri Şekil 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.3. *fil*C' genine özgü Fli 15 (2) ve Typ04 (2) primer çifti kullanılarak *Salmonella* Typhimurium'un pozitif örneklere ait jel görüntüsü. M:100 bp DNA ladder, 6: *Salmonella* Typhimurium pzitif örnekler, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ve 15 *Salmonella* Typhimurium negatif örnekler. N.C : Negatif Kontrol, P.C : Pozitif Kontrol.

4.1.1.4.(3). *sef*A genine özğü A058(3) ve A01(3) Primer Çifti Kullanılarak *S.* Enteritidis, *S.* Gallinarum ve *S.* Pullorum 'un Tanımlanması

Yapılan testler sonucunda *sef*A genine özgü primer çifti kullanılarak 51 izolatın PCR'ı yapılmış ve *sef*A geni içeren ve 488 bp moleküler ağırlıklı bant görüntüsü elde edilen *S.* Enteritidis, *S.* Gallinarum ve *S.* Pullorum olarak sadece 1 örnek pozitif bulunmuştur. Büyüklüğü 488 bp moleküler ağırlıklı bant görüntüsü Şekil 4.4.'te verilmiştir.



Şekil 4.4. *sef*A'ya özgü A058(3) ve A01(3) primer çifti kullanılarak *S*. Enteritidis, *S*. Gallinarum ve *S*. Pullorum'un pozitif örneğe ait jel görüntüsü. M:100 bp DNA ladder, 4: *S*. Enteritidis, *S*. Gallinarum ve *S*. Pullorum pozitif örnek, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ve 14: negatif örnekler. N.C : Negatif Kontrol, P.C : Pozitif Kontrol.

Şekil 4.4'de görüldüğü gibi *sef*A'ya özgü A058(3) ve A01(3) primer çifti kullanılarak *S*. Enteritidis, *S*. Gallinarum ve *S*. Pullorum'un pozitif olarak 1 örnek doğrulanmış ama serovar olarak tanımlaması yapılamamıştır. Bu tanımlama daha önce uygulanan biyokimyasal test ve hareketlilik sonuçları değerlendirilerek devam ettirildiğinde; gaz oluşturan ve hareketli olarak tespit edilen bu bir izolatın *S*. Enteritidis olduğu görülmüştür.

Oliveirve ark. (2002), kümeslerden topladıkları örneklerde *Salmonella* spp. varlığını araştırdıkları çalışmada yöntem olarak klasik yöntem ile PCR-RV yöntemini karşılaştırmışlardır. PCR yönteminde *inv*A geni ile *Salmonella* spp. tanımlanırken yine kümes hayvanlarında sıklıkla karşılaşılan, *S*. Enteritidis (SE), *S*. Gallinarum (SG), *S*. Pullorum (SP) için *sef*A genini ve *S*. Typhimurium (ST)'un tanımlamasında *fil*C genini hedef alan primerler kullanarak araştırmalarını yapmışlardır. PCR-RV yönteminin genel *Salmonella* ve *Salmonella* Typhimurium tanımlanmasında kesin sonuç verdiğini fakat *S*. Enteritidis, *S*. Gallinarum ve *S*.

Pullorum'un PCR pozitif örneklerine serovar tanımlaması gerektiğinde standart klasik metodla devam edilmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Malorny ve ark. (2003) uluslararası proje kapsamında yaptıkları bir çalışmada beş ana gıda patojeni tespiti için 43 *Salmonella* suşu ve 47 diğer patojen guruplarında *Salmonella* türlerine özgü dört primer setini değerlendirmişler ve en seçici primer seti olarak *inv*A genini hedef alan 139-141 primer çift olduğunu tespit etmişlerdir.

Anejo-Okopsi ve ark. (2016) yaptıkları bir çalışmada Nijerya'da bulunan 18 tavuk işletmesinden 80 örnek toplayarak *Salmonella* izolasyonu ve tanımlamasını yapmışlar ve genel *Salmonella* tanımlaması için PCR metodu ile *inv*A gen spesifik primerlerini başarıyla kullanmışlardır. kullandıkları metodun verimli olduğu ve *Salmonella* spp.'nin tespiti için tanımlamalarda alternatif bir yöntem olarak daha hızlı olabileceğini belirtmişlerdir.

4.1.1.5. Gıda, Klinik ve Su Örneklerinden İzole Edilen Şüpheli *Salmonella* spp.'lerin API 20E Test Kiti İle Tanımlanması

Araştırmamızda klasik PCR yöntemleri ile identifikasyonları yapılan 51 adet *Salmonella* spp. pozitif izolatının tamamının tür düzeyinde tanımlanması için API 20E test kiti ve API web tanımlama yazılımı (Biomeriux, France) kullanılmıştır.

PCR yöntemi ile tanımlanan *Salmonella* spp. şüpheli izolatlara API 20 E test kiti kullanılarak tür düzeyinde yapılan inceleme sonuçları Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. PCR yöntemi ile tanımlanan şüpheli *Salmonella* spp. izolatlarının API 20E test kiti ile doğrulanması

Örnek No	**PCR**	**API Test**	**Örnek No**	**invA gen**	**API Test**
*GBK1	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica	*GKKi11	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GBK2	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica	*GKKi12	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GBK3	*Salmonella* spp.	*Proteus mirabilis*	*GKKu1	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GBK4	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica	*GKKu2	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GBK5	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica	*GKKu5	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GBK6	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica	*GKKu6	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GBK7	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica	*GKKu9	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GBK8	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica	*GKKu10	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GBB1	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica	*Gİyü1	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GBB2	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica	*Gİyü2	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GBB3	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica	*Gİyü16	*Salmonella* spp.	*Salmonella* spp.
*GBB4	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica	*Gİyü25	*Salmonella* spp.	*Salmonella* spp.
*GBB5	*Salmonella* spp.	*Salmonella* spp.	*Gİyü26	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GBB6	*Salmonella* spp.	*Salmonella* spp.	*Gİyü27	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GBB7	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica	*Gİyü28	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GBB8	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica	*Gİyü29	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GBTT1	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica ssp. arizonae	*Gİyü33	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GBTT2	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica	*Gİyü34	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GBTT3	*Salmonella* spp.	*Salmonella* spp.	*Gİyü35	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GBTT4	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica	*Gİyü37	*Salmonella* spp.	*Salmonella* spp.
*GBG1	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica	**KDH4	*Salmonella* spp.	*Proteus mirabilis*
*GBG2	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica	**KDH5	*Salmonella* spp.	*Proteus mirabilis*
*GKKi3	*Salmonella* spp.	*Salmonella* ser Pullorum	***Sc.k1	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GKKi4	*Salmonella* spp.	*Salmonella* ser Pullorum	***Sc.k2	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GKKi7	*Salmonella* spp.	*Salmonella* spp.	***Sd.k	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica
*GKKi8	*Salmonella* spp.	*Salmonella* spp.	**ATCC® 13076™**	*Salmonella* spp.	*Salmonella* enterica

Çizelge 4.4 incelendiğinde bu 51 izolatın 3'ünün *Proteus mirabilis* olduğu tespit edilmiştir.Geriye kalan 48 *Salmonella* izolatının tamamı tür bazında tanımlanamamışken 39 örneğin *Salmonella enterica* olduğu ve alt tür olarak beyaz etlerden izole edilen *Salmonella* spp.'nin *Salmonella enterica* ssp. serovar Arizonae ve kırmızı etlerden izole edilen iki izolatın *Salmonella* serovar Pullorum olarak tanımlandığı görülmüştür.

PCR yöntemi ile *inv*A genini hedefleyen çift primer kullanıılarak yapılan tanımlamada 51 izolatın tamamının 284 bp uzunluğunda bantlara sahip ve *Salmonella* spp. pozitif olduğu görülürken, API 20E test kiti kullanılarak yapılan tanımlamada bu izolatlardan 3'ünün doğrulanmadığı ve *Proteus mirabilis* olduğu tespit edilmiştir.

Moleküler ve API test sonuçlarını karşılaştırdığımızda, API test kitinin *Salmonella* spp. için tanımlama oranının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, referans suş olarak temin edilen *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (ATCC® 13076™) suşu da API 20E test kitinde doğrulanmıştır.

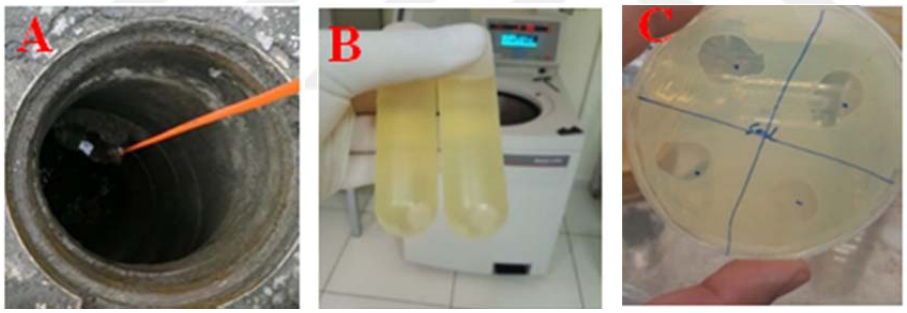
*inv*A genini hedefleyen çift primer kullanıılarak yapılan PCR yönteminde seçici besiyerinde üreyen diğer refakatçı gram negatif bakterilerin yani *Salmonella* negatif olarak tanımladığımız izolatların da *Salmonella* spp. gibi 284 bp uzunluğunda bantlar verdiği görülmüştür. Bu da *inv*A PCR yönteminin klasik biyokimyasal testler yapılarak doğrulanması gerektiğini göstermiştir.

Nucera ve ark. (2005) yaptıkları bir çalışmada *invA* PCR ve API 20E test kitini karşılaştırmak amacıyla 3 farklı domuz çiftliğinden izole ettikleri 310 *Salmonella* izolatını test ettiklerinde *invA* PCR yönteminin API 20E test kitine göre daha iyi bir yöntem olduğunu bildirmişler fakat yine aynı araştırmacıların (Nucera ve ark.2006) domuz çiftliklerinden izole ettikleri *Salmonella enterica*'nın tanımlamasında API 20E ve PCR kullanarak *inv*A genini değerlendirdiklerinde, API 20E'nin diğer testlere göre % 99.9 olasılık düzeyinde olduğunu bildirmişler ve her iki testin de 16S rRNA sıralamasına kıyaslandığında % 100 duyarlılığa ve % 96 özgüllüğe sahip olduklarını belirtmişlerdir.

4.2. *Salmonella* Bakteriyofaj İzolasyonu ve Tanımlanması

4.2.1. *Salmonella* Bakteriyofaj İzolasyonu

Salmonella bakteriyofaj izolasyonu için Adana'da bulunan Seyhan nehri, Seyhan baraj gölü, sulama kanalı ve kanalizasyon suları olmak üzere 8 farklı yerden su örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler Ç.Ü. Biyoteknoloji merkezinde bulunan yüksek devir santrifüj kullanılarak faj izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon işlemi yapılan *Salmonella* bakteriyofajların doğrulanması yapılmak üzere damlatma tekniği uygulanmıştır. Bu teknikte *Salmonella*'nın Tryptic Soy Agar üzerinde yayma ekim yöntemi ile ekimi yapılmıştır. Daha sonra izolasyonu yapılan fajlar Tryptic Soy Agar besiyerinde bulunan *Salmonella*'nın üzerine damlatılmıştır. İşlem sonucunda Seyhan nehri, sulama kanalı ve 2 farklı bölgeden temin edilen kanalizasyon sularında lizis pozitif plaklar elde edilmiştir. yapılan işlemler Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. A: Kanalizasyon sularından, B: yüksek devirde santrifüj yapılarak, C: *Salmonella* bakteriyofaj izolasyonu.

Şekil 4.5 (A)'da görüldüğü gibi atık ve kanalizasyon sulardan alınan numuneler santrifüj kullanarak (Şekil 4.5 (B)) *Salmonella* bakteriyofaj izolasyonu yapılmıştır ve Şekil 4.5 (C)'de izole edilmiş olan *Salmonella* bakteriyofajların *Salmonella* vejetatif hücreler üzerine etkisi tespit edilmiştir.

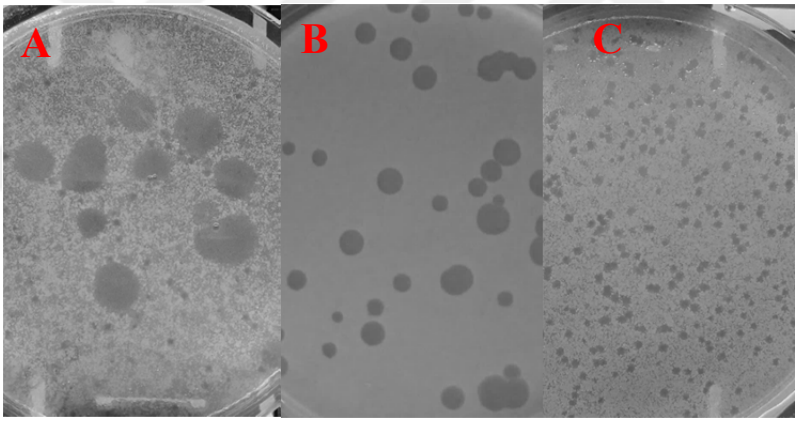
Augustine ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada *Salmonella* bakteriyofaj izolasyonunda tavukların bağırsak içeriğini kaynak olarak kullanmışlar.

Huang ve ark. (2018) yapttıkları bir çalışmada Atıksu arıtma tesislerinden, nehr kenarındaki atık sulardan, göl kenarındaki çiftlikte atıklari ve kümes hayvanlarından oluşan toplam 58 *Salmonella* fajı izole edilmişlerdir.

Duc ve ark. (2018) yaptıkları bir çalışmada çiğ tavuk derisi ve taşlıklarından 18 litik faj izole etmişler.

4.2.2. İzolasyonu Yapılan *Salmonella* Bakteriyofajının Saflaştırması

Faj varlığı saptanan faj süspansiyonlarından bakteriyofajı saflaştırmak için çift tabakalı agar metodu kullanılmış ve tek plak düşürülmüştür. Saflaştırılmış olan *Salmonella* faj plaklarının çift tabakalı agar üzerinde plak görüntüsü ve boyutları Şekil 4.6.'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Saflaştırılmış olan *Salmonella* faj plaklarının çift tabaka agar üzerinde görüntüsü. A: küçük, B: orta ve C: Büyük boyutlu plaklar

Salmonella bakteriyofaj izolasyonu için 8 farklı kaynaktan alınan atık su örneklerinin sadece 4'ünde *Salmonella* bakteriyofajına rastlanmıştır. İzole edilen bu fajlar Şekil 4.6.'da görüldüğü gibi çift tabaka agar üzerinde üç farklı boyutta (küçük plak, orta plak ve büyük plak) oldukları tespit edilmiştir. Koloni morfolojisi olarak tanımlanan *Salmonella* bakteriyofajlarının hücre morfolojisinin tanımlanması amacı ile Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) için hazırlanmıştır.

Acar (2007) yaptığı bir çalışmada izole ettiği 26 *S.thermophilus* fajı saflaştırmasında çift tabaka agar kullanarak agar üzerinde oluşan faj plaklarını steril enjektör yardımıyla keserek saf plaklar elde etmiştir.

Bao ve ark. (2011) yaptıkları bir çalışmada tavuk atık sularından zenginleştirme protokolü ve çift tabaka agar yöntemi kullanarak *Salmonella* Pullorum'a özgü iki bakteriyofaj (SPu-95 ve SPu-116) izole etmişledir.

Yine, Bao ve ark. (2015) yaptıkları bir çalışmada tavuk işletmelerinin kanalizasyon atıklarından alınan örneklerden vB_SenM-PA13076 (PA13076) ve vB_SenM-PC2184 (PC2184) isimli iki litik bakteriyofaj izole etmişler ve *Salmonella* Enteritidis (SE) ATCC13076 ve *Salmonella* Enteritidis (SE) CVCC2184 suşları ile muamele ettiklerinde bu fajların her iki suş için etkili olduğunu tespit etmişlerdir.

4.2.3. Çift Tabaka Agar Metodu İle *Salmonella* Bakteriyofaj Titresinin Hesaplanması

İzole edilmiş ve saflaştırılmış olan *Salmonella* bakteriyofajlarının kendi konakçısı olan *Salmonella*'yı lize edebilme yeteneği yani faj titresini hesaplamak için klasik plak oluşturma denemesi olan çift tabaka agar tekniği kullanılarak yapılmıştır.

İnkübasyonu yapılan fajların tek tek düştüğü noktalarda *Salmonella*'nın lize edilmesi sonucu oluşan çıplak gözle görülebilir sınırları belli, yuvarlak plaklar (şeffaf/berrak zonlar) sayılarak sayım sonucu PFU/ml olarak belirtilmiştir. Plak boyutları belirlenen bakteriyofaj izolatlarının adı, faj, konak suşu, araştırma yeri ve kimlik numarası olarak kodlanmıştır ve Plak sayım sonucu Çizelge 4.5 'te verilmiştir.

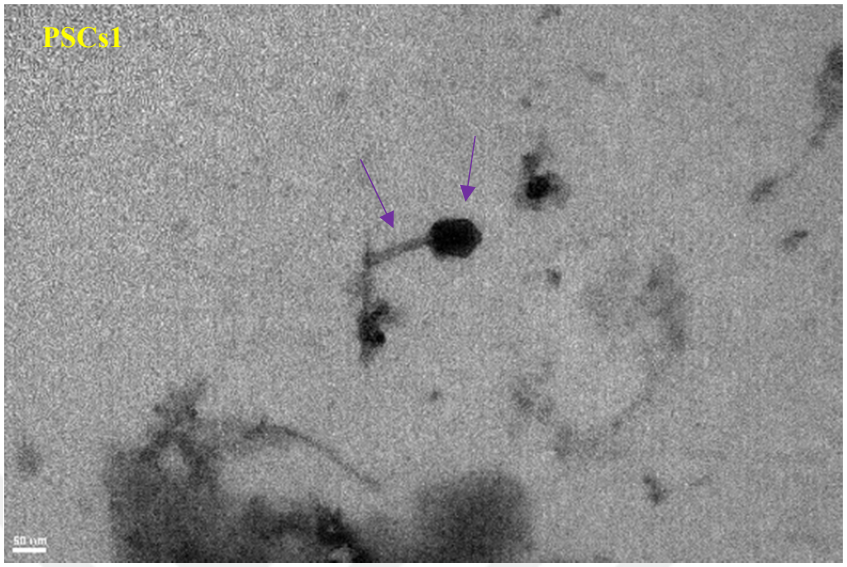
Çizelge 4.5. *Salmonella* bakteriyofajlarının izole edildiği kaynaklar ve faj plak sayım sonuçları.

Örnek				Plak sayımı pfu/ml
1	**P**	**S**	**Cs**	$3.1x10^6$ (küçük)
2	**P**	**S**	**Cs**	$1x10^8$ (orta)
3	**P**	**S**	**Ds**	$1.3x10^7$ (büyük)
4	**P**	**S**	**Sl**	-
5	**P**	**S**	**Sl**	-
6	**P**	**S**	**Sl**	-
7	**P**	**S**	**Sr**	$3x10^{10}$ (küçük)
8	**P**	**S**	**Mc**	$2x10^9$ (küçük)

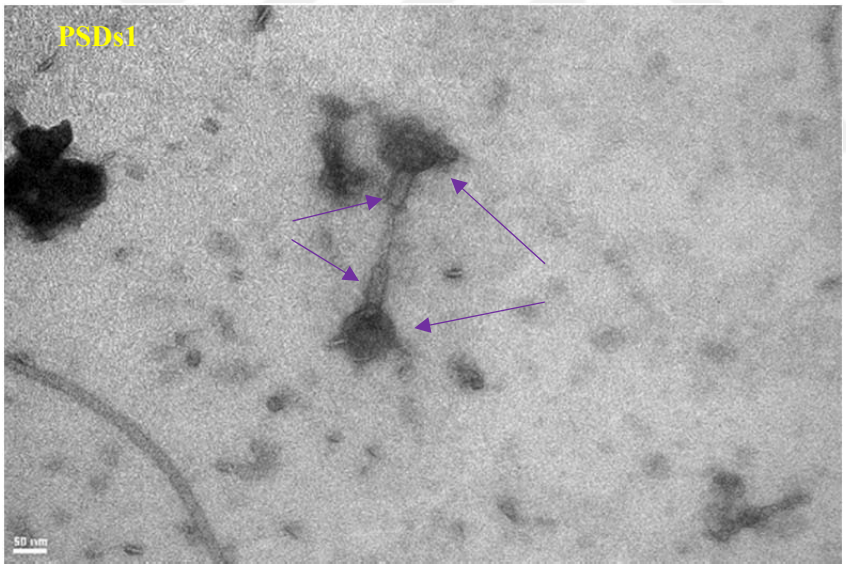
P: faj**. S:** *Salmonella***. Cs:** Cemalpasa kanalizasyon (s)**. Ds:** Dilberler kanalizasyon (s)**. Sl:** Seyhan göl (l). **Sr:** Seyhan nehir(r)**. Mc:** mavi bulvar sulama kanalı (c)

Saflaştırılmış olan beş farklı *Salmonella* bakteriyofajının (PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1 ve PSMc1) Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile görüntülemesi için karbon kaplı grid kullanılarak preparatı hazırlanıp Tıp fakültesi Histoloji bölümünde bulunan TEM mikroskobunda incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

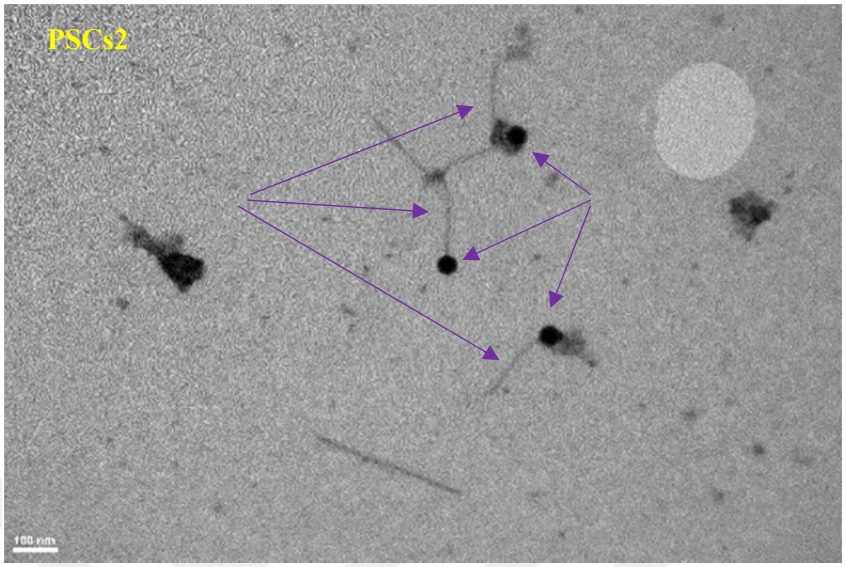
İzole edilmiş ve plak oluşumları tanımlanmış 5 farklı tip bakteriyofajın (PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1 ve PSMc1) görüntüleri şekil 4.7, şekil 4.8, şekil 4.9, şekil 4.10 ve şekil 4.11'de verilmiştir.



