ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Bakteriyofajların Bazı Gıdalardan ve Gıda İşletmelerinden İzole Edilen *Listeria* spp. ve Onların Oluşturduğu *Listeria* Biyofilmi Üzerine Etkisi

Selin SAĞLAM

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Ağustos, 2024

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZ ONAYI

Bakteriyofajların Bazı Gıdalardan ve Gıda İşletmelerinden İzole Edilen *Listeria* spp. ve Onların Oluşturduğu *Listeria* Biyofilmi Üzerine Etkisi

Selin SAĞLAM

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Bu ~~Yüksek Lisans~~ / Doktora Tezi 21/08/2024 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği / ~~Oy Çokluğu~~ ile Kabul Edilmiştir.

Jüri	: Prof. Dr. Işıl VAR	(Danışman)	……
	: Prof. Dr. Figen KOREL		……
	: Prof. Dr. Burhan ARIKAN		……
	: Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU		……
	: Doç. Dr. Sinan UZUNLU		……

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Ç. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2017-8958

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.

İÇİNDEKİLER

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
ÇİZELGELER DİZİNİ IV
ŞEKİLLER DİZİNİ VI
SİMGELER VE KISALTMALAR X
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 7
2.1. *Listeria monocytogenes* ve *Listeria* spp. 7
2.2. Biyofilmler 10
2.3. Bakteriyofajlar 12
2.4. Çeşitli Gıda Örneklerinden *Listeria* spp. İzolasyonu Üzerine Yapılan Çalışmalar 14
2.5. Çeşitli Gıda ve Çevre Örneklerinden İzole Edilen *Listeria* spp.'lerin Biyofilm Oluşturma Yetenekleri ile İlgili Yapılan Çalışmalar 15
2.6. *Listeria* Fajları İle İlgili Yapılan Çalışmalar 18
3. MATERYAL VE METOT 23
3.1. Materyal 23
3.1.1. Besiyerleri 25
3.1.2. Çözelti ve Solusyonlar 26
3.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yönteminde Kullanılacak Materyal ve Cihazlar 27
3.1.4. Çalışmada Kullanılan *Listeria* spp türleri 30
3.1.5. Çalışmada Kullanılan Bakteriyofajlar 31
3.2. Yöntem 32
3.2.1. *Listeria*'nın Klasik Yöntem ile İzolasyonu ve Tanımlanması 32
3.2.2. İzole edilen *Listeria*' ların Tanımlaması 32
3.3. Listex™ P100 Bakteriyofajının *Listeria* spp. Üzerine Antimikrobiyal Etkisi 35
3.3.1. Listex™ P100 Bakteriyofajının *Listeria* Vejetatif Hücreleri Üzerine Antimikrobiyal Etkisi 35
3.3.2. Listex™ P100 Bakteriyofajının Mikroplakada Geliştirilen *Listeria* spp. Biyofilmleri Üzerine Etkisi 37
3.3.3. Listex™ P100 Bakteriyofajının 37 Derecede Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz) Oluşturulan *Listeria* spp. Biyofilmlerine Etkisi 38

3.3.4. Listex™ P100 Bakteriyofajının Oda Sıcaklığında Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz) Oluşturulan *Listeria* spp. Biyofilmlerine Etkisi 41
3.4. FMWLLM3 Bakteriyofajının *Listeria* spp. Üzerine Antimikrobiyal Etkisi 42
3.4.1. FMWLLM3 Bakteriyofajının *Listeria* Vejetatif Hücreleri Üzerine Antimikrobiyal Etkisi 42
3.4.2. FMWLLM3 Bakteriyofajının Mikroplakada Geliştirilen *Listeria* spp. Biyofilmleri Üzerine Etkisi 43
3.4.3. FMWLLM3 Bakteriyofajının 37 Derecede Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz yüzeyler) Oluşturulan *Listeria* spp. Biyofilmlerine Etkisi 44
3.4.4. FMWLLM3 Bakteriyofajının Oda Sıcaklığında Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz) Oluşturulan *Listeria spp.* Biyofilmlere Etkisi 45
3.5. *Listeria* Bakteriyofaj İzolasyonu ve Tanımlanması 45
3.5.1. Örneklerden *Listeria* spp. Bakteriyofaj İzolasyonu 45
3.5.2. *Listeria* spp. Faj İzolasyonunda Çeşitli Metot Çalışmaları 45
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 53
4.1. *Listeria*'nın Klasik Yöntem ile İzolasyonu 53
4.1.1. Şüpheli *Listeria* İzolatlarının Morfolojik Tanımlama Sonuçları 53
4.1.2. Şüpheli *Listeria* spp.'lerin Biyokimyasal Olarak Tür Bazında Tanımlanmaları 55
4.1.3. *Listeria* spp.'lerin Tür Bazında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Tanımlanması 57
4.2. Listex™ P100 Bakteriyofajının *Listeria* spp. Üzerine Antimikrobiyal Etkisi 59
4.2.1. Listex™ P100 Bakteriyofajının *Listeria* Vejetatif Hücreleri Üzerine Antimikrobiyal Etkisi 59
4.2.2. Listex™ P100 Bakteriyofajının Mikroplakada Geliştirilen *Listeria* spp. Biyofilmleri Üzerine Etkisi 63
4.2.3. Listex™ P100 Bakteriyofajının 37 Derecede Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz) Oluşturulan *Listeria* spp. Biyofilmleri Üzerine Etkisi 67
4.2.4. Listex™ P100 Bakteriyofajının Oda Sıcaklığında Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz) Oluşturulan *Listeria* spp. Biyofilmleri Üzerine Etkisi 77
4.3. FMWLLM3 Bakteriyofajının Listeria spp. Üzerine Antimikrobiyal Etkisi 78
4.3.1. FMWLLM3 Bakteriyofajının *Listeria* Vejetatif Hücreleri Üzerine Antimikrobiyal Etkisi 78

4.3.2. FMWLLM3 Bakteriyofajının Mikroplakada Geliştirilen *Listeria* spp. Biyofilmleri Üzerine Etkisi 80
4.3.3. FMWLLM3 Bakteriyofajının 37 Derecede Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz yüzeyler) Oluşturulan *Listeria* spp. Biyofilmleri Üzerine Etkisi 81
4.3.4. FMWLLM3 Bakteriyofajının Oda Sıcaklığında Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz) Oluşturulan *Listeria spp.* Biyofilmleri Üzerine Etkisi 89
4.4. *Listeria* Bakteriyofaj İzolasyonu ve Tanımlanması 89
4.4.1. Farklı Metotlarla *Listeria* Bakteriyofaj İzolasyonu 89
4.4.2. Seçilen Bakteriyofaj İzolasyon Metodu İçin Validasyon Çalışması 102
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 105
KAYNAKLAR 107
ÖZGEÇMİŞ 121
EKLER 123
Ek. 1. Agaroz Jel Elektroforezde Kullanılan Tampon Çözeltiler 125

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Bakteriyofajların Bazı Gıdalardan ve Gıda İşletmelerinden İzole Edilen *Listeria* spp. ve Onların Oluşturduğu *Listeria* Biyofilmi Üzerine Etkisi

Selin SAĞLAM

Danışman: Prof. Dr. Işıl VAR

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

ÖZ

Listeria ve *Listeria* biyofilmi dünya genelinde öncelikle gıda sektörü ve halk sağlığı açısından önemli gıda kaynaklı hastalıklara neden olmaktadır. Son dönemlerde, patojenlere ve onların biyofilm yapılarına karşı kullanılan antibiyotikler ve dezenfektanlar yetersiz kalmaktadır. Bu durum bakteriyofaj terapisi gibi yeni mücadele yöntemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır.

Bu çalışmada bakteriyofajların *Listeria* spp. ve onların oluşturduğu biyofilmler üzerine etkisini araştırmak için toplam 154 adet örnekte tarama çalışması yapılmıştır. Toplam 38 izolat *Listeria* spp. olarak doğrulanmıştır. İzolasyonu yapılan *Listeria* spp.'lerden 5'i bu çalışmada kullanılmıştır, ayrıca 4 farklı referans suş ile de çalışılmıştır. Bakteriyofaj olarak Listex^{TM} P100 fajı ve Canterbury Üniversitesi'nden temin edilen FMWLLM3 bakteriyofajı kullanılmıştır.

Alınan örneklerden izole edilen *Listeria*'lar ile mikroplakada ve gıda ile temas eden yüzeylerde (çelik, galvaniz, plastik) biyofilm oluşturulmuştur. Listex^{TM} P100 bakteriyofajının (10^6 pob/ml konsantrasyonda) çeşitli yüzeylerde 37°C'de 9 günlük inkübasyonu sonrasında en fazla azalmanın yerel izolat *L. monocytogenes* üzerine 3,96 log iken 25°C'de 9 günlük inkübasyon sonrasında en fazla azalma *L. monocytogenes* ATCC #13932 üzerine 3,56 log ile olduğu belirlenmiştir. FMWLLM3 bakteriyofajının (10^6 pob/ml konsantrasyonda) 37°C'de 9 günlük inkübasyonu sonrasında en fazla azalmayı 4,7 log *L. monocytogenes* Lm 2000/47 üzerine olduğu görülmüştür. FMWLLM3 bakteriyofajının (10^6 pob/ml konsantrasyonda) 25°C'de 9 günlük inkübasyon sonrasında sonunda en fazla azalmanın *L. monocytogenes* Lm 2000/47 üzerine 2,88 log olduğu belirlenmiştir. Bunu 2,50 log azalma ile *L. monocytogenes* takip etmiştir.

SEM mikroskobu ile yapılan incelemelerde denemeye alınan tüm yüzeylerde (paslanmaz çelik, plastik ve galvaniz) *Listeria* spp.'ler biyofilm oluşturmuş ve bu biyofilmler üzerine her iki fajın (10^6 pob/ml konsantrasyonunun etkisi gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada ayrıca 5 farklı örnekte (Balık parçaları, nehir suyu, gübre, saman ve silaj) *Listeria* bakteriyofajları izole edilmiştir. Fakat faj çoğaltma işlemleri sonucunda başarılı sonuç alınamamıştır. Bu sonuç, bir çok Gram pozitif bakterilerde gözlenen bir durum olan bakterinin L forma geçerek faj entegrasyonundan kaçmış ve kendini koruma altına almış olabileceğini düşündürtmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Listeria*, bakteriyofaj, biyofilm, gıda güvenliği

CUKUROVA UNIVERSITY

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

PhD THESIS

Effects of Bacteriophages on *Listeria* spp. and *Listeria* Biofilm Isolated From Some Foods and Food Processing Facilities and on the Biofilm Formed by *Listeria*

Selin SAĞLAM

Advisor: Prof. Dr. Işıl VAR

Department of Food Engineering

ABSTRACT

Listeria and *Listeria* biofilm cause foodborne dieases worldwide, primarily in the food industry and public health. In recent years, antibiotics and disinfectants couldn't effective against pathogens and their biofilm structures any more. For this reason, new combat methods such as bacteriophage therapy are being introduced.

In this study, a total of 154 samples were screened to investigate the effect of bacteriophages on *Listeria* spp. and the biofilms they formed. A total of 38 isolates were confirmed as *Listeria* spp. In this study, 5 of the isolated *Listeria* spp. and 4 different *Listeria* reference strains were used. Listex™ P100™ phage, and also FMWLLM3 bacteriophage obtained from the University of Canterbury were used as bacteriophages. Biofilms were formed on microplates and food contact surfaces (steel, galvanized, plastic) with *Listeria* isolated from the samples. After 9 days of incubation of Listex™ P100 bacteriophage (10^6 pob/ml concentration) on various surfaces at 37°C, the highest reduction was determined to be 3,96 log on the local isolate *L. monocytogenes*, while the highest reduction after 9 days of incubation at 25°C was 3,56 log on *L. monocytogenes* ATCC #13932. After 9 days of incubation at 37°C, the highest reduction of FMWLLM3 bacteriophage (10^6 pob/ml concentration) was 4,7 log on *L. monocytogenes* Lm 2000/47. After 9 days of incubation at 25°C, the highest reduction of FMWLLM3 bacteriophage (10^6 pob/ml concentration) was determined to be 2,88 log on *L. monocytogenes* Lm 2000/47. This was followed by *L. monocytogenes* isolate with a 2,50 log decrease.

In examinations conducted with SEM microscopy, biofilm formation by *Listeria* spp. was observed on all tested surfaces (stainless steel, plastic, and galvanized), and the effect of both phages (at a concentration of 10^6 PFU/ml) on these biofilms was observed.

In this study, *Listeria* bacteriophages were also isolated in 5 different samples (fish body parts, river water, manure, straw and silage). However, successful results were not obtained as a result of phage multiplication processes. This result suggested that the bacteria may have escaped phage integration and protected itself by switching to L form, a situation observed in many gram-positive bacteria.

Keywords: *Listeria*, bacteriophage, biofilm, food safety

TEŞEKKÜR

Lisans dönemimden doktora sürecimin tamamlanmasına kadar tüm akademik sürecim boyunca, her adımda engin bilgi ve deneyimiyle bana yol gösteren, bu zorlu yolculukta en büyük desteğim ve ilham kaynağım olan, saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Işıl VAR'a, içten teşekkürlerimi sunarım. Göz ardı edilemeyecek katkıları ve bana sağladığı manevi destek sayesinde bu tezin tamamlanması mümkün olmuştur. Size olan minnettarlığımı ifade ederken, vizyonunuzun ve ileri görüşlülüğünüzün bu akademik yolculuğu daha anlamlı ve yönlendirici hale getirdiğini vurgulamak isterim. Sizden aldığım değerli rehberlik, bilgi ve destek, akademik yolculuğumun en büyük kazancıdır.

Çalışmam sırasında verdiği bilgi ve öneriler ile her zaman yardımcı olan değerli hocam ve abim Doç. Dr. Muharrem KAMBEROĞLU'na ve tezimi değerlendirip yorumları ile çalışmamıza katkı sağlayan değerli hocalarım ve jüri üyelerim Prof. Dr. Burhan ARIKAN, Prof. Dr. Figen KOREL ve Doç. Dr. Sinan UZUNLU'ya çok teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarımda beni destekleyen ve her zaman kapılarını açan değerli hocalarım Prof. Dr. Sait Polat ve Prof. Dr. Ebru Kafkas'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu değerli ana ulaşmama kadar geçen her sürede özellikle akademik hayatım ve bilhassa doktora eğitimim süresince maddi ve manevi desteklerini koşulsuz sunan ve hayat boyu bana her daim güvenen, her zaman yanımda olan çok değerli babam Hasan Basri SAĞLAM, annem Ayla SAĞLAM ve kardeşlerim Havva Nur SAĞLAM ile Ahmet Semih SAĞLAM'a sonsuz minnettarlarımı sunuyorum.

Çalışmalarım süresince yoğun tempolu iş hayatımı hafifleterek ve bu yolda beni her daim destekleyerek bu meşakatli süreci tamamlamam için yardımlarını ve desteklerini her zaman hissettiğim çok değerli yöneticim Umut AKİ ile Döhler'deki tüm diğer çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Uzunca bir süre erişmeye çalıştığım ancak en sonunda kendisinden destek alarak temin ettiğim faj ile devam ettiğim bu çalışmada Dr. Craig BILLINGTON'a minnettarım. Bu çalışmanın en önemli adımlarından birisini de onun katkıları ile tamamladım.

Çalışma süresince her zaman beni dinleyen, analiz eden ve beni bu yolda istikrarlılık konusunda teşvik eden, manevi desteklerini her zaman hissettiğim değerli arkadaşlarım Araştırma Görevlisi Selin TÜNK, Dr. Çağrı ÇELİK, Dr. Ali TEKİN, Dr. Behzad HESHMATİ ve stajyer öğrencimiz Salim Sezer ARSLAN'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamızı maddi olarak destekleyen Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: FDK-2017-8958) teşekkür ederim.

Bu metinde saydığım her bir isim benim için çok değerli, iyi ki hem bu süreçte hem de hayatımda var oldunuz, var olmaya devam etmeniz temennilerimle, tekrar teşekkür ederim.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bazı *Listeria* türlerinin tanımlanma kriterleri 8
Çizelge 3.1. *Listeria* spp. izolasyonu amacıyla alınan örneklerin lokasyon, örnek sayısı ve örnek alınan dönem bilgileri 23
Çizelge 3.2. *Listeria* spp. ve bakteriyofaj izolasyonu amacıyla alınan örneklerin lokasyon, örnek sayısı ve örnek alınan dönem bilgileri 24
Çizelge 3.3. Çalışmada Kullanılan Primer Çiftleri ve Sentezlenen Bölgenin Moleküler Büyüklüğü 29
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan *Listeria* spp. türleri 31
Çizelge 3.5. Kullanılan bakteriyofajlar, hedef mikroorganizmalar, tedarik yılı ve bakteriyofajın izole edildiği kaynak 31
Çizelge 3.6. PCR döngüsünde *Listeria* spp. için uygun sıcalıklar 35
Çizelge 3.7. Bakteriyofaj izolasyonunda kullanılan referans çalışma, ve fajın izole edildiği kaynağı 45
Çizelge 3.8. Bakteriyofaj izolasyonunda uygulanan metotlar ve kullanılan besiyerileri 46
Çizelge 3.9. *Listeria* Fajlarının Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile Tanımlanması .. 51
Çizelge 4.1. Gıdalardan ve işletmelerden izole edilen şüpheli *Listeria* spp.'lere uygulanan Gram boyama işlemi sonuçları 54
Çizelge 4.2. Şüpheli *Listeria* izolatlarına uygulanmış bazı biyokimyasal tanımlama testleri ve sonuçları 56
Çizelge 4.3. *Listeria* spp.'lerin Tür Bazında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Tanımlanması 58
Çizelge 4.4. Listex^{TM} P100 bakteriyofajının referans *Listeria* spp. ler üzerine lizis etkisi. 62
Çizelge 4.5. Listex^{TM} P100 bakteriyofajının *Listeria* spp. izolatları üzerine lizis etkisi. 63
Çizelge 4.6. Listex^{TM} P100 Bakteriyofajının 10^8 pob/ml konsantrasyonda *Listeria* spp. biyofilmleri üzerine 24 saatteki % azalma oranları 64
Çizelge 4.7. Listex^{TM} P100 Bakteriyofajının 10^6 pob/ml konsantrasyonda *Listeria* spp. biyofilmleri üzerine 24 saatteki % azalma oranları 64
Çizelge 4.8. Listex^{TM} P100 Bakteriyofajının 10^4 pob/ml konsantrasyonda *Listeria* spp. biyofilmleri üzerine 24 saatteki % azalma oranları 65
Çizelge 4.9. Listex^{TM} P100 Bakteriyofajının 10^4 , 10^6 ve 10^8 pob/ml konsantrasyonda *Listeria* spp. biyofilmleri üzerine 24 saatteki % azalma oranları 66
Çizelge 4.10. SEM Görüntüleri Değerlendirmesi (*Listeria* spp. Biyofilmleri ve Bu Biyofilmlere Listex^{TM} P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24.saatte Etkisi) 76
Çizelge 4.11. FMWLLM3 Bakteriyofajının *Listeria* spp. biyofilmleri üzerine 24. saatteki % azalma oranları 80

Çizelge 4.12. SEM Görüntüleri Değerlendirmesi (*Listeria* spp. Biyofilmleri ve Bu Biyofilmlere FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24.saatte Etkisi) 88
Çizelge 4.13. Bakteriyofaj izolasyonunda Metot 1 ve Metot 2 ile çalışılan lokasyon, örnek sayısı, örnek alınan dönem bilgileri ve örnek numaraları 91
Çizelge 4.14. İzole edilen 5 bakteriyofajın *Listeria* spp.'ler üzerine duyarlılık testleri 95
Çizelge 4.15. Bakteriyofaj izolasyonunda Metot 3 ile çalışılan lokasyon, örnek sayısı ve örnek alınan dönem bilgileri 97
Çizelge 4.16. Bakteriyofaj izolasyonunda Metot 4 ve Metot 7 ile çalışılan lokasyon, örnek sayısı ve örnek alınan dönem bilgileri 98
Çizelge 4.17. Bakteriyofaj izolasyonunda Metot 5 ile çalışılan lokasyon, örnek sayısı ve örnek alınan dönem bilgileri 99
Çizelge 4.18. Bakteriyofaj izolasyonunda Metot 6 ile çalışılan lokasyon, örnek sayısı ve örnek alınan dönem bilgileri 100

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. *Listeria* cinsinin serotipleri. 9
Şekil 2.2. Biyofilmin Yaşam Döngüsü..... 11
Şekil 3.1. Phage Guard Listex P100 (*v2014*) Phage Guard Listex P100 (*v2019*) FMWLLM3 ... 32
Şekil 3.2. Mikroplaka üzerinde %1'lik kristal viyolenin uzaklaştırılması 38
Şekil 3.3. Biyofilm oluşturma (A) ve biyofilmler üzerine bakteriyofaj ugulaması (B) 39
Şekil 3.4. %2.5 glutaraldehid'de içerisinde bekletilen yüzey materyalleri 40
Şekil 3.5. A: Kaplama cihazı (Q150R Plus)..... 40
Şekil 3.6. B: Scaning Elektron Mikroskobu (SEM)..... 40
Şekil 3.7. Galvaniz (A), plastik (B), paslanmaz çelik (C) test çubukları 41
Şekil 4.1. PALCAM Agar'da şüpheli *Listeria* spp. kolonilerinin görüntüsü 53
Şekil 4.2. *Listeria* spp. hücre morfoloji görüntüsü..... 54
Şekil 4.3. *Listeria* spp. (938 bp) cinsine ve *L. monocytogenes* (174 bp) türüne ait primer çifti ile yapılan PCR görüntüsü 58
Şekil 4.4. Listex^{TM} P100 TEM görüntüleri 60
Şekil 4.5. *Listeria* spp. referans suşlarına Listex^{TM} P100'ün etkisi..... 60
Şekil 4.6. *Listeria* faj plaklarının çift tabaka agar üzerinde görüntüsü 61
Şekil 4.7. *Listeria* spp. suşlarına (yerel izolat) Listex^{TM} P100'ün etkisi 62
Şekil 4.8. *Listeria* spp Biyofilmleri Üzerine Listex P100 Bakteriyofajının Etkisi..... 66
Şekil 4.9. SEM Görüntüleri **A**. *Listeria monocytogenes* ATCC #13932 - Paslanmaz Çelik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex^{TM} P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi 67
Şekil 4.10. SEM Görüntüleri **A**. *Listeria monocytogenes* ATCC #13932 - Galvaniz Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex^{TM} P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi..... 68
Şekil 4.11. SEM Görüntüleri **A**. *Listeria monocytogenes* ATCC #13932 - Plastik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex^{TM} P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi..... 68
Şekil 4.12. SEM Görüntüleri **A**. Yerel izolat *Listeria ivanovii*-Paslanmaz Çelik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex^{TM} P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi..... 69
Şekil 4.13. SEM Görüntüleri **A**. *Listeria ivanovii*-Galvaniz Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex^{TM} P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi 69
Şekil 4.14. SEM Görüntüleri **A**. *Listeria ivanovii*-Plastik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm 70

Şekil 4.15. SEM Görüntüleri **A**. Yerel izolat *Listeria innocua* - Paslanmaz Çelik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex™ P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi 70
Şekil 4.16. SEM Görüntüleri **A**. *Listeria innocua* – Galvaniz Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex™ P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi 71
Şekil 4.17. SEM Görüntüleri **A**. *Listeria innocua* – Plastik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex™ P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi 71
Şekil 4.18. **A**. SEM Görüntüleri *Listeria monocytogenes* - Paslanmaz Çelik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex™ P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi 72
Şekil 4.19. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria monocytogenes* - Galvaniz Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex™ P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi 72
Şekil 4.20. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria welshimeri* - Paslanmaz Çelik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex™ P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi 73
Şekil 4.21. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria welshimeri* - Galvaniz Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex™ P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi 73
Şekil 4.22. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria welshimeri* - Plastik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex™ P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi 74
Şekil 4.23. 37°C 'de *Listeria* Biyofilm Oluşumu Üzerine Listex™ P100 Bakteriyofajının Etkisi 77
Şekil 4.24. Oda Sıcaklığında *Listeria* Biyofilm Oluşumu Üzerine Listex™ P100 Bakteriyofajının Etkisi 78
Şekil 4.25. FMWLLM3 fajının TEM görüntüleri (Bigot ve ark., 2011) 79
Şekil 4.26. **A**. *Listeria monocytogenes* Lm 2000/47 üzerine FMWLLM3 fajının etkisi **B.** *Listeria innocua* üzerine FMWLLM3 fajının etkisi 79
Şekil 4.27. **A.** *Listeria ivanovii* ATCC #19119 üzerine FMWLLM3 fajının etkisi **B.** *Listeria monocytogenes* Lm 2000/47 üzerine FMWLLM3 fajının etkisi ***C.*** Yerel izolat *Listeria welshimeri üzerine* FMWLLM3 fajının etkisi 79
Şekil 4.28. *Listeria* spp. Biyofilmleri Üzerine FMWLLM3 Bakteriyofajının Etkisi 81
Şekil 4.29. SEM Görüntüleri **A.** Yerel izolat *Listeria monocytogenes* – Paslanmaz Çelik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm 82
Şekil 4.30. SEM Görüntüleri **A.** Yerel izolat *Listeria monocytogenes* - Galvaniz Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi 82