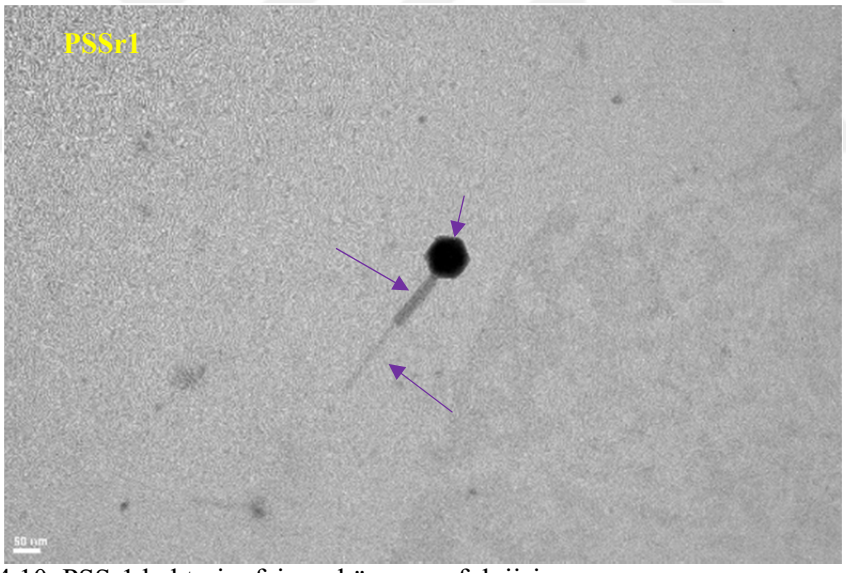
Şekil 4.7. PSCs1 bakteriyofajının hücre morfolojisi.



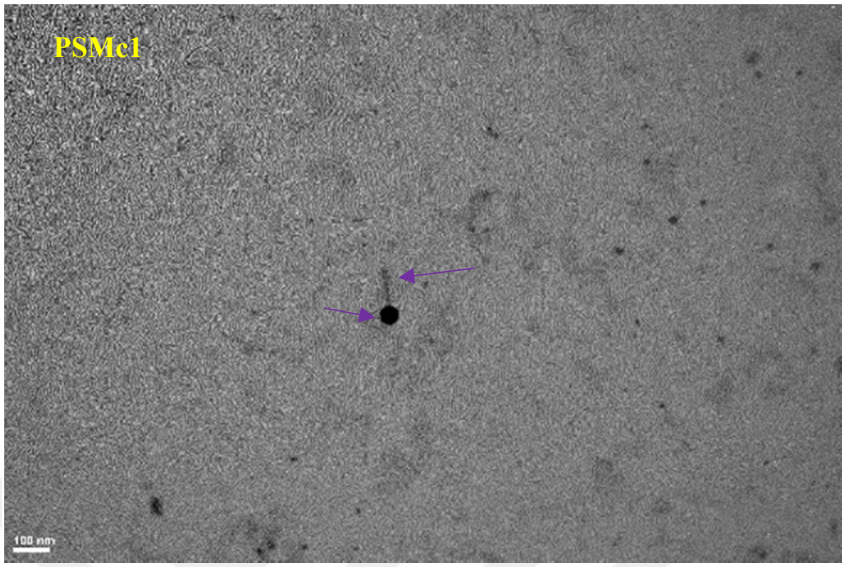
Şekil 4.8. PSDs1 bakteriyofajının hücre morfolojisi.



Şekil 4.9. PSCs2 bakteriyofajının hücre morfolojisi.



Şekil 4.10. PSSr1 bakteriyofajının hücre morfolojisi.



Şekil 4.11. PSMc1 bakteriyofajının hücre morfolojisi.

Morfolojik olarak tanımlanan TEM mikroskobu yardımıyla görselleştirilip karakterize edilen fajlar PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1 ve PSMc1 olarak adlandırılmış ve elektron mikroskobu sonuçlarına dayanarak izole fajları sınıflandırmak için uluslararası virüs taksonomisi (ICTV) kılavuzları kullanılmıştır. PSCs1, PSDs1, PSSr1 ve PSMc1 olarak adlandırılan 3 fajın kasılabilen kuyrukları ve icosahedral yapıları nedeniyle *Myoviridae* familyasının morfolojik özelliklerini taşıdığı gözlemlenmiştir. PSCs2 fajının ise uzun kuyruklu ve icosahedral yapısından dolayı *Siphoviridae* familyasına ait bir faj olduğu görülmüştür.

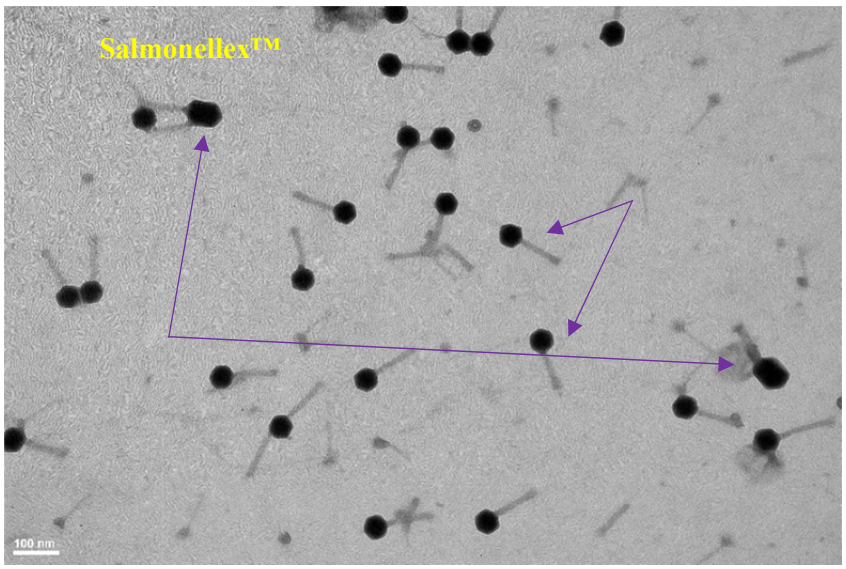
Görüntülenen beş farklı *Salmonella* bakteriyofajın hücre morfolojileri ve çift tabaka agarda oluşturduğu plak boyutları Çizelge 4.6'te ve Şekil 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. İzole edilen beş *Salmonella* bakteriyofajının morfolojik ve yapısal özellikleri.

Bakteriyofaj	Morfoloji		Familya	Plak boyutu
	Kaosid çapı, nm	**Kuyruk uzunluğu, nm**		
PSCs1	90±5	100±5	*Myoviridae*	Büyük
PSDs1	80±5	90±5	*Myoviridae*	Otra
PSCs2	45±5	110±5	*Siphoviridae*	Küçük
PSSr1	80±5	110±5	*Myoviridae*	Otra
PSMc1	40±5	100±5	*Myoviridae*	Otra

nm: Nano metre

Ayrıca ticari bakteriyofaj olarak Food Safety firmasından temin edilmiş olan Salmonellex™ bakteriyofajının TEM'de hücre morfolojisi incelemesi yapılmıştır ve bu bakteriyofajın görüntüsü şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12. Salmonellex™ bakteriyofajının hücre morfolojisi

Şekil 4.12'de gösterildiği gibi temin edilmiş olan Salmonellex™ bakteriyofaj solüsyonunda *Miyoviridae* ailesinden olan iki tür bakteriyofaja rastlanmıştır ve hücre morfoloji açısından iki bakteriyofajdan birisinin PSCs1 ve diğerinin PSMc1 bakteriyofajlarına benzediği tespit edilmiştir.

Bao ve ark. (2011) tavuk atık sularından izole ettikleri 2 bakteriyofajın (SPu-95 ve SPu-116) Transmission electron microskobu (TEM) incelemesi sonucunda SPu-95 bakteriyofajlarının *Siphoviridae* ve SPu-116 bakteriyofajının *Miyoviridae* ailesine ait olduğunu tespit etmişlerdir.

Augustine ve ark. (2013) tavuk bağırsak içeriğinden izole ettikleri ΦSP-1 bakteriyofajının TEM kullanarak hücre morfolojisini incelediklerinde *Podoviridae* ailesine ait olduğunu tespit etmişlerdir.

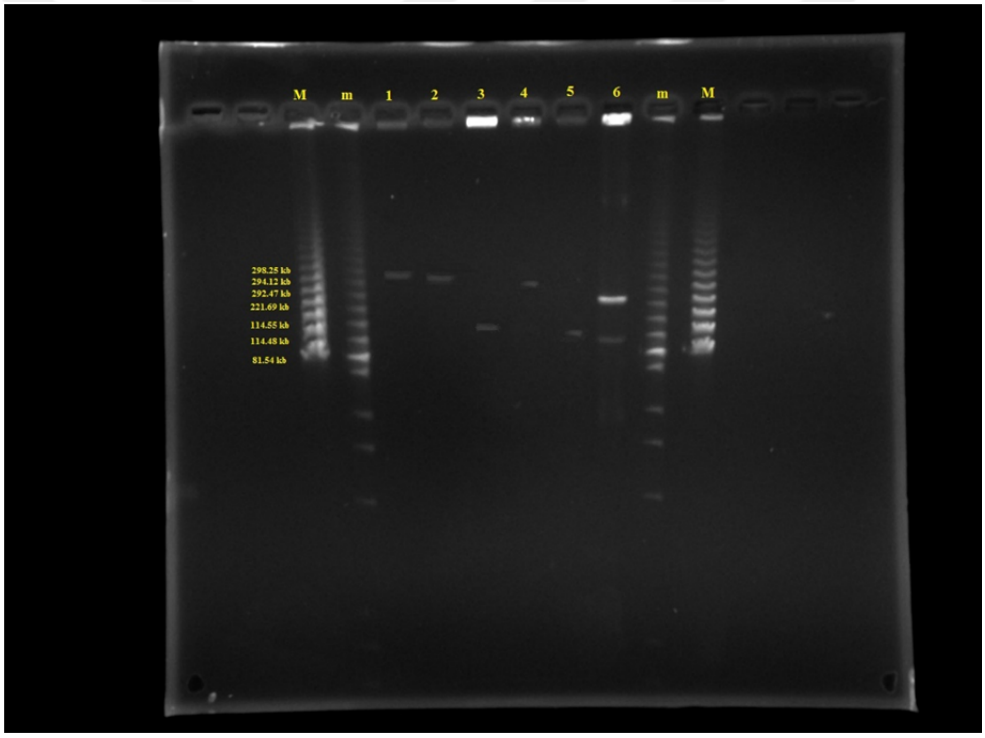
Yine, Bao ve ark. (2015) tavuk işletmelerinin kanalizasyon atıklarından alınan örneklerden izole ettikleri vB_SenM-PA13076 (PA13076) ve vB_SenM-PC2184 (PC2184) isimli iki litik bakteriyofajını Transmisyon Elektron Mikroskobu ile hücre morfoloji incelemesi sonucunda vB_SenM-PA13076 (PA13076) ve vB_SenM-PC2184 (PC2184)'nin *Myoviridae* familyasına ait olduğunu göstermişlerdir.

Huang ve ark. (2018) Atıksu arıtma tesislerinden, nehir kenarındaki atık sulardan, göl kenarındaki çiftlik atıklari ve kümes hayvanlarından izole ettikleri 58 *Salmonella* fajının tanımlamasında Transmisyon Elektron Mikroskobunda hücre morfolojisi açısından incelediklerinde faj LPST10'un *Siphoviridae* familyasına ait olduğunu, sırasıyla 83.26 nm, kuyruk uzunluğu ve genişliği yaklaşık 144.89 nm ve 10.9 nm ve ikosahedral başlığa sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Duc ve ark. (2018) çiğ tavuk derisi ve taşlıklarından 18 litik faj izole etmişler ve bu 18 litik fajdan sadece 5'ini tanımlamışlar ve bunların da, *Myoviridae* ve *Siphoviridae* familyalarına ait olduğunu bildirmişlerdir.

4.2.4. İzole Edilen *Salmonella* Bakteriyofajının Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) İle Moleküler Tanımlanması

Morfolojik olarak tanımlanan ve çalışmamızda kullanılan *Salmonella* bakteriyofajlarının (PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1, PSMc1 ve ticari Salmonellex™) Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) Yöntemi kullanarak genom boyutları belirlenmiştir. Yapılan bu yöntemde iki ayrı boyut aralığını içeren (0.1-200 kb ve 48.5-1,018 kb DNA) ladder (Biolabs) kullanılmıştır. Analiz sonuçları GelCompar II programında değerlendirilmiştir ve bant görüntüsü Şekil 4.13'te verilmiştir.



Şekil 4.13. pulsed-field gel electrophorezi (PFGE) kullanarak bakteriyofaj genom büyüklüğünün görüntüsü. m: DNA ladder (0.1-200 kb aralık), M: DNA ladder (48.5-1,018 kb aralık), 1: PSCs1, 2: PSDs1, 3: PSCs2, 4: PSSr1, 5: PSMc1, 6: Salmonellex™ .

Şekil 4.13'te görüldüğü gibi PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1 ve PSMc1 bakteriyofajlarının PFGE kullanarak bakteriyofaj genom büyüklüğü 98.25 kb

(PSCs1), 294.12 kb (PSDs1), 114.48 kb (PSCs2), 292.47 kb (PSSr1) ve 114.55 kb (PSMc1) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca doğrulamak amacıyla kullanılan Salmonellex™ bakteriyofajının da içerisinde bulunan *Miyoviridae* ailesine ait olan fajların genom uzunlukları 81.54 kb ve 221.69 kb olarak belirlenmiştir.

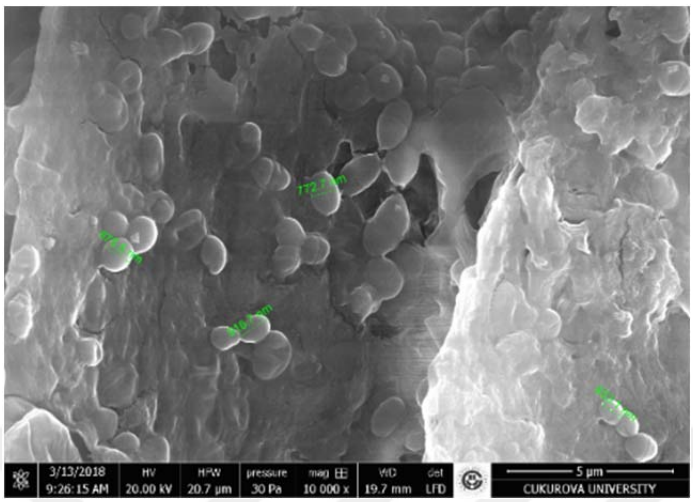
Bao ve ark. (2011) izole ettikleri ve TEM'de hücre morfolojisini tanımladıkları SPu-95 ve SPu-116 bakteriyofajlarının her ikisinin de, HindIII veya EcoRI restriksiyon enzimleri ile çift iplikli bir DNA'ya sahip olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu bakteriyofajların genomlarının elektroforez yöntemi ile yapılan calısma sonucunda 58.3 kbp (PSPu-95) ve 45.2 kbp (PSPu-4-116) boyutlarında olduğunu tespit etmişlerdir.

Augustine ve ark. (2013) izole ettikleri ΦSP-1 bakteriyofajının genom büyüklüğünün belirlenmesi için pulsed-field gel electrophorezi (PFGE) kullanarak bu bakteriyofajın genom büyüklüğünün 86 kb olarak tahmin etmişlerdir.

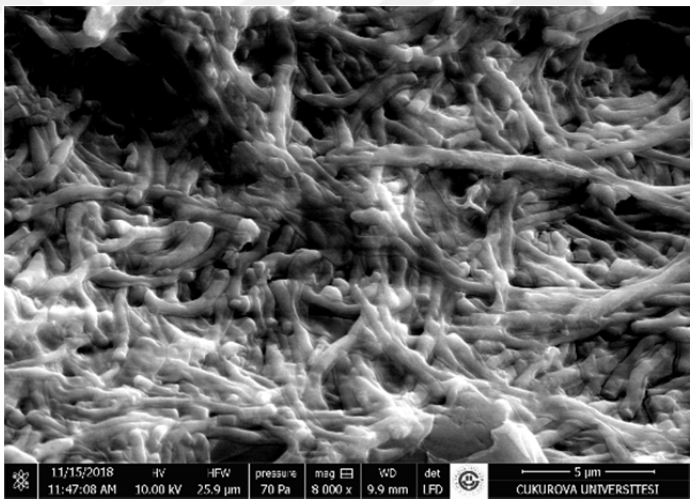
Huang ve ark. (2018) izole ettikleri LPST10 fajının genom büüklüğünün belirlenmesi için EcoRI and EcoRV olarak iki restriksiyon enzimi kullandıklarında LPST10 fajının genom uzunluğunun 47.66 kb olduğunu tahmin etmişlerdir.

4.3. Diş ve Safra Taşlarından Biyofilm İzolasyonu

Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi genel cerrahi bölümünden temin edilen safra taşları ve diş hekimliği polikliniğinden temin edilen diş örnekleri hiç bir işleme tabi tutulmadan soğük zincir sağlanarak direkt fiksasyon işlemleri için laboratuvara getirilmiştir. Fiksasyonu yapılan örnekler üzerinde *Salmonella* biyofilmi Çukurova Üniversitesi Merkez Laboratuvarı Scannig Electron Mikroskobunda (SEM) görüntülenmiştir. Safra taşı örneği ve Diş örneği yüzeyinde tespit edilen biyofilm yapısı görüntüleri sırasıyla Şekil 4.14 ve 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.14**.** Safra taşı yüzeyinde görüntülenen biyofilm yapısı.



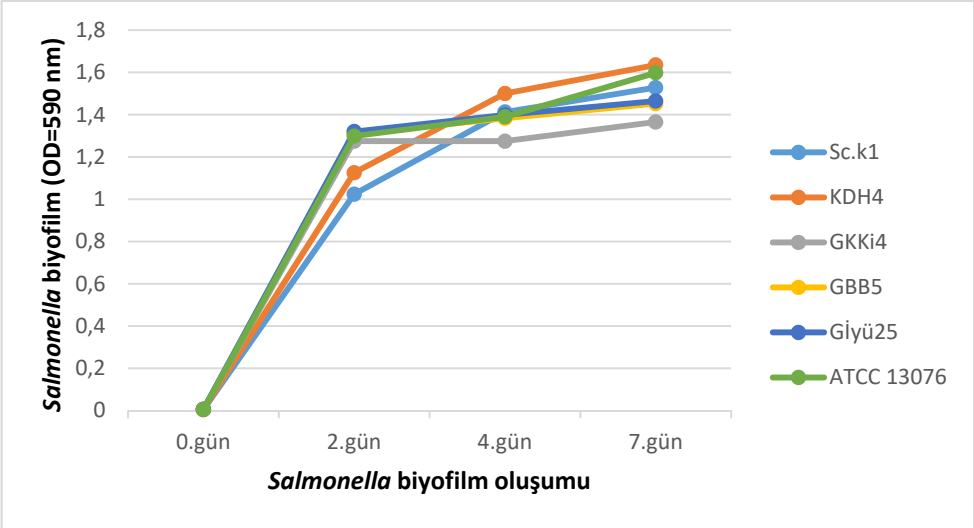
Şekil 4.15**.** Diş örnekleri yüzeyinde görüntülenen biyofilm yapısı.

Şekil 4.14 ve 4.15'te görüntülenmiş olan biyofilm yapısı safra taşı ve diş örnekleri yüzeyinde SEM kullanarak 5µm boyutunda fotoğrafları çekilmiştir. Görüntülenmiş olan safra taşı ve diş örnekleri yüzeyinde çubuk şeklinde olan *Salmonella* biyofilmine rastlanmamıştır. Ancak her iki örnek yüzeyinde'de kümelenmiş kok ve basil şeklinde bakteriler tespit edilmiştir.