Şekil 4.31. SEM Görüntüleri **A.** Yerel izolat *Listeria monocytogenes* – Plastik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi 83
Şekil 4.32. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria monocytogenes* Lm2000/47 - Galvaniz Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi 83
Şekil 4.33. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria monocytogenes* Lm 2000/47 - Plastik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi 84
Şekil 4.34. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria ivanovii* - Paslanmaz Çelik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi ... 84
Şekil 4.35. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria ivanovii* - Galvaniz Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi..... 85
Şekil 4.36. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria ivanovii* – Plastik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi 85
Şekil 4.37. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria innocua* - Paslanmaz Çelik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi ... 86
Şekil 4.38. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria innocua* - Galvaniz Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi..... 86
Şekil 4.39. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria innocua* – Plastik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi 87
Şekil 4.40. *37°C 'de Listeria* Biyofilm Oluşumu Üzerine FMWLLM3 Bakteriyofajının Etkisi ... 87
Şekil 4.41. Oda Sıcaklığında *Listeria* Biyofilm Oluşumu Üzerine FMWLLM3 Bakteriyofajının Etkisi 89
Şekil 4.42. **A.**Su örneği **B.** Balık parçaları örneği **C.** Mısır silaj örneği **D.** Saman örneği..... 92
Şekil 4.43. **A.**Yerel izolat *L. innocua* ile zenginleştirilen 1BHÇSi10 numaralı fajın *L.innocua* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (silaj) (1,2 mm) **B.**Yerel izolat *L. innocua* ile zenginleştirilen 1BHÇSi10 numaralı fajın *L. monocytogenes* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (silaj) (2,3 mm) 92
Şekil 4.44. **A.** Yerel izolat *L. monocytogenes* ile zenginleştirilen 2BHÇSa11 numaralı fajın *L. monocytogenes* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (saman) (1,7 mm) **B.** Yerel izolat *L. monocytogenes* ile zenginleştirilen 1BHÇG13 numaralı fajın *L. monocytogenes* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (gübre) (2,6 mm) 93

Şekil 4.45. **A ve B.** *Listeria ivanovii* ile zenginleştirilen KSBp numaralı fajın *L. Monocytogenes içeren* TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (0,9 mm)..... 93
Şekil 4.46. **A.** *L. ivanovii* ile zenginleştirilen KSBp numaralı fajın *L. ivanovii* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (0,8 mm) **B.** *L. monocytogenes* ile zenginleştirilen KSBp numaralı fajın *L. weshimeri* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (0,9 mm) 94
Şekil 4.47. Faj çoğaltma işlemi sonrasında *L. monocytogenes* üzerine lizis oluşumu (0,8 mm) ... 94
Şekil 4.48. **A.** *L. ivanovii* ile zenginleştirilen NS12 numaralı fajın *L. ivanovii içeren* TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (1,6 mm) **B.** *L. ivanovii* ile zenginleştirilen NS12 numaralı fajın *L. monocytogenes* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (1,1 mm) **C.** *L. ivanovii* ile zenginleştirilen NS12 numaralı fajın *L. weshimeri* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (0,9 mm) 95
Şekil 4.49. LB agar (A), TSA agar (B) ve LB+MOPS (C) agarda Listex™ P100 lizis oluşumları-I..... 102
Şekil 4.50. LB agar (A), TSA agar (B) ve LB+MOPS (C) agarda Listex™ P100 lizis oluşumları -II 103

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
µg	: Mikrogaram
µl	: Mikro Litre
AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Ag	: Antijen
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
SEM	: Scanning Elektron Mikroskobu
bp	: Baz Çift
CDC	: Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi
kob	: Koloni Oluşturan Birim
cm^2	: Santimetre Kare
pob	: Faj Oluşturma Birim
ml	: Mili Litre
DAL	: Çift Tabaka Agar
ddH_2O	: Distile Deyonize Su
dH_2O	: Distile Su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dsDNA	: Çift İplikli Deoksiribo Nükleik Asit
dv/dk	: Devir /Dakikada
EDTA	: Etilendiamintetra Asetikasit
EPS	: Ekzopolisakkarit
Fim	: Fimbriae
FTS	: Fiziyolojik Tuzlu Su
g	: Gram
MH	: Mueller Hinton
TSB	: Tyriptic Soy Broth
LB	: Luria Betani
PALCAM	: Polymyxin Acriflavin Lithium-chloride Ceftazidime Esculin Mannitol

1. GİRİŞ

Listeria'lar, *Listeriaceae* familyasında yer alan Gram pozitif, spor oluşturmayan, kapsülsüz, aerob ve fakültatif anaerob, kısa çubukçuklar veya kokobasiller şeklinde bakterilerdir (Oovermann ve ark., 2010; McLauchlin ve ark., 2015).

İlk başlarda (1991) *Listeria* cinsi altı tür içermekteyse de (Khelef ve ark., 2006; Farber ve Peterkin, 2006) son yapılan yayınlara göre *Listeria* cinsi içerisinde 30 tür tanımlanmaktadır (Anonymus, 2024b). *Listeria monocytogenes*, bu cinsin en patojenik türü olup (Khelef ve ark., 2006; Orsi ve Wiedmann, 2016), nadiren de olsa *Listeria* türleri arasında *L. ivanovii*, *L. seeligeri* ve *L. welshimeri*'nin neden olduğu hastalıklar tespit edilmiştir. Bu enfeksiyonlar genellikle yeni doğan bebekler, hamile kadınlar, yaşlılar ve bağışıklık sistemi zayıflamış bireylerde görülmektedir (Tunail, 2000; Lakicevic ve ark., 2010).

L. monocytogenes doğada yaygın olarak bulunmakta olup toprak, su ve hayvanların sindirim sistemlerinde bulunmaktadır (WHO, 2018). *Listeria*'ların organizma içine alınması temel olarak ağız yolu ile gerçekleşir fakat aynı zamanda solunum, açık deri veya göz gibi diğer yollardan da vücuda girebilmektedirler (Spickler, 2019).

Listeriosis, çevrede saprofit olarak yaşayan ancak ara sıra memeliler, keseli hayvanlar, kuşlar ve sürüngenler de dahil olmak üzere çok çeşitli omurgalılarda hastalığa neden olan *Listeria*'nın çeşitli türlerinden kaynaklanmaktadır (Spickler, 2019). Listeriosis, hayvanlarda ve insanlarda genellikle merkezi sinir sistemi bozuklukları ile kendini gösteren bir zoonotik hastalıktır (Mahmood ve ark., 2003; Anonymous, 2024a). Listeriosis'in insanlarda ilk kez 1929 yılında Nyfeldt tarafından bildirildiği kaydedilmiştir (Dutta, 2007). O zamandan beri, hastalıklı hayvanlarla sık sık temas eden işçilerde listeriosis vakalarının yaşandığı bildirilmiştir (Farber ve Peterkin, 2006). *Listeria* cinsinde her ne kadar diğer türlerden kaynaklı enfeksiyonların olduğu bilinse de (Spickler, 2019) *Listeria monocytogenes* kaynaklı enfeksiyonlar çok daha fazla olduğu için çalışmalar özellikle bu tür üzerinde yoğunlaşmıştır (Farber ve Peterkin, 2006).

Listeria monocytogenes gıdada görülme sıklığı ve gelişimi nedeniyle gıda kaynaklı bir patojen olarak listeriosise neden olabilmektedir (Diriba ve ark., 2021). Listeriosisin ilk kez raporlandığı (1929) yıllardan bu yana, genellikle hastalıklı hayvanlarla temas halinde olan işçilerde sporadik listeriosis vakaları rapor edilmiştir (Farber ve Peterkin, 2006). İnsanlardaki salgınlarda birçok farklı gıda materyali salgınların kaynağı olarak belirtilmektedir. Gıda kaynaklı salgınların bir sonucu olarak, 1980'li yıllarda gıda üreticileri ve devlet kurumları arasında organizmaya olan ilgi hızla artarken buna bağlı olarak çeşitli bilimsel çalışmalar ve yayınlar da artmaya başlamıştır (Farber ve Peterkin, 2006). Pastörize edilmemiş süt ürünleri (örn. yumuşak peynirler) ve çeşitli tüketime hazır soğutulmuş gıdalar (örn. kıyma, şarküteri etleri) listeriosis kaynağı olsalar da ayrıca çiğ et ve balık ve pişmemiş sebze veya meyveler dahil olmak üzere birçok gıda bu patojenin kaynağı olabilmektedir. Gıdaların bu mikroorganizma ile kirlenmesi bazen işleme tesislerine giren hammaddelerden kaynaklansa da bu

mikroorganizmalar zaman içinde bu tesislerde yerleşebilir ve bazen uzun yıllar varlığını sürdürebilir (Spickler, 2019; Diriba ve ark., 2021).

Listeriosis, Avrupa Birliği'nde hastaneye yatış oranların en yüksek olduğu ve en yüksek ölümcül vakaların görüldüğü gıda kaynaklı enfeksiyonlardan biri olmaya devam etmektedir. Septisemi ve serebral durumlar (örn. menenjit, meningoensefalit), esas olarak yaşlı kişilerde ve bağışıklık sistemi zayıf kişilerde meydana gelen hayatı tehdit eden durumlardır; hamile kadınlarda listeriosis ise düşük, ölü doğum veya fetal ölüme yol açabilmektedir (EFSA, 2023). Ayrıca, tüm bakteriyel menenjitler arasında *L. monocytogenes* menenjiti en yüksek ölüm oranına (%22) sahiptir (Schlech, 2000).

Listeria cinsi içerisindeki en patojenik tür olan *L. monocytogenes* bakteriyoloji alanına geç girmiş olup organizma ilk olarak 1917'de Pirie tarafından Güney Afrika'daki (Tiger River hastalığı) yabani kemirgenlerde epizootiklerin bir nedeni olarak gösterilmiş olsa da 1926'da Murray ve arkadaşları tarafından laboratuvar tavşanlarında periferik monositoz ile karakterize septik bir hastalık nedeni olarak tanımlamıştır. Bu nedenle cins adı önce Listerella sonra *Listeria* olarak değiştirilene kadar organizma Murray tarafından *Bacterium monocytogenes* olarak adlandırılmıştır (Schlech, 2000). 1927'de Pirie tarafından *Listerella hepatolytica* olarak isimlendirilmiştir (Donovan ve ark., 2015). 1940 yılında İngiliz cerrah ve antiseptik tekniğinin öncüsü Joseph Lister'den sonra bugünkü adını almıştır (Hof, 2003; Donovan ve ark., 2015). EFSA'nın zoonotik hastalıklar üzerine yayınladığı 2022 tarihli son bilimsel rapora göre sırası ile Campylobacteriosis, Salmonellosis**,** Shiga toxin-üreten *Escherichia coli* (STEC) enfeksiyonu ve Yersiniosisten sonra Listeriosis en sık rastlanan zoonotik hastalık olarak bildirilmiştir. Avrupa Birliği'nde listeriosis vakalarının uzunca bir süre artış gösterdikten sonra 2015-2019 yılları arasında stabil kaldığı ve son yıllarda yeniden artış gösterdiği belirtilmektir. Ayrıca *L. monocytogenes* enfeksiyonlarının en sık 64 yaş üstü grupta tespit edildiği bildirilirken hastanede yatış oranı (%92) ve ölüm oranı (%17,6) yüksek olan en ağır zoonotik hastalık olarak da bilinmektedir (EFSA, 2021). 2022'de invasif listeriosis, 2.738 vakayla en çok rapor edilen beşinci zoonoz olurken bu rakamın 2021'e kıyasla %15,9 artış gösterdiği belirtilmektedir (EFSA, 2023).

Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi'nin 2018 tarihinde yayınlanan raporunda *Listeria monocytogenes* için hastanede yatış oranı %94 ve ölüm oranı %15,9 olarak belirtilmiştir (CDC, 2018). Yine aynı raporda belirtilen 2,953 salgın içerisinde *Listeria, Salmonella* ve Shiga toksin üreten *Escherichia coli* (STEC) bakterilerinin neden olduğu salgınlardan dolayı bu bakterilerin hem hastaneye yatışların hem bildirilen ölümlerin %82'sinden sorumlu olduğu belirtilmiştir (Dewey-Mattia ve ark., 2018).

Listeria monocytogenes, gıdalarda karşılaşılan çok farklı çevresel koşullara iyi uyum sağlayabilmekte hatta organizma yüksek düzeyde tuz içeriğini (%10 ile 20) tolere edebilmektedir (Kim ve ark., 2005; Guenther ve ark., 2009; Townsend ve ark., 2021). *L. monocytogenes*'in bu ozmotik strese tepkisine, birincil ve ikincil tepki mekanizmalarından oluşan iki fazlı bir süreç olan ozmoadaptasyon adı verilmektedir (Hill ve ark., 2002). Birinci aşama potasyum iyonlarının (K^+) ve

karşıt iyonu glutamatın hücre içine alımını artırarak hücre içi basıncı koruyan hücrelerin fizyolojik değişikliklerini kapsarken ikinci aşamada bu potasyum iyonlarının (K^+) bir kısmı ile uyumlu çözünenler olarak bilinen düşük molekül ağırlıklı moleküllerle yer değiştirilmesi sağlanmaktadır (Sleator ve ark., 2003).

Listeria monocytogenes'in, düşük oksijenli ortamlarda pH değeri 6'nın altında, nemli ortamlarda birkaç ay ve düşük su aktivitesine sahip ortamlarda ise iki yıla kadar hayatta kalabildiği bilinmektedir (Kim ve ark., 2005; Guenther ve ark., 2009). Ayrıca, *Listeria monocytogenes*'in hem çok düşük hem de yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı olduğu ve buzdolabı sıcaklıklarında da çoğalabildiği belirtilmiştir (Kim ve ark., 2005; Guenther ve ark., 2009; Townsend ve ark., 2021). Bu hücreyi etkileyen düşük sıcaklıklar, membran lipid akışkanlığının azalmasına yol açmaktadır. Bu stres faktörüne yanıt olarak *L. monocytogenes*, membran lipit bileşimini doymamış yağ asitlerinin konsantrasyonunda bir artışa doğru değiştirmektedir. Bu da sitoplazmik içeriğin sızmasıyla sonuçlanabilecek jel benzeri bir durumun oluşmasını engellemektedir. Bu stres koşullarına maruz kalma sırasında *L. monocytogenes* farklı şekillerde de tepki vermektedir. Örneğin hücreler, soğukla etkinleşen bir taşıma sistemi yoluyla ortamdan glisin betain ve karnitin birikimini artırmaktadır. Bu kimyasallar ATP bağlayıcısı olup yapılan çalışmalarda hem glisin betain hem de karnitinin, *L. monocytogenes* tarafından 7°C'de 30°C'ye göre çok daha hızlı biriktiği ve 8°C'de gelişime bırakıldığında 37°C'ye kıyasla hücre içindeki seviyelerinin birkaç kat arttığı belirlenmiştir (Osek ve ark., 2022). Bakteri yüksek sıcaklığa (45°C üzeri) adaptasyonunu ise var olan grpE, dnaK, dnaJ, groEL, ve groES genleri ile kontrol etmektedir. *L. monocytogenes*'in toplam ısıyla inaktivasyonunun sırasıyla 10 dakika için 55°C, 12 saniye için 65°C'ye kadar sıcaklık aralığını gerektirdiği açıklanmıştır (Smelt ve Brul, 2014).

Listeria türlerinin yukarıda belirtilen ekstrem koşullar altında hayatta kalabilmesi diğer organizmalarla rekabet edebilmesine olanak sağlamaktadır (Townsend ve ark., 2021).

Gıda üretimi, hayvanların yetiştirilmesinden, bitkilerin hasat edilmesinden, farklı uygulamalarla başlayıp, tüketici tarafından tüketilmesine kadar geçen karmaşık ve çok yönlü bir süreçtir. Bu süreç boyunca, bu patojenik bakterilerin çoğu, çevrede ve hayvanlarda yaygın ve normal mikrobiyota olarak bulunduğundan bakteriyel kontaminasyon için birçok olasılık vardır. Zoonotik patojenler gibi enfeksiyonlara neden olabilirler ve genellikle insanlara çapraz kontaminasyon (örneğin, gıda ürünlerinin kötü şartla altında saklanması veya gıdaların yanlış işlenmesi ve hazırlanması sırasında) yoluyla bulaşırlar (Lavilla ve ark., 2023).

Gıda sektörü, hayvansal kaynaklı gıdalardan kaynaklanan insan patojenlerindeki antibiyotik direnç sorunlarının araştırılmasında ve bu patojenlerden kaynaklanan bulaşıcı hastalıkları önleme çabaları çalışmalarında düzenli olarak sürece dahil olmuşlardır. Gıda üretim sürecinin her aşamasında gıda kaynaklı patojenlerin tespiti ve ortadan kaldırılmasına yönelik teknolojik yöntemlerdeki birçok ilerlemeye, hayvancılık ve tarımsal süreçlerdeki değişikliklere, iyi üretim uygulamalarına, kalite kontrol ve hijyene rağmen, mikrobiyal güvenlik sorunları hala yaygındır. Örneğin hayvansal gıda

üretimi sırasında bazı antibiyotiklerin sınırlı kullanımı ve yeni antimikrobiyallerin geliştirilememesi, gıda üretim sektörü üzerinde daha fazla baskı oluşturmaktadır. Dolayısı ile gıda güvenliği standartlarını korumak, gıda kaynaklı patojenleri kontrol etmek ve bunların gıda endüstrisi ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerini sınırlamak için üretim düzeyinde alternatif antibakteriyel yaklaşımların geliştirilmesine gereksinim duyulmaktadır (Endersen ve Coffey, 2020).

Gıdayla temas eden yüzeylerin, ekipmanların ve işleme ortamlarının kötü sanitasyonu, özellikle *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella*'yı içeren gıda kaynaklı hastalık salgınlarında önemli bir faktör olmuştur. Uygun şekilde temizlenmeyen yüzeyler kir oluşumunu teşvik etmekte ve suyun varlığında patojenik mikroorganizmalar biyofilm oluşturabilmektedir (Chmielewski ve Fransk, 2003). Doğada bakterilerin çoğu, yüzeylerle ilişkili ve biyofilm olarak adlandırılan polimerik hücre dışı matriks içine gömülü sabit toplulukların bir parçası olarak bulunmaktadır (Acemel ve ark., 2018). Biyofilm oluşumu doğadaki mikrobiyal yaşam döngüsünün ayrılmaz bir parçasıdır. Gıda güvenliği araştırmalarına göre gıda kaynaklı hastalık salgınlarının yaklaşık yüzde 60'ı biyofilm formundaki patojenlerden kaynaklanmaktadır (Wardani ve ark., 2023).

Biyofilmler, kronik enfeksiyonlar, gıda kontaminasyonu, biyolojik kirlenme ve ekipman korozyonu gibi birçok endüstriyel ve biyolojik soruna neden olabilmektedirler (Delavar ve Wang, 2021). Biyofilmler gıda endüstrisinde çapraz kontaminasyonun ana kaynaklarından biri olarak görülmektedir (Flach ve ark., 2014; Azizoglu ve ark., 2015). Gıda işleme süreçlerinde gıdanın temas ettiği yüzeylerde biyofilmin varlığı, gıda maddeleri için önemli bir kontaminasyon kaynağı olarak kabul edilmekte ve gıdanın bozulmasına ve/veya gıda kaynaklı enfeksiyon ve zehirlenmelere yol açmaktadır (Trang ve ark., 2023).

Olgun biyofilmler, mikroorganizmalara kuruma, predator organizmalar (bir canlıya başka bir canlı tarafından saldırma) veya antimikrobiyal ajanlar gibi çevresel tehditlere karşı koruma sağlamanın yanı sıra, metabolik etkileşimleri ve genetik değişimi destekleyen stabil, besleyici bir ortam sağlamaktadır (Acemel ve ark., 2018).

Bakterilerin biyofilm formu oluşturmaları sürecinde hem biyotik hem de abiyotik yüzeylerde kolonileşmeleriyle gerçekleşmelerinin ardından koruyucu bir bariyer üretilmeye başlanır. Bu durum bakteriyi hem antibiyotikler gibi dış tehditlerden hem de bulunduğu ortamlardaki tehlikeli durumlardan korur (Sharma ve ark., 2023).

L. monocytogenes'in gıda işleme ortamlarında hayatta kalması ve kalıcılığını arttırması onların biyofilm oluşturabilme yetenekleriyle ilişkilendirilmektedir (Rolon ve ark., 2024). *Listeria monocytogenes*'in plastik, paslanmaz çelik ve cam gibi gıda işleme yüzeylerinde gelişebildiği ve biyofilm oluşturabildiği pek çok araştırma ile kanıtlanmıştır (Oliveira ve ark., 2010, Belak ve ark., 2012, Yun ve ark., 2014). Et ve kümes hayvanı ürünleri üreten 12 tesiste yapılan bir çalışmada *Listeria* spp. tespit edilen örneklerin %40'ının *L. monocytogenes* olduğu bulunmuştur. Tesisler arasında karşılaşma yapıldığında bir örneğin *L. monocytogenes* içerme olasılığının işletmeden işletmeye değiştiği ve her işletmenin kendine özgü bir ekosisteminin olduğu bildirilmiştir (Tompkin, 2002). *L.*

monocytogenes'in planktonik hücreleri tipik olarak gıda işleme tesislerinde uygulanan temizleme ve sanitasyon uygulamalarına duyarlı olsa da, *L. monocytogenes* biyofilmlerinin oluşumu söz konusu olduğunda sanitasyon uygulamalarına rağmen varlığını sürdürebilmektedir (Rolon ve ark., 2024).

L. monocytogenes'in biyofilm formu içinde dezenfektanlara karşı dirençli, birçoğu tam olarak anlaşılamayan çeşitli mekanizmalar aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bunlar arasında hücre dışı matriksin koruyucu etkisi ve dezenfektanın hücrelere sınırlı erişimi; biyofilmlerdeki hücrelerin özel fizyolojik durumu ve özel stres tepkileri; dezenfektanı hücre dışına pompalayan genlerin ekspresyonu (yatay gen transferi yoluyla elde edilenler dahil); ve normalde öldürücü olan dezenfektan maruziyetini tolere edebilen dorman hücrelerin (dayanıklı, ısrarcı) alt popülasyonunun varlığı sayılabilir (Azizoglu ve ark., 2015). Bir biyofilm içindeki hücrelerin quorum sensing (QS) ve fizyolojik heterojenlik (besinlerin, atık ürünlerin ve sinyal faktörlerinin değişimleri) gibi bir çok mekanizmalardan dolayı sanitasyon direnci gösterdiği düşünülmektedir (Mah ve Toole, 2001). Lee ve ark (2017)'nın perasetik asit (%0,5) kullanarak yaptıkları çalışmalarında paslanmaz çelik yüzeylerde etki görmüş olsalar da polimer yüzeylerde *L. monocytogenes* biyofilmlerinin dezenfektanlara karşı direncini etkileyen faktörler üzerine daha ileri çalışmalara ihtiyacı duyulduğunu iletmişlerdir.

Biyofilmlerin bulundukları ortamlardan uzaklaştırılmasını sağlamak amacıyla bir çok yöntemden yararlanılmaktadır. Bunlardan biri olan fiziksel yöntemler arasında iyonlaştırıcı ve ultraviyole radyasyon, malzeme kalitesini değiştirme gibi uygulamalar yer alırken, kimyasal yöntemler pahalı ve her koşula uyum sağlayamaması nedeni ile biyofilm ile mücadelede kullanımı çok fazla tercih edilmemektedir. Bakteriyofaj, bakteriyosin ve enzimle muamele gibi biyolojik yöntemler, biyofilme karşı kullanılan nispeten yeni yöntemler olarak daha yüksek inhibisyon etkinliğine sahip olmasıyla öne çıkmaktadır (Zhao ve ark., 2023). Bununla birlikte, biyofilm kaynaklı enfeksiyonları tedavi etmek için antibiyotiklerin sıklıkla kullanılmasının bir sonucu olarak, antibiyotiklere dirençli bakterilerin ortaya çıkması, biyofilmlerin neden olduğu tehdide karşı koymak için bakteriyel süreçlerin gözden geçirilmesini ve yeni genetik keşiflerin yapılmasını gerektirmektedir (Sharma ve ark., 2023). Son yıllarda, bakterilerin yüzeye yapışmasını sınırlamak, büyüyen biyofilmi ortadan kaldırmak veya oluşan biyofilmden hücreleri uzaklaştırmak amacıyla ortaya çıkan anti-biyofilm preparatları geliştirilmiştir (Zhao ve ark., 2023). Bunun yanısıra şimdilerde farklı yöntemler geliştirme sürecinde çalışılan (1) yeni ve geliştirilmiş metodolojiler (örneğin, elektrolize su, ozonlama, nanopartiküller ve aerosoller gibi yeni uygulama modelleri) ve (2) *Listeria*faj (ve bunların endolizinler gibi türevleri), yeni bakteriyosinler ve rekabetçi dışlama kültürleri (probiyotik strateji çeşidi) gibi *Listeria*'ya özgü reaktifler olmak üzere bunlardan bazıları test edilmeye başlanmıştır (Azizoglu ve ark., 2015). Gıda üretiminde faj veya faj ürünlerinin kullanılması, özellikle taze ve tüketime hazır gıda ürünlerinin güvenliğini artıran, istenmeyen patojenlerin biyokontrolü için yeni bir yöntem olarak gıda endüstrisi için son zamanlarda bir seçenek haline gelmiştir (Chhibber ve Kumari, 2012).

Bakteri virüsleri olan bakteriyofajlar (fajlar), biyoteknoloji ve gıda güvenliği başta olmak üzere birçok uygulamanın yanı sıra bakteriyel hastalıkların tedavisi için yeni etkili antimikrobiyallere

olan talep nedeniyle önem kazanmıştır (Lavilla ve ark., 2023). Bakteriyofajların insanlarda yüksek dozda alımlarında zararlı etkilerinin bulunmaması, yüksek derecede spesifik olmaları, yalnızca hedef mikroorganizma üzerinde etkili olmaları, onların antimikrobiyal ajan olarak kullanılmasını öne çıkaran özelliklerdir (Hagens ve Loessner, 2010). Yüksek spesifik özelliklerinden fayda sağlamak üzere gıda sanayisinde fajlar, hayvansal ve bitkisel gıdaların gıda güvenliği riskini azaltmak için biyokontrol önlemi olarak kullanılabilmektedir (Keary ve ark., 2013; Greer, 2005).

Bakteri içine girmesiyle aktivite faaliyeti bozan ve özellikle litik faz durumunda bakterinin kaybına neden olan bakteriyofajlarla ilgili ilk gözlemlerin ise 1896 yılında Ernest Hankin tarafından yapıldığı bilinmektedir (Durupınar, 2005). Bakteriyofajlar, bakterilerin doğal düşmanları olarak görülmekte olup *Listeria, Campylobacter, Salmonella* ve *Escherichia* gibi riskli gıda kaynaklı patojenlerin kontrolünde geniş bir uygulama alanına sahip olan ajanlar olarak değerlendirilmektedir (Carlton ve ark., 2005; Endersen ve ark., 2014). Gen veya türe özgü olan bakteriyofajlar, hedef bakteri hücrelerine spesifik şekilde etki ettikleri için fermente gıdalarda bulunan starter kültürlere ve gastrointestinal sistem ile çevredeki bakteri florasına zarar vermezler (Carlton ve ark., 2005).

Listeria fajlarının pek çok ortamda varlığını tespit etmek amacıyla çalışmalar yürütülse de fajların işletme ortamlarında varlığı ve karakteristiklerini belirleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Bu çalışmada çeşitli gıda ve gıda işletmelerinde sorun yaratan *Listeria* spp. ve *Listeria* biyofilmlerinin *Listeria* spp. bakteriyofajlarıyla çözümü gözetilerek araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla gıda ve gıda işletmelerinden *Listeria* spp. izolasyon ve tanımlamaları yapılmış ve tanımlananan *Listeria* spp.'lere biyofilm oluşturuldaktan sonra ticari olarak üretimi yapılan Hollanda menşeili Listex^{TM} P100 bakteriyofajı ile Yeni Zelanda Canterbury Üniversitesi Çevre Bilimleri ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen FMWLLM3 fajlarının *Listeria* hücreleri ve *Listeria* biyofilmleri üzerine antibakteriyel etkisi belirlenmiştir. Bunların yansı sıra çeşitli kaynaklardan *Listeria* bakteriyofajlarının izolasyonu farklı metotlarla yapılmıştır. Buna göre 5 farklı örnekten (Balık parçaları, nehir suyu, gübre, saman ve silaj) *Listeria* bakteriyofajı izole edilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *Listeria monocytogenes* ve *Listeria* spp.

Listeria cinsinde günümüzde 30 tür *(Listeria monocytogenes, Listeria seeligeri, Listeria ivanovii, Listeria welshimeri, Listeria innocua, Listeria grayi, Listeria murrayi, Listeria marthii, Listeria fleischmannii, Listeria aquatica, Listeria newyorkensis, Listeria floridensis, Listeria rocourtiae, Listeria cornellensis, Listeria weihenstephanensis, Listeria grandensis, Listeria riparia, Listeria grandensis, Listeria booriae, Listeria costaricensis, Listeria goaensis, Listeria thailandensis, Listeria valentina, Listeria cossartiae, Listeria cayugensis, Listeria farberi, Listeria immobilis, Listeria portnoyi, Listeria rustica)* bulunduğu bildirilmiştir (Anonymus, 2024b).

22 *Listeria* türü (*Listeria fleischmannii, Listeria floridensis, Listeria aquatica, Listeria newyorkensis, Listeria cornellensis, Listeria rocourtiae, Listeria weihenstephanensis, Listeria grandensis, Listeria riparia, Listeria booriae, Listeria costaricensis, Listeria goaensis, Listeria thailandensis, Listeria valentina, Listeria cossartiae, Listeria cayugensis, Listeria farberi, Listeria immobilis, Listeria portnoyi, Listeria rustica, Listeria ilorinensis ve Listeria swaminathanii)* 2009 ve sonrasında yayınlanmıştır (Lourenco ve ark., 2022; Anonymus, 2024b). *Listeria* cinsi içerisinde 30 tür listelenmiş olsa da *Listeria denitrificans* ve *Listeria murrayi* isimli iki tür benzer olarak gösterilmektedir (Nwaiwu, 2020; Anonymus, 2024b).

Bu cins içerisinde yalnızca *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*, patojen olarak değerlendirilmektedir (Khelef ve ark., 2006; Orsi ve Wiedmann, 2016). *Listeria monocytogenes* bu cins içindeki en patojenik tür olmakla birlikte, *Listeria* türlerinin neden oldukları hastalıklarda seyrek de olsa *L. ivanovii, L. seeligeri ve L. welshimeri* suşlarının varlığı saptanmış olup enfeksiyonlar temel olarak yeni doğmuş bebekler, hamile kadınlar, yaşlılar ve bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde görülmektedir (Tunail, 2000; Lakicevic ve ark., 2010; Rossi ve ark., 2020). *L. monocytogenes'in* inlA ve inlB internalin genleri ile patojenite adası 1'in (LIPI1) prfA, hly ve plcA'nın genlerinin *L. monocytogenes*'ten ayrıldıktan sonra onlara sahip olan bir *L. innocua* suşunun menenjite sebep olduğu bildirilmiştir. Atipik *L. innocua* suşları *L. monocytogenes* LIPI-1, inlA ve inlB genlerinin farklı kombinasyonlarına sahiptir (Rossi ve ark., 2020).

İlk tanımlama yöntemleri arasında sayılan biyokimyasal reaksiyonlar ve fenotipik bazı özellikler, hala yaygın olarak kullanılmaktadır. *Listeria* kolonilerini kesin olarak tanımlamak için daha fazla teste ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak seçici agar üzerindeki şüpheli koloniler önce saflık açısından araştırılmalıdır. Ayrıca zaman alıcı olan karbonhidrat bazlı türlerin ayırt edilmesi için bir hafta süren geleneksel biyokimyasal testlere alternatif olarak hazırlanmış test ticari tanımlama kitleri bulunmaktadır. Bunlardan API *Listeria* (bio-Merieux, Marcy-Etoile,

Fransa) ve Micro-IDe (Remel, ABD) gibi test şeritleri kapsamlı bir şekilde doğrulanmıştır ve artık standart metodolojiye dahil edilmiştir (Gasanov ve ark., 2005).

Listeria spp'nin tanımlanması Çizelge 2.1 de görüldüğü gibi birkaç biyokimyasal belirteç ve hemolize dayanmaktadır (Khelef ve ark., 2006).

Çizelge 2.1. Bazı *Listeria* türlerinin tanımlanma kriterleri (Abay, 2004)

Ayırıcı Tanı Kriterleri		*Listeria spp.*					
		L. monocytogenes	*L. ivanovii*	*L. innocua*	*L. welshimeri*	*L. seeligeri*	*L. grayi*
Hidrolizasyo	Eskulin	+	+	+	+	+	+
	Kazein	-	-	-	-	-	-
	Selüloz	-	-	-			-
	Hippurat	+	+	-			-
	Nişasta	d	-	d			-
	Jelatin	-	-	-	-	-	-
Asit Oluşumu	Arabinoz	-	-	-	?	?	-
	Galaktoz	d	d	-	?	?	+
	d-xylose	-	+	-	+	+	-
	Mannitol	-	-	-	-	-	+
	β- Liksoz	-	-	-			-
	Laktoz	d	+	+	?	?	-
	Dekstrin	d	-	-			+
	Glikoz	+	+	+	+	+	+
	Ramnoz	+	-	d	d	-	-
	Sorbitol	d	-	-	?	?	
	Salisin	+	+	+	+	+	+
	Sükroz	-	d	d			-
	Melebiaz	-	-	-			-
	Melezitaz	d	d	d			-
	α-Mehty-β-Mannosidasid	+	-	+	+	-	-
	α-Mehty-β-glukozid	+	+	+			+
β-hemoliz oluşturma		+	+	-	-	+	-
CAMP Testi		+	-	-	-	+	-
Metil Red		+	+	+	+	+	+
Voges Proskauer Testi		+	+	+	+	+	+
Nitrat Redüksiyonu		-	-	-	-	-	-
Fosfataz		+	+	+			+
Oksidaz		-	-	-	-	-	-
Katalaz		+	+	+	+	+	+
Lesitinaz		D	+	d			-
Üre		-	-	-	-	-	-
Mol % G+C							
Virülans Fare Testi		+	+	-	-	-	-

d: değişken

Listeria türleri, serolojik testlerde temel alınan somatik (O) ve flagella (H) antijenleri gibi özgül yüzey proteinleri ile karakterize edilmektedir (Liu, 2006). Alt türler arasındaki farklılıklar, bu yüzey proteinleri arasındaki reaksiyonlara bağlı olarak sıklıkla aglütinasyon testleri ile gerçekleştirilmektedir (Seeliger ve Höhne, 1979).

Listeria monocytogenes, 4h serotipi yakın zamanda belirlenmiş yeni bir serotip olmak üzere Şekil 2.1'de görüldüğü üzere toplamda 14 serotip içermektedir. Hibrit alt soy II'ye ait Serovar 4h *L. monocytogenes*, hipervirülent özellikler sergilemektedir (Feng ve ark., 2020). Bununla birlikte, insan enfeksiyonlarının %95'inden fazlası yalnızca üç serotipten kaynaklanmaktadır (1/2a, 1/2b ve 4b) (Finn ve ark., 2023). Bunlardan serotip 4b en patojenik olarak kabul edilen, 1/2a ise gıda endüstrisi ortamında en yaygın olanıdır (Mazaheri ve ark., 2022).

L. monocytogenes	*L. ivanovii*	*L. seeligeri*	*L. innocua*	*L. welshimeri*	*L. grayi*
1/2a, 1/2b, and 1/2c	5	1/2a, 1/2b, and 1/2c		1/2b	
3a, 3b, and 3c					
4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, and 4e		4b and 4d	4ab	4c	
		6b	6a and 6b	6a and 6b	
7		US*	US	US	S

Abbreviations: US, undesignated serovar; S, specific; and * is both US and S.

Şekil 2.1. *Listeria* cinsinin serotipleri (Khelef ve ark., 2006).

Antibiyotiklere dirençli ilk *L. monocytogenes* suşları 1988 yılında bildirilmiş olup, bu suşlar ml başına 10 mg tetrasikline karşı direnç göstermektedir. Ayrıca, *L. monocytogenes*'in ilk çok dirençli suşu Fransa'da aynı yıl içinde izole edilmiştir. O zamandan beri, gıda/çevreden veya sporadik insan listeriosis vakalarından izole edilen bir veya birkaç antibiyotiğe dirençli *Listeria* spp. suşları tanımlanmıştır. Çeşitli çalışmalar bu direnç mekanizmalarından birisinin *Enterococcus* ve *Streptococcus* türlerinden *Listeria*'ya ve *Listeria* türleri arasında antibiyotik direnç genlerini taşıyan plazmid ve transpozonların konjugasyon yoluyla aktarılması ile olduğunu belirtmiştir (Charpentier ve Courvalin, 1999).

Hücre duvarı, bakteriler için önemli bir yapı olduğu halde, bazı bakteriler çevresel stres altında veya antibiyotik etkisiyle bu duvarı kaybedebilmektedir ve bakteriler L-formuna geçebilmektedir. Bakterilerde L-formu, bakterilerin hücre duvarlarını kaybettikleri veya yapısal olarak değiştirdikleri, ancak hayatta kalabildikleri ve çoğalabildikleri bir durumu ifade etmektedir. Bu durum, genellikle hücre duvarını hedef alan antibiyotiklere karşı direnç geliştirirken ortaya çıkabilmektedir (Dell'Era ve ark., 2019; Errington ve ark., 2016). Birçok antibiyotiğin (örneğin, beta-laktam antibiyotikleri) ana hedefi olan hücre duvarının antibiyotikler sebebiyle sentezlenmesi engellenmeye çalışılmaktadır. Ancak L-formda olan bakteriler, hücre duvarlarını kaybettikleri için bu antibiyotiklerin hedefi olmaktan çıkar ve bu durum, onları bu tür ilaçlara karşı dirençli hale getirmektedir. L-formda bakteriler, zorlayıcı çevresel koşullar altında hayatta kalmak için bu formu alabilmektedir ve bu, özellikle

antibiyotik tedavisi sırasında gözlemlenebilmektedir. Bakterilerin hücre duvarını hedefleyen antibiyotiklere direnç kazanmaları, tedavinin etkinliğini azaltmaktadır ve enfeksiyonun kronikleşmesine neden olabilmektedir (Domingue, 1997; Allan, 2003; Errington ve ark., 2016).

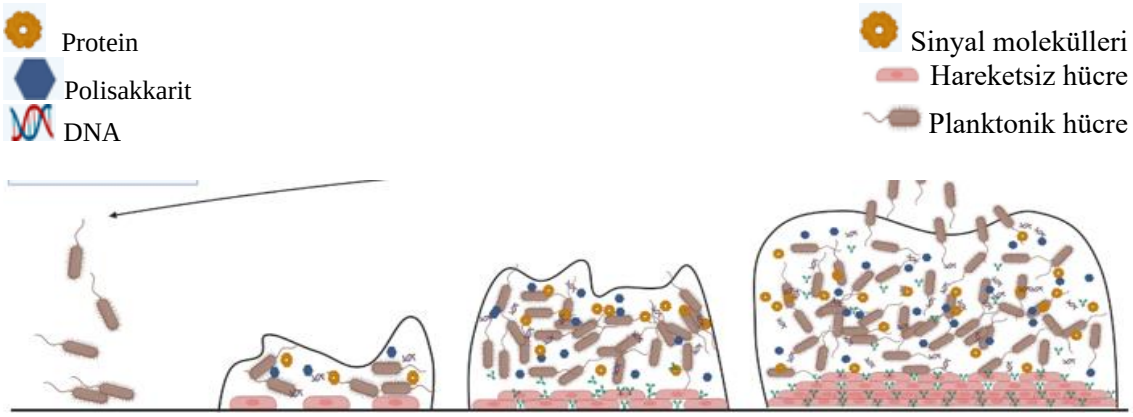
L-formdaki bakteriler, sadece antibiyotiklere değil, aynı zamanda bakteriyofajlara karşı da direnç geliştirebilmektedir. Bakteriyofajlar genellikle bakterilerin hücre duvarında bulunan spesifik reseptörlere bağlanarak onları enfekte eder. Ancak, L-form bakterilerde hücre duvarı eksik olduğu için bu reseptörler mevcut değildir veya erişilemez hale gelir, bu da fajın enfeksiyon döngüsünü başlatmasını zorlaştırır. Bu nedenle, L-formu, bakteriyofaj terapisine karşı da bir direnç mekanizması olarak ortaya çıkabilmektedir (Young, 1992; Glover ve ark., 2009; Dell'Era ve ark., 2019; Errington ve ark., 2016).

2.2. Biyofilmler

Biyofilmler, bir yüzey üzerinde gelişen, düzensiz bir ekstraselüler matriks içinde gelişen ve hücreler tarafından kısmen üretilen ekzopolisakkarit (EPS) matriksi ile çevrilmiş mikrobiyal hücreler topluluğudur (Rodrigues ve ark., 2010; Harper ve ark., 2014). Biyofilmin yapısını %10 mikrobiyal kütle ve %90 su içermektedir. Biyofilmlerin organik bileşeninin tamamının %50-90'ı, matriksi oluşturan polisakkaritlerden oluşmaktadır (Sharma ve ark., 2023). *L. monocytogenes* biyofilmlerinde EPS, esas olarak ekstraselüler DNA (eDNA), proteinler ve özellikle de polisakkarit yapısında olan teikoik asitleri içermektedir (Colagiorgi ve ark., 2016; Finn ve ark., 2023). Biyofilmler, Reynolds sayısının (Re) 5000'den fazla olduğu türbülanslı akış ortamında oluşmaktadır (Sharma ve ark., 2023).

Listeria monocytogenes biyofilmlerinde en spesifik bileşeni olarak görülen EPS, biyofilmin çevresel strese karşı dayanıklılığını artırmaktadır. EPS, biyofilmin fiziksel yapısını koruyan ve onu dış etkenlere karşı dirençli hale getiren kritik bir bileşendir ve *Listeria*'nın biyofilm yaparak uzun süre gıda üretim tesisleri gibi ortamlarda hayatta kalmasına yardımcı olmaktadır (Flemming ve Wingender, 2010; Colagiorgi ve ark., 2016).

Planktonik hücreden biyofilm büyümesine geçiş, bakteri hücresi ile yüzey arasındaki zayıf, geri dönüşümlü etkileşimlerle başlar. Yüzey büyümesine bağlılık, daha güçlü, geri dönüşümsüz bağlanma ile belirlenir, ardından mevcut olduğunda fagella kaybı ve yüzeyde mikro koloniler oluşturmak için klonal büyüme gelir. Bu aşamada biyofilm matriksinin sentezi başlamaktadır. Düz, iki boyutlu mikro koloniler, sonunda biyofilm matriksinde hareketsizleştirilmiş hücreleri içeren karmaşık, üç boyutlu yapılara sahip olgun bir biyofilme dönüşmektedir (Acemel ve ark., 2018). Bir biyofilm kolonisindeki hücrelerin yakın ilişkisi besin bulunması, gen değişimi ve quorum sensing (QS) gelişimlerini teşvik eden koşulları yaratmaktadır (Sharma ve ark., 2023). Biyofilm oluşumu ve gelişim sürecinin katı bir yüzey üzerinde dört aşamada BioRender kullanılarak şematik gösterimi Şekil 2.2'de verilmiştir (Byun ve Kim, 2023).



Şekil 2.2. Biyofilmin Yaşam Döngüsü (Byun ve Kim, 2023)

Yapısal çok hücreli bir bakteri topluluğu oluşturma ve sürdürme kabiliyeti, hücre dışı matriks bileşenlerinin üretimine kritik olarak bağlıdır (Limoli ve ark., 2015). Biyofilm gibi bir mikroorganizma topluluğu, vücudun doğal bağışıklık sistemine ve aynı zamanda antibiyotik ve biyositlere dirençli olan, hastalık yapıcı mikroorganizmalar tarafından oluşturulabilen en önemli patojenik stratejilerden biridir. Bu oluşum bakterilerdeki mekanik, biyokimyasal ve genetik faktörler aracılığıyla gerçekleşmektedir (Jain ve ark., 2013).

İşletmelerde sanitasyon uygulamalarına dayanıklı bir biyofilm, bakteriyel yayılma potansiyeline sahiptir. Gıda kaynaklı patojenler söz konusu olduğunda, kontaminasyon oluşturma potansiyeline sahip bakteriler, bir dezenfektan kullanıldıktan sonra bile ürün hatlarını kirletmeye devam edebilmektedir (Chavant ve ark., 2002). *L. monocytogenes* işletmelerde soğutucu zeminlerde, dondurucularda, proses odalarında, kasalarda, zemin paspaslarında ve süt endüstrisinde kullanılan endüstriyel yağlarda bulunmuştur (Moltz ve Martin, 2005). Paslanmaz çelik, cam, kauçuk ve plastikler *Listeria* biyofilmlerinin gelişebileceği yüzey çeşitleri arasında yer almaktadır (Finn ve ark., 2023). Bu tür yüzeylere yapışma işletme ortamında biyofilm oluşumunu tetikleyen faktörler arasında yer almaktadır (Moltz ve Martin, 2005). Substrat yüzeyinin pürüzlülüğü, hidrofobisite, film modülasyonu ve yüzey yükü gibi fiziko-kimyasal özellikler, planktonik bakteri kolonizasyonunun ve biyofilm oluşumunun verimliliğini etkileyebilmektedir. Hidrofobisite, bakteriyel mikroorganizmaların yüzeylere bağlanmasında hayati bir rol oynamaktadır (Zhao ve ark., 2023). Hidrofobik bir yüzey, muhtemelen hidrofobik etki nedeniyle, hidrofilik bir malzemeden daha fazla bakteriyel kolonizasyona elverişlidir; bu da bakteriyel hücre yüzeyi ile substrat arasındaki kuvveti azaltmaktadır (Yin ve ark., 2021; Zhao ve ark., 2023).

Cam veya paslanmaz çelik dahil olmak üzere hidrofilik yüzeylerle karşılaştırıldığında hücreler, hidrofobik ve polar olmayan yüzeylere (plastiklere) daha hızlı yapışabilmektedir (Trang ve ark., 2023).

Gelişme sıcaklığı ve gelişme fazı, *Listeria* hücrelerinde hücre duvarı bileşimini etkileyebilir ve böylece yüzeyin elektriksel özelliklerini, hidrofobikliğini ve bakterilerin elektron donörü veya elektron alıcı karakterini değiştirebilmektedir (Chavant ve ark., 2002).

Listeria monocytogenes biyofilmleri, sıcaklık gibi çevresel koşullara duyarlıdır ve sıcaklık değişiklikleri biyofilm oluşumunu etkileyebilmektedir. *Listeria*, hem düşük hem de yüksek sıcaklıklarda hayatta kalabilen bir bakteri türüdür, bu da onun biyofilmlerini gıda üretim ortamlarında özellikle tehlikeli hale getirmektedir. *Listeria* spp.'lerin pek çok çalışmada farklı sıcaklıklarda biyofilm oluşturabildiği gösterilmiştir (Lee, 2019; Chavant ve ark., 2002; Moltz ve Martin, 2005; Trang ve ark., 2023).

Yukarıda açıklanan substrat yüzey özelliklerine ek olarak, bakteri türlerinin yüzey özellikleri ve organelleri gibi birçok başka faktör de biyofilm oluşumunu etkilemektedir. Bakteriyel yüzey yükü ve yüzey hidrofobisitesi, özellikle ilk yapışma sırasında biyofilm oluşumunu kritik bir şekilde etkilemektedir. Dahası, kamçılar *L. monocytogenes* biyofilm gelişiminde çok önemlidir çünkü hücresel hareket ile birlikte ilk yapışma ve sonraki biyofilm oluşumu sırasında substrat yüzeyinin yakınında veya üzerinde bireysel ve kolektif yönelimi (dikeyleştirme dahil) sağlamaktadırlar (Gu ve ark., 2021).

Flagella aracılığı ile hareketliliğin, *L. monocytogenes* tarafından hem başlangıçtaki yüzeye tutunmasında (yüzey adezinleri olarak görev yapmaktadır) hem de daha sonraki biyofilm oluşumunda anahtar bir rol oynadığı bilinmektedir (Osek ve ark., 2022). *Listeria monocytogenes*'in hücre başına dört ila altı peritriköz kamçısı bulunmaktadır. Kamçı aracılığı hareketlilik, nasıl ki birkaç Gram negatif bakteri tarafından da biyofilm oluşumu açısından önemli ise *L. monocytogenes* için de kamçılar, erken yüzey tutunmasında yüzey adezinleri olarak rol oynamaktadır. Bu yetenek, özellikle daha az erişilebilir kör ve ölü noktalarda hijyenik uygulamaların yetersiz kalmasından dolayı bakterinin üretilen gıda ürünlerinde kalıcı kontaminasyonuna yol açmasını kolaylaştırabilmektedir (Doghri ve ark., 2021).

2.3. Bakteriyofajlar

Bakteriyofajlar, bakterilere özgü virüslerdir ve bu organizmalar zorunlu parazitler olarak kabul edilmektedirler (Tarhan ve ark., 2007; Brown, 1997; Hagens ve Loessner, 2010). Yaklaşık 100 yıl önce Frederick W. Twort (1915) ve Félix d'Hérelle (1917) tarafından keşfedilen bakteriyofaj, aynı zamanda faj terapisi fikrinin de ortaya çıkmasını sağlamıştır (Kawacka ve ark., 2020).

Bakteriyofajların ilk klinik uygulaması 1919'da Felix d'Hérelle tarafından yapılmış olup (*Shigella* faj kokteyli), Amerika Birleşik Devletleri'nde ilk bildirilen kullanım 1922'de gerçekleşmiştir. 1920'lerin başından 1930'ların sonuna kadar olan dönemde bakteriyofajların dünya çapında bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için kullanımında artış görülmüştür (Aswani ve Shukla, 2021).

1931'e gelindiğinde, Eli-Lilly&Co, E.R. Squibb&Sons ve Swan-Myers (Abbott Laboratories'in bir bölümü) gibi büyük ABD şirketleri terapötik kullanım için ticari faj preparatları üretmeye başlamıştır (Walker, 2006; Aswani ve Shukla, 2021). Straub ve Applebaum jel formunda olan Eli Lilly'nin ürünü ile sıvı filtratlar halinde olan E.R. Squibb&Sons ve Swan-Myers ürünleri olmak üzere bu üç şirketin ürünlerini değerlendirmiştir Ürünler *Staphylococcus* (stafilokok) ve *Escherichia coli* (kolon basili) tarafından neden olan enfeksiyonları tedavi etmek için tasarlanmıştır (Aswani ve Shukla, 2021).

1945 yılında penisilin için Fleming, Chain ve Florey'e Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü verilmesi, kimyasal antimikrobiyallerin bakteriyofajların yerini almasının bir habercisi olmuştur (Aswani ve Shukla, 2021). 1940'larda antibiyotiklerin öne geçmesine rağmen 20. yüzyılın başından beri bu alanda çalışmalarını sürdüren Eliava Bakteriyofaj, Mikrobiyoloji ve Viroloji Enstitüsü'nde (Tiflis, Gürcistan) ve Hirszfeld İmmünoloji ve Deneysel Terapi Enstitüsü (Wrocław, Polonya) olmak üzere pek çok araştırma enstitüleri hala bulunmaktadır (Kawacka ve ark., 2020).

Bakteriyofajlar (fajlar), konakçı olarak sadece bakterileri seçen ve enfekte eden virüslerdir. Bakteriyofajlar hem litik hem de lizojenik döngüde çoğalma yeteneğine sahip olup, özellikle bakteriyel enfeksiyonların kontrolünde kullanılmaktadır. Bu kullanım, fajların spesifik bakterilere karşı hedeflenebilme yeteneğini göstermektedir. Ayrıca, fajların genetik materyali bakteriyel kromozoma entegre olabilmektedir ve bu durum fajların bakterilerle daha karmaşık bir etkileşim kurmasına olanak tanımaktadır (Ackermann, 2007; Clokie ve Kropinski, 2009).