4.4. Gıda ve klinik Örneklerden İzole Edilen *Salmonella* spp.'lerin Biyofilm Oluşturma Yetenekleri

4.4.1. Mikroplaka Metodu İle *Salmonella* spp.'lerin Biyofilm Oluşturulması

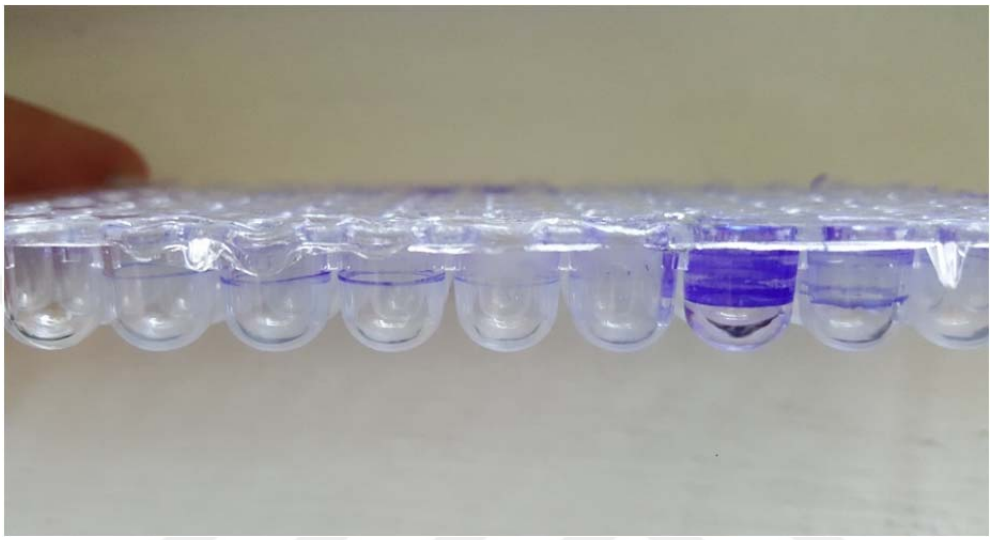
Mikroplaka yönteminde çalışılan örnekler içinde *Salmonella* izolasyonu yapılabilmiş 51 örnekten (gıda işletme yüzeyi, beyaz et, kırmızı et, su ve diş örnekleri) elde edilen *Salmonella* spp. izolatından sadece 10 örneğe ait izolata *Salmonella* biyofilmi yaptırılmıştır. Çalışılan 10 örneğe ait *Salmonella* spp.izolatının hepsinin biyofilm yapma yeteneğine sahip olduğu gözlenmiştir. Şekil 4.16'da çalışılan bu 10 örnekten 5'ine ait *Salmonella* spp. izolatlarının biyofilm oluşumları gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Mikroplaka üzerinde *Salmonella* biyofilm oluşturması. Giyü: (gıda işletme yüzeyi), GBB: (gıda beyaz et), GKKi: gıda kırmızı et), KDH4: klini hasta diş ve Sc.k1: (su örneği) ATCC 13076: *Salmonella* enterica referans suş.

Seçilmiş olan 5 örneğe ait *Salmonella* izolatının ve referans suş olarak temin edilen ATCC® 13076™'nin *Salmonella* biyofilm oluşumlarına ait 2, 4 ve 7. günde OD 590 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Şekil 4.16'da görüldüğü gibi biyofilm oluşumunun 7. güne doğru daha yoğunlaştığı gözlenmiştir.

Optik yoğunluğu ölçülen *Salmonella* biyofilminin %1'lik kristal viyole ile boyanarak gösterilmiş biyofilm yoğunluğu Şekil 4.17'de gösterilmiştir.

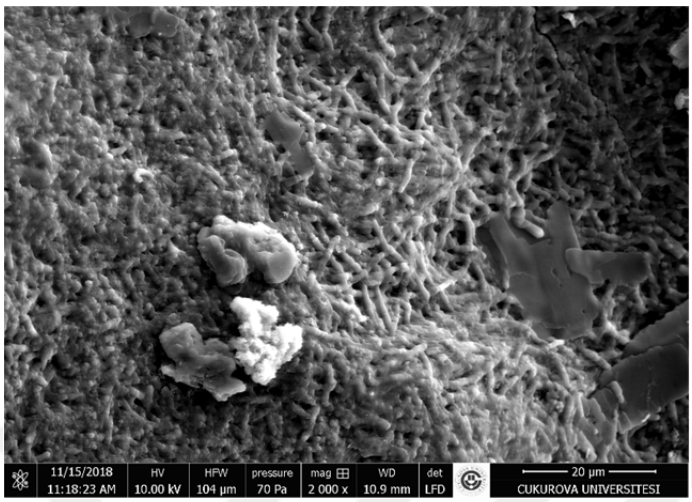


Şekil 4.17. 96 kuyucuklu mikroplaka üzerinde yaptırılan *Salmonella* biyofilmi

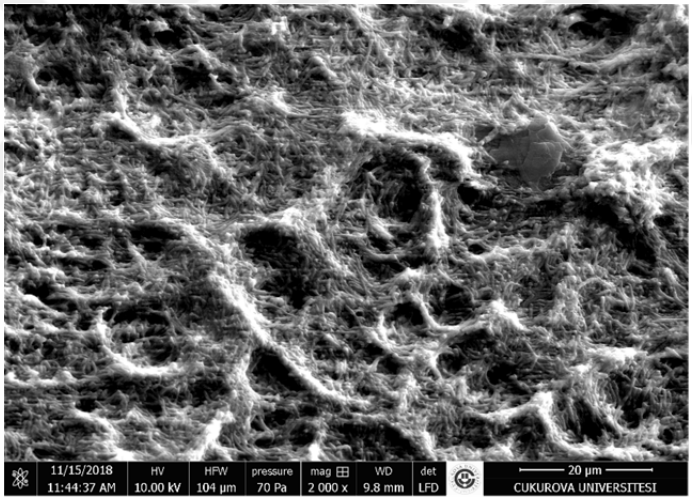
4.4.2. Safra taşları ve Diş Örnekleri üzerinde *Salmonella* spp.'lere biyofilm oluşturulması

Çalışmamızda kullanılan safra taşları ve diş örneklerinde *Salmonella* biyofilmi izole edilemediğinden alınan örneklere *Salmonella* aşılanmış ve 18 gün boyunca *Salmonella* biyofilmi yaptırılmıştır. Örnekler 18 günü tamamladıktan sonra besi ortam üzaklaştırılıp fiksasyonları yapılmıştır.

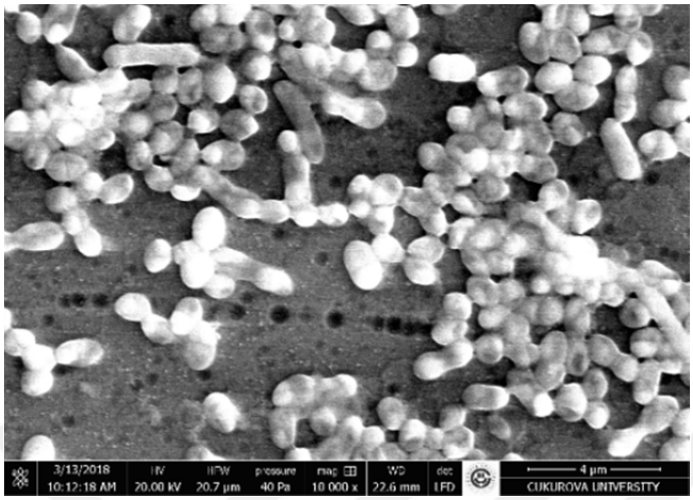
Fiksasyonu yapılan safra taşları (Şekil 4.18) ve diş örnekleri üzerinde (Şekil 4.19) biyofilm oluşumu Çukurova Merkez Laboratuvarın'da bulunan SEM mikroskobunda incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. *Salmonella* biyofilm yaptırma işlemi sırasında safra taşı ve diş örneklerinin koyulduğu lamın üzerinde de *Salmonella* biyofilm görüntüsü tespit edilmiş ve Şekil 4.20'de de bu görüntü verilmiştir.



Şekil 4.18**.** Safra taşı yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilm görüntüsü.



Şekil 4.19**.** Diş örnekleri yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilm görüntüsü.



Şekil 4.20**.** Lam yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilm görüntüsü.

Safra taşları (Şekil 4.18), diş örnekleri (Şekil 4.19) ve onları taşıyan lam yüzeyinde (Şekil 4.20) kümelenmiş *Salmonella* hücrelerine rastlanmıştır. Yüzeye tutunan *Salmonella* hücrelerinin yapıları biyofilm yapısı olarak değerlendirilmiştir.

Aslında safra taşları yüzeyinde biyofilm yapabilen *Salmonella enterica*'nın hareketli olması dolayısıyla safra taşını taşıyan cam yüzeyinde de biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Literatürlerde safra taşında biyofilm yapmak için organizmanın hareketli olması gözetilmezken cam yüzeylerde biyofilm oluşmasında hareketliliğin arandığından bahsedilmektedir (Prouty ve Gunn, 2003). Bu nedenle bizim çalışmamızda safra taşını taşıyan cam yüzeyinde biyofilme rastlanması organizmamızın hareketliliğinden kaynaklanmıştır.

4.5. *Salmonella* Vejetatif Hücreleri ve *Salmonella* Biyofilmi Üzerine Bakteriyofajların Etkisi

4.5.1. *Salmonella* Vejetatif Hücreleri Üzerine Bakteriyofajların Etkisi

İzole edilmiş ve tanımlanmış 6 farklı bakteriyofaj (PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1, PSMc1 ve ticari olarak temin edilen Salmonellex™) filtratı, Tryptone Soy Agar (TSA)'a 0.1 ml ekilen vejetatif *Salmonella* spp. (Çizelge 4.7)'ler üzerine 10 µl

miktarında nokta şeklinde damlatılmış ve petriler 37°C de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda bakteriyofajların lizis etkisi kontrol edilmiştir. (Çizelge 4.7)

Çizelge 4.7. PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1, PSMc1 ve ticari olarak temin edilen Salmonellex™ bakteriyofajlarının farklı kaynaklardan izole edilen bazı *Salmonella* spp. ler üzerine lizis etkisi.

***Salmonella* spp. kaynaklar**	***Salmonella* bakteriyofajların *Salmonella* vejetatif hücreleri üzerine lizis etkisi**					
	PSCs1	**PSDs1**	**PSCs2**	**PSSr1**	**PSMc1**	**Salmonellex™**
GBTT1	+++	+++	+++	+++	+++	+++
GBTT2	+++	+++	+++	+++	+++	+++
GBTT3	+++	+++	++	+++	+++	++
GBTT4	+++	+++	+++	+++	+++	+++
GKKi3	+++	+	+++	-	-	-
GKKi4	+++	++	++	-	-	-
GKKi7	-	++	-	-	-	-
GKKi8	-	++	-	-	-	-
GBK5	+++	+++	+++	+++	+++	+++
GBK6	+++	+++	+++	+++	+++	+++
GBB5	+++	+++	+++	+++	+++	+++
GBB6	+++	+++	+++	+++	+++	+++
GBB7	+++	+++	+++	+++	+++	+++
GBB8	+++	+++	+++	+++	+++	+++
GBG1	+++	+++	+++	+++	+++	+++
GBG2	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Giyü16	-	+++	-	+++	-	-
Gİyü25	+++	+++	+++	-	-	-
Gİyü37	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Sc.k1	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Sc.k2	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Sd.k	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ATCC® 13076™	+++	++	+++	++	++	+

Fajların lizis etkisi + + + (çok yoğun etki), + + (yoğun etki), + (az etki) ve – (etki yok) olarak verilmiştir. S.E: *Salmonella* Enteritidis, S.T: *Salmonella* Typhimurium, ATCC® 13076™ : *Salmonella* enterica referans suş.

Çizelge 4.7'de görüldüğü gibi beyaz etlerden (tüm tavuk ve but) ve su örneklerinden izole edilen *Salmonella* spp. vejetatif hucrelerine 6 bakteriyofajın tümünün yoğun bir şekilde etki ettiği görülmüştür. 4 kırmızı et örneğinin 2'sinden (GKKi3 ve GKKi4 kodlu örnek) izole edilen *Salmonella* spp. izolatları üzerine PSSr1, PSMc1 ve Salmonellex™ bakteriyofajının ve diğer iki örneğe de (GKKi7 ve GKKi8 kodlu örnek) PSCs1, PSSr1, PSMc1 ve Salmonellex™ bakteriyofajlarının etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Gıda işletme yüzeylerinin Giyü16 kodlu örneğinden izole edilen *Salmonella* spp. izolatına sadece PSDs1 ve PSSr1 bakteriyofajının, Gİyü25 kodlu örneğe de sadece PSCs1, PSDs1 ve PSCs2 fajının ve Gİyü37 kodlu örneğe ise tüm fajların çok yoğun etkisi olduğu görülmüştür. Ayrıca ticari Salmonellex™ bakteriyofajının etkisinin referans suş olarak temin edilen *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Enteritidis (ATCC 13076™) üzerine az olduğu gözlenirken, aksine çalışmamızda izole edilmiş olan (PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1 ve PSMc1) 5 bakteriyofajın yoğun etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Şekil 4.21'de *Salmonella* bakteriyofajlarının (PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1, PSMc1 ve Salmonellex™) GKKi3 kodlu *Salmonella* spp. vejetatif hücresi üzerine lizis etkisinin damlatma tekniği ile elde edilen çok yoğun (+++), az yoğun (+) ve etkisiz (-) olduğunu gösteren faj plaklarının görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.21. GKKi3 kodlu *Salmonella* spp. vejetatif hücresi üzerine bakteriyofajların lizis etkisinin damlatma tekniği ile gösterilmesi

Bao ve ark. (2011) yaptıkları bir çalışmada izole ettikleri ve tanımladıkları SPu-95 ve SPu-116 *Salmonella* bakteriyofajlarının konakçı hücrelerine ilgisi 20 bakteri suşu ile nokta testleri yapılarak belirlemişler ve her iki bakteriyofajın geniş bir konakçı ilgilerinin olduğunu tespit etmişlerdir. *Siphoviridae* ailesine ait PSPu-95, 20 bakteriyofaj izolatın 17'sinde (% 85) litik bir etkiye sahip olduğunu ve *Miyoviridae* ailesinden olan PSPu-4-116 bakteriyofajıjın 14 izolatta (% 70) litik bir etki yarattığını ve enterotoksijenik üzerinde net bir plak üreten tek bakteri olduğunu belirtmişlerdir. Bu 2 bakteriyofajın kanatlı hayvan endüstrisindeki bakterilerilerin kontrol etmesi ve en etkili bakteriyofajın benimsenmesi için bir temel oluşturulmasında yardımcı olabileceğini bildirmişlerdir.

Yine, Bao ve ark. (2015) izole ettikleri ve tanımladıkları PC2184, PA13076 isimli iki fajın *Salmonella* cinsi içinde geniş konukçu aralığı sergiledikleri ve PC2184 bakteriyofajının sıvı kültürdeki litik yeteneklerinin PA13076'dan daha iyi olduğunu gözlemlemişlerdir. PA13076 ve PC2184 fajlarının 311 *Salmonella* izolatına litik etkileri incelendiğinde, PA13076 fajının 222 izolata (% 71.4) ve PC2184 fajının ise 298 izolata (% 95.8) etki gösterdiklerini bildirmişlerdir.

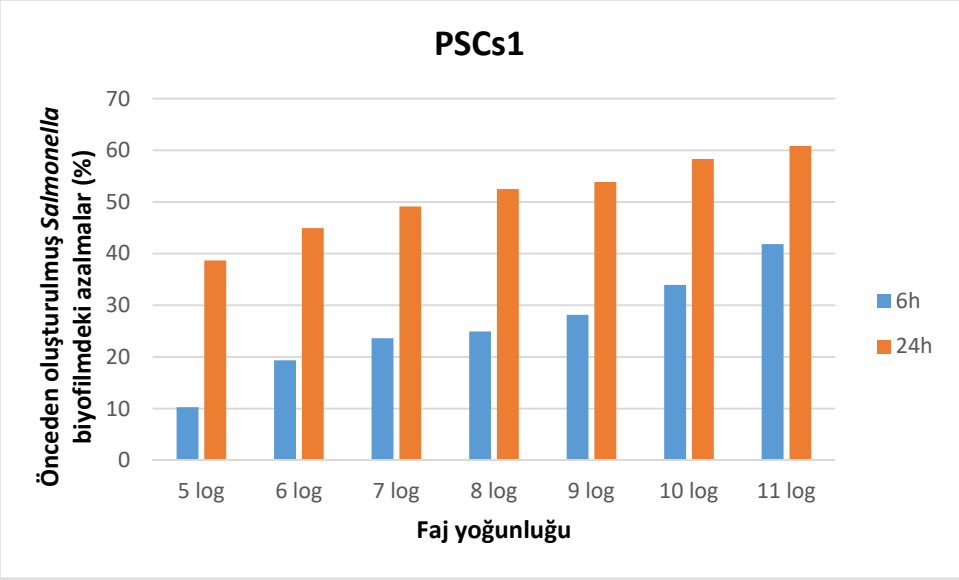
Nouraldin ve ark. (2016) hastane atıklarından izole ettikleri 6 *Pseudomonas aeruginosa*'ya özgü litik fajın izole ettikleri 50 *P. Aeruginosa* suşlarının 15'inde etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Huang ve ark. (2018) atık sulardan ve kümes hayvanlarında izole ettikleri LPST10, LPST18 ve LPST23 fajlarının *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028'yi enfekte ettiğini, özellikle faj LPST10'nin, test edilen tüm *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Enteritidis suşları üzerinde daha fazla verimli olduğunu gözlemlemişlerdir.

4.5.2. *Salmonella* Biyofilmi Üzerine Bakteriyofajların Etkisi

4.5.2.1. Mikroplakada Geliştirilen *Salmonella* Biyofilm Üzerine *Salmonella* Bakteriyofajlarının Etkisi

Mikroplaka yöntemiyle oluşturulan *Salmonella* biyofilmi üzerine bakteriyofajların etkileri incelenmesi için *Salmonella* bakteriyofajlarının *Salmonella* biyofilmleri üzerinde etkisi 96 kuyucuklu mikroplaka üzerinde iki ayrı günde ve en az 2 tekrar yapılmıştır. Sonuçların ortalaması alınmıştır ve *Salmonella* bakteriyofajın *Salmonella* biyofilm üzerine etkisinin yüzdesi her faj seyreltisi için hesaplanmıştır. Şekil 4.22ve 4.27'ye kadar olan tüm şekillerde her bir bakteriyofajın mikroplaka üzerinde *Salmonella* biyofilmi üzerine etkisi gösterilmiştir. Log5, log6, log7, log8, log9, log10 ve log11 bakteriyofaj uygulamasında kullanılan faj yoğunluğuna, sırasıyla 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10} ve 10^{11} PFU/ml titresine işaret etmektedir.



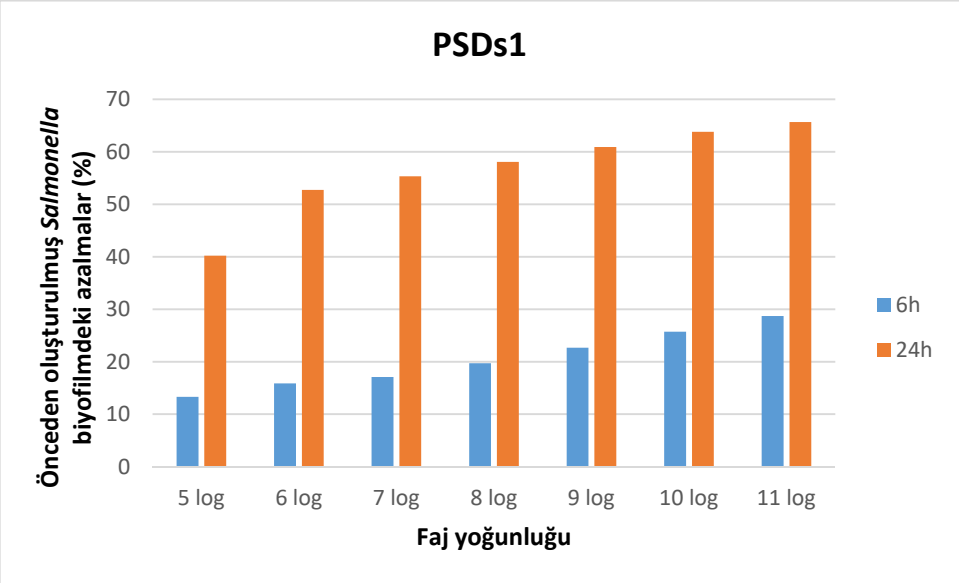
Şekil 4.22. PSCs1 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde *Salmonella* biyofilmine etkisi.

PSCs1 bakteriyofajının *Salmonella* biyofilm üzerine azalma etkisi yüzde olarak hesaplanmıştır ve Şekil 4.22'de gösterilmiştir.

6. saat sonuçlarına bakıldığında, *Salmonella* biyofilm yapısına PSCs1 bakteriyofajının log5: %10.2, log6: %19.3, log7: %23.6, log8: %24.9, log9: %28.1, log10: %33.9 ve log11: %41.8 azalma etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

24. saatinde PSCs1 bakteriyofajının log5: %38.6, log6: %44.9, log7: %49.1, log8: %52.4, log9: %53.8, log10: %58.3 ve log11: %60.8 azalma etkisi gösterdiği görülmüştür.

PSCs1 bakteriyofajı en yüksek etkiyi 6. saatte %41.8 ve 24. saatte %60.8 olarak 10^{11} PFU/ml'lik titrede ve en az etkiyi 6. saatte %10.2 ve 24. saatte %38.6 olarak 10^{5} PFU/ml'lik titrede gösterdiği görülmüştür.



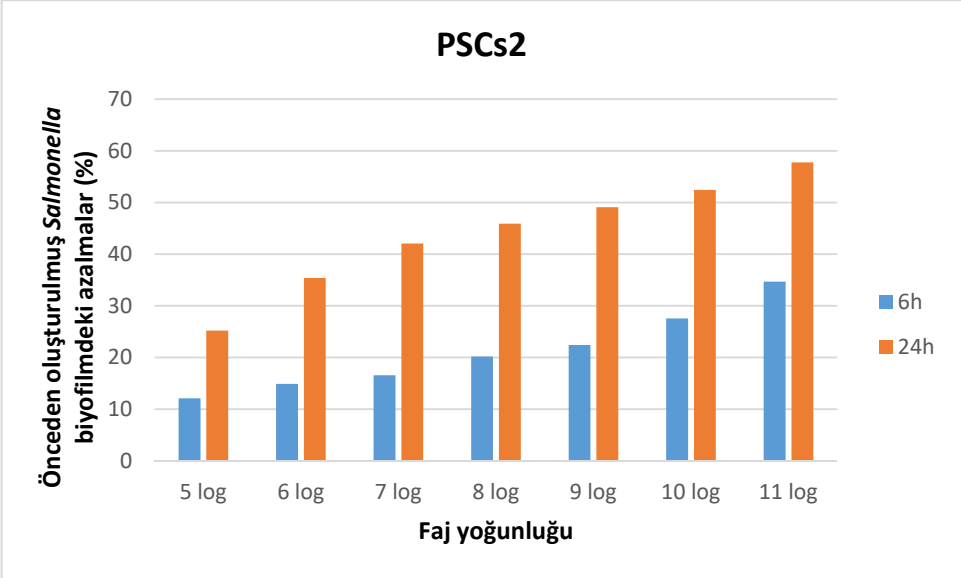
Şekil 4.23. PSDs1 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde *Salmonella* biyofilmine etkisi.