Fajlar, konak hücrelerle etkileşimlerine bağlı olarak litik veya lizojenik olarak sınıflandırılabilen iki farklı yaşam döngüsü sergilemektedir. Litik döngüde bakteriyi enfekte eden fajlar konak hücreye girdikten sonra, faj litik enzimlerinin birikmesi sonucu konak hücreden salınan çok sayıda fajın üretilme sürecini başlatmaktadır ve konak hücrenin ölümüne neden olmaktadır. Buna karşılık, lizojenik döngüde, fajlar genomlarını konakçılarına entegre etmektedir ve konakçıyı öldürmeden bakteriyel yaşam döngüsü ile çoğalmaktadırlar (Kawacka ve ark., 2020). Antimikrobiyal amaçlı kullanılan fajların genellikle litik döngüde olması istenmektedir. Çünkü bu döngü bakteriyi enfekte ederek ölmesine neden olmaktadır. Bu sayede, fajlar bakter kaynaklı enfeksiyonların yayılmasını önleyebilmektedirler (Brüssow ve ark., 2004; Moye ve ark., 2018).

Bakteriyofajlarda lizojenik döngüye geçiş, bakteriyofajın konakçı bakteriyi öldürmeden DNA'sını bakteriyel kromozoma entegre ettiği ve sessiz kaldığı bir süreçtir. *Listeria monocytogenes* ile ilişkili bakteriyofajlar, genellikle çevresel koşulların elverişli olduğu durumlarda lizojenik döngüye girmektedirler (Loessner, 2005; Carlton ve ark., 2005). Lizojenik döngüdeki fajlar, bakteriyel genlerin yatay transferini sağlayabilmektedirler ve bakterilere yeni özellikler kazandırabilmektedirler. Bu özellikler, bakteriyi daha virülent hale getirebilmektedir veya bakterinin antibiyotiklere karşı direnç kazanmasına neden olmaktadır. *Listeria*

monocytogenes ile ilişkili fajlar her iki döngüyü de izleyebilmektedir (Brüssow ve ark., 2004; Moye ve ark., 2018).

Bakteriyofajlar özellikle *Listeria monocytogenes* gibi bakterilerde lizojenik döngüden litik döngüye geçebilmektedirler. Bu geçiş süreci "indüksiyon" olarak adlandırılmaktadır ve belirli çevresel stres faktörleri veya uyarıcılar nedeniyle gerçekleşmektedir. Bu geçiş mekanizması, özellikle bakteriyofaj terapisinde oldukça önemlidir, çünkü tedavi amaçlı kullanılan fajların genellikle litik döngüde olması gerekmektedir. Lizojenik döngüde, bakteriyofajın DNA'sı konakçı bakterinin kromozomuna entegre olur ve bu durumda "profaj" olarak adlandırılır. Bu aşamada, faj bakteriye zarar vermez. Ancak belirli koşullar altında (örneğin, UV ışığı, kimyasal ajanlar veya hücrede oluşan DNA hasarı gibi stres faktörleri), profaj aktif hale gelerek litik döngüye geçiş yapabilir. Bu geçiş sırasında faj DNA'sı, bakteriyel kromozomdan ayrılır ve faj genomu, litik döngünün adımlarını başlatarak yeni faj partiküllerinin üretilmesini sağlar. Sonuç olarak, fajlar, bakteriyi parçalayarak (lizis) serbest kalır ve çevredeki diğer bakterileri enfekte edebilir (Loessner, 2005; Carlton ve ark., 2005; Fortier ve Sekulovic, 2013).

Fajların gıdalarda bol miktarda bulunduğu ve çok çeşitli çiğ ürünlerden (örn. sığır eti, tavuk), işlenmiş gıdalardan (örn. bisküvi hamuru, kızarmış hindi, turtalar), deniz ürünlerinden (örn. istiridye ve midye) ve fermente ürünlerden (örn. yoğurt, peynir) izole edilebildiği bazı çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu durum, fajların bakteriyel konaklarının yaşadığı veya bir zamanlar bulunduğu ve aynı ortamlarda bulunabileceğini ve fajların insanlar tarafından günlük olarak tüketildiğini göstermektedir (Carlton ve ark., 2005; Sillankorva ve ark., 2012).

2.4. Çeşitli Gıda Örneklerinden *Listeria* spp. İzolasyonu Üzerine Yapılan Çalışmalar

Alsheikh ve ark (2013) Sudan'da restoranlardan satın alınan tavuk ürünlerinde *Listeria* spp. taraması yapmışlardır. Buna göre 250 adet örnekte 95'inde (%3) *Listeria* spp. tespit edilmiştir. Tür bazında incelenen *Listeria* spp. izolatların %13,6'sının *L. monocytogenes,* % 0.8'inin *L. seeligeri,* % 1.6'sının *L. grayi*, % 20,8'inin *L. ivanovi* ve % 1,2'sinin *L. welshimeri* olduğu tespit edilmiştir.

Alsheikh ve ark (2014) Sudan'da materyal olarak dondurulmuş tavuk örnekleri kullandıkları çalışmada 800 örneğin ISO metoduna göre *Listeria* spp. açısından incelemesini yapmışlardır. Beş farklı tavuk mezbahasından alınan örneklerin beş yüz adedi dondurulmuş (-18º) çiğ piliç örneği, üç yüz adedi ise taze, -18ºC ve şok dondurulmuş (-40ºC) çiğ piliçten oluşmaktadır. Tavuk mezbahasından alınan 500 örneğin 195'inin (%39) *Listeria* spp. ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Tür bazında yapılan tanımlamalara göre ise 64 örnekte *L. monocytogenes* (%12,8), 97 örnekte *Listeria ivanovii* (%19,4), 20 örnekte *Listeria grayi* (%4), 5 örnekte *Listeria seeligeri* (%1), 9 örnekte *Listeria welshimeri* (%1,8) tespit etmişlerdir. 300 örnekten oluşan çalışma grubunda ise örneklerin 111 adedinde (%37) *Listeria* spp. bulunmuştur.

Buna göre örneklerin 39 adedi *Listeria monocytogenes* (13%), 54 adedi *Listeria ivanovii* (18%), 11 adedi *Listeria grayi* (3,6%), 3 adedi *Listeria seeligeri* (1%) ve 4 adedi *Listeria welshimeri* (1,3%) olarak belirlemişlerdir.

Var ve ark (2014) 21 farklı marketten ve 3 farklı tavuk kesimhanesinden temin ettikleri toplam 160 örneği [haşlama suyu, tavuk parçaları (kanat, but, göğüs), tüm tavuk karkası, yıkama suyu] *Listeria* spp. açısından incelemişlerdir. Çalışma sonucuna göre 160 örneğin 90'ından *Listeria* spp. izole edildiği bildirilirken, insan patojeni olarak bilinen *L. monocytogenes*'in %23,6 oranında bulunduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, tavuk kesimhanelerinden aldıkları örneklerdeki *Listeria*'ları %33,3, %31,94, %8,33 ve %2,77 olarak sırasıyla *L. innocua, L. welshimeri, L. seeligeri* ve *L. ivanovii* olarak tanımlamışlardır.

Siqueira ve ark (2017) tarafından Brezilyada yürütülen çalışmada 10 farklı gıda marketinden, gıda işleme alanlarının farklı noktalarından (ekipman, mutfak gereçleri ve yüzeyler) alınan toplamda 86 adet swab örneğinde inceleme yapılmıştır. Marketlerin 8'inden izole edilen örneklerin 27'si (%31,2) *Listeria* spp. açısından pozitif bulunmuş ve sadece bir örnekte (%3,7) *Listeria monocytogenes* olduğu belirlenmiştir. Başlıca kontaminasyon bölgeleri zemin (%50,0), plastik kesme tahtası (%42,9) ve bıçak (%40,0) olarak belirlenmiştir.

2.5. Çeşitli Gıda ve Çevre Örneklerinden İzole Edilen *Listeria* spp.'lerin Biyofilm Oluşturma Yetenekleri ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Gıda işleme ortamlarında kullanılan malzemeler üzerinde *Listeria monocytogenes*'i de içeren türlerin bir araya gelmesi ile farklı mikrobiyal topluluklar bulunabilmektedir (Lake ve ark., 2024). Biyofilm yapısının karmaşıklığı, bunları incelemek için bir dizi mikroskobik tekniğin geliştirilmesini olanak sağlamaktadır. Örneğin biyofilm yapılarının araştırılması için atomik kuvvet mikroskobu (AFM), geniş alanlı floresan mikroskobu (WFM) ve Scanning Elektron Mikroskobu (SEM) önemli detayların incelenmesine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, konfokal lazer tarayıcı mikroskobu (CLSM) yerinde ve in vivo üç boyutlu biyofilm optik görüntülemeye olanak sağlamaktadır (Mosquera-Fernández ve ark., 2016). Chavant ve ark (2002) gıda endüstrisinde en sık kullanılan malzemelerden olan paslanmaz çelik (hidrofilik yüzey) ve politetrafloroetilen (PTFE) yüzeyde (hidrofobik) *L. monocytogenes* LO28 biyofilmlerinin oluşumlarını incelemişlerdir. Buna göre çalışma taramalı elektron mikroskobu, epifloresan mikroskobu ve hücre sayımı ile izlenen bu süreçte inkübasyon sıcaklığı ne olursa olsun suşun her iki yüzeyde (hidrofilik ve hidrofobik yüzey) de çoğalabilmesi konusunda büyük bir kapasiteye sahip olduğunu, ancak hidrofilik yüzeyde biyofilm oluşumunun daha hızlı geliştiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca 8°C'de paslanmaz çelik üzerinde yalnızca bakteriyel tek bir katman görünürken, PTFE üzerinde hiçbir büyüme gözlemlenmediği belirtilmiştir. 37°C veya 20°C'de 5 gün sonunda biyofilm yapısının üç boyutlu şekilde kümeleştiğini ancak 37°C'de PTFE üzerinde önemli bir kopmanın meydana geldiği görülmüştür. Stepanovic ve ark (2004)

yaptıkları çalışmada 48 adet *Listeria monocytogenes* ve 122 adet *Salmonella* spp. bakterisinin plastik ortamlarda biyofilm oluşturma özelliğini kontrol etmişlerdir. Bu çalışmaların sonucuna göre kullanılan *L. monocytogenes* ve *Salmonella* spp. suşlarının uygun ortamda biyofilm oluşturduğunu ancak *Salmonella* spp.'nin *L. monocytogenes* bakterisine göre daha iyi biyofilm oluşturduğunu belirtmişlerdir. Ortamın besin içeriğinin üretilen biyofilm miktarını önemli ölçüde etkilediğini göstermişlerdir. Buna göre seyreltilmiş TSB (1:20), *Salmonella* spp. tarafından biyofilm üretimini teşvik etmede en etkili besiyeri olup bunu TSB besiyerinin takip ettiğini iletmişlerdir. En az biyofilm miktarı ise BHI ve MB'de oluşturulmuştur. *L. monocytogenes* ise BHI'de en yüksek miktarda biyofilm üretmiş, bunu sırasıyla TSA ve MB izlemiş; en az miktarda biyofilm ise seyreltilmiş TSB (1:20)'de üretilmiştir.

Moltz ve Martin (2005) sıcaklığın ve yüzeyin *Listeria* biyofilm oluşumu üzerine etkisini inceledikleri çalışmada 3 farklı sıcaklıkla ve paslanmaz çelik yüzeyde deneme yapmışlardır. Buna göre durağan fazdaki hücreler paslanmaz çelik test çubuklarına *Listeria* inokülasyonunun ardından bu hücreler 4°C, 20°C ve 37°C'lerde inkübasyona bırakılmıştır. Test çubuklarının yüzeyinden 2 ila 96 saat arasında belli aralıklarla eküvyon ile örnek alınmış ve 48°C'de inkübe edilen test çubukları her 24 saatte bir temizlenmiştir. 14 gün boyunca aynı hücre konsantrasyonuyla muamele edildiğinde 20°C'de (her bir test çubuğunda 5,50 log kob) ve 37°C'de (her bir test çubuğunda 4,66 log kob) büyütülen biyofilmlerde farklılıklar gözlenmiştir (5 log). 4°C'deki tutunma ise 37°C'ye göre oldukça az olduğu belirtilmiştir. Biyofilmlerdeki *Listeria* hücrelerinin sayısı, hem 20°C hem de 37°C'de inkübasyon süresi arttıkça arttığını ve 24 saatlik inkübasyonun ardından benzer konsantrasyonlara ulaştığını belirtmişlerdir.

Lee ve ark (2019) *Listeria monocytogenes* biyofilm oluşumunu ve bu oluşumu etkileyen genleri belirledikleri çalışmalarında tuz ilavesinin ve besin yoksunluğunun biyofilm üretimi üzerinde dramatik, doğrusal olmayan kümülatif etkisini ortaya çıkarmışlardır. NaCl'nin biyofilm olgunlaşması üzerindeki olumlu etkisinin besin eksikliği ile önemli ölçüde zayıflatıldığını bildirmişlerdir. Mao ve ark (2023) çalışmalarında Çin'de bir kıyı kentinde kumdan izole edilen *Listeria* türlerinin genetik ve fenotipik özelliklerini araştırmışlardır. 5 farklı sahil kıyısında yapılan çalışmada 769 kum örneği bu kapsamda incelenmiş, 26 örnek *Listeria* spp. suşuna ait olup 16 örneğin (2,08%) *L. monocytogenes* olduğu belirlenmiştir. İzolatlar arasında özellikle baskın olan *Listeria monocytogenes* ST87 suşunun *L. fleischmannii* türüne oldukça benzer özelliklerde bulunduğu ve deniz suyunda önemli ölçüde üstün biyofilm oluşumu sergilemiş olduğu gözlenmiştir.

Trang ve ark (2023) Japonya'da Pangasius balık işleme tesislerinden izole edilen kırk beş *Listeria monocytogenes* suşunu 96 kuyucuklu mikroplaka üzerinde biyofilm oluşturma kapasitesinin anlaşılması ve bunun nasıl kontrol edileceği konusu açısından incelemişlerdir. Buna göre, *L. monocytogenes* üzerine yaptıkları çalışmada; 10°C, 16°C ve 30°C'de 1, 4 ve 7 gün değerlendirilen 45 *L. monocytogenes* suşunun tamamında ortalama OD değerinin, artan sıcaklık

ve uzun inkübasyon süreleri ile artmış olduğunu gözlemişlerdir. Elde edilen bu sonuç, *L. monocytogenes*'in en yüksek biyofilm kütlesinin 30°C'de 7 gün boyunca 0,9 ± 0,06 olduğunu ortaya koymuşlardır.

Biyofilmler içindeki suşların varlığı, bolluğu ve çeşitliliği, karşılıklı etkileşimlerden ve düzenli temizlik ve dezenfeksiyon prosedürlerine karşı dirençteki farklılıklardan etkilenmektedir. Lake ve ark (2024) Hollanda'da mantar prosesi tesisinde yürüttükleri çalışmada polivinil klorür (PVC) ve paslanmaz çelik (SS) üzerinde biyofilm oluşumu sırasında *L. monocytogenes* suş kokteylinin büyümesini ve çeşitliliğini, bulundukları çevrenin mikrobiyotası ele alınarak bu çevredeki mikroorganizmalar kümesinin varlığı ve varlığı olmadan karakterize etmeyi amaçlamışlardır. Temizleme ajanı olarak klorat içerikli alkalin malzeme, dezenfeksiyon uygulaması için perasetik asit ve hidrojen peroksit karışımı içerik kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan kuponlar üzerinde yapılan çalışmaya göre her temizlik ve dezenfeksiyon işleminden sonra kuponlar, toplam 8 günlük bir inkübasyon süresi boyunca iki gün boyunca yeniden inkübe edilmiş ve biyofilmlerin paslanmaz çelik kupondan etkili bir şekilde uzaklaştırılmasıyla veya azalmasıyla sonuçlanmıştır (4,5 log kob/cm^2 veya daha az azalma). PVC üzerinde oluşturulan biyofilmler ise temizlik ve dezenfeksiyon uygulamalarına rağmen sınırlı azalmalarla sonuçlanmıştır (1,2 ve 2,4 log kob/cm^2 arasındaki azalmalar).

Rolon ve ark (2024) çalışmalarında meyve paketleme tesisinden izole ettikleri ve seçilmiş çevresel mikrobiyotanın biyofilm oluşumu ve oluşan biyofilmlerde *L. monocytogenes*'in benzalkonyum klorüre toleransı üzerindeki etkisini belirlemişlerdir. Bu nedenle Kuzeydoğu ABD'de 901 bakteri izole edilmiş ve bunlardan rastgele seçilen 510 izolat üzerine 16S rRNA PCR ile tanımlama yapmışlardır. *L. monocytogenes'*in biyofilmlerdeki konsantrasyonunu en muhtemel sayı yöntemi kullanılarak belirlemişlerdir. Meyve paketleme tesislerinin çevre örneklerinden sırasıyla toplam 25 *Pseudomonadaceae* (8 suş), *Xanthomonadaceae* (8 suş), *Microbacteriaceae* (6 suş) ve *Flavobacteriaceae* (3 suş) familyalarına ait suş izole etmişler ve çalışmalarında kullanmışlardır. *Pseudomonadaceae, Xanthomonadaceae* ve tüm çok aileli topluluklar tarafından oluşturulan biyofilmler, tek başına *L. monocytogenes* tarafından oluşturulan biyofilmlerle karşılaştırıldığında, *L. monocytogenes* tarafından oluşturulan biyofilmin önemli ölçüde daha yüksek bakteri konsantrasyonuna sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgular, *L. monocytogenes* kontrol stratejilerinin yalnızca etkinliğin değerlendirilmesine odaklanmaması gerektiğini göstermektedir. *L. monocytogenes*'e karşı dezenfektanların kullanımı, aynı zamanda *Pseudomonadaceae* veya *Xanthomonadaceae* gibi gıda işleme ortamında bulunan biyofilm oluşturan mikroorganizmaların da dikkate alınmasını gerektirmektedir.

Silva ve ark (2024) Portekiz'de 2014-2022 yılları arasında toplanan gıda ve ilgili çevresel ürünlerde *L. monocytogenes*'in varlığını ve genetik çeşitliliğini değerlendirmek, antibiyotik duyarlılığını ve biyofilm oluşturma yeteneklerini araştırmak istemişlerdir. Bulgular,

gıda ürünlerinde ve gıdayla ilişkili ortamlarda *L. monocytogenes* suşlarının varlığının altını çizmekte ve bu suşların antibiyotiklere ve aynı zamanda dezenfektanlara ve antiseptiklere karşı direnç genleriyle ilişkili yüksek virülansını ortaya koymaktadır.

Yang ve ark (2024) yaptıkları çalışmada, *L. monocytogenes* biyofilm oluşumuna katkıda bulunan faktörleri araştırmışlar ve daha güçlü hücre dışı polimer salgılaması ve kendi kendine aglütinasyon yetenekleri olan suşların biyofilm oluşturma konusunda daha belirgin bir yetenek sergilediğini göstermişlerdir. Ayrıca biyofilm oluşumundan sonra hücrelerin adezyonunun ve istilasının arttığını dolayısı ile ilaç direncinin de arttığı belirlenmiştir. Bu nedenle biyofilm oluşumunun *L. monocytogenes*'i daha patojenik hale getirdiğini ve antibiyotiklerle ortadan kaldırılmasını daha zor hale getirdiği düşünülmektedir. RT-PCR kullanarak, quorum sensing (QS), flagellar sentez ve hücre dışı polimer üretiminde rol oynayanlar da dahil olmak üzere biyofilm oluşumuyla ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerini de bu çalışmada tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Tüm bu bulguların hücre dışı polimerler, kendi kendine aglütinasyon yetenekleri ve biyofilm oluşumu arasındaki kritik ilişkinin altını çizmekte olduğunu bildirmişlerdir.

2.6. *Listeria* Fajları İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Kim ve ark (2008) yaptıkları çalışma ile Amerika Birleşik Devletleri'ndeki dört hindi işleme tesisinden alınan çevresel örneklerden *Listeria*'ya özgü fajların izolasyonunu araştırmışlardır. Toplam 113 örnekte on iki faj izole edilmiş olup bunlardan dokuzu, *Listeria monocytogenes*'in çoklu serotiplerinin yanı sıra diğer *Listeria* spp. (*L. innocua, L. welshimeri, L. seeligeri ve L. ivanovii*) şeklinde geniş bir konukçu yelpazesine sahip olduğu bildirilmiştir. Kalan fajların çoğunlukla *L. monocytogenes* serotip 4b'nin yanı sıra *L. innocua, L. ivanovii* ve/veya *L. welshimeri*'yi enfekte ettiğini iletmişlerdir. İşleme tesisi ortamından serotip 4b kompleksinin (4b, 4d, 4e) suşlarından biri hariç tümü, işleme tesislerinin ortamından izole edilen geniş konakçı-fajlar tarafından kolayca enfekte olabildiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, çevresel örneklerden izole edilen *L. monocytogenes* suşlarının çoğunluğunu temsil eden diğer serotiplerin (1/2a [veya 3a] ve 1/2b [veya 3b]) birçok suşu, bu fajların neden olduğu enfeksiyona dirençli olduğunu ve faja dirençli iki suşla yapılan deneylerde konakçı hücrelere azalmış faj adsorpsiyonu gösterdiğini iletmişlerdir.

Arachchi ve ark (2013) tarafından Yeni Zelanda'da deniz ürünleri işleme ortamlarından izole edilen 3 virülant psikrotrofik *Listeria* fajlarının karakteristiklerinin incelendiği çalışmada fajların geniş konukçu aralıklarına ve düşük üretken replikasyona sahip oldukları gözlemlenmiştir. Deniz ürünleri işleme ortamlarından izole edilen üç virülan psikrotrofik fajın geniş konakçı aralıkları ve düşük üretken replikasyonları gözlemlenmiştir. Bu özellikler, fajların deniz ürünleri kaynaklı *L. monocytogenes*'e karşı uygun pasif biyokontrol ajanları olabileceğini düşündürmektedir. Silva ve ark. (2014), yumuşak peynirlere inoküle edilen *L. monocytogenes* suşları üzerine bakteriyofaj P100 etkisini çalışmışlardır. Bu amaçla Minas Frescal ve Coalho

peynirlerine *L. monocytogenes* 10^5 kob/g oranında 1/2a and Scott A suşları karışımını inoküle etmişlerdir. Ardından 8,3 x 10^7 pob/g oranında bakteriyofaj eklemişlerdir. İnokülasyonu takiben uygulamadan 30 dakika sonra kontrol örneği ile karşılaştırma yapıldığında bakteriyofaj Listex™ P100'ün Coalho peynirinde 2,1 log birim azalma, Minas Frescal peynirinde ise 2,3 log birim azalma sağladığını belirlemişlerdir. Ancak, bakteriyofaj Listex™ P100'ün buzdolabında saklanan örneklerde daha zayıf bir anti *Listerial* etki gösterdiğini (en düşük azalma Minas Frescal peynirinde 1,0 log birim, Coalho peynirinde 0,8 log birim) tespit etmişlerdir.

George ve ark (2014) tarafından Hindistan'da üç farklı kasabadan alınan fekal örneklerle yapılan çalışmada 110 örnekten 18'inde *Listeria* spp. pozitif izolatlar elde edilmiştir. Konak kullanılan hücre *Listeria monocytogenes* (MTCC-1143) olarak seçilmiştir.

Iacumin ve ark (2016) yılında yaptıkları çalışmada Listex™ P100 bakteriyofajının hem sıvı kültür ortamında hem de kürlenmiş jambon eti yüzeyinde *Listeria monocytogenes*'in 5 serotipine (i.e., Scott A, 1/2a, 1/2b, ve 4b) anti-*Listeria*l aktivitesini gözlemlemişlerdir. En iyi sonuçların 4°C'de alındığını, kürlenmiş jambon etinde 5-8 log pob/cm^2 konsantrasyonun kayda değer bir azalma için gerekli olduğunu, ayrıca faj P100'ün, kürlenmiş jambon üretiminde kullanılan makine yüzeylerindeki serbest *L. monocytogenes* hücrelerini ve biyofilmlerini elimine ettiğini bildirmişlerdir.

Tokman ve ark (2016) dört *Listeria* fajının (*Listeria*'nın P70-benzeri ve P100-benzeri fajlarından ikişer adet) 7–37°C sıcaklık aralığında gelişmiş 1/2a, 1/2b, 4a ve 4b serotiplerinden oluşan beş *L. monocytogenes* suşuna karşı etki potansiyelini incelemişlerdir. Dört fajın tümü için plak oluşturma verimliliklerinin sıcaklıktan önemli ölçüde etkilendiği ancak 37°C'de dört fajın hiçbirinde plak gözlemlenmediği bildirilmiştir. P100-benzeri fajlar, LP-048 ve LP-125 ile gerçekleştirilen adsorpsiyon deneyleri, LP-048'in 30°C'ye kıyasla 37°C'de duyarlı suşlara karşı ciddi şekilde azaltılmış bir adsorpsiyon verimine sahip olduğunu göstermiştir.

Lee ve ark (2017) yılında tavuk dışkılarından izole ettikleri LMP1 ve LMP7 fajlarının *L. monocytogenes*'in çeşitli suşları (*L. monocytogenes* ATCC 7644, 15313, 19114 ve 19115) üzerine litik etkilerini inceledikleri çalışmada bakteriyofajların *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve 19114 suşlarının gelişimini inhibe ettiğini ve her iki fajın *Siphoviridae* familyasına ait olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca dondurulmuş ürünlerde kullanımını değerlendirmek amacıyla süt ürünlerinde çalışma yapılmış ve bu çalışmanın sonucuna göre iki bakteriyofajın, farklı konakçı özgünlükleri ve özellikleri sergilemeleri nedeniyle gıda endüstrisinde *L. monocytogenes*'i kontrol etmek için faj kokteylinin bir bileşeni olarak kullanılabileceğini önermişlerdir.

Stone ve ark (2020) İrlanda'da yaptıkları çalışmada, *L. monocytogenes* faj P61'in biyolojik ve genomik karakterizasyonunu ve yapay olarak kontamine olmuş gıdalarda *L. monocytogenes*'in yükünün azaltımasına yönelik uygulama yaptıklarını bildirmektedirler. Buna göre *Herelleviridae* familyasına ait ve genom boyutu 136.485 bp olan virülent bir bakteriyofaj

P61 izole ettiklerini bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada faj P61'in litik spektrumu araştırılmış ve 1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b, 4e ve 6a serotiplerini enfekte ettiği gösterilmiştir. 8 ve 12°C'de saklanan yapay kontamine süte faj P61 ile muamele edilmesi, ürünün raf ömrü boyunca *L. monocytogenes* sayılarında önemli bir azalma ile sonuçlanmıştır. Benzer şekilde, faj P61, 8, 12 ve 25°C'de saklanan yapay olarak kontamine bebek ıspanakta *L. monocytogenes* sayısını azaltmıştır. Elde edilen araştırma bulguları ile, *L. monocytogenes*'in faj P61 ile biyokontrolünün, belirli tüketime hazır gıdalarda *L. monocytogenes* sayılarının azaltılması için güvenli ve çevre dostu bir yaklaşım olarak sunulabileceğini göstermişlerdir.

Zhou ve ark (2020) yaptıkları çalışmada *L. innocua* ve *L. welshimeri*'nin yanı sıra *L. monocytogenes*'i de lize edebilen geniş konakçı aralıklı bir *Listeria* fajı (vB-LmoM-SH3-3) izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bu fajın hem *Listeria* hücreleri (30 *L. monocytogens*, 4 *L. innouca* ve 11 *L. welshimeri*) üzerine vejetatif etkilerini hem de biyofilmleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. *L. innocua*'nın patojenik özelliklere sahip olmasa da virülans ve dirençle ilgili genlerin kaynağı olabileceğini ve patojenik bakterilere aktarılabilecek direnç genleri için bir kaynak oluşturabileceği düşüncesiyle çalışma kurgulanmıştır. Çalışma sonuçlarına göre *L. monocytogenes* biyofilminin 10^6 pob/mL'lik düşük konsantrasyonlu faj muamelesinden sonra inhibe edildiği gösterilmiştir. Bu sonuç da SH3-3 fajının *L. monocytogenes*'in biyofilm oluşumuna karşı etkili olduğunu düşündürtmüştür. Fajın genom düzeyinde dizilim ve büyüklüğünü göstermek için analizler de yapılmıştır.

Li ve ark (2022) Çin'de 3 farklı tavuk işletmesinden alınan atık sularda yapılan analizler sonucunda LP8 fajı izole edilmiştir. Tam genom dizilimi, LP8'in genom boyutunun 87.038 bp olduğunu ve 120 gen içerdiğini gösterrmişlerdir. Fareler üzerinde yapılan çalışmaya göre LP8 ve antibiyotik kombinasyonunun, fajın tek başına olan etkisinden daha etkili bulunmuş ve aynı zamanda faj ilavesinin antibiyotik kullanımını azaltabileceği ve direnci azaltma ve sınırlama etkisine ulaşabileceği bildirilmiştir.

Byun ve ark (2022a) çalışmalarında kereviz ve enoki mantarlarında *L. monocytogenes*'e karşı bir biyokontrol ajanı olarak bir bakteriyofaj kokteylinin etkinliğini değerlendirmişlerdir. Buna göre sırasıyla kanalizasyon, nehir ve topraktan izole etmiş oldukları LMPC01, LMPC02 ve LMPC03 litik fajlarının morfolojik gözlemi sonrasında bu fajları *Myoviridae* (LMPC01 ve LMPC02) veya *Siphoviridae* (LMPC03) ailesine ait olarak sınıflandırılmışlardır. İzole edilen fajların, *L. monocytogenes*'e karşı litik aktivite gösterdiği ve benzer adsorpsiyon oranları (30 dakika içinde %90 adsorpsiyon), latent dönemleri (sırasıyla 69,5; 20,3 ve 93,0 pob/kob patlama hacmi ile 50 dakika) ve hayatta kalma (4 ila 50°C arasındaki sıcaklıklarda ve pH 4-10'da) sürelerinde benzerlik olduğu belirtilmiştir. In vitro lizis kinetiğine göre, faj kokteylinin belli konsantrasyon düzeyinde (MOI=10) *L. monocytogenes*'in büyümesini 30°C'de 24 saat boyunca tutarlı bir şekilde inhibe edebildiğini göstermişlerdir.

Elsayed ve ark (2023) yılında süt sığırı çiftliklerinde dirençli *L. monocytogenes* bakterileri ile mücadelede araştırdıkları bakteriyofaj çalışmalarında, 32 adet silaj ve 32 adet gübre örneğinde altı farklı fenotipte LMP fajı izole etmişlerdir. Fajları LMP1, LMP2, LMP3, LMP4, LMP5 ve LMP6 olarak isimlendirmişler ve hem doğrudan faj izolasyonu hem de ön zenginleştirme yöntemi ile izolasyon gerçekleştirmişlerdir. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile görüntüleme sonrasında izole edilmiş fajların üç farklı familyaya *Myoviridae* (LMP2, LMP4 ve LMP6), *Siphoviridae* (LMP1 ve LMP5) ve *Podoviridae* (LMP3)] ait olduğunu belirlemişlerdir

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırmada, Çukurova bölgesinde faaliyet gösteren gıda işletmelerinden (tavuk, süt ve meyve sebze işleme), marketlerden, pazar yerlerinden, sulama kanallarından, nehirlerden, çiftliklerden ve çevreden izole edilen vejetatif *Listeria* hücreleri ile laboratuvar ortamında çeşitli yüzeylerde geliştirilmiş *Listeria* biyofilmleri materyal olarak kullanılmıştır. Toplam 154 örnek ile çalışmalar yapılmıştır.

Listeria izolasyonu hedef alınarak yürütülen çalışmada 12 su örneği ve 66 gıda örneği ile çalışılmıştır. Çizelge 3.1.'de bu çalışmanın örnekleme detayları verilmiştir. Seçilen bu örnekler Adana ve Osmaniye illerinde faaliyet gösteren işletmeler, semt pazarları ve marketlerden alınmıştır.

Çizelge 3.1. *Listeria* spp. izolasyonu amacıyla alınan örneklerin lokasyon, örnek sayısı ve örnek alınan dönem bilgileri

Malzeme	**Lokasyon**	**Örnek Sayısı**	**Dönem**
Tavuk eti ve yıkama/haşlama suyu	Adana İşletme AŞ	7	Ocak 2014
Tavuk eti ve yıkama/haşlama suyu	Adana İşletme AŞ	7	Mayıs 2014
Tavuk eti ve yıkama/haşlama suyu	Adana İşletme AB	7	Ocak 2014
Tavuk eti ve yıkama/haşlama suyu	Adana İşletme AB	7	Mayıs 2014
Tavuk eti ve yıkama/haşlama suyu	Adana İşletme AF	7	Ocak 2014
Tavuk eti ve yıkama/haşlama suyu	Adana İşletme AF	7	Mayıs 2014
Kuruyemiş Örnekleri/Pazar Yeri-Market	Adana-Osmaniye	36	Haziran 2015
Toplam		**78**	

Listeria ve *Listeria* bakteriyofaj izolasyonu çalışmasına ait örnekleme detayları ise Çizelge 3.2.'de verilmiştir. Bu çalışmaya göre 6 yıkama suyu (tavuk işletmesi chiller) örneği, 27 hayvan (büyükbaş) yemi (silaj/küspe/yem/saman), 4 sulama kanalı su örneği, 10 nehir suyu, 12 atık su örneği, 5 fekal örnek, 2 lağım suyu örneği, 6 hayvan (büyükbaş) gübresi örneği, 2 gıda (balık parçaları) atığı, , 2 gıda atığı (balık atıkları) olmak üzere toplam 76 örnek analiz edilmiştir.

Çizelge 3.2. *Listeria* spp. ve bakteriyofaj izolasyonu amacıyla alınan örneklerin lokasyon, örnek sayısı ve örnek alınan dönem bilgileri

Malzeme	**Lokasyon**	**Örnek Sayısı**	**Dönem**
Tavuk işletme yıkama suları/chiller suyu	Adana Merkez	6	Ekim 2019
Buzağı Çiftliği, silaj	Adana Merkez	2	Ekim 2019
Sulama Kanalı	Adana Merkez	4	Ekim 2019
Nehir Suyu (Seyhan Nehri)	Adana Merkez	2	Ekim 2019
Meyve Sebze İşleme (Atık su)	Karaman	2	Ocak 2020
Buzağı Çiftliği, silaj	Adana Merkez	2	Kasım 2020
Buzağı Çiftliği, fekal örnek	Adana Merkez	2	Kasım 2020
Tavuk çiftliği, fekal örnek	Adana Sarıçam	2	Kasım 2020
Sulama Kanalı, lağım suyu	Adana İmamoğlu	2	Kasım 2020
Tavuk işletme yıkama atık suları	Adana İşletme A	2	Aralık 2020
Tavuk işletme yıkama atık suları	Adana İşletme B	2	Aralık 2020
Tavuk işletme yıkama atık suları	Adana İşletme D	2	Aralık 2020
Süt işletme yıkama atık suyu	Adana İşletme E	2	Aralık 2020
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (silaj saman gübre)	Adana Merkez	4	Aralık 2020
Dere Suyu	Adana Merkez	1	Aralık 2020
Göl Suyu	Adana Merkez	1	Aralık 2020
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (silaj saman gübre)	Adana Merkez	3	Aralık 2020
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (silaj saman gübre)	Adana Merkez	3	Aralık 2020
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (saman yem tezek)	Adana Merkez	3	Ekim 2022
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (saman)	Adana Merkez	1	Ekim 2022
Üniversite Çiftliği, silaj	Adana Sarıçam	3	Ekim 2022
Atık su tesisi	Adana Merkez	1	Ekim 2022
Süt işletme yıkama atık suyu	Adana Sarıçam	1	Ekim 2022
Köy evleri (silaj, pancar küspesi)	Adana Ceyhan	2	Ekim 2022
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (gübre -saman)	Adana Ceyhan	2	Haziran 2023
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (gübre -saman)	Adana Ceyhan	2	Haziran 2023
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (gübre)	Adana Merkez	1	Haziran 2023
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (silaj yeni)	Adana Merkez	1	Haziran 2023
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (silaj eski)	Adana Merkez	1	Haziran 2023
Balık çiftliği, göl suyu	Adana Merkez	2	Haziran 2023
Köy evleri (gübre-silaj)	Adana Ceyhan	4	Haziran 2023
Nehir Suyu (Seyhan)	Adana Merkez	2	Haziran 2023
Durgun Nehir Suyu (Seyhan)	Adana Merkez	2	Temmuz 2023
Kasaplar çarşısı (kırmızı et, balık parçaları)	Adana Merkez	4	Temmuz 2023
Toplam		**76**	

Micreos Food Safety (Hollanda) firmasından ve Canterbury Üniversitesi Çevre Bilimleri ve Araştırma Enstitüsü (Yeni Zelanda)'nden temin edilen iki farklı *Listeria* bakteriyofajı (Listex^{TM} P100 ve FMWLLM3) ile çalışmalar yapılmıştır. Bunun yanı sıra *Listeria* izolasyonlarının yapıldığı ortamlardan *Listeria* bakteriyofajı da izolasyonu için çalışmalar yapılmıştır.

3.1.1. Besiyerleri

Katı ve sıvı besiyerlerinin tamamı piyasadaki firmalardan temin edilmiş, uygulama öncesinde hazırlanmış ve taze olarak kullanılmıştır.

Listeria spp. ve bakteriyofajlarının izolasyonu ve biyofilm oluşturma çalışmalarında mikroorganizmaya özgü besiyerleri yanı sıra %95 etanol, 0,1% kristal viyole solüsyonu, alkali ve asit bazlı kimyasallar, çeşitli özellikte yüzey test çubukları hidrofilik testi için paslanmaz çelik ve hidrofobik test için plastik ve galvaniz yüzeyler) gibi çeşitli sarf malzemeleri kullanılmıştır.

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 saf su içinde dikkatlice eritilmiş ve otoklavda 121^{o} C'de 15 dakika sterilize edilip, steril petri kutularına yaklaşık 15 ml olacak şekilde dökülmüştür (Soni ve Nannapaneni, 2010).

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 renklidir ve 25°C'da PH'sı 6.8±0.2'dir (Anonim, 2011).

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

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

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Sterilizasyondan önce pH 7.0 ± 0.2'ye ayarlanır. Luria Bertani Broth cam tüplere dağıtıldıktan, Luria Bertani Agar ise agar ilavesinden sonra, otoklavda (121 °C / 15 dakika) sterilize edilir. Katı besiyerleri 55°C 'ye kadar soğutulduktan sonra petrilere dökülür.

Scholten's (MS) Broth, modifiye edilmiş

İçerik	g/L
Sığır Ekstraktı	12
Pepton	10
Sodyum klorür	3
Maya Ekstraktı	3

Karışımın tamamı, 28 g/L olacak şekilde damıtık su içinde topaklanma olmayıncaya kadar karıştırılmıştır. Besiyeri, steril kavanozlar içerisinde 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir.

LB Agar (MOPS ile modifiye edilmiş)

İçerik	g/L
MOPS	10,46
$MgCl_2$	0,95
$CaCl_2$	1,10
Pepton	10
Sodyum Klorür	10
Agar agar	12
Maya Ekstraktı	5

Her bir malzeme damıtık su içinde topaklanma olmayıncaya kadar karıştırılmıştır. Besiyeri, steril kavanozlar içerisinde 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir.

3.1.2. Çözelti ve Solusyonlar

SF (Serum Fizyolojik İçerik)

SF (Serum Fizyolojik)	g/L
NaCl	8,5 g
dH2O	1000 mL

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Sterilizasyon işlemi 121 °C'de 15 dk süre ile yapılır.

Alkol/Aseton Çözeltisi

Alkol/Aseton Çözeltisi	100 mL
Saf etanol	70 mL
Aseton	30 mL

%0.8 Agaroz jel

%0.8 Agaroz jel	**100 mL**
Agaroz	0.8 g
dH2O	100 mL

Distile su ile 100 ml‘ye tamamlanır. Eritme işlemi mikrodalga’da çözülme gerçekleşene kadar karıştırılır.

%2.5 Glutaraldehide (%25’ten)

%2.5 Glutaraldehide (%25’ten)	**200 mL**
%25 Glutaraldehide	20 mL
PBS	180 mL

%1’lik Uranyl acetate

%1’lik Uranyl acetate	**10 mL**
Toz Uranyl acetate	0.1 g
dH2O	10 mL

Distile su ile 10 ml‘ye tamamlanır. pH 3.5±0.02 ayarlanır. 0.22 µm steril membran filtreden geçirilir. Filtrat oda sıcaklığında uzun süre karanlık ortamda saklanabilir.

3.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yönteminde Kullanılacak Materyal ve Cihazlar

Listeria izolatlarının moleküler karakterizasyonunu belirlemek amacıyla uygulanan PCR yönteminde, örneklerden ekstrakte edilen DNA, Taq DNA polimeraz enzimi, dATP, dCTP, dTTP, dGTP, çeşitli tampon çözeltiler, saf su, steril pipet uçları ve pipet, PCR tüpü, *Listeria* bakterisine özel spesifik primer çiftleri materyal olarak kullanılmıştır.

PCR Primerleri

Çalışmada 2 farklı firmadan alınan primer setleri kullanılmıştır:

Lis-1 ve Lis-2 primerleri ile U1 ve LI1 primerleri içermektedir. Primer Lis 1 (5’-GCA-TCT-GCA-TTC-AAT-AAA-GA-3’), Lis-2 (5’-TGT-CAC-TGC-ATC-TCC-GTG-GT-3’) *L. monocytogenes* içerisindeki hlyA genindeki 174-bp bölgesini hedeflemiştir. Primer U1 (5’- CAG-CMG-CCG-CGG-TAA-TWC-3’; M, A veya C’ni, W A veya T’yi göstermektedir) ve LI1 (5’- CTC-CAT-AAA-GGT-GAC-CCT-3’) ise *Listeria* cinsinin üyelerinin 938-bp’lik 16S rRNA’sını hedef almaktadır (Çizelge 3.3) (Wesley ve ark., 2002). Primerler ticari olarak sentezlettirilmiştir (Macrogen, Türkiye, 2020).

İkinci primer seti *L. grayi* için Oxidoreductasi genini hedefleyen PrsF ve PrsR primerlerini; *L. innocua* için Lin0464 genini hedefleyen JOgrayiF ve JOgrayiR primerlerini; *L. ivanovii* için namA

genini hedefleyen Liv22228F ve Liv22228R primerlerini; *L. monocytogenes* için Lmo1030 genini hedefleyen Lmo1030F ve Lmo1030R primerlerini; *L. seelingeri* için Lmo0333 genini hedefleyen IseelinF ve IseelinR primerlerini; *L. welshimeri için* scrA genini hedefleyen Lwe1801F ve Lwe1801R primerlerini içermektedir. Bu primerler ticari olarak sentezlettirilmiştir (Molgentek, Türkiye, 2022)**.** İlgili genlerdeki hedef bp bölgesi Çizelge 3.3 te gösterilmiştir (Mazza ve ark., 2015).

Çizelge 3.3. Çalışmada Kullanılan Primer Çiftleri ve Sentezlenen Bölgenin Moleküler Büyüklüğü

Tür	Hedef Gen	Primer Çifti	Sekans (5'-3')	Baz Çifti Sayısı (bp)
L. monocytogenes	*hlyA*	Lis 1	5'-GCA-TCT-GCA-TTC-AAT-AAA-GA-3'	174
L. monocytogenes	*hlyA*	Lis 2	5'-TGT-CAC-TGC-ATC-TCC-GTG-GT-3'	174
***Listeria* spp.**	*prs*	U1	5'- CAG-CMG-CCG-CGG-TAA-TWC-3'	938
***Listeria* spp.**	*prs*	LI1	5'- CTC-CAT-AAA-GGT-GAC-CCT-3'	938
L. grayi	*Oxidoreductasi*	PrsF	5'- GCT-GAA-GAG-ATT-GCG-AAA-GAAG-3	201
		PrsR	5'- CAA-AGA-AAC-CTT-GGA-TTT-GCG-G-3	
L. innocua	*Lin0464*	JOgrayiF	5'- GCG-GAT-AAA-GGT-GTT-CGG-GTC-AA-3	749
		JOgrayiR	5'- ATT-TGC-TAT-CGT-CCG-AGG-CTA-GG-3	
L. ivanovii	*namA*	Liv22228F	5'- CGA-ATT-CCT-TAT-TCA-CTT-GAG-C-3	463
		Liv22228R	5'- GGT-GCT-GCG-AAC-TTA-ACT-CA-3	
L. monocytogenes	*Lmo1030*	Lmo1030F	5'- GCT-TGT-ATT-CAC-TTG-GAT-TTG-TCT-GG-3	509
		Lmo1030R	5'- ACC-ATC-CGC-ATA-TCT-CAG-CCA-ACT-3	
L. seeligeri	*Lmo0333*	IseelinF	5'- GTA-CCT-GCT-GGG-AGT-ACA-TA-3	673
		IseelinR	5'- CTG-TCT-CCA-TAT-CCG-TAC-AG-3	
L. welshimeri	*scrA*	Lwe1801F	5'- CGT-GGC-ACA-ATA-GCA-ATC-TG-3	281
		Lwe1801R	5'- GAC-ATG-CCT-GCT-GAA-CTA-GA-3	

L, .Listeria

Çalışmalarımız Çukurova Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarında, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Laboratuvarında, Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Merkez Laboratuvarları, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Bölümü ve Çukurova Üniversitesi Merkezi Laboratuvar'da gerçekleştirilmiştir.

Marker

Listeria tanımlaması için marker olarak 100 bp'lik DNA ladder (Thermo) kullanılmıştır. Listex^{TM} P100 bakteriyofaj tanımlaması için lambda PFG ladder, 48.5-1,018 kb aralığında kullanılmıştır.

Ethidium Bromid

Elektroforez işleminden sonra görüntüleme için jelin boyanmasında Sigma marka %1'lik Ethidium Bromid 500 ml 0,5X TBE ile hazırlanmıştır.

Kullanılan Cihazlar

Thermocycler Cihazı

PCR işlemi, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarında 96 örnek kapasiteli Veriti Applied Biosystems PCR System 9700 termal döngüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

Elektroforez

Elektroforez işlemi, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarında BIORAD marka, elektroforez tankında; görüntüleme işlemi UVP Ultraviolet Transilluminator görüntüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.1.4. Çalışmada Kullanılan *Listeria* spp türleri

Bu çalışmada kullanılan 4 suş Ç.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarından, 4 suş ise Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC; Manassas, VA, ABD) temin edilmiştir. *Listeria* spp. suşları Çizelge 3.4'te listelenmiştir. Suşlar, kullanılana kadar -20 °C'de Tryptone Soy Broth (TSB; Merck, Darmstadt, Almanya) ve %30 (w/v) gliserol (1:1) karışımında saklanmıştır.

Her bir suş Tryptone Soy Broth (TSB; Merck, Darmstadt, Almanya) içinde 37°C inkübatörde aktive edilmiştir. PALCAM *Listeria* Seçici Agar (PALCAM; Darmstadt, Almanya) ve Tryptic Soy Agar (TSA; Merck, Almanya) olmak üzere iki katı besiyerinde pasajlanmıştır. Ardından tekrar TSB içerisine ekilerek çalışmalar tamamlanmıştır.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan *Listeria* spp. türleri

Bakteri Türü	İzolat Numarası	Örnek Türü	Kaynak
***Listeria monocytogenes* ATCC #13932**	-	Omurilik sıvısı	İnsan
***Listeria ivanovi* ATCC #19119**	-	Koyun	Çiftlik
***Listeria innocua* ATCC #33090**	-	İnek beyni	Çiftlik
***Listeria seeligeri* ATCC #35967**	-	Toprak	Çevre
***Listeria monocytogenes* yerel izolat**	AŞb2	Tavuk	Kesimhane
***Listeria ivanovi* yerel izolat**	ABtt3	Tavuk	Kesimhane
***Listeria innocua* yerel izolat**	AŞys1	Yıkama suyu	Süt İşletmesi
***Listeria welshimeri* yerel izolat**	AŞk1	Tavuk	Kesimhane

3.1.5. Çalışmada Kullanılan Bakteriyofajlar

Çalışma kapsamında *Listeria* türlerini hedefleyen Hollanda menşeili Listex™ P100 (Phage Guard L) bakteriyofajı ile *Listeria monocytogenes* türünü hedefleyen Yeni Zelanda Canterbury Üniversitesi Çevre Bilimleri ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen FMWLLM3 bakteriyofajları kullanılmıştır (Çizelge 3.5).

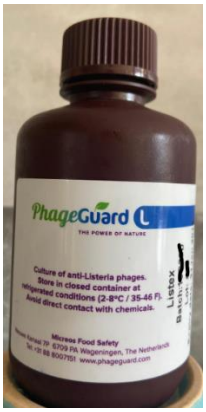
Ticari bakteriyofajlar piyasaya kahverengi, opak plastik ambalajda ve hafif sarı renkte, sıvı formda $2x10^{11}$ pob/ml konsantrasyonda sunulmaktadır (Şekil 3.1.). İki farklı miktar seçeneği (100 ml ve 1000 ml) bulunan fajın önerilen saklama koşulları 2-8°C olup, raf ömrü 8 ay olarak iletilmiştir.

FMWLLM fajı Ağustos 2023 yılında çoğaltılmış ve temin edilmesi sonrasında çalışmalarımızda Şubat 2024'te kullanılmaya başlanmıştır. FMWLLM fajı benzer şekilde ışık geçirmeyecek şekilde bir ambalaj içerisinde olup hafif sarı renktedir ve önerilen saklama koşulları 2-8°C'dir.

Çizelge 3.5. Kullanılan bakteriyofajlar, hedef mikroorganizmalar, tedarik yılı ve bakteriyofajın izole edildiği kaynak (Kawacka ve ark., 2020; Bigot ve ark., 2011)

Bakteriyofaj	Hedef Mikroorganizma	Tedarik Yılı	Kaynak
Listex™ P100	*Listeria* spp.	2014	Koyun dışkısı
Listex™ P100 (Phage Guard Listex)	*Listeria* spp.	2019	Koyun dışkısı
FMWLLM3	*Listeria monocytogenes*	2023	Koyun dışkısı







Şekil 3.1. Phage Guard Listex P100 (*v2014*) Phage Guard Listex P100 (*v2019*) FMWLLM3

3.2. Yöntem

3.2.1. *Listeria*'nın Klasik Yöntem ile İzolasyonu ve Tanımlanması

Gıda Örneklerinden *Listeria İzolasyonu*

Listeria spp. izolasyonu çalışılan örneklerde FDA metodu ile gerçekleştirilmiştir. 1988 yılında Lovett ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu metot süt, süt ürünleri, sebze – meyveler, deniz ürünleri ve gibi birçok gıdadan *Listeria* spp. izolasyonu ve sayımı amacıyla kullanılmaktadır.

Listeria spp. izolasyonu için değerlendirilen her bir katı örnek 25'er gram olarak ve gerektiğinde steril bıçak yardımı ile parçalara ayrılarak; her bir sıvı örnek 25'er ml alınarak ön zenginleştirme sağlamak için 225 ml Buffered *Listeria* Enrichment Broth (BLEB) besiyerinde homojenize edilmiştir. Besiyeri önce 30ºC'de 4 saat inkübe edilmiş, 4 saatin sonunda gerekli olan supplement (*Listeria* Selective Enrichment Supplement FDA-BAM) ilave edilerek inkübasyon toplam 48 saate tamamlanmıştır. İnkübasyonun başlagıcından itibaren 24. ve 48. saatlerde olmak üzere PALCAM Agar besiyerine sürme ekimi yapılmıştır ve ekim yapılan petriler 37ºC'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. PALCAM Agar'da 1.5-2 mm çapında zeytin yeşili-gri-kahverengi renkli ve siyah zonlu koloniler, şüpheli koloniler olarak değerlendirilmiştir. Seçici katı besiyerinde gelişen 5 tipik koloni TSA-YE besiyerine ekilen ve 24 saat inkübasyon sonucunda ileri tanımlama testlerine tabi tutulmıştır (FDA, 1998).