PSDs1 bakteriyofajının *Salmonella* biyofilm üzerine azalma etkisi yüzde olarak hesaplanmıştır ve Şekil 4.23'de gösterilmiştir.

6. saat sonuçlarına bakıldığında, *Salmonella* biyofilm yapısında PSDs1 bakteriyofajının log5: %13.3, log6: %15.8, log7: %17, log8: %19.7, log9: %22.6, log10: %25.7 ve log11: %28.7 azalma etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

24. saatinde PSDs1 bakteriyofajının log5: %40.2, log6: %52.7, log7: %55.3, log8: %58, log9: %60.9, log10: %63.8 ve log11: %65.6 azalma etkisi gösterdiği görülmüştür.

PSDs1 bakteriyofajı en yüksek azalma etkisini 6. saatte %28.7 ve 24. saatte %65.6 olarak 10^{11} PFU/ml'lik titrede ve en az etkiyi 6. saatte %13.3 ve 24. saatte %40.2 olarak 10^{5} PFU/ml'lik titrede gösterdiği görülmüştür.



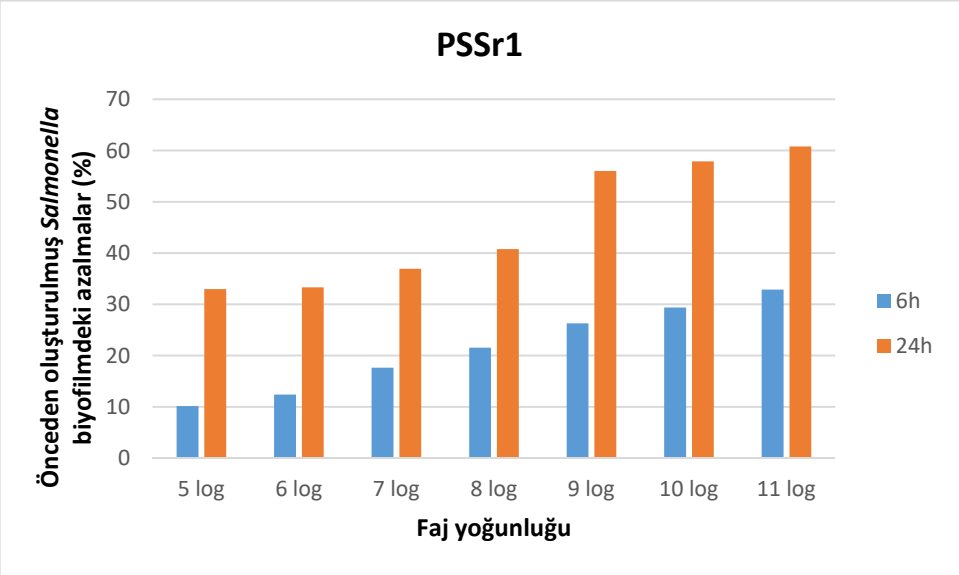
Şekil 4.24. PSCs2 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde *Salmonella* biyofilmine etkisi.

PSCs2 bakteriyofajının *Salmonella* biyofilm üzerine azalma etkisi yüzde olarak hesaplanmıştır ve Şekil 4.24'de gösterilmiştir.

6. saat sonuçlarına bakıldığında, *Salmonella* biyofilm yapısında PSCs2 bakteriyofajının log5: %12, log6: %14.9, log7: %16.5, log8: %20.1, log9: %22.4, log10: %27.5 ve log11: %34.6 azalma etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

24. saatinde PSCs2 bakteriyofajının log5: %25.1, log6: %35.4, log7: %42, log8: %45.9, log9: %49, log10: %52.4 ve log11: %57.7 azalma etkisi gösterdiği görülmüştür.

PSCs2 bakteriyofajı en yüksek en yüksek azalma etkisini 6. saatte %34.6 ve 24. saatte %57.7 olarak 10^{11} PFU/ml'lik titrede ve en az etkiyi 6. saatte %12 ve 24. saatte %25.1 olarak 10^{5} PFU/ml'lik titrede gösterdiği görülmüştür.



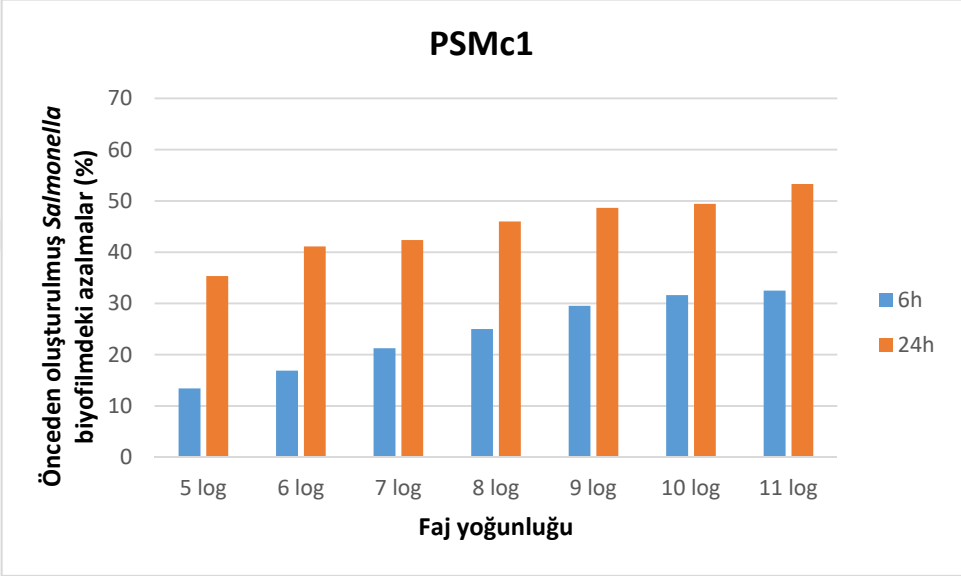
Şekil 4.25. PSSr1 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde *Salmonella* biyofilmine etkisi.

PSSr1 bakteriyofajının *Salmonella* biyofilm üzerine azalma etkisi yüzde olarak hesaplanmıştır ve Şekil 4.25'de gösterilmiştir.

6. saat sonuçlarına bakıldığında, *Salmonella* biyofilm yapısında PSSr1 bakteriyofajının log5: %10.1, log6: %12.4, log7: %17.6, log8: %21.5, log9: %26.3, log10: %29.3 ve log11: %32.8 azalma etkisi olduğu görülmüştür.

24. saatinde PSSr1 bakteriyofajının log5: %32.9, log6: %33.3, log7: %36.9, log8: %40.7, log9: %56, log10: %57.8 ve log11: %60.7 azalma etkisi gösterdiği görülmüştür.

PSSr1 bakteriyofajı en yüksek en yüksek azalma etkisini 6. saatte %32.8 ve 24. saatte %60.7 olarak 10^{11} PFU/ml'lik titrede ve en az etkiyi 6. saatte %10.1 ve 24. saatte %32.9 olarak 10^{5} PFU/ml'lik titrede gösterdiği görülmüştür.



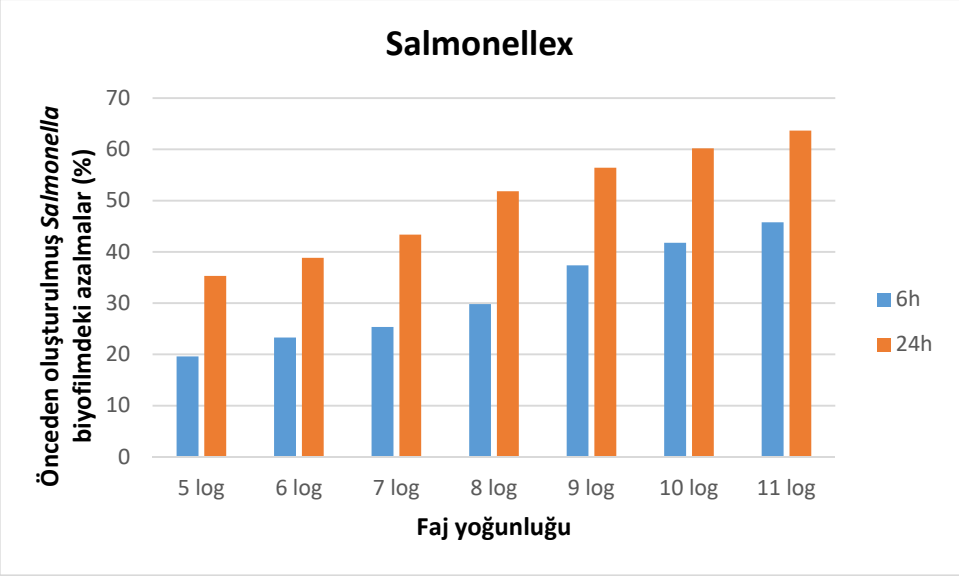
Şekil 4.26. PSMc1 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde *Salmonella* biyofilmine etkisi.

PSMc1 bakteriyofajının *Salmonella* biyofilm üzerine azalma etkisi yüzde olarak hesaplanmıştır ve Şekil 4.26'de gösterilmiştir.

6. saat sonuçlarına bakıldığında, *Salmonella* biyofilm yapısında PSMc1 bakteriyofajının log5: %13.4, log6: %16.9, log7: %21.2, log8: %25, log9: %29.5, log10: %31.6 ve log11: %32.4 azalma etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

24. saatinde PSMc1 bakteriyofajının log5: %35.3, log6: %41.1, log7: %42.3, log8: %46, log9: %48.6, log10: %49.4 ve log11: %53.3 azalma etkisi gösterdiği görülmüştür.

PSMc1 bakteriyofajı en yüksek en yüksek azalma etkisini 6. saatte %32.4 ve 24. saatte %53.3 olarak 10^{11} PFU/ml'lik titrede ve en az etkiyi 6. saatte %13.4 ve 24. saatte %35.3 olarak 10^{5} PFU/ml'lik titrede gösterdiği görülmüştür.



Şekil 4.27. Salmonellex™ bakteriyofajının mikroplaka üzerinde *Salmonella* biyofilmine etkisi.

Salmonellex bakteriyofajının *Salmonella* biyofilm üzerine azalma etkisi yüzde olarak hesaplanmıştır ve Şekil 4.27'de gösterilmiştir.

6. saat sonuçlarına bakıldığında, *Salmonella* biyofilm yapısında Salmonellex bakteriyofajının log5: %19.6, log6: %23.2, log7: %25.3, log8: %29.8, log9: %37.3, log10: %41.7 ve log11: %45.7 azalma etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

24. saatinde Salmonellex bakteriyofajının log5: %35.3, log6: %38.8, log7: %43.3, log8: %51.8, log9: %56.4, log10: %60.1 ve log11: %63.6 azalma etkisi gösterdiği görülmüştür.

Salmonellex bakteriyofajı en yüksek azalma etkisini 6. saatte %45.7 ve 24. saatte %63.6 olarak 10^{11} PFU/ml'lik titrede ve en az etkiyi 6. saatte %19.6 ve 24. saatte %35.3 olarak 10^{5} PFU/ml'lik titrede gösterdiği görülmüştür.

Tavuklardan izole edilmiş olan 5 *Salmonella* spp. izolatının mikroplakalarda oluşturulmuş olan *Salmonella* biyofilmlerinin azaltılması için, 6 bakteriyofajın (PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1, PSMc1 ve Salmonellex™) her biri farklı titrelerde (10^{5}, 10^{6}, 10^{7}, 10^{8}, 10^{9}, 10^{10} ve 10^{11} PFU/ml) kuyucuklara

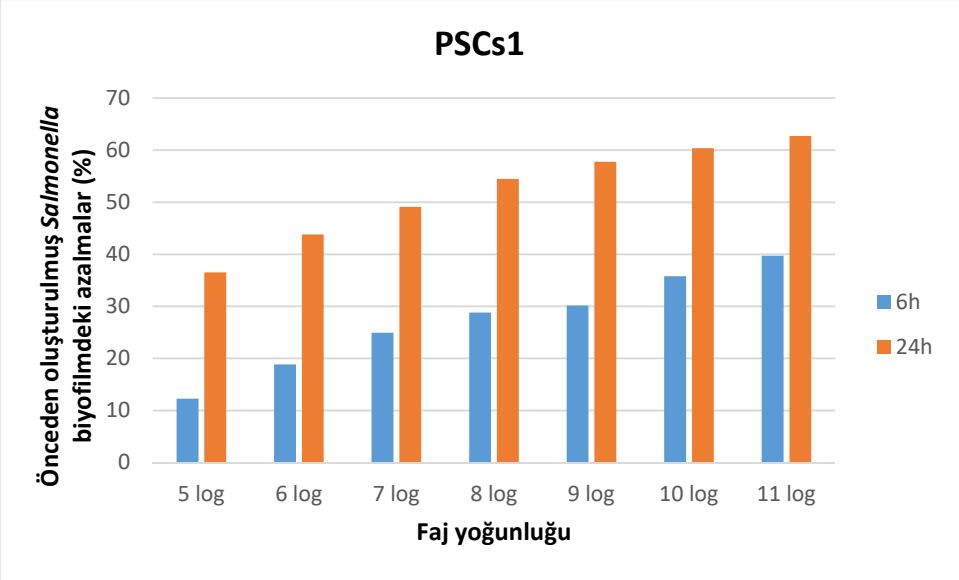
uygulanmıştır ve 6. ve 24. saatte azalma etkileri incelenmiştir. *Salmonella* bakteriyofajlarının *Salmonella* biyofilmler üzerine azalma etkisi yüzde olarak hesaplanmıştır ve Şekil 4.22'den 4.27'ya kadar olan şekillerde gösterilmiştir.

6. saat sonuçlarına bakıldığında, *Salmonella* biyofilm yapısında, PSCs1: %10.2 ila %41.8, PSDs1: %13.3 ila %28.7, PSCs2: %12.0 ila %34.6, PSSr1: %10.1 ila %32.8, PSMc1: %13.4 ila %32.4 ve Salmonellex™: %19.6 ila %45.7 azalma etkisi göstermiştir.

24. saatinde PSCs1: %38.6 ila %60.8, PSDs1: %40.2 ila %65.6, PSCs2: %25.1 ila %57.7, PSSr1: %32.9 ila %60.7, PSMc1: %35.3 ila %53.3 ve Salmonellex™: %35.3 ila %63.6 azalma etkisi göstermiştir.

Çalışmada izole edilmiş olan tüm bakteriyofajlar ve ticari olarak temin edilen Salmonellex bakteriyofajı, tavuklardan izole edilmiş olan *Salmonella* spp. izolatı ile oluşturulan biyofilm üzerine farklı titrelerde etkiler göstermiştir. Biyofilm üzerine en yüksek etkiyi 10^{11} PFU/ml'lik titrede Salmonellex™ bakteriyofajı 6. saatte %45.7 olarak ve PSDs1 bakteriyofajı 24. saatte %65.6 oranında gostermiştir. PSSr1 bakteriyofajı ise biyofilm üzerine en az etkiyi 10^5 PFU/ml'lik titrede 6. saatte (%10.1 azalma) ve PSCs2 bakteriyofajı 24. saatte (%25.1 azalma) göstermiştir.

Ayrıca doğrulama amacıyla ticari olarak temin edilen ATCC® 13076™ *Salmonella enterica* suşunun biyofilmi üzerine PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1, PSMc1 ve Salmonellex™ bakteriyofajlarının etkisi incelenmiştir. Sonuçların ortalaması alınmıştır ve *Salmonella* bakteriyofajın ATCC® 13076™ biyofilm üzerine etkisinin yüzdesi her faj seyreltisi için hesaplanmıştır. Şekil 4.28 ve 4.33 'ye kadar olan tüm şekillerde her bir bakteriyofajın mikroplaka üzerinde ATCC® 13076™ biyofilmi üzerine etkisi gösterilmiştir. Log5, log6, log7, log8, log9, log10 ve log11 bakteriyofaj uygulamasında kullanılan faj yoğunluğuna, sırasıyla 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10} ve 10^{11} PFU/ml titresine işaret etmektedir.



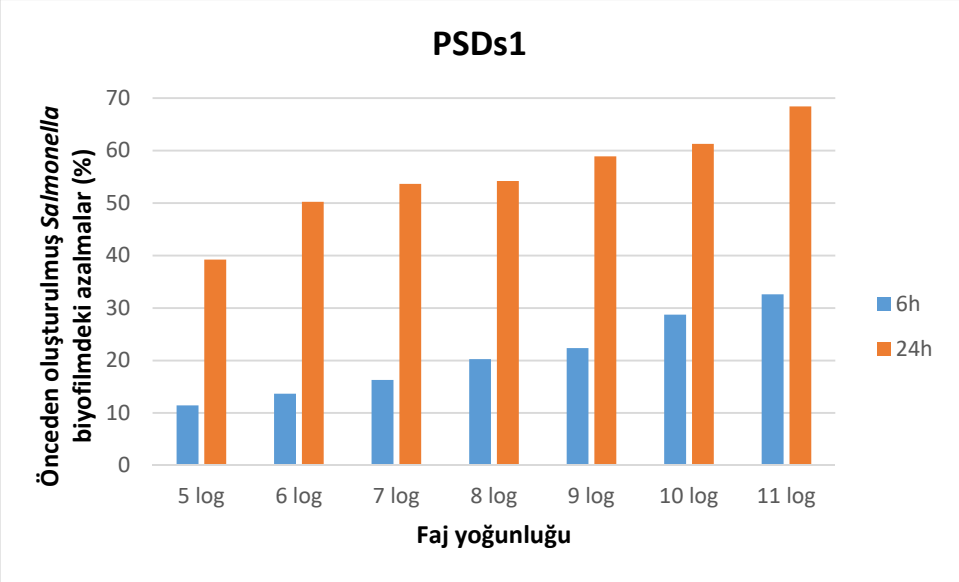
Şekil 4.28. PSCs1 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde ATCC®13076™ biyofilmine etkisi.

PSCs1 bakteriyofajının referans suş olarak kullanılan *Salmonella* ATCC®13076™ biyofilm üzerine azalma etkisi yüzde olarak hesaplanmıştır ve Şekil 4.28'de gösterilmiştir.

6. saat sonuçlarına bakıldığında, *Salmonella* biyofilm yapısında PSCs1 bakteriyofajının log5: %12.2, log6: %18.8, log7: %24.9, log8: %28.8, log9: %30.1, log10: %35.8 ve log11: %39.7 azalma etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

24. saatinde PSCs1 bakteriyofajının log5: %36.5, log6: %43.8, log7: %49.1, log8: %54.4, log9: %57.7, log10: %60.3 ve log11: %62.7 azalma etkisi gösterdiği görülmüştür.

PSCs1 bakteriyofajı en yüksek azalma etkisini 6. saatte %39.7 ve 24. saatte %62.7 olarak 10^{11} PFU/ml'lik titrede ve en az etkiyi 6. saatte %12.2 ve 24. saatte %36.5 oranında 10^{5} PFU/ml'lik titrede gösterdiği görülmüştür.



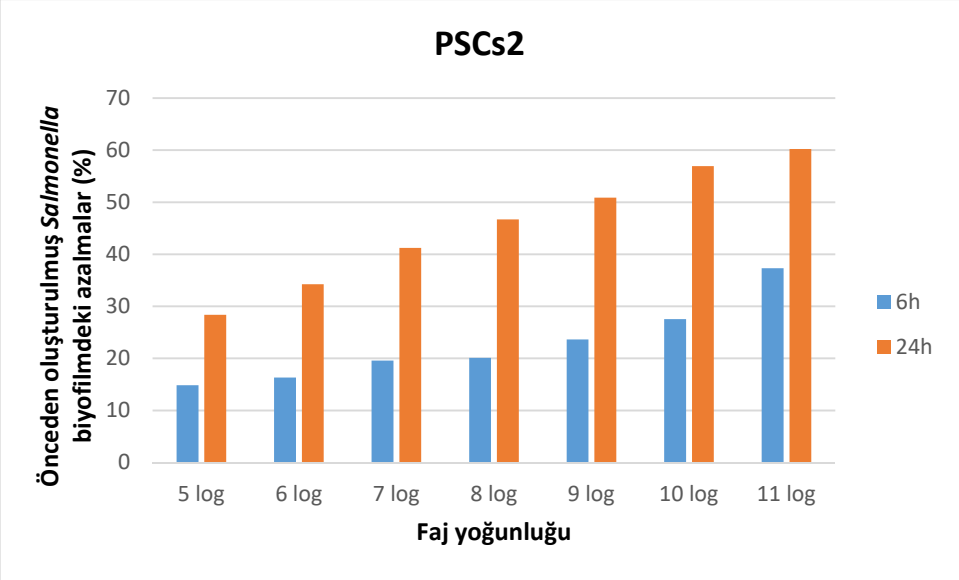
Şekil 4.29. PSDs1 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde ATCC®13076™ biyofilmine etkisi.

PSDs1 bakteriyofajının referans suş olarak kullanılan *Salmonella* ATCC®13076™ biyofilm üzerine azalma etkisi yüzde olarak hesaplanmıştır ve Şekil 4.29'de gösterilmiştir.

6. saat sonuçlarına bakıldığında, *Salmonella* biyofilm yapısında PSDs1 bakteriyofajının log5: %11.4, log6: %13.6, log7: %16.2, log8: %20.2, log9: %22.3, log10: %28.7 ve log11: %32.6 azalma etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

24. saatinde PSDs1 bakteriyofajının log5: %39.2, log6: %50.2, log7: %53.6, log8: %54.2, log9: %58.9, log10: %61.2 ve log11: %68.4 azalma etkisi gösterdiği görülmüştür.

PSDs1 bakteriyofajı en yüksek azalma etkisini 6. saatte %32.6 ve 24. saatte %68.4 olarak 10^{11} PFU/ml'lik titrede ve en az etkiyi 6. saatte %11.4 ve 24. saatte %39.2 oranında 10^{5} PFU/ml'lik titrede gösterdiği görülmüştür.



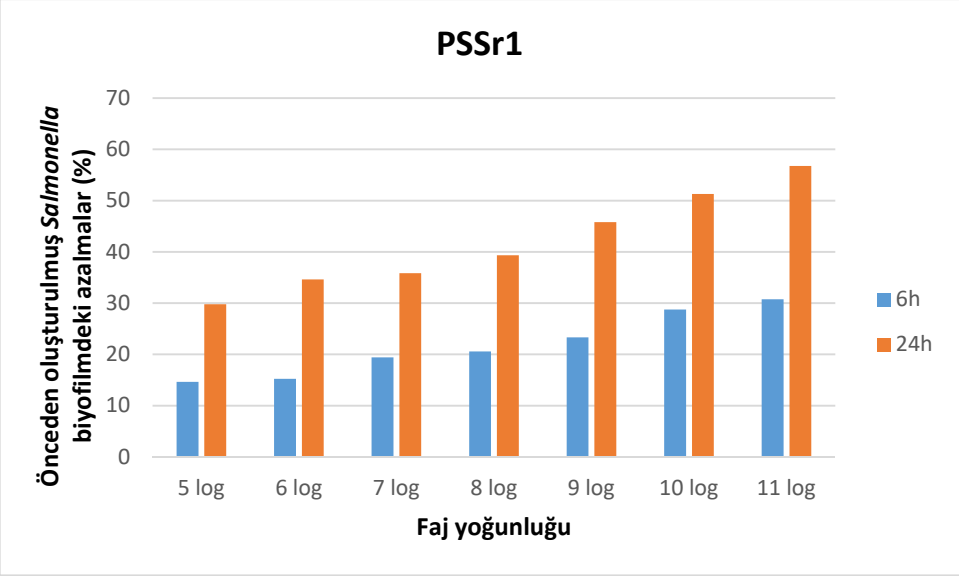
Şekil 4.30. PSCs2 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde ATCC®13076™ biyofilmine etkisi.

PSCs2 bakteriyofajının referans suş olarak kullanılan *Salmonella* ATCC®13076™ biyofilm üzerine azalma etkisi yüzde olarak hesaplanmıştır ve Şekil 4.30'de gösterilmiştir.

6. saat sonuçlarına bakıldığında, *Salmonella* biyofilm yapısında PSCs2 bakteriyofajının log5: %14.8, log6: %16.3, log7: %19.5, log8: %20.1, log9: %23.6, log10: %27.5 ve log11: %37.3 azalma etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

24. saatinde PSCs2 bakteriyofajının log5: %28.3, log6: %34.2, log7: %41.2, log8: %46.7, log9: %50.8, log10: %56.9 ve log11: %60.2 azalma etkisi gösterdiği görülmüştür.

PSCs2 bakteriyofajı en yüksek azalma etkisini 6. saatte %37.3 ve 24. saatte %60.2 olarak 10^{11} PFU/ml'lik titrede ve en az etkiyi 6. saatte %14.8 ve 24. saatte %28.3 olarak 10^{5} PFU/ml'lik titrede gösterdiği görülmüştür.



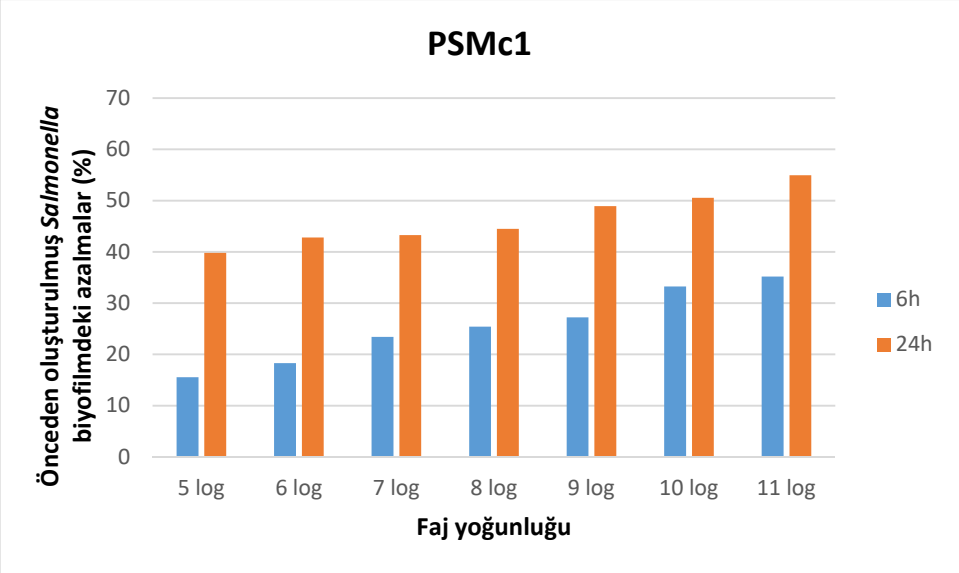
Şekil 4.31. PSSr1 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde ATCC®13076™ biyofilmine etkisi.

PSSr1 bakteriyofajının referans suş olarak kullanılan *Salmonella* ATCC®13076™ biyofilm üzerine azalma etkisi yüzde olarak hesaplanmıştır ve Şekil 4.31'de gösterilmiştir.

6. saat sonuçlarına bakıldığında, *Salmonella* biyofilm yapısında PSSr1 bakteriyofajının log5: %14.6, log6: %15.2, log7: %19.4, log8: %20.5, log9: %23.3, log10: %28.7 ve log11: %30.7 azalma etkisi gösterildiği belirlenmiştir.

24. saatinde PSSr1 bakteriyofajının log5: %29.7, log6: %34.6, log7: %35.8, log8: %39.9, log9: %45.8, log10: %51.2 ve log11: %56.7 azalma etkisi gösterdiği görülmüştür.

PSSr1 bakteriyofajı en yüksek azalma etkisini 6. saatte %30.7 ve 24. saatte %56.7 olarak 10^{11} PFU/ml'lik titrede ve en az etkiyi 6. saatte %14.6 ve 24. saatte %29.7 olarak 10^{5} PFU/ml'lik titrede gösterdiği görülmüştür.



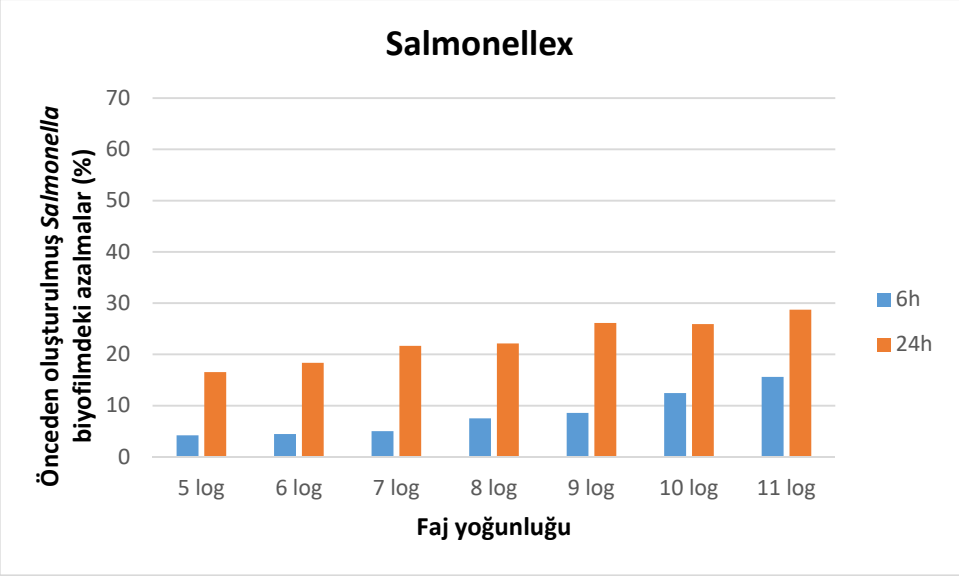
Şekil 4.32. PSMc1 bakteriyofajının mikroplaka üzerinde ATCC®13076™ biyofilmine etkisi.

PSMc1 bakteriyofajının referans suş olarak kullanılan *Salmonella* ATCC®13076™ biyofilm üzerine azalma etkisi yüzde olarak hesaplanmıştır ve Şekil 4.32'de gösterilmiştir.

6. saat sonuçlarına bakıldığında, *Salmonella* biyofilm yapısında PSMc1 bakteriyofajının log5: %15.5, log6: %18.2, log7: %23.4, log8: %25.4, log9: %27.2, log10: %33.2 ve log11: %35.1 azalma etkisi gösterildiği belirlenmiştir.

24. saatinde PSMc1 bakteriyofajının log5: %39.8, log6: %42.8, log7: %43.2, log8: %44.5, log9: %48.9, log10: %50.5 ve log11: %54.9 azalma etkisi gösterdiği görülmüştür.

PSMc1 bakteriyofajı en yüksek azalma etkisini 6. saatte %35.1 ve 24. saatte %54.9 olarak 10^{11} PFU/ml'lik titrede ve en az etkiyi 6. saatte %15.5 ve 24. saatte %39.8 olarak 10^{5} PFU/ml'lik titrede gösterdiği görülmüştür.



Şekil 4.33. Salmonellex™ bakteriyofajının mikroplaka üzerinde ATCC®13076™ biyofilmine etkisi.

Salmonellex bakteriyofajının referans suş olarak kullanılan *Salmonella* ATCC®13076™ biyofilm üzerine azalma etkisi yüzde olarak hesaplanmıştır ve Şekil 4.33'de gösterilmiştir.

6. saat sonuçlarına bakıldığında, *Salmonella* biyofilm yapısında Salmonellex bakteriyofajının log5: %4.2, log6: %4.4, log7: %5, log8: %7.5, log9: %8.5, log10: %12.4 ve log11: %15.6 azalma etkisi gösterildiği belirlenmiştir.

24. saatinde Salmonellex bakteriyofajının log5: %16.5, log6: %18.3, log7: %21.6, log8: %22.1, log9: %26.1, log10: %25.9 ve log11: %28.7 azalma etkisi gösterdiği görülmüştür.

Salmonellex bakteriyofajı en yüksek azalma etkisini 6. saatte %15.6 ve 24. saatte %28.7 olarak 10^{11} PFU/ml'lik titrede ve en az etkiyi 6. saatte %4.2 ve 24. saatte %16.5 olarak 10^{5} PFU/ml'lik titrede gösterdiği görülmüştür.

6. saat sonuçlarına bakıldığında, *Salmonella* ATCC®13076™ biyofilm yapısında, PSCs1: %12.27 ila %39.72, PSDs1: %11.44 ila %32.61, PSCs2: %14.85 ila %37.31, PSSr1: %14.65 ila %30.76, PSMc1: %15.54 ila %35.18 ve Salmonellex™: %4.2 ila %15.6 azalma etkisi göstermiştir.

24. saatinde PSCs1: %36.5 ila %62.7, PSDs1: %39.2 ila %68.4, PSCs2: %28.3 ila %60.2, PSSr1: %29.7 ila %56.7, PSMc1: %39.8 ila %54.9 ve Salmonellex™: %16.5 ila %28.7 azalma etkisi göstermiştir.

Çalışmada izole edilmiş olan tüm bakteriyofajlar ve ticari olarak temin edilen Salmonellex bakteriyofajı, ATCC®13076™ kodlu *Salmonella* biyofilmi üzerine farklı titrelerde etkiler göstermiştir. Biyofilm üzerine en yüksek etkiyi 10^{11} PFU/ml'lik titrede PSCs1 bakteriyofajı 6. saatte (%39.7 azalma); PSDs1 bakteriyofajı 24. saatte (%68.4 azalma) gostermiştir. Salmonellex™ bakteriyofajı ise biyofilm üzerine en az etkili olan bakteriyofaj olup 10^5 PFU/ml'lik titrede 6. saatte %4.2 azalma ve 24. saatte %16.5 azalma göstermiştir.

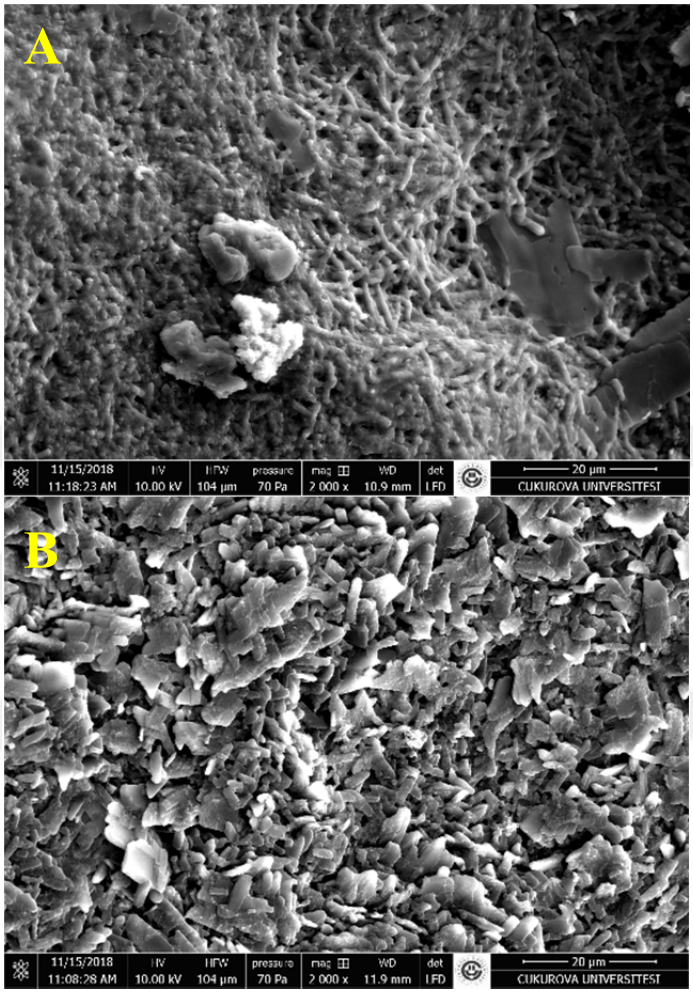
Chao ve Jiang (2017) işletmelerden izole ettikleri 6 *Salmonella* bakteriyofajının 10^4-10^8 PFU/ml seyreltileri şeklinde 96 kuyucuklu mikroplakada oluşma aşamasında olan ve önceden oluşturdukları *Salmonella* biyofilm üzerine azalma etkisine bakmışlar ve *Salmonella* biyofilm oluşma aşamasında %90 azalma görülürken önceden oluşan biyofilmlerde ise %66 azalma tespit etmişledir.

Temin edilen ve referans suş olarak kullanılan ATCC®13076™ (*Salmonella enterika* ssp. *enterica* serovar Enteritidis)'ye mikroplaka üzerinde biyofilm oluşturulmuştur. Çalışmalarımızda izole edip tanımlamış olduğumuz PSDs1 bakteriyofajının 10^{11} PFU/mL'lik titrede bu biyofilm üzerine 24. saatte en yüksek %68.4 oranında azalma etkisi gözlemlenirken ticari olarak temin edilmiş olan Salmonellex™ bakteriyofajının 24. Saatte 10^{11} PFU/mL'lik titrede en yüksek %28.7 oranında azalma etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Bu da ticari olarak temin edilen bakteriofajın her suşa ve onun oluşturduğu biyofilme etkisinin aynı olamayacağını göstermiştir. Bu nedenle ticari olarak satılan faj preparatlarının farklı kokteyller şeklinde hazırlanarak suşlar baz alınarak daha geniş virülans

etkileri olacak şekilde uygulamaya koyulmasının daha doğru olabileceği düşünülmüştür.

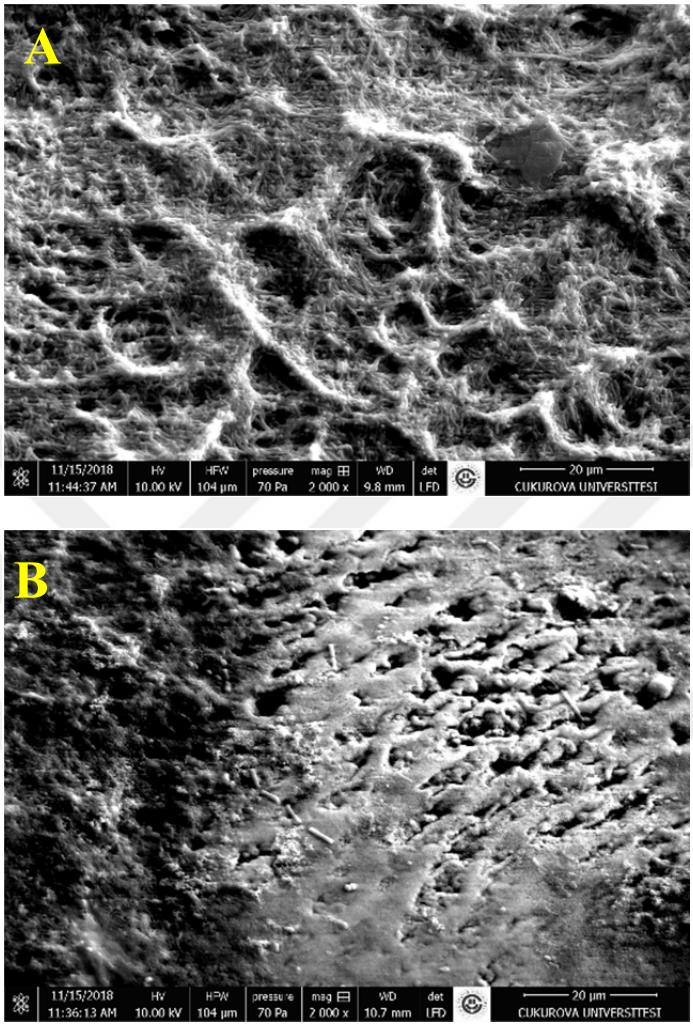
4.5.2.2. Safra Taşı, Diş Örnekleri, Paslanmaz Çelik ve LB Agar Üzerinde *Salmonella* Biyofilm Geliştirilmesi ve *Salmonella* Bakteriyofajlarının Oluşturulan Biyofilmler Üzerine Etkisi

Safra taşı ve diş örnekleri yüzeyinde oluşturulmuş olan *Salmonella* biyofilmleri üzerine izole edilmiş olan 5 *Salmonella* bakteriyofajın (PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1 ve PSMc1) ve ticari olarak temin edilmiş olan Salmonellex™ bakteriyofajlarının etkisi 24 saat uygulanmak üzere Ç.Ü Gıda Mühendisliği mikrobiyoloji laboratuvarında yapılmıştır. Fiksasyonu yapılan preparatlar Ç.Ü merkez laboratuvarında bulunan Scanning Electron Mikroskobunda (SEM) incelenmiştir ve görüntüleri Şekil 4.34 - Şekil 4.45 'te verilmiştir.



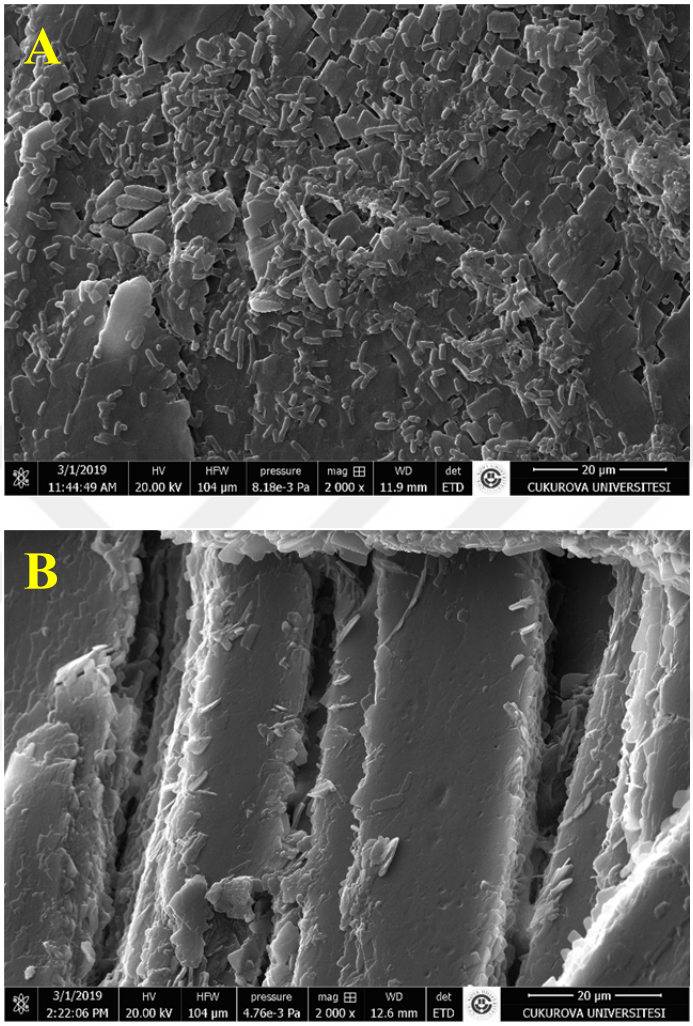
Şekil 4.34**. (A)** Safra taşı yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. (B) bu biyofilm üzerine PSCs1 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi.