3.2.2. İzole edilen *Listeria*' ların Tanımlaması

Şüpheli *Listeria*'ların inkübasyonunun ardından Tryptic Soy Agar-Yeast Extract besiyerinde bu hücrelerin koloni ve hücre morfolojilerinin değerlendirmesi yapılmıştır. Gram pozitif, oksidaz negatif, katalaz pozitif, üre negatif ve hareketlilik pozitif koloniler *Listeria* spp. şüpheli koloniler olarak değerlendirmeye alınmıştır.

İzolatlar cins bazında *Listeria* spp. olarak doğrulandıktan sonra çeşitli biyokimyasal testleri takiben PCR ile tür bazında tanımlama yapılmıştır.

Morfolojik Tanımlama

Gram Boyama

Öze yardımıyla şüpheli kolonilerden alınıp temiz bir lam üzerine yayıldıktan sonra ateş üzerinde 3 kez fiksasyon işlemi yapılmıştır. Birkaç damla Kristal Violet lam üzerine damlatılmış ve 1 dakika boyunca beklendikten sonra saf su ile yıkama işlemi yapılmıştır. İkinci aşamada birkaç damla lugol çözeltisi damlatılıp 1 dakika beklenip saf su ile yıkanmıştır. Üçüncü aşamada ise %96'lık etil alkolde 15 saniye boyunca bekletilip lam saf su ile yıkanmıştır. Son aşama olarak 15 saniye boyunca aynı lam üzerine Sulu Fuksin Çözeltisi damlatılmış ve saf su ile yıkandıktan sonra kurutulup, immersiyon yağıyla 100'lük objektif altında incelenmiştir (Anonymus, 2024c).

Hareket Testi

Yumuşak dik agarlı besiyerinde şüpheli kolonilere hareketlilik testi uygulanmıştır. Şüpheli koloniden iğne uçlu öze yardımı ile alınıp 5 ml Nutrient Broth (%0,5 agar eklenmiş) içeren besiyerine ekim yapılmıştır. Ardından 18-24 saat süre ile 37°C'de inkübasyona bırakılan broth besiyerleri, inkübasyonun sonunda değerlendirmeye alınmıştır. Uygulama yapılan inokülasyon hattının yanlarına doğru yayılmış, şemsiye görünümlü bulanıklık bakterinin hareketliliğinin pozitif olarak değerlendirilmiştir (Anonymus, 2024c).

Biyokimyasal Tanımlama

Katalaz Testi

Katalaz testi %30'luk H_2O_2 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. %30'luk H_2O_2, analizde kullanılmak üzere %3'lük olarak ayarlanmıştır. Kullanımdan hemen önce taze olarak hazırlanan %3'lük hidrojen peroksitten bir lam üzerine 1-2 damla eklenmiş ve şüpheli koloni öze yardımı ile alınarak hidrojen peroksite karıştırılmıştır. Gaz kabarcıklarının oluşumunun gözlenmesi halinde test sonucu pozitif kabul edilmiştir (Anonymus, 2024c).

Üre Testi

Bir öze dolusu koloni alınıp Urea Broth besiyerine inoküle edilmiştir. 35 °C'de 48 saate kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüp rengi kontrol edilmiştir. Kırmızı renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu ise testin negatif olduğunu göstermekte olmıştır (Anonymus, 2024c).

İndol Testi

Bu test, mikroorganizmaların bir aminoasit olan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirebilme yeteneğini belirlemek için kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar sıvı besi yerine veya peptonlu sıvıya ekildikten sonra 37 °C de 1-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda kültürlerin üzerine Kovacs (veya Ehrlich) ayıracından 0,5 ml ilave edilip iyice karıştırılmıştır.

Tüplerin üst kısmında bir iki dakika içinde kırmızı bir halkanın oluşması indol pozitif, sarımsı halka indolun oluşmadığının göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Anonymus, 2024c).

Moleküler Tanımlama

Listeria İzolatlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tür Bazında Tanımlanması

Çalışma süresince elde edilen *Listeria* izolatlarının tür bazında tanımlanmaları polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile gerçekleştirilmiş olup bu uygulama Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarında yapılmıştır.

Kaynatma Yöntemi ile Nükleik Asit (DNA) Ekstraksiyonu

Listeria kolonilerinden DNA ekstraksiyonu FDA-BAM protokolüne göre yürütülmüş olup aşağıda ekstraksiyon basamakları sıralanmıştır:

1. Bakteriyel izolatlar BHI broth'ta 1 gece 37°C'de gelişmeye bırakılmıştır.
2. Süspansiyondan 1 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve 12000×g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
3. Üstte kalan sıvı kısım (süpernatant) uzaklaştırılmış ve çöken kısmın (pellet) tamamı 1 ml %0,85 tuzlu su içerisinde süspanse edilmiştir.
4. Ardından tekrar 12000×g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Üstte kalan sıvı kısım (süpernatant) uzaklaştırılmış ve çöken kısım (pellet) 1 ml steril su içerisinde süspanse edilmiştir.
6. Örnek, 10 dakika kaynayan su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır.
7. Ardından 12000×g'de 1 dakika santrifüj edilmiş, üstte kalan sıvı kısım (süperpernatant) uzaklaştırılmış ve DNA örneği olarak kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır (FDA, 2018)

DNA İzolatlarının PCR Amplifikasyonu

PCR işleminde öncelikle PCR tüpüne 50 µl (0.5 ng DNA örneği, 50'şer pmol Lis-1, Lis-2, UI ve LI1, 1.25 U of *Taq* DNA polimeraz, 200'er mM dATP, dCTP, dTTP, ve dGTP; 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl ve 6.5 mM $MgCl_2$)'lik hacim ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı mineral yağ ile kaplanmış ve tüpler DNA termal döngüsüne yerleştirilmiştir. Örneklere 95°C'de 3 dakika başlangıç denatürasyonunu takiben 95°C'de 30 saniye 30 amplifikasyon döngüsü, 51°C'de 30 saniye primer bağlama, 72°C'de 40 saniye primer uzama işlemi uygulanmıştır. Amplifikasyon döngüsünde tekrar 72°C'de 10 dakika primer uzama basamağı gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyon ürünleri %1,5 agaroz jelde (60 V, 1.5 saat koşturma tamponu Tris-borate-EDTA ile ayrılmıştır. DNA moleküler ağırlık işaretleyici her bir baz çiftinin ağırlık karşılaştırmasında kullanılmıştır. Ardından jel etidyum bromid ile boyanmış ve DNA bantları gözlemlenmiştir (Wesley ve ark., 2002; Sağlam, 2017).

Daha sonra tüpler Çizelge 3.6.'daki gibi olacak şekilde ayarlanarak thermocycler'a yerleştirilmiş ve böylece PCR işlemi tamamlanmıştır.

Çizelge 3.6. PCR döngüsünde *Listeria* spp. için uygun sıcalıklar (Wesley ve ark., 2002)

Sıcaklık ve Zaman Döngüsü	
95 °C 3 dk	
95°C 30 sn	30 döngü
51°C 30 sn	
72 °C 40 sn	
72°C 10 dk	

Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları

Agaroz jel elektroforez çalışması Galitelli ve Minafra (1994)'ya göre uygulanmıştır.

1. Cam erlen içerisine 20 ml 1X TAE (4.84 g Tris, 2ml 0.5 M Na_2EDTA, 1.142 ml Glacial acetic acid) ya da 1X TBE tampon çözeltisi konulmuş ve toz agaroz tamamen eriyinceye kadar ısıtıcıda tutulmuştur.
2. Karışım kaynama derecesine ulaştıktan sonra ısıtıcı yüzeyden alınarak kısa bir süre (30 dakika) soğumaya bırakılmış ve tank içerisine dökülerek belirtici bir tarak takılmıştır.
3. Hazırlanan jel karışımının donması beklenmiş ve jel donduktan sonra belirtici bir tarak çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirilmiş ve jeli 1-2 mm geçecek kadar kullanılan buffera göre 1X TAE ya da 1X TBE eklenmiştir.
4. Örnekler ve marker 10 µl olacak şekilde jeldeki kuyulara dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir. Marker ilk çukura konulmuş ve yükleme tamponundaki turuncu renk (Orange G) jelin sonuna gelene kadar elektroforez tankına virüslere göre değişmekle beraber 30 V elektrik akımı 1 saat boyunca verilmiştir.
5. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel, oda sıcaklığında 10 dk süreyle ethidium bromid (30 µl ethidium bromid/100 ml saf su) çözeltisinde boyanmış ve daha sonra fazla ethidium bromidi uzaklaştırmak için 10 dk saf su içerisinde tutulmuştur.
6. Jelin yıkama işlemi gerçekleştikten sonra UV jel görünütüleme cihazı üzerine konulmuş ve UV ışıkta ortaya çıkan bantlar gözlemlenerek fotoğrafı çekilmiştir (Sağlam, 2017)

3.3. Listex™ P100 Bakteriyofajının *Listeria* spp. Üzerine Antimikrobiyal Etkisi

3.3.1. Listex™ P100 Bakteriyofajının *Listeria* Vejetatif Hücreleri Üzerine Antimikrobiyal Etkisi

Bu çalışmada ticari bakteriyofaj Micreos Food Safety (Hollanda) firmasından temin edilmiş olup bu bakteriyofajın *Listeria* vejetatif hücreler üzerine antimikrobiyel etkisi çalışılmıştır.

Damlatma (Spot) Testi ile Listex^{TM} P100 Fajının Bakteriyel Etkinliğinin Belirlemesi

Listex^{TM} P100'ün çalışmada kullanılması planlanan bakterileri enfekte edip edemeyeceğini kontrol etmenin hızlı bir yolu olan bu yöntemde alt agar ve üst agar olarak TSA (Tryptic Soy Agar) besiyeri kullanılmıştır (Anonymus, 2019). Bu çalışmada Listex^{TM} P100 bakteriyofajı 10^{11} pob/ml titrede (orijinal tedarik konsantrasyonu) kullanılmıştır.

Çift tabaka agar tekniğine göre hazırlanan besiyeri ortamında öncelikle *Listeria* türlerinin 10 ml TSB (Tryptic Soy Broth) içinde 37°C'de 18 saat süre inkübasyona bırakılarak gelişimi sağlanmıştır.

Alt agar olarak TSA (Tryptic Soy Agar), üst agar için %0,6 agar içeren TSB (Tryptic Soy Broth) ile hazırlanmış yumuşak agar kullanılmıştır (Oliveira ve ark., 2012; Anonymus, 2019; Anonymus, 2024d). Otoklav sonrası donmaması için yumuşak agar, kullanılıncaya kadar 42 °C'ye ayarlı su banyosunda bekletilmiştir. 3 ml hacimli yumuşak agara 100 µl *Listeria* spp. suşları eklendikten sonra bu yumuşak agar karışımı vortekslenerek hızlıca içerisinde TSA bulunan petri üzerine dökülmüştür. 15-20 dakika boyunca agarların katılaşması beklenmiştir.

Bir mikropipet kullanarak, 10 µL sıvı faj örneğinin (Listex^{TM} P100) orijinal konsantrasyonundan petri üzerinde uygun alanlara damlatılmıştır. Pipet ucunun agara fiziksel olarak temas etmediğinden veya herhangi bir kabarcık oluşmadığından emin olunarak uygulama tamamlanmıştır. Yaklaşık yarım saat fajın besiyerine absorbe olması beklenmiştir. Ardından petriler 30°C'de 18-24 saat saat inkübasyona bırakılmıştır (Anonymus, 2019; Anonymus, 2024d).

İnkübasyon sonrasında damlatma yapılan noktalar kontrol edilmiştir. Pozitif bir damlatma testi, damlatmanın yapıldığı alan üzerinde tamamen berrak bir şekilde alınan görüntü ile; negatif bir nokta testi ise damlatmanın yapıldığı alanda bakteri yayılımın normal bir gelişim göstermesiyle sonuçlanmıştır (Anonymus, 2019; Anonymus, 2024d).

Listex^{TM} P100 Preparatının Farklı Tarihlere Ait Etkinliğinin Damlatma (spot) Testi ile İncelenmesi

Damlatma (spot) testi ile Uygulama 1 ve Uygulama 2 adı altında iki farklı tarihe sahip Listex^{TM} P100 hazır bakteriyofaj preparatlarının etkinliği incelenmiştir.

Çift Tabaka Agar Yöntemi ile Listex^{TM} P100 Faj Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Besiyeri üzerinde yaygın bir şekilde tabaka oluşturan bakteri içerisinde plak üreten bir fajın, konakçısını lize edebilme yeteneği yani faj titresi çift tabaka agar tekniği kullanılarak ölçülmektedir (Santos ve ark., 2009). Çalışmada, bakteriyofaj plak oluşumu için seçilen *Listeria* türlerinin faj konsantrasyonu ayarlanarak çift tabaka agar yöntemi ile çalışılmıştır.

Çalışma sırasında kullanılan olan *Listeria* türlerinin 10 ml TSB (Tryptic Soy Broth) içinde 37°C'de 18 saat süre inkübasyona bırakılarak gelişimi sağlanmıştır. İstenen konsantrasyona ulaşmak için NaCl çözeltisi ile seri dilüsyonları hazırlanmıştır (Soni ve Nannapaneni, 2010a).

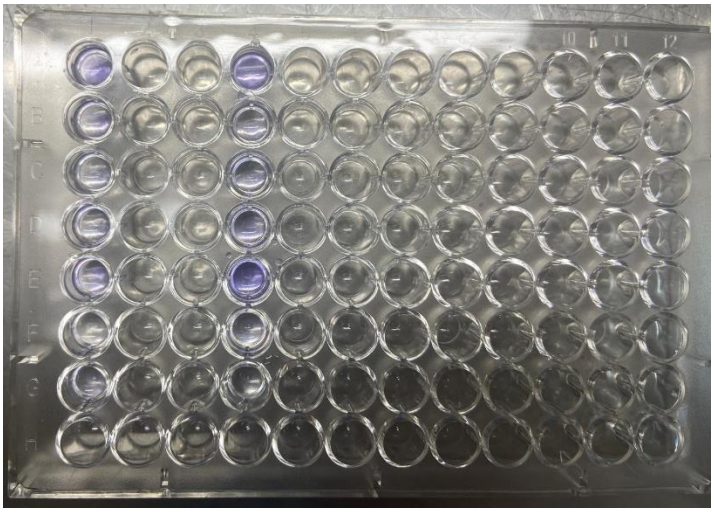
Çift tabaka agar tekniğinde yumuşak agar ve alt (base) agar seçilmiş olup alt agar olarak TSA (Tryptic Soy Agar), üst agar için %0,5 agar içeren TSB (Tryptic Soy Broth) ile hazırlanmış yumuşak agar kullanılmıştır (Oliveira ve ark., 2012). Otoklav sonrası donmaması için yumuşak agar, 42 °C'ye ayarlı su banyosunda kullanım öncesinde bekletilmiştir.

3 ml hacimli yumuşak agara (%0,5 agar içeren TSB) önce 100 µl *Listeria* spp. suşları ardından 100 µl fajdan eklenerek vortekslenerek faj ile bakterinin karışması sağlanmıştır. Daha önceden hazırlanan ve içerisinde TSA bulunan petriler üzerine bu yumuşak agar dökülerek agarların katılaşmaları için petriler 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından petriler 30°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Soni ve Nannapaneni, 2010a). İnkübasyonun ardından fajın tek tek düştüğü noktalarda bakterinin lize edilmesi sonucu oluşan çıplak gözle görülebilir sınırları belli, yuvarlak plaklar (şeffaf/berrak zonlar) sayılarak sayım sonucu pob/ml olarak değerlendirilmiştir (Tunail, 2009; Soni ve Nannapaneni, 2010a).

3.3.2. Listex^{TM} P100 Bakteriyofajının Mikroplakada Geliştirilen *Listeria* spp. Biyofilmleri Üzerine Etkisi

Çalışma öncesinde her bir bakterinin durgun fazlı kültürleri TSB'de 18-24 saat geliştirilmiştir. Bir gece öncesinden hazır edilen taze *Listeria* spp. kültürlerine 0,5 McFarland (yaklaşık $1,5x10^8$ kob/ml) miktarında inokuluma ulaşmak için 1:100 oranında dilüsyon yapılmıştır. Her bir tür için hazırlanan bu kültürlerden 200 µl, kuyucuklara eklenmiştir. Pozitif kontrol amaçlı birden fazla kuyucuk kullanılmıştır. Ayrıca, negatif kontrol kuyucuklarına 200 µl steril TSB eklenmiştir. Petriler steril kapakla kapatılmış ve kenarları parafilmle kaplanmıştır. 37°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresinin sonunda, biyofilm yapısına tutunamayan bakteriler pipet yardımı ile uzaklaştırılmış ve 2 kez yıkama yapılmıştır. Yıkama aşaması, her bir kuyucuğun 200 µl steril tuzlu su solüsyonu ekleme ve uzaklaştırma adımlarını içermiştir. Ardından her bir kuyucuk, farklı konsantrasyonlardaki (10^8, 10^6, 10^4 pob/ml) 200 µl faj (Listex^{TM} P100) solüsyonu ile muamele edilmiştir. Kontrol olarak da aynı sayıda kuyucuğa 200 µl tuzlu su eklenmiştir. Faj ve tuzlu su solüsyonları başlangıçtaki sadece TSB içeren negatif kontrol kuyucuklarına da eklenmiştir. 30˚C'deki 24 saatlik faj muamelesinin ardından her bir kuyucuğa kristal viyole ile 15 dakika boyama işlemi yapılmıştır. Boyama işleminin ardından tüm kuyucuklar 200 µl fizyolojik tuzlu su ile 3 kez yıkanmıştır. Hücreler tarafından bağlanamamış olan kristal viyole 200 µl fizyolojik tuzlu suyun eklenmesi ve uzaklaştırılması şeklindeki yıkamanın ardından uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.2). Her bir kuyucuğa 200 µl etanol-aseton (80:20) karışımı, *Listeria* biyofilmlerindeki bağlı kristal viyoleyi çözebilmek amacıyla eklenmiştir. Böylece *Listeria* biofilmi hücre türbiditesi OD_{595}'de ölçülebilir durumda olmuştur (Soni ve Nannapaneni, 2010b; Lemon ve ark., 2007; Doijad ve ark., 2015).



Şekil 3.2. Mikroplaka üzerinde %1'lik kristal viyolenin uzaklaştırılması

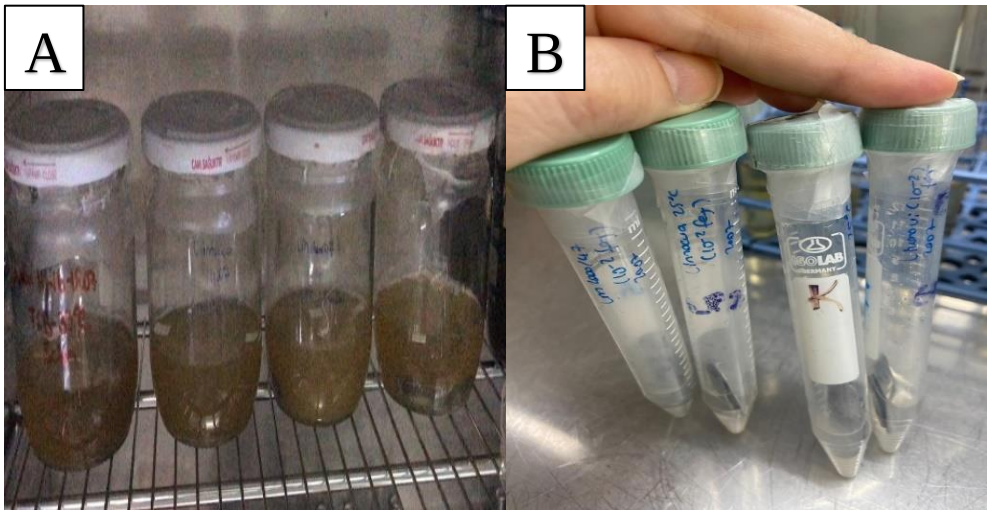
3.3.3. Listex™ P100 Bakteriyofajının 37 Derecede Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz) Oluşturulan *Listeria* spp. Biyofilmlerine Etkisi

Bu çalışmada, gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan hidrofilik (paslanmaz çelik) ve hidrofobik (plastik ve galvaniz) yüzeylerde biyofilm oluşumunu incelemek ve bu biyofilmler üzerinde Listex™ P100 bakteriyofajının etkisini değerlendirmek amaçlanmıştır.

Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz) Biyofilm Oluşturma

Bu çalışmada endüstriyel gıda ortamlarında sıklıkla kullanılan yüzeyler arasında yer alan paslanmaz çelik, plastik ve galvaniz test çubukları (2x5 cm) tercih edilmiştir. Bu test çubukları kullanılmadan önce yıkanmıştır. Yıkama işlemine göre asetonda yağdan arındırılmış ve 25°C'de klorlu deterjan içerisinde 30 dakika tutulmuştur (Folsom ve ark., 2006). Ardından, test çubukları deterjan solüsyonundan uzaklaştırılarak deiyonize su ile yıkanmış ve temizleme işleminin ardından, test çubukları otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

100 ml steril TSB içeren 250 ml hacimli steril kavanozlara bir gece öncesinden hazır edilen taze *Listeria* spp. kültürlerinden 100 µl eklenmiştir. Test çubukları bu kültürlerin içerisinde tutunmayı sağlamak amacıyla batırılmıştır. Birisi kontrol örneği olmak üzere inkübasyona her bir yüzeyden 2'şer adet bırakılmıştır. Her bir kavanoz parafilm ile kapak kısmı kontaminasyonu engelleyecek şekilde kapatılmıştır. Kavanozlar 37°C'de 9 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır ve her biri gün aşırı 75 ml taze TSB besiyeri ile yenilenmiştir (Şekil 3.3).

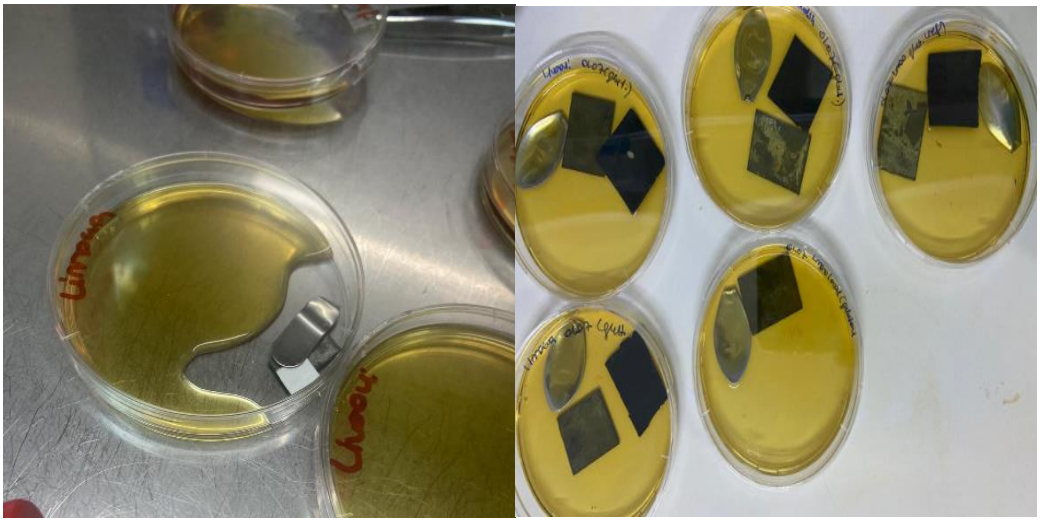


Şekil 3.3. Biyofilm oluşturma (A) ve biyofilmler üzerine bakteriyofaj ugulaması (B)

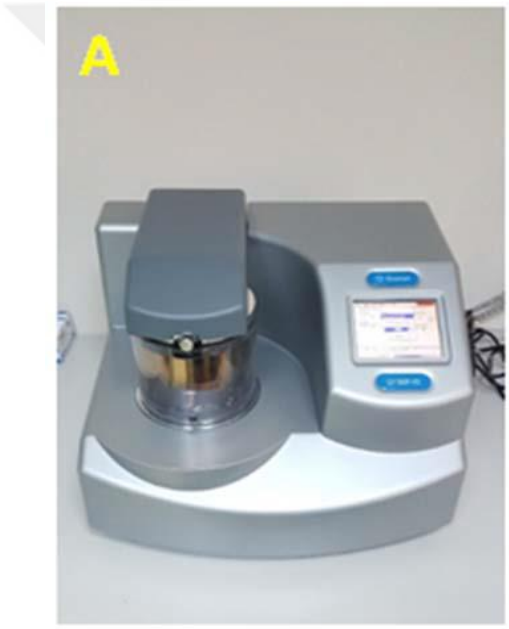
Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz) Oluşturulan Biyofilmlere Uygulanan Yıkama Protokolü ve Görüntü Alınması

Scanning Elektron Mikroskobu (SEM) ile incelenen biyofilmler 3.3.3.'de anlatıldığı şekilde paslanmaz çelik, plastik ve galvaniz test çubukları üzerinde oluşturulmuştur. İnkübasyon periyodunun ardından biyofilm oluşumu tamamlanan her üç yüzeye ait test çubuklarından steril petri kapları içerisine alınmıştır. Test çubuklarından birisi biyofilm yıkama protokolünün ardından direkt olarak mikroskop için ayrılırken diğer test çubuğu 24 saat Listex^{TM} P100 bakteriyofaj (10^6 pob/ml) ile muamelesine tabi tutulmuştur. Bakteriyofajla muamele işlemi paslanmaz çelik, plastik ve galvaniz test çubuklarının bakteriyofaj çözeltisine daldırılması şeklinde uygulanmıştır. Bu işlem tamamlanınca test çubukları yıkmaya tabi tutulmuş ve takiben test çubukları Scanning Elektron Mikroskobu (SEM) altında incelenmiştir (Lourenco, 2014).