Şekil 4.34 A'da görüldüğü gibi safra taşı yüzeyinde yoğun bir şekilde *Salmonella* biyofilmi oluşmuştur, PSCs1 bakteriyofajı ile muamele edilen bu biyofilmin fotoğrafları alındığında (Şekil 4.34) bakteriyofajın şekil 4.34 A'da görüntülenen biyofilm üzerine etkisinin olduğu görülmüştür. (Şekil 4.34 B)



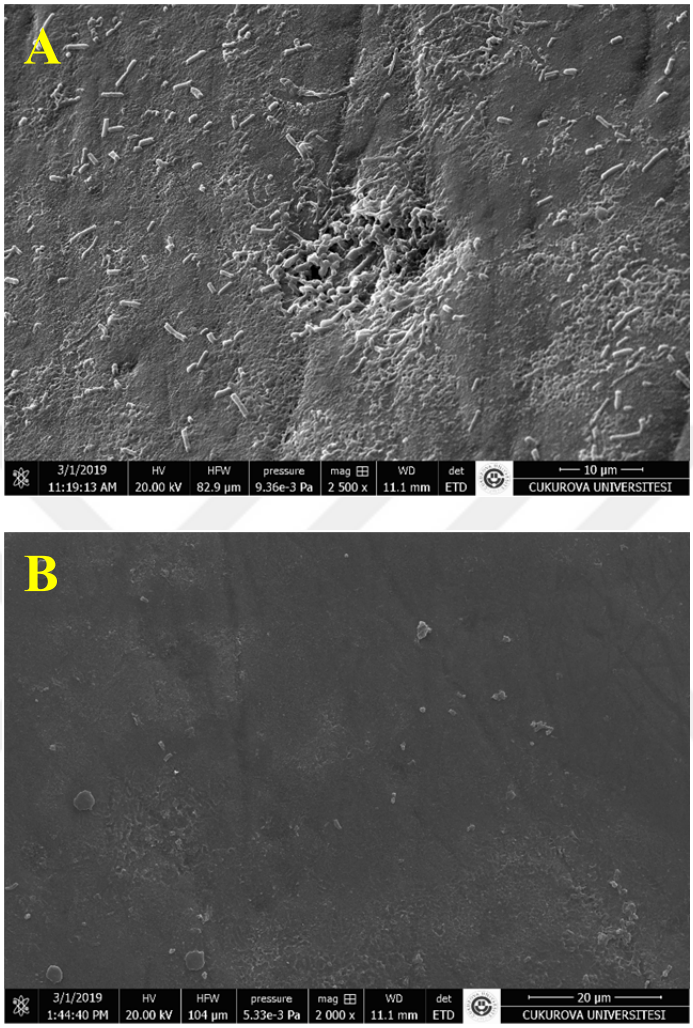
Şekil 4.35. **(A)** Diş örnekleri yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. (B) bu biyofilm üzerine PSCs1 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi

Şekil 4.35A'da görüldüğü gibi diş örnekleri yüzeyinde yoğun bir şekilde *Salmonella* biyofilmi oluşmuştur, PSCs1 bakteriyofajı ile muamele edilen bu biyofilmin fotoğrafları alındığında (Şekil 4.35) bakteriyofajın şekil 4.35 A'da görüntülenen biyofilm üzerine etkisinin olduğu görülmüştür. (Şekil 4.35 B)



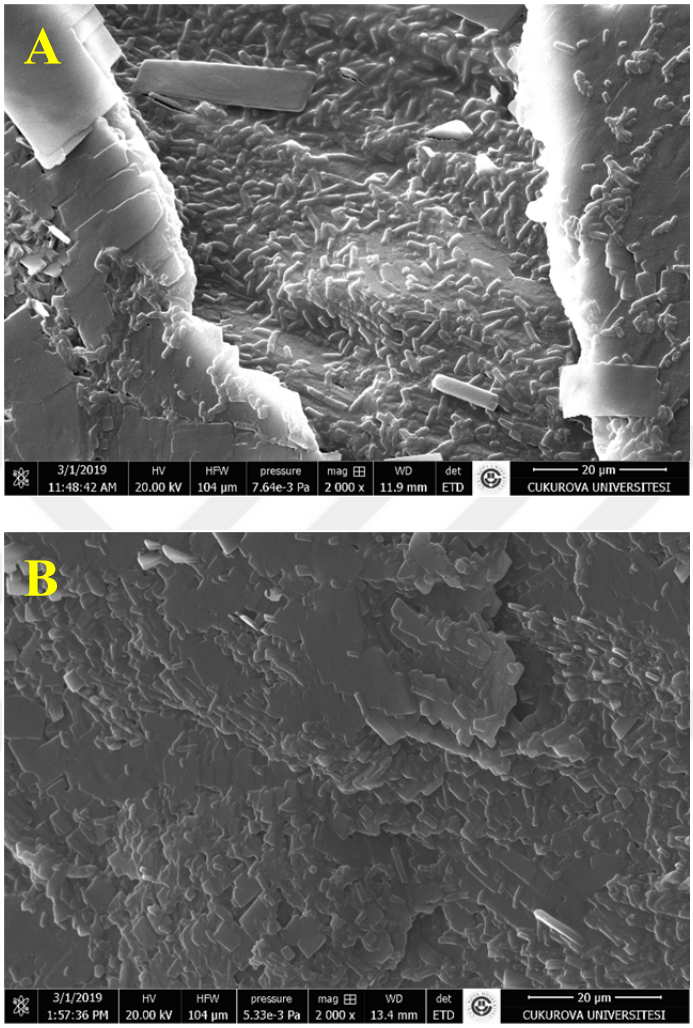
Şekil 4.36. (A) Safra taşı yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. (B) bu biyofilm üzerine PSDs1 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi

Şekil 4.36 A 'da görüldüğü gibi safra taşı yüzeyinde yoğun bir şekilde *Salmonella* biyofilmi oluşmuştur, PSDs1 bakteriyofajı ile muamele edilen bu biyofilmin fotoğrafları alındığında (Şekil 4.36) bakteriyofajın şekil 4.36 A 'da görüntülenen biyofilm üzerine etkisinin olduğu görülmüştür. (Şekil 4.36 B)



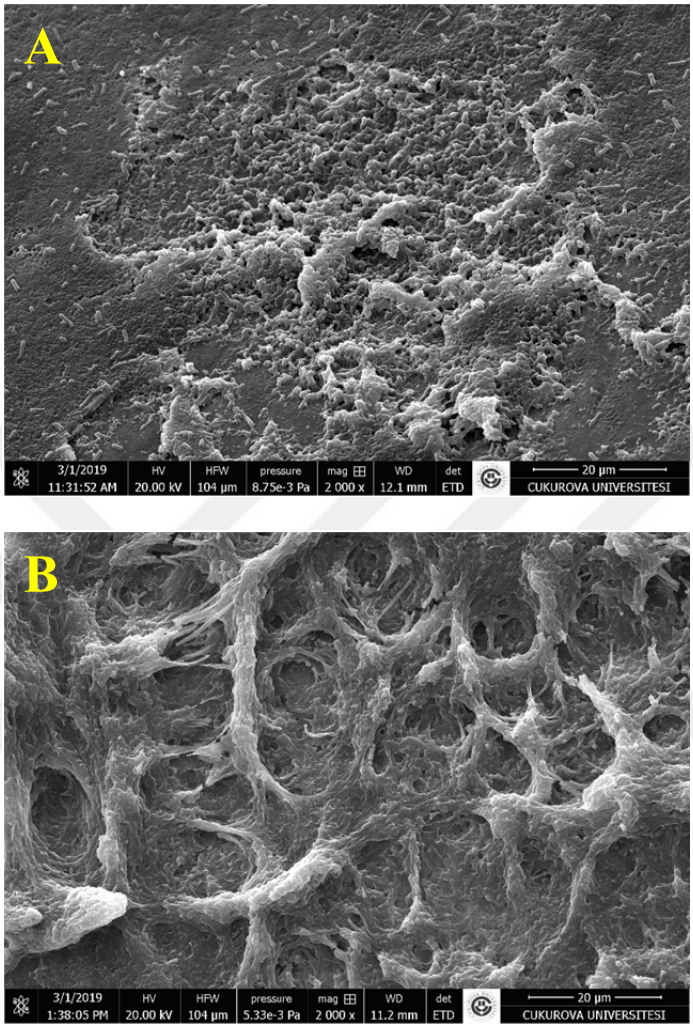
Şekil 4.37. **(A)** Diş örnekleri yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. (B) bu biyofilm üzerine PSDs1 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi

Şekil 4.37 A'da görüldüğü gibi diş örnekleri yüzeyinde yoğun bir şekilde *Salmonella* biyofilmi oluşmuştur, PSDs1 bakteriyofajı ile muamele edilen bu biyofilmin fotoğrafları alındığında (Şekil 4.37) bakteriyofajın şekil 4.37 A'da görüntülenen biyofilm üzerine etkisinin olduğu görülmüştür. (Şekil 4.37 B)



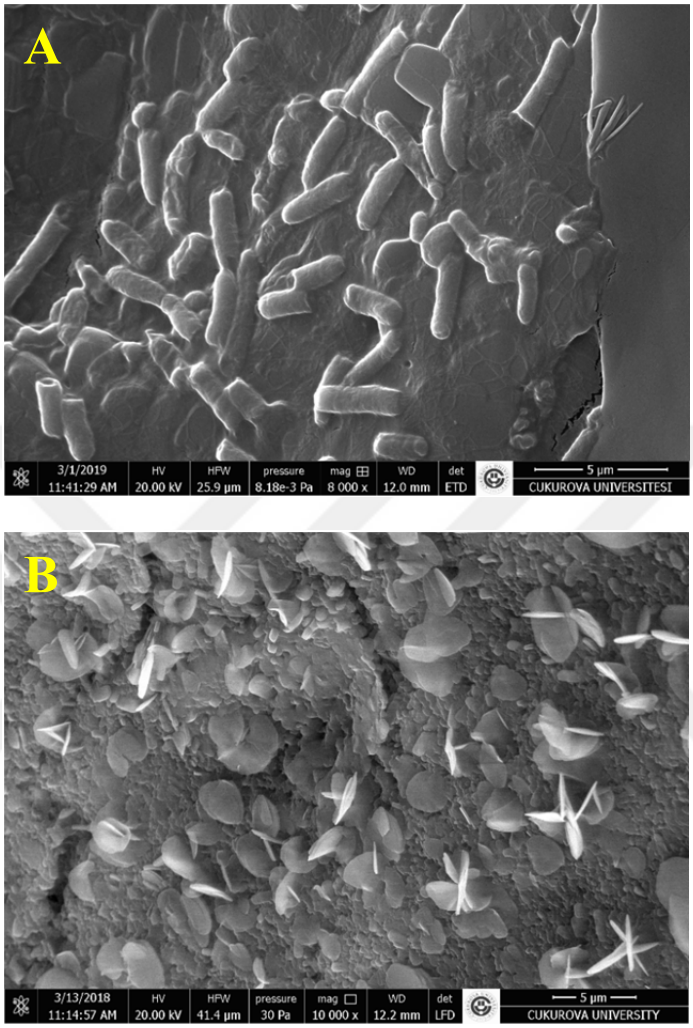
Şekil 4.38. (A) Safra taşı yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. (B) bu biyofilm üzerine PSCs2 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi

Şekil 4.38 A 'da görüldüğü gibi safra taşı yüzeyinde yoğun bir şekilde *Salmonella* biyofilmi oluşmuştur, PSCs2 bakteriyofajı ile muamele edilen bu biyofilmin fotoğrafları alındığında (Şekil 4.38) bakteriyofajın şekil 4.38 A 'da görüntülenen biyofilm üzerine etkisinin olduğu görülmüştür. (Şekil 4.38 B)



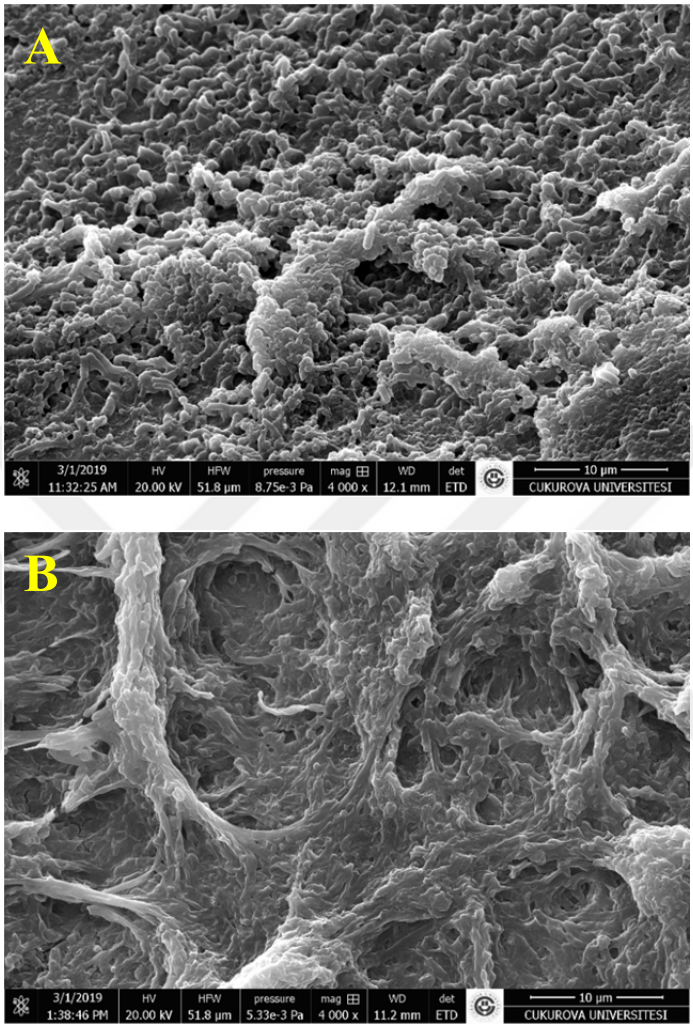
Şekil 4.39. (A) Diş örnekleri yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. (B) bu biyofilm üzerine PSCs2 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi

Şekil 4.39 A 'da görüldüğü gibi diş örnekleri yüzeyinde yoğun bir şekilde *Salmonella* biyofilmi oluşmuştur, PSCs2 bakteriyofajı ile muamele edilen bu biyofilmin fotoğrafları alındığında (Şekil 4.39) bakteriyofajın şekil 4.39 A 'da görüntülenen biyofilm üzerine etkisinin olduğu görülmüştür. (Şekil 4.39 B)



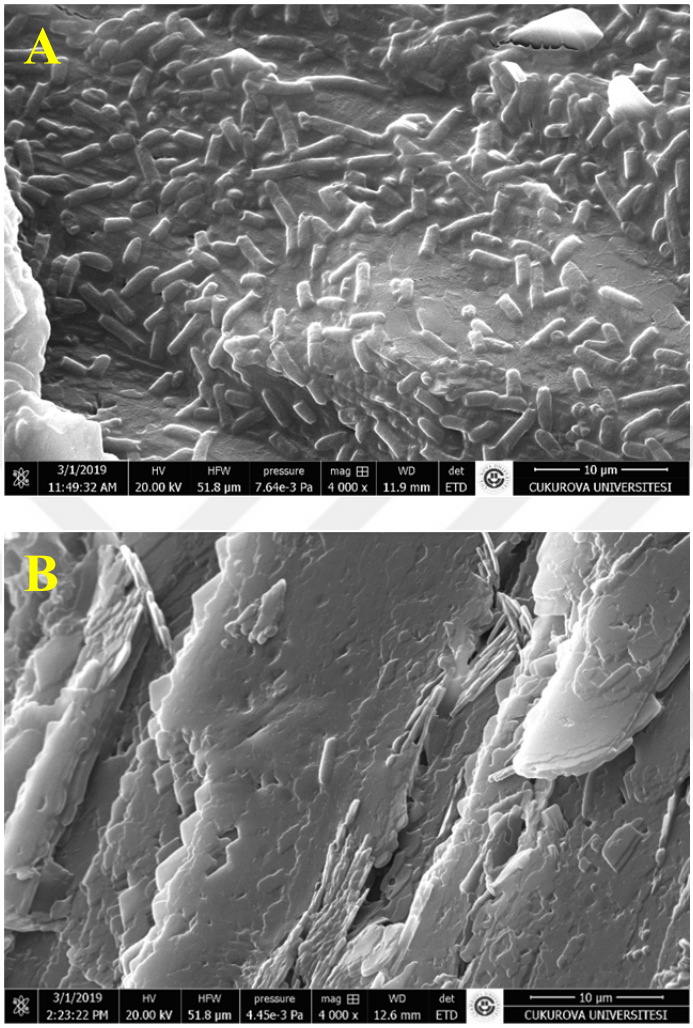
Şekil 4.40. (A) Safra taşı yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. (B) bu biyofilm üzerine PSSr1 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi

Şekil 4.40 A 'da görüldüğü gibi safra taşı yüzeyinde yoğun bir şekilde *Salmonella* biyofilmi oluşmuştur, PSSr1 bakteriyofajı ile muamele edilen bu biyofilmin fotoğrafları alındığında (Şekil 4.40) bakteriyofajın şekil 4.40 A 'da görüntülenen biyofilm üzerine etkisinin olduğu görülmüştür. (Şekil 4.40 B)



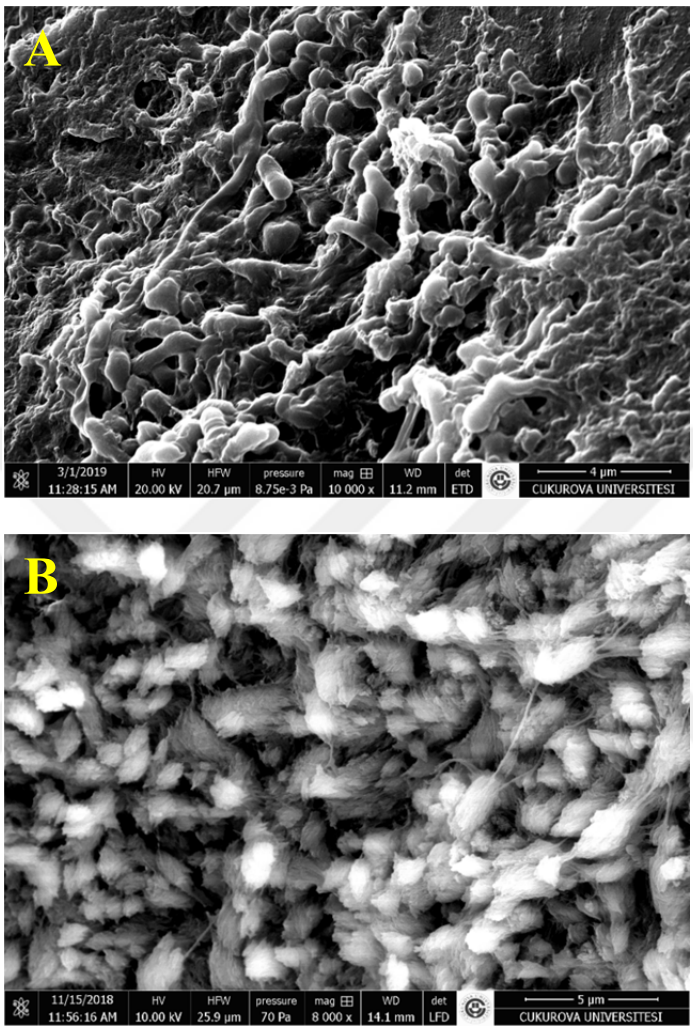
Şekil 4.41. (A) Diş örnekleri yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi (B) üzerine PSSr1 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi

Şekil 4.41 A 'da görüldüğü gibi diş örnekleri yüzeyinde yoğun bir şekilde *Salmonella* biyofilmi oluşmuştur, PSSr1 bakteriyofajı ile muamele edilen bu biyofilmin fotoğrafları alındığında (Şekil 4.41) bakteriyofajın şekil 4.41 A'da görüntülenen biyofilm üzerine etkisinin olduğu görülmüştür. (Şekil 4.41 B)



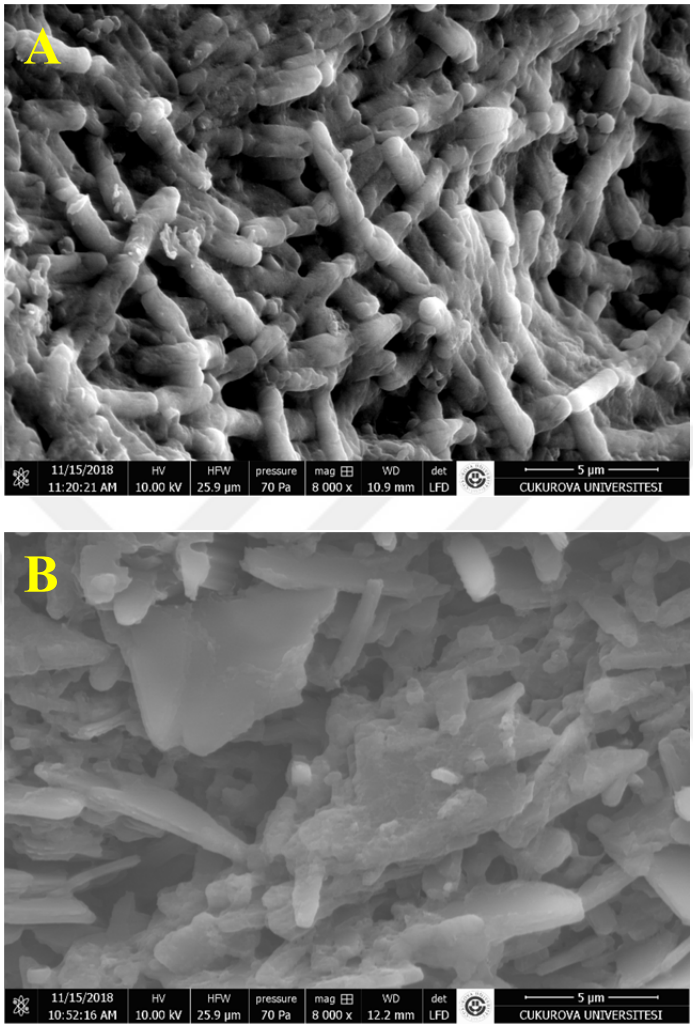
Şekil 4.42. (A) Safra taşı yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi (B) bu biyofilmin üzerine PSMc1 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi

Şekil 4.42 A 'da görüldüğü gibi safra taşı yüzeyinde yoğun bir şekilde *Salmonella* biyofilmi oluşmuştur, PSMc1 bakteriyofajı ile muamele edilen bu biyofilmin fotoğrafları alındığında (Şekil 4.42) bakteriyofajın şekil 4.42 A'da görüntülenen biyofilm üzerine etkisinin olduğu görülmüştür. (Şekil 4.42 B)