Yıkama işlemi için her bir test çubuğu (kontrol örnekleri dahil) yaklaşık 3 ml steril tuzlu su (SF) ile hafif pipetleme yoluyla işleme alınmıştır. Bu uygulamanın ardından PBS ile yıkanıp %2.5 glutaraldehide içeren PBS'de 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir (Şekil 3.4). Daha sonra test çubukları çıkarılıp sırasıyla yaklaşık 15-20 saniye (25%, 50%, 75%, ve 100%) etanolda kurutulmuştur. Üzerine altın-palladium tozu kaplamak için kaplama cihazına (Q150R Plus) koyulmuştur (Şekil 3.5). Fiksasyonu yapılan örnekler Ç.Ü. Merkezi Laboratuvar'da Scanning Elektron Mikroskobu (SEM) mikroskobunda (Quanta FEG 650) incelenmiş ve fotoğrafları alınmıştır (Lourenco, 2014).



Şekil 3.4. %2.5 glutaraldehid'de içerisinde bekletilen yüzey materyalleri



Şekil 3.5. A: Kaplama cihazı (Q150R Plus).



Şekil 3.6. B: Scaning Elektron Mikroskobu (SEM)

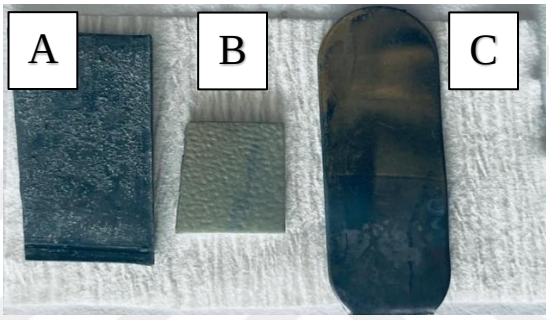
Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz) Oluşturulan Biyofilmler*e *Listex^{TM} P100 Etkisi

Madde 3.3.3.'te açıklandığı üzere paslanmaz çelik, plastik ve galvaniz test çubuklarına 37°C'de 9 gün boyunca biyofilm oluşturumuştur. Kontrol örneklerinin de bulunduğu inkübasyon sonrasında test çubukları tutunamayan hücreleri uzaklaştırmak amacıyla distile su ile yıkanmış test çubuğunun her iki tarafından eküvyon çubuğu ile örnek alınmıştır. Ardından bu çubuklar 10 ml peptonlu su içerikli 15 ml hacimli steril tüpe transfer edilmiş ve yaklaşık 1 dakika vortekslenmiştir. Bu süspansiyona ardından desimal olarak dilüsyon yapılmış ve PALCAM agara ekilmiştir.

Test çubuklarından diğeri ise 37°C'de 9 gün boyunca gerçekleşen biyofilm oluşumunun ardından 24 saat Listex^{TM} P100 bakteriyofaj (10^6 pob/ml) ile muamelesine tabi tutulmuştur.

Bakteriyofajla muamele işlemi paslanmaz çelik, plastik ve galvaniz test çubuklarının (Şekil 3.6) bakteriyofaj çözeltisine daldırılması şeklinde uygulanmıştır (Lourenco, 2014; Folsom ve ark., 2006). Listex™ muamele edilen test çubukları inkübasyonun ardından tutunamayan hücreleri uzaklaştırmak amacıyla distile su ile yıkanmış test çubuklarının her iki tarafından eküvyon çucuğu ile örnek alınmıştır. Eküvyon çubukları 10 ml peptonlu su içerikli 15 ml hacimli steril tüpe transfer edilmiş ve yaklaşık 1 dakika vortekslenmiştir. Bu süspansiyona ardından desimal olarak dilüsyon yapılmış ve PALCAM agara ekilmiştir.

PALCAM petriler koloni sayımı için 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Negatif kontroller de inokülasyonun ardından aynı işlemlerle muamele edilmiştir. Çalışma üç tekerrür olarak yürütülmüştür (Lourenco, 2014; Folsom ve ark., 2006).



Şekil 3.7. Galvaniz (A), plastik (B), paslanmaz çelik (C) test çubukları

3.3.4. Listex™ P100 Bakteriyofajının Oda Sıcaklığında Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz) Oluşturulan *Listeria* spp. Biyofilmlerine Etkisi

Bu çalışmada da endüstriyel gıda ortamlarında sıklıkla kullanılan yüzeyler arasında yer alan paslanmaz çelik, plastik ve galvaniz test çubukları (2x5 cm) tercih edilmiştir. Bu test çubukları kullanılmadan önce yıkanmıştır. Yıkama işlemine göre asetonda yağdan arındırılmış ve 25°C'de klorlu deterjan içerisinde 30 dakika tutulmuştur (Folsom ve ark., 2006). Ardından, test çubukları deterjan solüsyonundan uzaklaştırılarak deiyonize su ile yıkanmış ve temizleme işleminin ardından, test çubukları otoklavda steril edilmiştir.

100 ml steril TSB içeren 250 ml hacimli steril kavanozlara bir gece öncesinden hazır edilen taze *Listeria* spp. kültürlerinden 100 µl eklenmiştir. Test çubukları bu kültürlerin içerisinde tutunmayı sağlamak amacıyla batırılmıştır. Birisi kontrol örneği olmak üzere inkübasyona her bir test çubuğundan 2'şer adet bırakılmıştır. Her bir kavanoz parafilm ile kapak kısmı kontaminasyonu engelleyecek şekilde kapatılmıştır. Kavanozlar 25°C'de 9 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır ve her biri gün aşırı 75 ml taze TSB besiyeri ile yenilenmiştir.

Madde 3.3.3.'te açıklandığı üzere sadece sıcaklık parametresi değiştirilerek yapılan bu çalışmada, 25°C'de 9 gün boyunca biyofilm oluşturulan test çubuklarından kontrol için ayrılanlar inkübasyonun ardından tutunamayan hücreleri uzaklaştırmak amacıyla distile su ile yıkanmış test çubuğunun her iki tarafından eküvyon çucuğu ile örnek alınmıştır. Ardından bu çubuklar 10 ml

peptonlu su içerikli 15 ml hacimli steril tüpe transfer edilmiş ve yaklaşık 1 dakika vortekslenmiştir. Bu süspansiyona ardından desimal olarak dilüsyon yapılmış ve PALCAM agara ekilmiştir.

Test çubuklarından diğeri ise 25°C'de 9 gün boyunca gerçekleşen biyofilm oluşumunun ardından 24 saat Listex^{TM} P100 bakteriyofaj (10^6 pob/ml) ile muamelesine tabi tutulmuştur. Bakteriyofajla muamele işlemi paslanmaz çelik, plastik ve galvaniz test çubuklarının bakteriyofaj çözeltisine daldırılması şeklinde uygulanmıştır (Lourenco, 2014; Folsom ve ark., 2006). Listex^{TM} muamele edilen test çubukları inkübasyonun ardından tutunamayan hücreleri uzaklaştırmak amacıyla distile su ile yıkanmış test çubuklarının her iki tarafından eküvyon çucuğu ile örnek alınmıştır. Eküvyon çubukları 10 ml peptonlu su içerikli 15 ml hacimli steril tüpe transfer edilmiş ve yaklaşık 1 dakika vortekslenmiştir. Bu süLaurenspansiyona ardından desimal olarak dilüsyon yapılmış ve PALCAM agara ekilmiştir.

PALCAM petriler koloni sayımı için 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Negatif kontroller de inokülasyonun ardından aynı işlemlerle muamele edilmiştir. Çalışma üç tekerrür olarak yürütülmüştür (Lourenco, 2014; Folsom ve ark., 2006).

3.4. FMWLLM3 Bakteriyofajının *Listeria* spp. Üzerine Antimikrobiyal Etkisi

3.4.1. FMWLLM3 Bakteriyofajının *Listeria* Vejetatif Hücreleri Üzerine Antimikrobiyal Etkisi

FMWLLM3 fajı Canterbury Üniversitesi Çevre Bilimleri ve Araştırma Enstitüsü (Yeni Zelanda)'nden talep edilmiş olup *Listeria* vejetatif hücreler üzerine antimikrobiyel etkisi çalışılmıştır.

Damlatma (Spot) Testi ile FMWLLM3 Fajının Bakteriyel Etkinliğinin Belirlemesi

FMWLLM3 fajının çalışmada kullanılması planlanan bakterileri enfekte edip edemeyeceğini kontrol etmenin hızlı bir yolu olan bu yöntemde alt agar ve üst agar olarak TSA (Tryptic Soy Agar) besiyeri kullanılmıştır (Anonymus, 2024). Bu çalışmada FMWLLM3 bakteriyofajı, 10^7 pob/ml titrede (orijinal tedarik konsantrasyonu) kullanılmıştır.

Çift tabaka agar tekniğine göre hazırlanan besiyeri ortamında öncelikle *Listeria* türlerinin 10 ml TSB (Tryptic Soy Broth) içinde 37°C'de 18 saat süre inkübasyona bırakılarak gelişimi sağlanmıştır.

Alt agar olarak TSA (Tryptic Soy Agar), üst agar için %0,6 agar içeren TSB (Tryptic Soy Broth) ile hazırlanmış yumuşak agar kullanılmıştır (Oliveira ve ark., 2012; Anonymus, 2019; Anonymus, 2024d). Otoklav sonrası donmaması için yumuşak agar, kullanılıncaya kadar 42 °C'ye ayarlı su banyosunda bekletilmiştir. 3 ml hacimli yumuşak agara 100 µl *Listeria* spp. suşları eklendikten sonra bu yumuşak agar karışımı vortekslenerek hızlıca içerisinde TSA bulunan petri üzerine dökülmüştür. 15-20 dakika boyunca agarların katılaşması beklenmiştir.

Bir mikropipet kullanarak, 10 µL sıvı faj örneğinin (FMWLLM3) orijinal konsantrasyonundan petri üzerinde uygun alanlara damlatılmıştır. Pipet ucunun agara fiziksel olarak temas etmediğinden

veya herhangi bir kabarcık oluşmadığından emin olunarak uygulama tamamlanmıştır. Yaklaşık yarım saat fajın besiyerine absorbe olması beklenmiştir. Ardından petriler 30°C'de 18-24 saat saat inkübasyona bırakılmıştır (Anonymus, 2019; Anonymus, 2024d).

İnkübasyon sonrasında damlatma yapılan noktalar kontrol edilmiştir. Pozitif bir damlatma testi, damlatmanın yapıldığı alan üzerinde tamamen berrak bir şekilde alınan görüntü ile; negatif bir nokta testi ise damlatmanın yapıldığı alanda bakteri yayılımın normal bir gelişim göstermesiyle sonuçlanmıştır (Anonymus, 2019; Anonymus, 2024d).

Çift Tabaka Agar Yöntemi ile FMWLLM3 Faj Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çalışmada, bakteriyofaj plak oluşumu için seçilen *Listeria* türlerinin faj konsantrasyonu ayarlanarak çift tabaka agar yöntemi ile çalışılmıştır.

Çalışma sırasında kullanılan olan *Listeria* türlerinin 10 ml TSB (Tryptic Soy Broth) içinde 37°C'de 18 saat süre inkübasyona bırakılarak gelişimi sağlanmıştır. İstenen konsantrasyona ulaşmak için hem *Listeria* türlerinin hem de FMWLLM3 fajının NaCl çözeltisi ile seri dilüsyonları hazırlanmıştır (Soni ve Nannapaneni, 2010a).

Çift tabaka agar tekniğinde yumuşak agar ve alt (base) agar seçilmiş olup alt agar olarak TSA (Tryptic Soy Agar), üst agar için %0,5 agar içeren TSB (Tryptic Soy Broth) ile hazırlanmış yumuşak agar kullanılmıştır (Oliveira ve ark., 2012). Otoklav sonrası donmaması için yumuşak agar, 42 °C'ye ayarlı su banyosunda kullanım öncesinde bekletilmiştir.

3 ml hacimli yumuşak agara (%0,5 agar içeren TSB) önce 100 µl *Listeria* spp. suşları ardından 100 µl FMWLLM3 fajdan eklenerek vortekslenerek faj ile bakterinin karışması sağlanmıştır. Daha önceden hazırlanan ve içerisinde TSA bulunan petriler üzerine bu yumuşak agar dökülerek agarların katılaşmaları için petriler 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından petriler 30°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Soni ve Nannapaneni, 2010a). İnkübasyonun ardından fajın tek tek düştüğü noktalarda bakterinin lize edilmesi sonucu oluşan çıplak gözle görülebilir sınırları belli, yuvarlak plaklar (şeffaf/berrak zonlar) sayılarak sayım sonucu pob/ml olarak değerlendirilmiştir (Tunail, 2009; Soni ve Nannapaneni, 2010a).

3.4.2. FMWLLM3 Bakteriyofajının Mikroplakada Geliştirilen *Listeria* spp. Biyofilmleri Üzerine Etkisi

Çalışma öncesinde her bir bakterinin kültürleri TSB'de 18-24 saat geliştirilmiştir. Bir gece öncesinden hazır edilen taze *Listeria* spp. kültürlerine 0,5 McFarland (yaklaşık $1,5x10^8$ kob/ml) miktarında inokuluma ulaşmak için 1:100 oranında dilüsyon yapılmıştır. Her bir tür için hazırlanan bu kültürlerden 200 µl kuyucuklara eklenmiştir. Pozitif kontrol amaçlı birden fazla kuyucuk kullanılmıştır. Ayrıca, negatif kontrol kuyucuklarına 200 µl steril TSB eklenmiştir. Petriler steril kapakla kapatılmış ve kenarları parafilmle kaplanmıştır. 37°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresinin sonunda, biyofilm yapısına tutunamayan bakteriler pipet yardımı ile uzaklaştırılmış ve 2 kez yıkama yapılmıştır. Yıkama aşaması, her bir kuyucuğun 200 µl steril tuzlu su solüsyonu ekleme ve uzaklaştırma adımlarını içermiştir.

Ardından her bir kuyucuk, konsantrasyonu belli (10^6 pob/ml) titredeki 200 µl faj (FMWLLM3) solüsyonu ile muamele edilmiştir. Kontrol olarak da aynı sayıda kuyucuğa 200 µl tuzlu su eklenmiştir. Faj ve tuzlu su solüsyonları başlangıçtaki sadece TSB içeren negatif kontrol kuyucuklarına da eklenmiştir. 30˚C'deki 24 saatlik faj muamelesinin ardından kristal viyole ile 15 dakika boyama işlemi yapılmıştır. Boyama işleminin ardından tüm kuyucuklar 200 µl fizyolojik tuzlu su ile 3 kez yıkanmıştır. Hücreelre tarafından bağlanamamış olan kristal viyole 200 µl fizyolojik tuzlu suyun eklenmesi ve uzaklaştırılması şeklindeki yıkamanın ardından uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 200 µl etanol-aseton (80:20) karışımı boyalı *Listeria* biyofilmlerindeki bağlı kristal viyoleyi çözebilmek amacıyla eklenmiştir. Böylece *Listeria* biyofilmi hücre türbiditesi OD_{562}'de ölçülebilir durumda olmuştur (Soni ve Nannapaneni, 2010b; Lemon ve ark., 2007; Doijad ve ark., 2015).

3.4.3. FMWLLM3 Bakteriyofajının 37 Derecede Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz yüzeyler) Oluşturulan *Listeria* spp. Biyofilmlerine Etkisi

Bu çalışma sadece bakteriyofaj türü (FMWLLM3) ve konsantrasyonu (10^6 pob/ml) değiştirilmiş olup 3.3.3 ile aynı metot kullanılmıştır.

Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz) Biyofilm Oluşturma

Bu çalışma sadece bakteriyofaj türü (FMWLLM3) ve konsantrasyonu (10^6 pob/ml) değiştirilmiş olup 3.3.3 ile aynı metot kullanılmıştır.

Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz) Oluşturulan Biyofilmlere Uygulanan Yıkama Protokolü ve Görüntü Alınması

Bu çalışma sadece bakteriyofaj türü (FMWLLM3) ve konsantrasyonu (10^6 pob/ml) değiştirilmiş olup 3.3.3 ile aynı metot kullanılmıştır.

*Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz) Oluşturulan Biyofilmler*e *FMWLLM3 Etkisi*

Bu çalışma sadece bakteriyofaj türü (FMWLLM3) ve konsantrasyonu (10^6 pob/ml) değiştirilmiş olup 3.3.3 ile aynı metot kullanılmıştır.

3.4.4. FMWLLM3 Bakteriyofajının Oda Sıcaklığında Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz) Oluşturulan *Listeria spp.* Biyofilmlere Etkisi

Bu çalışma sadece bakteriyofaj türü (FMWLLM3) ve konsantrasyonu (10^6 pob/ml) değiştirilmiş olup 3.3.3 ile aynı metot kullanılmıştır.

3.5. *Listeria* Bakteriyofaj İzolasyonu ve Tanımlanması

3.5.1. Örneklerden *Listeria* spp. Bakteriyofaj İzolasyonu

Listeria bakteriyofaj izolasyonu için *Listeria* spp. izolasyon analizinde kullanılan gıda örneklerinin yanı sıra işletme atık sularını da içeren çevresel örnekler de değerlendirmeye alınmıştır Faj izolasyon işlemlerinde direkt faj izolasyonu ve ön zenginleştirme sonrası faj izolasyonu olmak üzere birden fazla metot kullanılmıştır. Bu metotlar bakteriyofaj izolasyonunda kullanılan referans çalışma, ve fajın izole edildiği kaynağı içerecek şekilde Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Bakteriyofaj izolasyonunda kullanılan referans çalışma, ve fajın izole edildiği kaynağı

Uygulanan Metot	Referans Çalışma	Kaynak
Metot 1	Vongkamjan ve ark., 2012	Silaj örneği
Metot 2	Kim ve ark., 2008; (modifiye edilmiş)	Çevre örnekleri, hindi kesimhanesi
Metot 3	Lee ve ark, 2017; Elsayed ve ark., 2023; (modifiye edilmiş)	Fekal örnek, silaj, gübre; tavuk çiftliği
Metot 4	Model çalışma; Lemaître ve ark., 2015 (modifiye edilmiş)	-
Metot 5	Vongkamjan ve ark., 2012; Elsayed ve ark., 2023; (modifiye edilmiş)	Silaj ve gübre örneği
Metot 6	Heshmati, 2019; (modifiye edilmiş)	Şehir atık suları
Metot 7	Li ve ark., 2022; (modifiye edilmiş)	Atık su örnekleri

3.5.2. *Listeria* spp. Faj İzolasyonunda Çeşitli Metot Çalışmaları

Listeria fajı izolasyonu için seçilen metotlar ve bu metotlarda kullanılan alt agar, üst agar ve diğer içerik detaylarına ilişkin bilgiler Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Bakteriyofaj izolasyonunda uygulanan metotlar ve kullanılan besiyerileri

Uygulanan Metot	Sıvı Besiyeri	Alt Agar	Üst Agar	Metot Özelliği
Metot 1	LB (%1,5 MOPS ils desteklenmiş	%1,5 LB MOPS/ tuz agarozu	%0,7 LB MOPS/ agaroz	$MgCl_2$ ve $CaCl_2$ ile tamponlanmış Ön zenginleştirme var
Metot 2	BHI Broth	TSA agar (%0,6 Tyriptic Soy Broth)	-	$MgCl_2$ ve $CaCl_2$ ile tamponlanmış Ön zenginleştirme var
Metot 3	Modifiye edilmiş Scholten's (MS) Broth	LB agar	-	$CaCl_2$ ile tamponlanmış, Ön zenginleştirme var
Metot 4	Buffered Listeria Enrichment Broth	TSA agar (%0,6 Tyriptic Soy Broth)	-	Ön zenginleştirme var.
Metot 5	Tamponlanmış peptonlu su	%1,5 LB MOPS/ tuz agarozu	%0,7 LB MOPS/ agaroz	Ön zenginleştirme yok
Metot 6	Tamponlanmış peptonlu su	TSA agar (%0,6 Tyriptic Soy Broth)	-	Ön zenginleştirme yok
Metot 7	Peptonlu su	TSA agar (%0,6 Tyriptic Soy Broth, 1.25 mM $CaCl_2$ ve 0.5% agaroz)	-	1,25 mM $CaCl_2$ ile tamponlanmış Ön zenginleştirme yok

Ön Zenginleştirme Metodu Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

Metot 1

10 g/ml örnek 90 ml steril LB MOPS (50 mM MOPS ile zenginleştirilmiş ortam) içeren steril kavanoz içerisinde karıştırılmış ve bu karışıma 0,5 McFarland (yaklaşık $1,5x10^8$ kob/ml) oranına ulaşan her bir suştan 250 µl mikroorganizma kültürü eklenmiştir. Karışımın son hali, 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Zenginleştirilmiş örneklerden alınan her bir 15 ml örnek 6000xg 20 dakika

santrifüje bırakılmıştır. Santirifüj işlemi tamamlandıktan sonra her bir örnek ardışık filtreleme için kullanılmıştır. Bu amaçla önce 0.45 µm'lik, ardından 0,2 µm'lik bir steril membran filtreden süzdürülmüştür.

Bir konak suşun bir gecelik kültürünün 0,5 McFarland'a (yaklaşık $1,5x10^8$ kob/ml) seyreltilen dilüsyonundan 100 µl ile 100 µl örnek filtratı ve 4 ml yumuşak agar, %0,7 LB MOPS (50 mM MOPS, pH 7,6 ve 10 mM [her biri] $MgCl_2$ ve $CaCl_2$ ile tamponlanmış LB ortamı) ile karıştırılarak bir kaplama hazırlanmıştır. Bu karışım yeni hazırlanmış bir alt agar (%1,5 LB MOPS/tuz agarozu) üzerine dökülmüştür.

Her bir süzüntü için bu işlem gerçekleştirilmiştir. Petriler 24 saat boyunca 30°C'de inkübe edilmiş ve ardından petride bulunan her bir belirli plak morfolojisinin bir temsilcisi faj saflaştırması için kullanılmıştır.

Metot 2

20 g/ml örnek 180 ml steril BHI broth içeren içeren steril kavanoz içerisinde karıştırılmış, ardından bu karışım 0,5 McFarland (yaklaşık $1,5x10^8$ kob/ml) oranına seyreltilen her bir konakçı suştan 250 µl kültür eklenmiştir. Karışımın son hali, 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Zenginleştirilmiş örneklerden alınan 15 ml, 6000xg 20 dakika santrifüje bırakılmıştır. Santirifüj işlemi tamamlandıktan sonra her bir örnek, ardışık filtreleme için kullanılmıştır. Bu amaçla önce 0.45 µm'lik, ardından 0.22 µm'lik bir steril membran filtreden süzdürülmüştür.

Steril membran filtreden geçirilen örneğin 10 µl'si, *Listeria* spp. içeren TSA agar (%0,6 agar Tyriptic Soy Broth ve 10 mM $MgCl_2$ ve 10 mM $CaCl_2$ ile zenginleştirilmiş) üzerine damlatılarak 20 dakika ortam sıcaklığında besiyerine adsorpsiyonun gerçekleşmesi için bırakılmıştır. Her bir örnek için bu işlem gerçekleştirilmiştir. Petriler 18-24 saat boyunca 30°C'de inkübe edilmiş ve ardından petride gözlemlenen lizis oluşumlarına göre değerlendirme yapılarak her bir belirli plak morfolojisinin bir temsilcisi faj saflaştırması için kullanılmıştır.

Metot 3

Laboratuvara getirilen örneklere direkt santrifüj işlemi yapılmıştır. Örneklerden 10 ml alınmıştır, ardından steril kavanoz içerisinde bulunan modifiye edilmiş Scholten's (MS) Broth içerisine alınarak 100 µl *Listeria monocytogenes* eklenmiştir. Ayrıca 50 µl 10 mM $CaCl_2$ ilavesi yapılmıştır. Karışımın son hali, 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu karışım 6000 xg, 30 dakika, 4°C olarak seçilen santrifüje bırakılmıştır. Santirifüj işlemi tamamlandıktan sonra her bir örnek ardışık filtreleme için kullanılmıştır.

Katı besiyeri olarak alt ve üst agar Luria Bertani agar (LB agar) olarak kullanılmıştır.

Steril membran filtreden geçirilen örneğin 10 µl'si, *Listeria* spp. içeren ve yukarıda belirtilen her bir alt agar üzerine damlatılarak 20 dakika ortam sıcaklığında besiyerine adsorpsiyonun

gerçekleşmesi için bırakılmıştır. Her bir örnek için bu işlem gerçekleştirilmiştir. Petriler 18-24 saat boyunca 30°C'de inkübe edilmiş ve ardından petride gözlemlenen lizis oluşumlarına göre değerlendirme yapılarak her bir belirli plak morfolojisinin bir temsilcisi faj saflaştırması için kullanılmıştır.

Metot 4

Bu mettotta faj izolasyonu için örnekler (25 g/25 ml) 225 ml steril kavanoz içinde bulunan BLEB (Buffered *Listeria* Enrichment Broth) içerisine alınmıştır. Çalışmada, örnek içerisinde var olabilecek hasar görmüş *Listeria* spp.'lerin desteklenmesi amaçlanarak *Listeria* izolasyonunda kullanılan metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu karışıma 4 saatin sonunda supplement (*Listeria* Selective Enrichment Supplement FDA-BAM) ilave edilip inkübasyon 24 saate tamamlanmıştır. Bu karışım 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Zenginleştirilmiş örneklerden alınan 10 ml, 3200xg 10 dk 4°C'de santrifüje bırakılmıştır. Santrifüj edilen filtrat 0.22 µm'lik steril bir membran filtreden süzdürülmüştür.