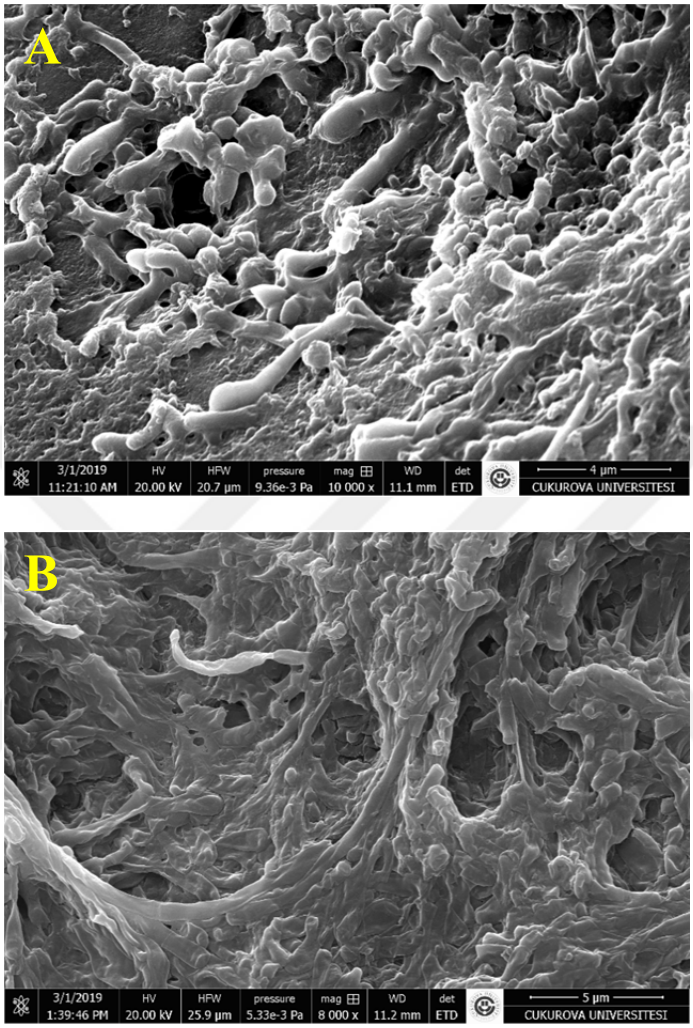
Şekil 4.43. (A) Diş örnekleri yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. (B) üzerine PSMc1 bakteriyofajının 24. Saatte etkisi

Şekil 4.43 A'da görüldüğü gibi diş örnekleri yüzeyinde yoğun bir şekilde *Salmonella* biyofilmi oluşmuştur, PSMc1 bakteriyofajı ile muamele edilen bu biyofilmin fotoğrafları alındığında (Şekil 4.43) bakteriyofajın şekil 4.43 A 'da görüntülenen biyofilm üzerine etkisinin olduğu görülmüştür. (Şekil 4.43 B)



Şekil 4.44**.** (A) Safra taşı yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. Bu biyofilm üzerine Salmonellex™ bakteriyofajının 24. Saatte etkisi

Şekil 4.44 A'da görüldüğü gibi safra taşı yüzeyinde yoğun bir şekilde *Salmonella* biyofilmi oluşmuştur, Salmonellex™ bakteriyofajı ile muamele edilen bu biyofilmin fotoğrafları alındığında (Şekil 4.44) bakteriyofajın şekil 4.44 A'da görüntülenen biyofilm üzerine etkisinin olduğu görülmüştür. (Şekil 4.44 B)



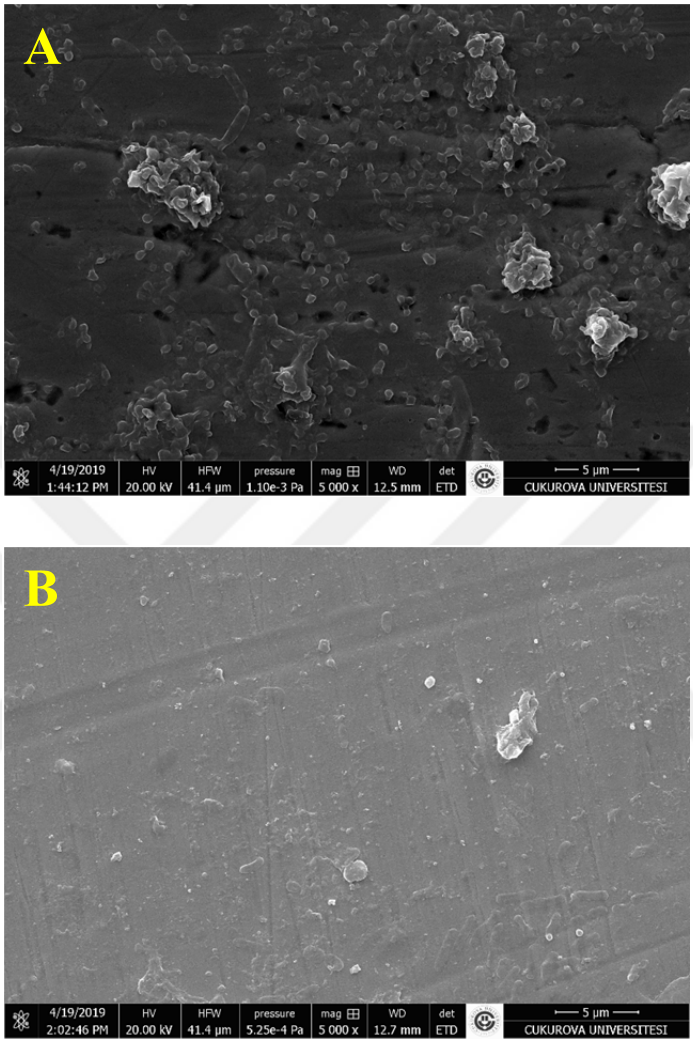
Şekil 4.45. (A) Diş örnekleri yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. (B)bu biyofilm üzerine Salmonellex™ bakteriyofajının 24. Saatte (B) etkisi

Şekil 4.45 A 'da görüldüğü gibi diş örnekleri yüzeyinde yoğun bir şekilde *Salmonella* biyofilmi oluşmuştur, Salmonellex™ bakteriyofajı ile muamele edilen bu biyofilmin fotoğrafları alındığında (Şekil 4.45) bakteriyofajın şekil 4.45 A)'da görüntülenen biyofilm üzerine etkisinin olduğu görülmüştür. (Şekil 4.45 B)

Çalışmanın devamında paslanmaz çelik yüzeyinde hem tavuk etinden izole edilen GBTT1 kodlu *Salmonella* suşuna ve hem referans suş olarak temin edilmiş

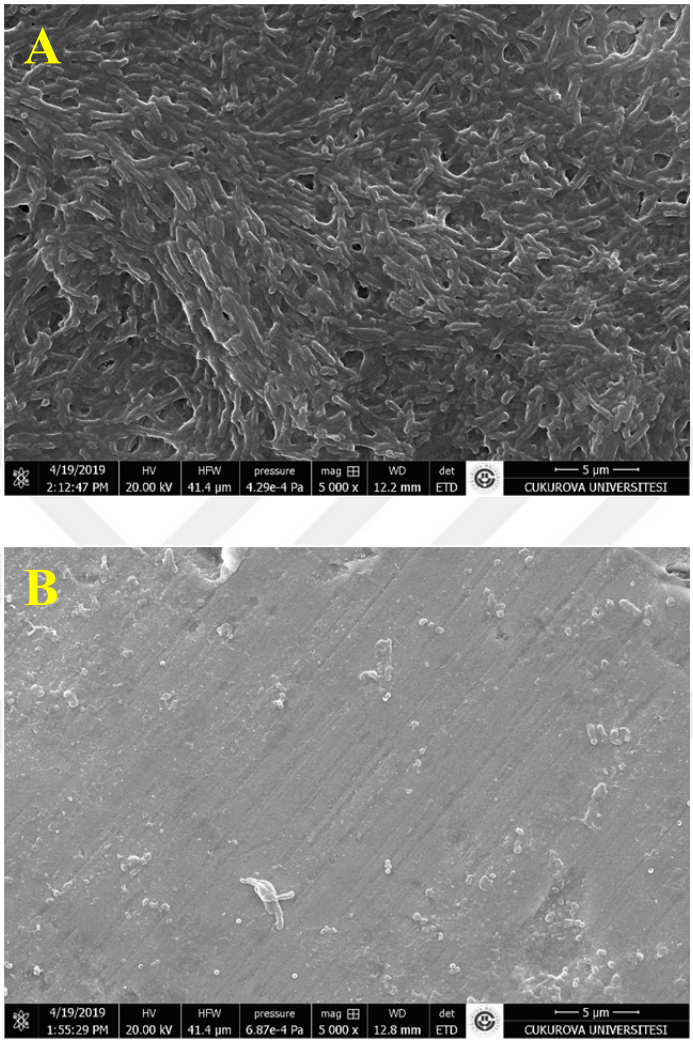
olan ATCC®13076™ (*Salmonella enterika* ssp. *enterica* serovar Enteritidis)'ye biyofilm yaptırılmıştır. Çelik yüzeyinde oluşmuş olan *Salmonella* biyofilmler üzerine, PSDs1 bakteriyofajı uygulanmıştır ve SEM'de paslanmaz çelik yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilm üzerine PSDs1 bakteriyofajın etkisi incelenmiştir ve görüntüler Şekil 4.46 ve Şekil 4.47 'da verilmiştir.

Çelik ve LB agar yüzeylerinde çalışma aşamasında proje bütçesinin kısıtlı ve analiz masraflarının yüksek olması izolatların hepsinin çalışılmasını engellemiştir. Bu nedenle sadece tek bir (GBTT1) örnekten izole edilmiş ve *Salmonella enterica* olarak tanımlanmış izolatla çalışma yürütülmüştür.



Şekil 4.46. (A) Paslanmaz çelik yüzeyinde oluşan GBTT1 kodlu *Salmonella* biyofilmi. (B) bu biyofilm üzerine izole edilmiş olan PSDs1 bakeriyofajın etkisi.

GBTT1 kodlu *Salmonella* suşunun paslanmaz çelik yüzeyinde çok yoğun olarak biyofilm oluşturduğu Şekil 4.46. (A)'da görülmektedir. Bu oluşan biyofilm PSDs1 bakteriyofajı ile muamele edildiğinde Şekil 4.46 (B)'de görüleceği gibi etkisinin gerçekleşmiş olduğu ve biyofilme rastlanmadığı tespit edilmiştir.

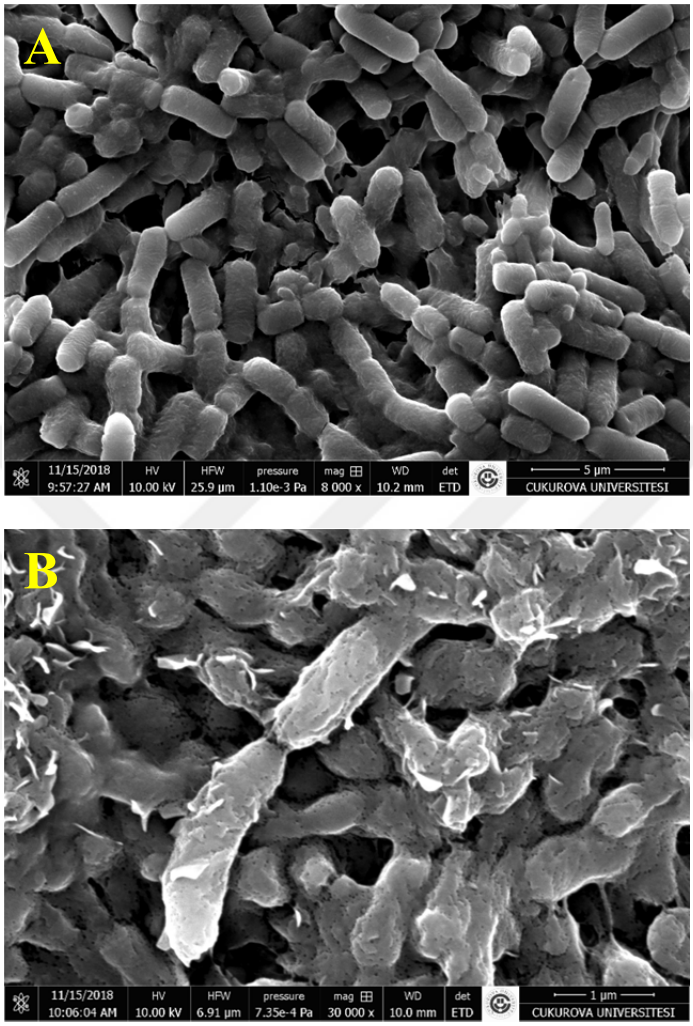


Şekil 4.47. (A) Paslanmaz çelik yüzeyinde oluşan ATCC®13076™ kodlu *Salmonella* biyofilmi. (B) bu biyofilm üzerine izole edilmiş olan PSDs1 bakeriyofajın etkisi**.**

ATCC®13076™ kodlu *Salmonella* suşunun paslanmaz çelik yüzeyinde çok yoğun olarak biyofilm oluşturduğu Şekil 4.47. (A)'da görülmektedir. Bu oluşan biyofilm PSDs1 bakteriyofajı ile muamele edildiğinde Şekil 4.47 (B)'de görüleceği gibi etkisinin gerçekleşmiş olduğu ve biyofilme rastlanmadığı tespit edilmiştir.

Gong ve Jiang (2017) sert yüzeylerde *Salmonella* biyofilmlerin azaltılmasında işletmelerden izole ettikleri 6 *Salmonella* bakteriyofajın etkisini değerlendirmişlerdir. Araştırmada çelik yüzeylerinde 7. günde oluşturmuş oldukları *Salmonella* biyofilmi üzerine *Salmonella* bakteriyofajları 10^9 pfu/ml olarak bir gün boyunca uygulanmıştır. Çelik yüzeylerde en yoğun biyofilm oluşturan 10 *Salmonella* izolatı ve *S.* Typhimurium 8243 suşu seçilerek çelik yüzeye ilk 6 saatte tutunma ve oluşan yoğunluğa bakteriyofajın etkisine bakmışlar ve tutunma yoğunluğunun sonuç olarak sırasıyla 0.53 (% 71) ve 0.84 (% 86) log CFU /cm^2 olduğunu gözlemişlerdir.

Çalışmamızda ayrıca *Salmonella* biyofilm yapısını ve PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1 ve PSMc1 bakteriyofajlarının etkisini görüntülemek amacıyla Luria Bertani (LB) agar yüzeyinde de GBTT1 kodlu örneğin izolatından *Salmonella* biyofilmi yaptırılmıştır ve bu biyofilmler üzerine bakteriyofajların etkisine bakılmıştır. Fiksasyonu yapılan preparatlar SEM'de incelenmiş ve görüntüleri Şekil 4.48 'de verilmiştir.



Şekil 4.48. (A) LB agar yüzeyinde oluşan *Salmonella* biyofilmi. (B) bu biyofilm üzerine bakeriyofajların (PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1 ve PSMc1) etkisi.

GBTT2 kodlu *Salmonella* suşunun LB agar yüzeyinde çok yoğun olarak biyofilm oluşturduğu Şekil 4.48. (A)'da görülmektedir. Bu oluşan biyofilm PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1 ve PSMc1 bakteriyofajı ile muamele edildiğinde Şekil 4.48 (B)'de görüleceği gibi etkisinin gerçekleşmiş olduğu ve biyofilm yapısındaki *Salmonella* bakterilerinin yapısının bozulduğu ve hücre duvarında deliklerin oluştuğu ve bakterilerin çöktüğü gözlenmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuç olarak; bu çalışmada analize alınan gıda örnekleri olarak, 24 tavuk eti örneğinin 24'ünde, 22 kırmızı et örneğinin 22'sinde, gıda işletmesi olarak yüzeylerden alınan 37 örneğin 15'inde, su örnekleri olarak 9 örneğin 3'ünde ve klinik örnekleri olarak 25 diş örneğinin 14'ünde *Salmonella* spp. şüpheli koloniler bulunduğu tespit edilmiştir.

Salmonella spp. şüpheli koloniler olarak değerlendirilen 78 örnekten elde edilen izolatların biyokimyasal tanımlanmalarında 51 örnekten elde edilen izolatın *Salmonella* spp. olduğu gözlenmiştir. *Salmonella* spp. pozitif bulunan örneklerin hepsinin *inv*A genini hedeflemekte olan 139 ve 141 primer çiftleri kullanarak *Salmonella*'nın spp. düzeyde doğrulanması amacıyla PCR yapılmıştır ve biyokimyasal testler ile tanımlanan izolatların hepsinde pozitif sonuçlar elde edilmiştir.

Bu çalışma kapsamında 5 farklı *Salmonella* bakteriyofajı izole edilmiş ve morfolojik tanımlamaları TEM ve PFGE yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda ticari olarak Micreos Food Safety (Hollanda) firmasından temin edilen Salmonellex™ fajının da tanımlaması yapılmış ve iki farklı bakteriyofaj içerdiği tarafımızdan belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan bakteriyofajların tamamının API ile tanımlamaları yapılmış olan *Salmonella enterica*, ve PCR ile tanımlanmış *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Enteritidis üzerine lizis etkisi görülmüştür. Referans suş olarak temin edilen *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Enteritidis (ATCC 13076™) üzerine ticari Salmonellex™ bakteriyofajının etkisinin az olduğu gözlenmiştir.

Salmonella biyofilmleri üzerine faj etkisini incelemek amacıyla 96 kuyucuklu mikroplaka'da *Salmonella* biyofilmleri oluşturulmuş ve çalışmada izole edilmiş olan tüm bakteriyofajlar (PSCs1, PSDs1, PSCs2, PSSr1 ve PSMc1) ve ticari olarak temin edilen Salmonellex bakteriyofajı, seçilen 5 *Salmonella* spp.

izolatı ve referans suş olarak temin edilen ATCC®13076™ kodlu *Salmonella* spp. ile yapılan biyofilmler üzerine etkileri araştırılmış ve 5 *Salmonella* spp. izolatın biyofilmi üzerine en yüksek etkinin 10^{11} PFU/ml'lik titrede PSDs1 bakteriyofajının 24. saatte (%65.6 azalma) ile gösterdiği tespit edilmiştir. Referans suş olarak temin edilen ATCC®13076™ kodlu *Salmonella* spp.'ye yaptırılmış biyofilm üzerine en yüksek etkinin 10^{11} PFU/ml'lik titrede PSDs1 bakteriyofajının %68.4 azalma ile 24. saatte olduğu görülmüştür.

Ayrıca, klinik örnek olarak alınan safra taşı ve diş örnekleri yüzeyinde çalışılmakta olan 5 *Salmonella* spp. izolatı ve paslanmaz çelik yüzeylerinde sadece tek bir (GBTT1) örnekten izole edilmiş olan *Salmonella* spp. izolatı ve referans suş olarak temin edilen ATCC®13076™ kodlu *Salmonella* spp. ile yapılan biyofilmler üzerine 6 bakteriyofajın etkisi araştırılmıştır ve bu bakteriyofajların tüm yüzeylerde oluşturulmuş *Salmonella* biyofilmin azalmasında etkili olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak; hem gıda endüstrisinde hem de kliniklerde sorun yaratan ve birçok antibiyotiğe dirençli olduğu bilinen *Salmonella* spp.ve onların oluşturabildikleri biyofilmlerle biyolojik mücadelede *Salmonella* bakteriyofajlarının etkilerinin yüksek olduğu görülmüştür. Fakat bu çalışmada ticari *Salmonella* faj preparatı dahil diğer *Salmonella* bakteriyofajlarının tüm *Salmonella* tür ve alt türlerine etkilerinin olmadığının tespit edilmesi farklı *Salmonella* fajlarını içeren kokteyllerin çeşitlendirilerek hazırlanmasının gerekli olduğunu göstermiştir.

.

KAYNAKLAR

Abdallah, F., Lagha, R., Said, K., Kallel, H. and Gharbi, J., 2014. Detection of Cell Surface Hydrophobicity, Biofilm and Fimbirae Genes in *Salmonella* Isolated From Tunisian Clinical and Poultry Meat. Iranian Journal of Public Health, 43(4): 423–431.

Abu Sayem S. M., 2014. Biofilm Control and Antimicrobial Agents, Canada: Apple Academic Press, Inc. 376 s.

Acar, S., 2007. *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus Bulgaricus* Virülent Fajlarinin Replikasyon Parametreleri, Kapsid Protein Profilleri ve Restriksiyon Endonükleaz Analizleri Esas Alinarak Tanimlanmalari ve Sınıflandırılmaları. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. 176 s

Achtman, M., Wain, J., Weill, F.X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M.G., Hale, J.L., Harbottle, H., Uesbeck, A., Dougan, G., Harrison, L.H. and Brisse, S., 2012. Multilocus Sequence Typing As a Replacement For Serotyping in *Salmonella enterica*. PLoS Pathogens, 8 (6): 1-19

Ahmed, A.M., and Shimamoto, T., 2014. Isolation and Molecular Characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella* spp. From Meat and Dairy Products in Egypt. International journal of food microbiology, 168–(169):57–62.

Akhtar, M., Viazis, S. and Diez-Gonzalez, F., 2014. Isolation, Identification and Characterization of Lytic, Wide Host Range Bacteriophages From Waste Effluents Against *Salmonella enterica* serovars. Food Control, 38(1):.67–74.

Aksakal, A., 2003. Bazı Kanatlıların Dışkılarında *Salmonella* Türlerinin Varlığı ve Yaygınlığı ile Antibiyotiklere Duyarlılıkları. YYÜ. Vet. Fak. Derg, 14(1):.95–101.

Anejo-Okopi, J., Isa, S., Audu, O., Fagbamila, I., Iornenge, J. and Smith, I., 2016. Isolation and Polymerase Chain Reaction Detection of Virulence *inv*A Gene in *Salmonella* spp. From Poultry Farms in Jos, Nigeria. Journal of Medicine in the Tropics, 18(2): 98.

Anonymus., 2017. National Reference Laboratories Zoonoses - Department of Agriculture, Food and amp; the Marine. http://www.agriculture.gov.ie/animalhealthwelfare/laboratoryservices/nationalreferencelaboratorieszoonoses/ Erişim Tarihi: June 13, 2017.

Anonymus.,2002. ISO 6579: 2002 -Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs Horizontal Method For The Detection of *Salmonella* spp. http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=29315 Erişim Tarihi: February 19, 2015.

Anonymus 2018., Basic Structure of a Bacteriophage. https://www.brighthub.com/science/medical/articles/114022.aspx Erişim Tarihi: June 10, 2018].

Antunes, P., Mourão, J., Campos, J. and Peixe, L., 2016. Salmonellosis: The role of poultry meat. Clinical Microbiology and Infection.22: 110-121

Atterbury, R.J., Van Bergen, M. a P., Ortiz, F., Lovell, M. a., Harris, J. a., De Boer, a., Wagenaar, J. a., Allen, V.M. and Barrow, P. a., 2007. Bacteriophage Therapy to Reduce *Salmonella* Colonization of Broiler Chickens. Applied and Environmental Microbiology, (73): 4543–4549.

Augustine, J., Louis, L., Varghese, S.M., Bhat, S.G. and Kishore, A., 2013. Isolation and Partial Characterization of SP-1, a *Salmonella* Specific Lytic Phage From Intestinal Content of Broiler Chicken. Journal of Basic Microbiology, (53): 111–120.

Bao, H., Zhang, P., Zhang, H., Zhou, Y., Zhang, L. and Wang, R.,2015. Bio-control of *salmonella enteritidis* in Foods Using Bacteriophages. Viruses, 7(8): 4836–4853.

Bao, H., Zhang, H. and Wang, R., 2011. Isolation and Characterization of Bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. Poultry Science, 90(10): 2370–2377.

Bayhan, G.İ., Tanir, G., Levent, B., Özkan, Ş., Gülşen, R. ve Timur, Ö.M., 2014. *Salmonella* Enfeksiyonlarının Serotip Dağılımı, Antibiyotik Direnci ve Klinik Özellikleri. , 34(2): 137–144.

Bayındır Bilman, F., 2010. Kateter İlişkili Hastane Enfeksiyonlarında Sık Karşılaşılan Biyofilm Oluşturan Bakterilerde, Biyofilm İlişkili Antibiyotik Direncinin Araştırılması, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi. Uzmanlık Tezi, 76 s.

Bekar, M., Ayaz, Y., Akman., A., Yazıcıoğlu, N., Uyal, Y. Tekin, C., ve Ergün, A., ildeş, Z., Korkut, N., Mirolu, M., Aslan, A., 1993. Tavuk Mezbahalarının *Salmonella* Yönünden Taranması. Etlik Vet. Mikrobiy. Derg, 7(4): 1–23.

Bjarnsholt, T., Alhede, M., Alhede, M., Eickhardt-Sørensen, S.R., Moser, C., Kühl, M., Jensen, P.Ø. and Høiby, N., 2013. The in vivo Biofilm. Trends in Microbiology, 21(9): 466–474.

Biomerieux, 2002. Identification System for *Enterobacteriaceae* and Other Non-Fastidious Gram-negative rods http://biomanufacturing.org/uploads/files/587872707301898351-api20einstructions.pdf, Erişim Tarihi: 02.08.2018

Brands, D. A., 2006. *Salmonella*, Printed and Bound in The United States of America: Chelsea House Publishers. 102s.

Brooks, J.D., and Flint, S.H., 2008. Biofilms in The Food Industry: Problems and potential solutions. International Journal of Food Science and Technology, 43(12): 2163–2176.

Carli, K.T., Caner, V ve Eyigor, A., 2001. *Salmonella* Profile of Chicken Flocks in Turkey. World Poultry, Elsevier, 17(4): 32–33.

Castelijn, G. a a., 2013. *Salmonella* Biofilms. Wageningen University, Wageningen, NL, PhD thesis, 171 s.

Ceylan, N., 2009. İçme Sularında Gastrik Patojen Helicobacter pylori Tarafından Biyofilm Oluşumu. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, 3(2): 115–119.

Chen, H.M., Wang, Y., Su, L.H. and Chiu, C.H., 2013. Nontyphoid *Salmonella* infection: Microbiology, Clinical Features, and Antimicrobial Therapy. Pediatrics and Neonatology, 54(3)147–152.

Corcoran, M., 2013. *Salmonella enterica*-Biofilm Formation and Survival of Disinfection Treatment on Food Contact Surfaces . National University of Ireland Galway. PhD Thesis. 268 s.

Cramer, M., 2012. Biofilms: Impact on the Food Industry. http://www.foodsafetymagazi ne.com/magazine-archive1/junejuly-2012/biofilms-impact-on-the-food-industry/. (Erişim Tarihi: 19.10.2013)

Di Domenico, E.G., Cavallo, I., Pontone, M., Toma, L. and Ensoli, F., 2017. Biofilm producing *Salmonella typhi*: Chronic Colonization and Development of Gallbladder Cancer. International Journal of Molecular Sciences. 18: 1-14.

Duc, H.M., Son, H.M., Honjoh, K. and Miyamoto, T., 2018. Isolation and Application of Bacteriophages to Reduce *Salmonella* Contamination in Raw Chicken Meat. LWT - Food Science and Technology, 91,January: 353–360.

Eng, S.K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N.S., Ser, H.L., Chan, K.G. and Lee, L.H.,2015. *Salmonella*: A Review on Pathogenesis, Epidemiology and Antibiotic Resistance. Frontiers in Life Science, 8(3): 284–293.

Ergün A, Erturun H, Yiğit A, ve Akalın N, M.F., 1997. Ege Bölgesi Kanatlı Mezbahalarının Bazı Patojen Bakteriler Yönünden Kontrolü. Bornova Vet. Kontr. Araşt. Enst.Md. Derg., 22(36): 31–54.

Esfa., 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. The EFSA Journal, 9(3): 2090.

Flynn, G.O., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Coffey, A., 2004. Evaluation of a Cocktail of Three Bacteriophages for Biocontrol of *Escherichia coli* O157 : H7 Evaluation of a Cocktail of Three Bacteriophages for Biocontrol of Escherichia coli O157 : H7. Appl. Environ. Microbiol., 70(6): 3417–3424.

Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Skandamis, P. and Nychas, G., 2012. Attachment and Biofilm Formation by *Salmonella* in Food Processing Environments. *Salmonella* - A Dangerous Foodborne Pathogen, 157–180.

Gök, F., 2005. Piyasadan Sağlanan Tahin Helvalarının Mikrobiyolojik Kalitesinin Belirlenmesi ve *Salmonella* spp. İzolasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. 77s.

Gong, C., and Jiang, X., 2017. Application of Bacteriophages to Reduce *Salmonella* Attachment and Biofilms on Hard Surfaces. Poultry Science, 96(6): 1838–1848.

Gonzalez-Escobedo, G., and Gunn, J.S., 2013. Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Genes Regulated During Biofilm Formation on Cholesterol Gallstone Surfaces. Infection and Immunity, 81(10): 3770–3780.

Goode, D., Allen, V.M. and Barrow, P. A., 2003. Reduction of Experimental. Society, 69(8)5032–5036.

Guerra, B., Soto, S., Cal, S. and Mendoza, M.C., 2000. Antimicrobial Resistance and Spread of Class 1 Integrons Among *Salmonella* Serotypes. Antimicrob Agents Chemother, 44(8): 2166–2169.

Gün, İ., ve Ekinci, F.Y., 2009. Biyofilmler :Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam Biofilms : Microbial Life on Surfaces. (34): 165–173.

Heinitz, M.L., and Johnson, J.M., 2016. The Incidence of *Listeria* spp., *Salmonella* spp., and *Clostridium botulinum* in Smoked Fish and Shellfish, Journal of Food Protection, 61(3): 318–323.

Heringa, S.D., Kim, J.K., Jiang, X., Doyle, M.P. and Erickson, M.C., 2010. Use of a Mixture of Bacteriophages For Biological Control of *Salmonella enterica* Strains in Compose. Applied and Environmental Microbiology, 76(15): 5327–5332.

Higgins, J. P., Higgins, S. E., Guenther, K. L., Huff, W., Donoghue, A. M., Donoghue, D. J., and Hargis, B.M., 2005. Use of a Specific Bacteriophage Treatment to Reduce *Salmonella* in Poultry Products. Poultry Science, 84: 1141–1145.

Higgins, J.P., Higgins, S.E., Guenther, K.L., Huff, W., Donoghue, D.J. and Hargis, B.M., 2018. Use of a Specific Bacteriophage Treatment to Reduce, Poultry Science, 84: 1141–1145.

Hood, S.K., and Zottola, E.A., 1995. Biofilms in Food Processing. Food Control, 6(1): 9–18.

Hosseinidoust, Z., Tufenkji, N. and van de Ven, T.G.M., 2013. Formation of Biofilms Under Phage Predation: Considerations Concerning a Biofilm Increase. Biofouling, 29(4): 457–468.

Huang, C., Shi, J., Ma, W., Li, Z., Wang, J., Li, J. and Wang, X., 2018. Isolation, Characterization, and Application of a Novel Specific *Salmonella* Bacteriophage in Different Food Matrices. Food Research International, 111,May, 631–641.

Hungaro, H.M., Mendonça, R.C.S., Gouvêa, D.M., Vanetti, M.C.D. and Pinto, C.L. de O., 2013. Use of Bacteriophages to Reduce *Salmonella* in Chicken Skin in Comparison With Chemical Agents. Food Research International, 52(1): 75–81.

Isoken, H., 2015. Biofilm formation of *Salmonella* Species Isolated From Fresh Cabbage and Spinach, Journal of Applied Sciences and Environmental Management, 19(1): 45-50.

Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., De Pinna, E., Nair, S., Fields, P.I. and Weill, F.X., 2014. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor Scheme. Research in Microbiology, 165(7): 526–530.

Janssens, J.C. a, Steenackers, H., Robijns, S., Gellens, E., Levin, J., Zhao, H., Hermans, K., De Coster, D., Verhoeven, T.L., Marchal, K., Vanderleyden, J., De Vos, D.E. and De Keersmaecker, S.C.J., 2008. Brominated Furanones Inhibit Biofilm Formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Applied and Environmental Microbiology, 74(21): 6639–48.

Jonas, K., Tomenius, H., Kader, A., Normark, S., Römling, U., Belova, L.M. and Melefors, O.,2007. Roles of Curli, Cellulose and BapA in *Salmonella* Biofilm Morphology Studied by Atomic Force Microscopy. BMC microbiology, 7, s.70.

Joseph, B., Otta, S.K. and Karunasagar, I., 2001. Biofilm Formation by *Salmonella* spp. on Food Contact Surfaces and Their Sensitivity to Sanitizers. International Journal of Food Microbiology, 64(3): 367–72.

Kaushik, P., Anjay, Kumari, S., Bharti, S.K. and Dayal, S., 2014. Isolation and Prevalence of *salmonella* From Chicken Meat and Cattle Milk Collected From Local Markets of Patna, India. Veterinary World, 7(2): 62–65.

Kiros, A., 2016. Phage Therapy ; A Review on the Biology and Therapeutic Application of Bacteriophage, ARC Journal of Animal and Veterinary Sciences (AJAVS), 2(4): 15–25.

Klug, B., Rodler, C., Koller, M., Wimmer, G., Kessler, H.H., Grube, M. and Santigli, E., 2011. Oral Biofilm Analysis of Palatal Expanders by Fluorescence In-Situ Hybridization and Confocal Laser Scanning Microscopy. Journal of Visualized Experiments, 56: 1–9.

Knezevic, P., and Petrovic, O., 2008. A Colorimetric Microtiter Plate Method for Assessment of Phage Effect on Pseudomonas Aeruginosa Biofilm. Journal of Microbiological Methods, 74(2–3): 114–118.

Kocharunchitt, C., Ross, T. and McNeil, D.L., 2009. Use of Bacteriophages as Biocontrol Agents to Control *Salmonella* Associated With Seed Sprouts. International Journal of Food Microbiology, 128(3): 453–459.

Koluman, A., and Özdemir, H., 2017. Biyofilm ve Gıda Hijyeni Yönünden Önemi - Dünya Gıda. Available at: http://flip.dunyagida.com.tr/haber/biyofilm-ve-gida-hijyeni-yonunden-onemi/4335 Erişim Tarihi: 2017.

Kumar, T., Rajora, V.S., Arora, N., Prakash, A. and K, S.S., 2017. Isolation and Characterization of *Salmonella* Bacteriophages from Poulty and Pig Sewage Wastes Isolation and Characterization of *Salmonella* Bacteriophages from Poulty and Pig Sewage Wastes. Indian Journal of Animal Sciences. 562-567.

Kurtböke, I., 2012. Bacterıophages, Intech Books and Journals, Croatia. 256 s

Núñez, C., Reffuveille, F., Haney, E.F., Straus, S.K. and Hancock, R.E.W., 2014. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. PLoS pathogens, 10(5): e1004152.

Lacroix, C., 2011. Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation, Woodhead Publishing limited, Cambridge, 256 s.

Lertworapreecha, M., Sutthimusik, S. and Tontikapong, K., 2013. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* isolated from pork, chicken, and vegetables in southern Thailand. Jundishapur Journal of Microbiology, 6(1): 36–41.

Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A. and Hoekstra, R.M., 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 50: 882–889.

Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C., Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C. and Helmuth, R.,2003. Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR : towards an International Standard Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR : towards an International Standard. , 69(1): 290–296.

Mcbride, G.B., Skura, B.J., Yadal, I.R.Y. and Bowmer, E.J., 1980. Chilled Chickens in a Poultry Processing Plant. , 43(7): 538–542.

McLaughlin, M.R., Balaa, M.F., Sims, J. and King, R., 2006. Isolation of *salmonella* bacteriophages from swine effluent lagoons. Journal of environmental quality, 35: 522–528.

Merk., 2000. Microbiology Manual 12th Editi., https://www.analytics shop.com/media/Hersteller/Kataloge/merck-de/Merck_Microbiology_Manual_12th_edition.pdf. Erişim Tarihi: 02.05.2018

Nalbantsoy, A.,2008. *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Pullorum O ve H Antijenlerine Karşı Mono Klonal Antikor Üretimi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Ege Üniversitesi, .342 s.

Nouraldin, A.A.M., Baddour, M.M., Harfoush, R.A.H. and Essa, S.A.M., 2016, Bacteriophage-antibiotic synergism to control planktonic and biofilm producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Alexandria Journal of Medicine, 52(2): 99–105.

Oliveira, S.., Santos, L.., Schuch, D.M.., Silva, A.., Salle, C.T., and Canal, C., 2002. Detection and identification of *salmonellas* from poultry-related samples by PCR. Veterinary Microbiology, 87(1): 25–35.

Piknová, L., Štefanovičová, A., Drahovská, H., Sásik, M. and Kuchta, T., 2002. Detection of *Salmonella* in food, equivalent to ISO 6579, by a three-days polymerase chain reaction-based method. Food Control, 13(3): 191–194.

Prouty, A.M., Schwesinger, W.H. and Gunn, J.S., 2002. Biofilm Formation and Interaction with the Surfaces of Gallstones by *Salmonella* spp., ASM Journal.70 (5): 2640-2649.

Qin, H., Cao, H., Zhao, Y., Zhu, C., Cheng, T., Wang, Q., Peng, X., Cheng, M., Wang, J., Jin, G., Jiang, Y., Zhang, X., Liu, X., and Chu, P.K., 2014. In vitro and in vivo anti-biofilm effects of silver nanoparticles immobilized on titanium. Biomaterials, 1–12.

Rodrigues, L.B., dos Santos, L.R., Tagliari, V.Z., Rizzo, N.N., Trenhago, G., de Oliveira, A.P., Goetz, F. and do Nascimento, V.P., 2010. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. Brazilian Journal of Microbiology, 41(4): 1082–1085.

Schatten, H., and Eisenstark, A., 2007. *Salmonella:* Methods and Protocols., Department of Veterinary Pathobiology, University of Missouri-Columbia, Humana Press, USA. 501 s.

Sillankorva, S., and Azeredo, J., 2013. The Use of Bacteriophages and Bacteriophage-derived Enzymes for Clinically Relevant Biofilm Control., September, 305-325 .

Simões, M., Simões, L.C. and Vieira, M.J., 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. LWT - Food Science and Technology, 43(4): 573–583.

Somily, A.M., Sayyed, S.B., Habibl, H.A., Al-Khattaf, A.S., Al-Otabi, F.E., Shakoor, Z. and Kambal, A.M., 2012. *Salmonella* isolates' serotypes and susceptibility to commonly used drugs at a tertiary care hospital in Riyadh, Saudi Arabia. Journal of Infection in Developing Countries, 6: 478–482.

Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S.C.J., 2012. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. Food Research International, 45(2): 502–531.

Stepanović, S., Cirković, I., Ranin, L. and Svabić-Vlahović, M., 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Letters in applied microbiology, 38(5): 428–32.

Tammakritsada, M., and Todhanakasem, T., 2012. Isolation of *Salmonella* from Natural Sources Representing High Potential for Biofilm Formations. , 15(4): 225–232.

Tarabees, R., Elsayed, M.S.A., Shawish, R., Basiouni, S. and Shehata, A.A.,2017. Isolation and characterization of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from chicken meat in Egypt. The Journal of Infection in Developing Countries, 11,04: 314.

Trachoo, N., 2003, Biofilms and The Food Industry, Songklanakarin J. Sci. Technol, 25(6): 807–815.

Tunail, N., 2009. Mikrobiyoloji, Pelin Ofset, Ankara, Türkiye, 448 s.

Uchida, N.S., Grespan, R., Piovezan, M., Ferreira, E.C., Júnior, M.M., Kenji, R., Cuman, N. and G, J.M., 2014. Effect of Carvacrol on *Salmonella* Saintpaul Biofilms on Stainless Steel Surface. , 13,December, 2021–2025.

Karapınar, M., ve Aktuğ Gönül, Ş., 1998. Gıda Kaynaklı Mikrobiyal Hastalıklar, (Ünlütürk, A., ve Turantaş, F., editörler) Gıda Mikrobiyolojisi, Ege Üniversitesi, Mengi Tan Basımevi, İzmir, 605s.

Uyanık, M.H., ve Yazgı, H., 2009, Kan ve Dışkı Örneklerinden İzole Edilen *Salmonella* Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere Duyarlılıkları. Tütk Mikrobiyol Cem Derg, 39(1–2): 27–30.

Var, I., ve Evliya, B., 1995. Çeşitli Yumurtalarda *Salmonella* Taraması. Gıda dergisi, 20(6): 387–391.

Var, I., ve Sağlam, S., 2017 Biofilm Structure of Foodborne Pathogens. (Mendez-vilas, A., editor). Antimicrobial Research: Novel bioknowledge and Educational programs,s. 301–307.

Veldman, A. and Vahl, H.A. and Borgerev, G.S. and Fuller, D.C.,1995. A survey of the incidence of *Salmonella* species and Enterobacteriaceae in poultry feeds and feed components. *Vet Rec*, 136: 169–172.

Vestby, L.K., Møretrø, T., Langsrud, S., Heir, E. and Nesse, L.L.,2009. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. BMC Veterinary Research, 5: 1–6.

Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R. and Kolter, R., 2013. Sticking together: Building a biofilm the Bacillus subtilis way. Nature Reviews Microbiology, 11(3): 157–168.

Wang, Y., Yang, B., Wu, Y., Zhang, Z., Meng, X., Xi, M., Wang, X., Xia, X., Shi, X., Wang, D. and Meng, J., 2015. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on retail raw poultry in six provinces and two National cities in China. Food microbiology, 46: 74–80.

Wong, C.L., Sieo, C.C., Tan, W.S., Abdullah, N., Hair-Bejo, M., Abu, J. and Ho, Y.W.,2014. Evaluation of a lytic bacteriophage, Φ st1, for biocontrol of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens. International Journal of Food Microbiology, 172: 92–101.

Wong, H.S., Townsend, K.M., Fenwick, S.G., Trengove, R.D. and O'Handley, R.M., 2010. Comparative susceptibility of planktonic and 3-day-old *Salmonella* Typhimurium biofilms to disinfectants. Journal of applied microbiology, 108(6): 2222–8.

Wong, H.S., Townsend, K.M., Fenwick, S.G., Maker, G., Trengove, R.D. and O'Handley, R.M., 2010. Comparative susceptibility of *Salmonella* Typhimurium biofilms of different ages to disinfectants. Biofouling, 26(7): 859–64.

Xu, Y., Liu, Y., Liu, Y., Pei, J., Yao, S. and Cheng, C.,2015. Bacteriophage therapy against Enterobacteriaceae. Virologica Sinica, 30,November 2014: 11–18.

Yele, A.B., Thawal, N.D., Sahu, P.K. and Chopade, B. a.,2012. Novel lytic bacteriophage AB7-IBB1 of Acinetobacter baumannii: Isolation, characterization and its effect on biofilm. Archives of Virology, 157(8): 1441–1450.

Yılmaz, M., ve Çelik, G.Y.,2007. Bakteriyel Ekstraselüler Polisakkaritler. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 5(2): 7–13.

ÖZGEÇMİŞ

01/12/1986 yılında Malekan/ İRAN'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Malekan şehrinde tamamladım. 2006 yılında başladığım Bonab Üniversitesi, Hücre ve Moleküler Biyoloji Bölümünden (Mikrobiyoloji Bilim Dalı)'nden 2010 yılında mezun oldum. 2011 yılında Erzurum Atatürk Üniversitesinde Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Anabilim dalında yüksek lisansa başlayıp 2013 yılında tamamladım ve aynı yıl Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilimdalı'nda Doktoraya başladım. 2015 yılında Sanpey Gıda Maddeleri SAN ve TİC. kurumunda Mikrobiyoloji ve Gıda Analizi laboratuvarında mikrobiyoloji ve hijyenden sorumlu uzman olarak görev alıp yaklaşık 1.5 yıl çalıştım.

EKLER

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Sayısı		Tarih
57		7 Ekim 2016

KARAR NO 23- Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nın, Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'nın bilimsel işbirliğiyle, Doç. Dr. Işıl Var yönetiminde, Behzat Heshmati tarafından yürütülmesi öngörülen, "Bakteriyofajların Bazı Gıda İşletmeleri ve Klinik Örneklerden İzole Edilen Salmonella spp. ve Salmonella Biyofilmi Üzerine Etkisi" başlıklı doktora tez projesi araştırma etiği yönünden değerlendirildi. Toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

BAŞKAN	**Doç Dr Selim Kadıoğlu** Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	
ÜYELER	**Prof Dr Davut Alptekin** Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
	Prof Dr Dinçer Yıldızdaş Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Prof Dr Mehmet Kanadaşı Kardiyoloji Anabilim Dalı	
	Prof Dr Gülşah Seydaoğlu Biyoistatistik Anabilim Dalı	
	Prof Dr Gürhan Sakman Genel Cerrahi Anabilim Dalı	
	Doç Dr Suat Gezer Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Av. Zehra Bulut Hukukçu Üye	Toplantıya Katılmadı
	Dr Neşe Kayrın Kurum Dışı Üye	

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası, Balcalı 01330 Adana
Telefon: 0322 338 60 60 dahili 3465, Faks: 0322 338 67 22

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Karar Belgesi