Her bir süzüntünün 100 µl'si 3 ml yumuşak agar (%0,6 agar Tyriptic Soy Broth) ile karıştırılarak TSA (Tyriptic Soy Agar) alt agar üzerine dökülerek 20 dk ortam sıcaklığına bırakılmıştır. Her bir süzüntü için bu işlem gerçekleştirilmiştir. Petriler 24 saat boyunca 30°C'de inkübe edilmiş ve ardından petride bulunan her bir belirli plak morfolojisinin bir temsilcisi faj saflaştırması için kullanılmıştır.

Direkt İzolasyon Metodu Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

Metot 5

Örnekler (10 g/10 ml) 90 ml steril kavanoz içinde fosfat tamponlu peptonlu su (PBS) içerisine alınmıştır. Her örnek daha sonra 0.45 µm'lik filtreden süzülmüş ve ardından 1 ml'lik bir süzüntünün 0.22 µm'lik bir steril membran filtreden süzdürülmüştür. 0.22 µm'lik gözenek boyutu kullanımının bazı büyük fajların geri kazanımını tehlikeye atabileceği öngörülse de diğer pek çok çalışma gibi 0,22 µm filtre fa izolasyonu için kullanılmıştır. 0.22 µm steril membran filtreden alınan süzüntüler, çift tabakalı agar yöntemi kullanılarak faj izolasyonu için kullanılmıştır.

Bir konak suşun bir gecelik kültürünün 0,5 McFarland (yaklaşık $1,5x10^8$ kob/ml) oranına seyreltilen dilüsyonundan 300 µl, 100 µl örnek filtratı ve 4 ml yumuşak agar, %0,7 LB MOPS/Glu/salts agaroz (50 mM MOPS, pH 7,6 ve 10 mM [her biri] $MgCl_2$ ve $CaCl_2$ ile tamponlanmış LB ortamı) ile karıştırılarak bir besiyeri hazırlanmıştır. Bu karışım yeni hazırlanmış bir alt agar (%1,5 LB MOPS/tuz agarozu) üzerine dökülmüştür.

Her bir süzüntü için bu işlem gerçekleştirilmiştir. Petriler 24 saat boyunca 30°C'de inkübe edilmiş ve ardından petride bulunan her bir belirli plak morfolojisinin bir temsilcisi faj saflaştırması için kullanılmıştır.

Metot 6

Getirilen her bir sıvı örnekten 25 ml analize alınmıştır. Katı örnekler için 25 g alınarak 225 ml tamponlanmış peptonlu su içerisine eklenmiş ve 4°C'de, 15 dakika boyunca 15,285 xg devirde santrifüj (Beckman Coulter, 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 0,5 McFarland (yaklaşık $1,5x10^8$ kob/ml) oranına seyreltilen 100 µl *Listeria* spp. (daha önce gıda ve su örneklerinden izole edilmiş) örneği ile karıştırılmıştır. Bu karışım bir gece boyunca 37°C'de inkübatör içerisinde homojenize bir şekilde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra bakteri 4°C'de, 10 dakika boyunca 15.285 xg devirde santrifüjlenerek parçalanan bakterilerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Üstte kalan kısım 0.22 µm por büyüklüğündeki steril membran filtreden tekrar geçirilmiştir.

Steril membran filtreden geçirilen örneğin 10 µl'si, *Listeria* spp. içeren TSA agar (%0,6 agar içeren Tyriptic Soy Broth) ile karıştırılarak TSA (Tyriptic Soy Agar) üzerine damlatılarak 20 dakika ortam sıcaklığında besiyerine adsorpsiyonun gerçekleşmesi için bırakılmıştır. Her bir örnek için bu işlem gerçekleştirilmiştir. Petriler 18-24 saat boyunca 30°C'de inkübe edilmiş ve ardından petride gözlemlenen lizis oluşumlarına göre değerlendirme yapılarak her bir belirli plak morfolojisinin bir temsilcisi faj saflaştırması için kullanılmıştır.

Metot 7

Getirilen her bir sıvı örnekten 25 ml analize alınmıştır. Katı örnekler için 25 g örnek, 225 ml peptonlu su içerisinde analize alınmıştır Bu örneklerden alınan 50 ml, 3000xg 10 dakika 4°C'de santrifüje bırakılmıştır. Santrifüj edilen örnekten 15 ml, 0.22 µm'lik steril bir membran filtreden süzdürülmüştür.

Membran filtreden geçen filtratın 10 ml'si, 10 ml TSB (Tryptic Soy Broth) ve 0,5 McFarland (yaklaşık $1,5x10^8$ kob/ml) oranına seyreltilen 100 µl *Listeria* spp. örneği ile karıştırılmıştır. Bu karışım bir gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra bakteri 4°C'de, 10 dakika boyunca 3000xg devirde santrifüjlenerek parçalanan bakterilerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Üstte kalan kısım 0.22 µm por büyüklüğündeki steril membran filtreden tekrar geçirilmiştir.

Steril membran filtreden geçirilen örneğin 10 µl'si, *Listeria* spp. içeren TSA agar (%0,6 agar ve ve 0,5% agaroz içeren Tyriptic Soy Broth; 1,25 mM $CaCl_2$ ile zenginleştirilmiş) üzerine damlatılarak 20 dakika ortam sıcaklığında besiyerine adsorpsiyonun gerçekleşmesi için bırakılmıştır. Her bir örnek için bu işlem gerçekleştirilmiştir. Petriler 18-24 saat boyunca 30°C'de inkübe edilmiş ve ardından petride gözlemlenen lizis oluşumlarına göre değerlendirme yapılarak her bir belirli plak morfolojisinin bir temsilcisi faj saflaştırması için kullanılmıştır.

Listeria Fajlarının Saflaştırılması ve Faj Stoğunun Hazırlanması

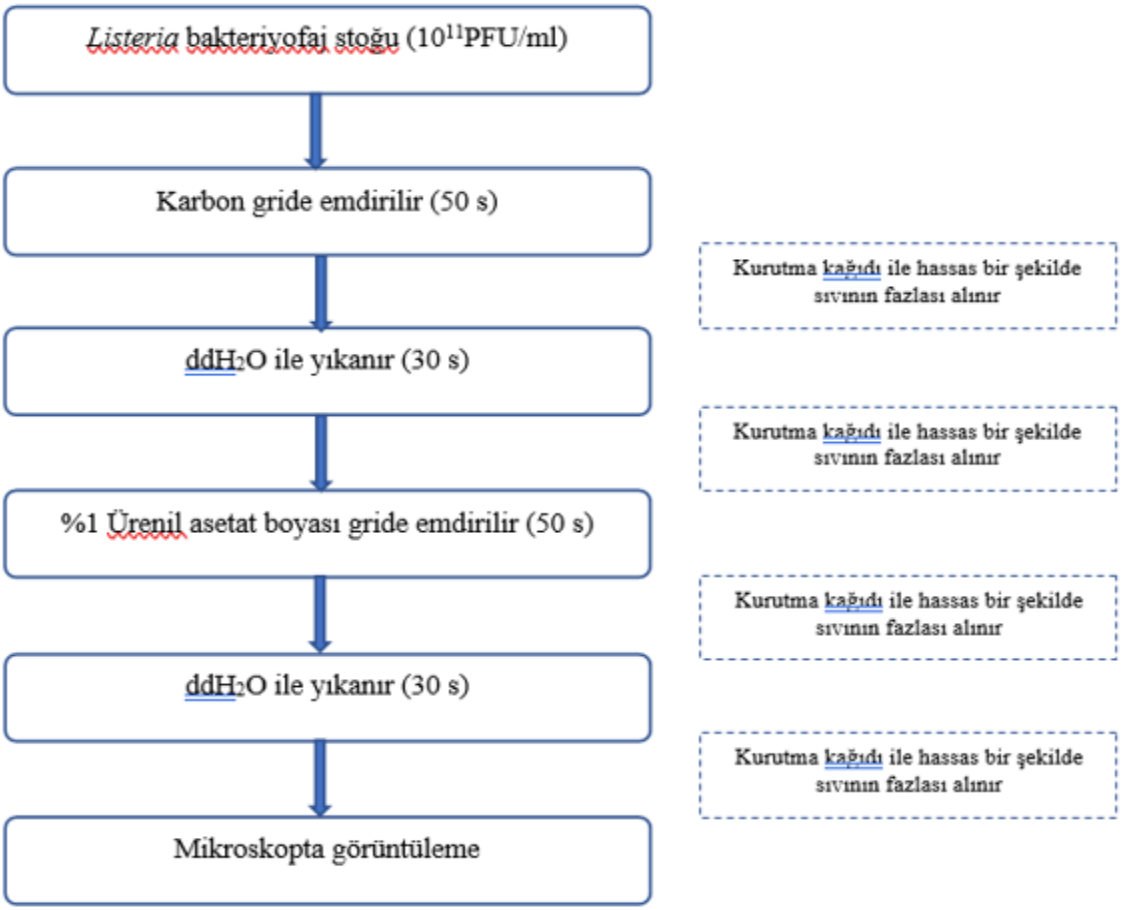
İzole edilen bir plak steril pastör pipeti yardımı ile alınmıştır ve 100 µl PBS içerisinde süspanse edilmiştir. PBS solüsyonu içerisinde bulunan plakların 10 katlı dilüsyonları yapılarak çift tabaka agar yöntemi kullanılmıştır. 30°C'de 24 saat inkübasyonun ardından en düşük sayıdaki plakların bulunduğu petri üzerinden sayımlar alınmıştır.

Faj plaklarının tek tek düştüğü bir bölgeden tek bir faj plağı steril enjektör ucuyla kesilerek 5 ml TSB (Tryptic Soy Broth) içine alınmıştır. Bu karışım vortekslenerek fajların besiyeri içerisine geçmesi sağlanmıştır. 4 saatlık konakçı kültürden tekrar 100 µl alınarak bu tüp içine pipetlenmiş ve adsorpsiyonun gerçekleşmesinden sonra 5 ml daha TSB eklenmiştir. 37ºC'de 24 saat inkübasyonun ardından hücre artıklarını uzaklaştırmak için 4.200 rpm'lik santrifüj işlemi 15 dk süre ile uygulanmıştır. Elde edilen süpernatant, 0.45 µm steril membran filtreden geçirilip %10 kloroform eklenerek saf faj filtratı elde edilmiş ve diğer analizler için kullanılmıştır (Vongkamjan ve ark., 2012).

Listeria Fajlarının Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile Tanımlanması

Transmisyon Elektron Mikroskobu ile inceleme çalışmaları için yüksek titreye getirilen faj stoğundan bir damla karbon bir plaka üzerine damlatılarak 1-2 dakika kurumaya bırakılmıştır. Fazla gelen sıvı filtre kâğıdı kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Ardından aynı karbon plaka 50 saniye %1 Uranyl acetat içerisinde emdirilmiştir. Aynı şekilde fazla sıvı çekildikten sonra 30 saniye yıkanak fazla sıvı alınmış ve karbon plaka kurumaya bırakılmıştır. Uygulama basamakları Çizelge 3.9'da gösterilmiştir. Ardından plakalar 5.000-20,000x büyütme işlemi ile gözlemlenmiştir (Nonis, 2016).

Çizelge 3.9. *Listeria* Fajlarının Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile Tanımlanması



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *Listeria*'nın Klasik Yöntem ile İzolasyonu

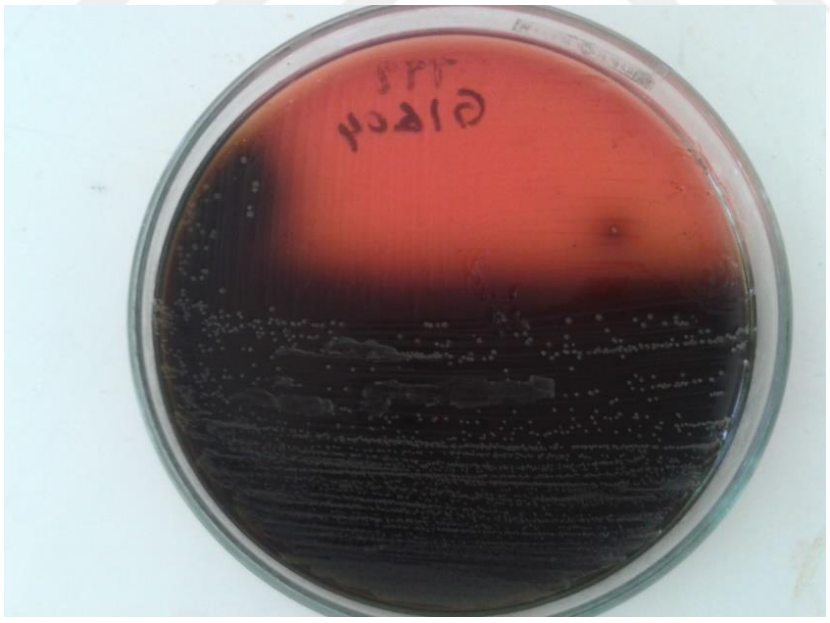
Araştırma kapsamında Çukurova bölgesinde faaliyet gösteren gıda işletmelerinden (tavuk, süt ve meyve sebze işleme), marketlerden, pazar yerlerinden, sulama kanallarından, nehirlerden, atık sulardan, çiftliklerden ve çevreden alınan örnekler kullanılmıştır. Belirli periyotlarla en az 2 tekerrürlü olarak yürütülen bu çalışmada toplam 154 örnek çalışılmıştır.

Örneklerin alındığı bölgeler, örnek sayıları, çeşitleri ve örneklerin alındığı dönem Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Aseptik koşullar altında gerçekleştirilen örnek alma işlemleri sırasında, örnekler steril cam kavanozlara/tek kullanımlık kaplara alınarak soğuk zincir bozulmadan laboratuvara getirilip, 48 saat içinde analize alınmıştır.

4.1.1. Şüpheli *Listeria* İzolatlarının Morfolojik Tanımlama Sonuçları

Şüpheli Listeria* spp.*'lerin Koloni Morfolojilerinin Sonuçları

Çalışmada, seçici katı besiyeri olarak kullanılan PALCAM Agar besiyerinde 1.5-2 mm çapında, siyah zonlu ve tipik zeytin yeşili-gri renkli *Listeria* spp. görüntüsü veren koloniler değerlendirmeye alınmıştır. PALCAM Agar'da görülen şüpheli *Listeria* spp.'ler Şekil 4.1'de verilmiştir.

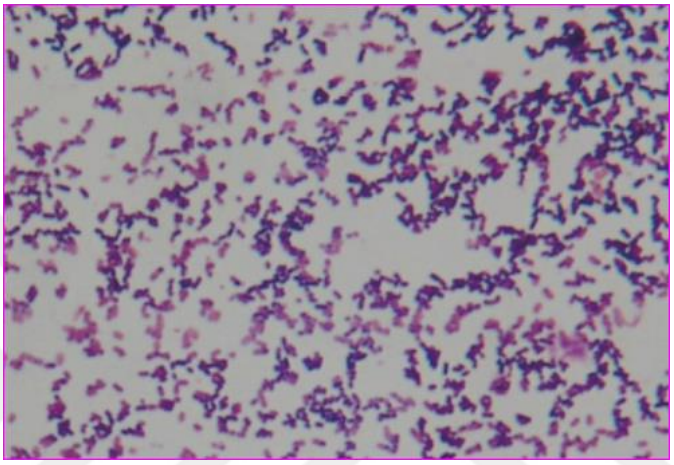


Şekil 4.1. PALCAM Agar'da şüpheli *Listeria* spp. kolonilerinin görüntüsü

Bu araştırmada incelenen 154 adet örneğin 45'inde *Listeria* spp. şüpheli koloni izole edilmiştir. (Çizelge 4.1).

Şüpheli Listeria* spp.*'lerin Hücre Morfolojilerinin Sonuçları

Koloni görüntüleri beklenen özelliklere sahip olan şüpheli *Listeria* spp.'lere hücre morfolojilerinin araştırılması için Gram boyama yapılmıştır. Işık mikroskobu altında (0.5–4 µm çaplı ve 0.5–2 µm in uzunluğunda) kokobasil, kısa çubuk şekilli görüntüler Şekil 4.2'de görüldüğü gibi *Listeria* spp. olarak kaydedilmiştir (Nayak ve ark, 2015).



Şekil 4.2. *Listeria* spp. hücre morfoloji görüntüsü

Yapılan gram boyama sonuçları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Gıdalardan ve işletmelerden izole edilen şüpheli *Listeria* spp.'lere uygulanan Gram boyama işlemi sonuçları

Örnek No.	Gram Boyama	Örnek No.	Gram Boyama	Örnek No.	Gram Boyama
AŞg1	Gr (+) Kokobasil	**ABg2**	Gr (+) Kokobasil	**AFg1**	Gr (+) Kok
AŞk1	Gr (+) Kokobasil	**ABb2**	Gr (+) Kokobasil	**AFb1**	Gr (+) Kokobasil
AŞys1	Gr (+) Kokobasil	**Abtt2**	Gr (+) Kokobasil	**AFg2**	Gr (+) Kokobasil
AŞtt1	Gr (+) Basil	**ABys2**	Gr (+) Kokobasil	**AFtt2**	Gr (+) Kokobasil
AŞb2	Gr (+) Kokobasil	**ABk3**	Gr (+) Kokobasil	**AFys2**	Gr (+) Basil
AŞg2	Gr (+) Kokobasil	**ABg3**	Gr (+) Kokobasil	**AFg3**	Gr (+) Kokobasil
AŞys2	Gr (+) Kokobasil	**ABtt3**	Gr (+) Kokobasil	**AFb4**	Gr (+) Kokobasil
AŞb4	Gr (+) Kok	**ABk4**	Gr (+) Kokobasil	**AFg4**	Gr (+) Kokobasil
AŞg4	Gr (+) Kokobasil	**ABg4**	Gr (+) Kokobasil	**AFtt4**	Gr (+) Kokobasil
AŞk4	Gr (+) Kokobasil	**ABhs4**	Gr (+) Basil	**AFys4**	Gr (+) Kokobasil
7BHÇSi28	Gr (+) Kokobasil	**ABys4**	Gr (+) Kokobasil	**4BHÇSa20**	Gr(+)Kokobasil
NS40	Gr (+) Kokobasil	**8BHÇSi29**	Gr (+) Kokobasil	**9KEG31**	Gr (+) Kok
SKLs63	Gr (+) Kokobasil	**9KESi33**	Gr (+) Kokobasil	**5BHÇSa23**	Gr(+)Kokobasil
9KESi33	Gr (+) Kokobasil	**ÜÇSi24**	Gr (+) Basil	**9KEG32**	Gr(+)Kokobasil
9KESi34	Gr (+) Kokobasil	**KESi54**	Gr (+) Kokobasil	**StAs53**	Gr(+)Kokobasil

*G: Göğüs, B: But, HS: Haşlama suyu, TT: Tüm tavuk, Gr: Gram boyama, +: pozitif NS: Nehir suyu, Ls: Lağım suyu, K: kırmızı et parçaları G: Gübre; Si: Silaj, SM: Saman S: Süt işletmesi K: Kanat, YS: Yıkama suyu

Çizelge 4.1.'de görüldüğü üzere toplam 45 şüpheli *Listeria* spp.'lere yapılan hücre morfolojisinin incelenmesi sonucunda, bu izolatlardan 38'sinin Gram boyama analiz sonucuna göre *Listeria* spp. olduğu bulunmuştur.

Koloni ve hücre morfolojileri açısından bakıldığında haşlama suyunda *Listeria* spp. tespit edilememiştir. Haşlama sularında *Listeria* bulunamamasının sebebi olarak örneklerin alındığı işletmelerde bu sulara antimikrobiyal amaçla kullanılan klordan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Listeria spp. izolasyonunda haşlama suyu örneklerinde sıcaklık 55°C civarında ölçülmüştür. Varabioff ve ark. 1990 tavuk işletmeleri ile ilgili yaptığı çalışmasında belirli saat aralıklarıyla sıcak su tanklarındaki sıcaklığı 56°C ila 67°C arasında ölçümlediğini dolayısı ile *Listeria* spp. izole edemediğini bildirmiştir. Bu sıcaklığın altında bir derecede olması durumunda *Listeria* spp. varlığının olası olduğunu belirtmiştir. Ayrıca soğuk yıkama suyu tanklarındaki sıcaklığı 0 ila 9°C arasında ölçümlemiş ve bu örneklerde *Listeria* spp. (%6,2) tespit etmiştir. Buna göre hijyen koşullarının sağlanması amacıyla su sıcalıkllarının düzenli olarak kontrol edilmesi ve özellikle soğuk su depolarının sıcaklığının 5°C'nin altında, tercihen 0-2°C olması gerektiğini vurgulamıştır.

Barbalho ve ark. (2005) Brezilya'da bazı tavuk işletmelerinden alınan çeşitli örneklerde *Listeria* bulaşısını inceledikleri çalışmada, 55°C'de 90 saniye boyunca uygulanan haşlama işlemi sonrasında bu örneklerin hiç birinde *Listeria* spp'ye rastlanmadığı bildirilmiştir. *Listeria* spp. tespit edilememesinin sebebi olarak tavuk karkasının ön haşlama işlemi ile beraber haşlama sularına 102 ve 156 ppm civarında konsantrasyonunda koruyucu klor ilave edilmesinden dolayı olduğunu belirtmişlerdir.

4.1.2. Şüpheli *Listeria* spp.'lerin Biyokimyasal Olarak Tür Bazında Tanımlanmaları

Koloni ve morfolojik incelemeler sonucunda tipik özellik gösteren 38 şüpheli *Listeria* spp. izolatının doğrulanması amacıyla izolatlara katalaz, oksidaz, hareketlilik, üre ve indol gibi bazı biyokimyasal testler uygulanmış ve sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi incelenen 38 izolatın tamamının katalaz negatif, oksidaz pozitif, üre negatif, indol negatif, ve hareketlilik pozitif, oldukları görülmüş ve bunların sonucunda bu 38 izolatın *Listeria* spp. oldukları gözlenmiştir.

Tekin'in (2010) dondurmalarda *Listeria* spp. izolasyonu üzerine yaptığı çalışmada, Oxford Agar ve PALCAM Agar'da *Listeria* spp. için tipik koloni görünümü sergileyen plaklar elde edilmiştir. Bu plaklardaki koloniler, hücre morfolojisi ve biyokimyasal testlerle incelenmiş ve 21 plakta *Listeria* spp. şüphesi taşıyan koloniler belirlenmiştir. Ancak, daha sonra Microbact™ *Listeria* 12L tanımlama kiti ile yapılan detaylı analizler sonucunda, bu 21 şüpheli kolonilerin aslında *Listeria* spp. olmadığı tespit edilmiştir. Bu durum, *Listeria* spp. açısından pozitif olarak

değerlendirilen kolonilerin tamamının sahte pozitif olduğu anlamına gelmektedir ve çalışmada bu durum özellikle vurgulanmıştır.

Çizelge 4.2. Şüpheli *Listeria* izolatlarına uygulanmış bazı biyokimyasal tanımlama testleri ve sonuçları

Örnek No.	Biyokimyasal Testler				
	Katalaz	Oksidaz	Hareketlilik	İndol	Üre
AŞg1	+	-	+	-	-
AŞk1	+	-	+	-	-
AŞys1	+	-	+	-	-
AŞb2	+	-	+	-	-
AŞg2	+	-	+	-	-
AŞys2	+	-	+	-	-
AŞg4	+	-	+	-	-
AŞk4	+	-	+	-	-
7BHÇSi28	+	-	+	-	-
NS40	+	-	+	-	-
SKLs63	+	-	+	-	-
9KESi33	+	-	+	-	-
9KESi34	+	-	+	-	-
ABg2	+	-	+	-	-
ABb2	+	-	+	-	-
Abtt2	+	-	+	-	-
ABys2	+	-	+	-	-
ABk3	+	-	+	-	-
ABg3	+	-	+	-	-
ABtt3	+	-	+	-	-
ABk4	+	-	+	-	-
ABg4	+	-	+	-	-
ABys4	+	-	+	-	-
8BHÇSi29	+	-	+	-	-
9KESi33	+	-	+	-	-
KESi54	+	-	+	-	-
AFb1	+	-	+	-	-
AFg2	+	-	+	-	-
AFtt2	+	-	+	-	-
AFg3	+	-	+	-	-
AFb4	+	-	+	-	-
AFg4	+	-	+	-	-
AFtt4	+	-	+	-	-
AFys4	+	-	+	-	-
4BHÇSa20	+	-	+	-	-
5BHÇSa23	+	-	+	-	-
9KEG32	+	-	+	-	-
StAs53	+	-	+	-	-

*G: Göğüs, K: Kanat, YS: Yıkama suyu, B: But, TT: Tüm tavuk, NS: Nehir suyu, K: kırmızı et parçaları GB: Gübre; Sİ: Silaj, SM: Saman

Andritsos ve ark (2010) kıyılmış domuz etinde *Listeria monocytogenes*'in yaygınlığını (p) ve konsantrasyonunu (c) ve ayrıca 3 farklı kültür ortamının (PALCAM, ALOA and RAPID'L.mono) duyarlılığını (Se) ve özgüllüğünü (Sp) belirlemek istedikleri çalışmalarında; karakteristik kolonilere sahip ortamlardan alınan toplam 279 izolatta tür tespiti için motilite, gram, katalaz ve oksidaz reaksiyonları kullanılmıştır. Tür doğrulaması için ramnoz, ksiloz, mannitol ve

metil a-D-mannopiranosidin hemolizi ve fermantasyonu yapılmıştır. Direkt ekim yoluyla hiçbir *L. monocytogenes* tepit edilemediğini; zenginleştirme ile örneklerin %15'inde (PALCAM), %19'unda (ALOA) ve %24'ünde (RAPID'L.mono) *L. monocytogenes* tespit edildiği bildirilmiştir.

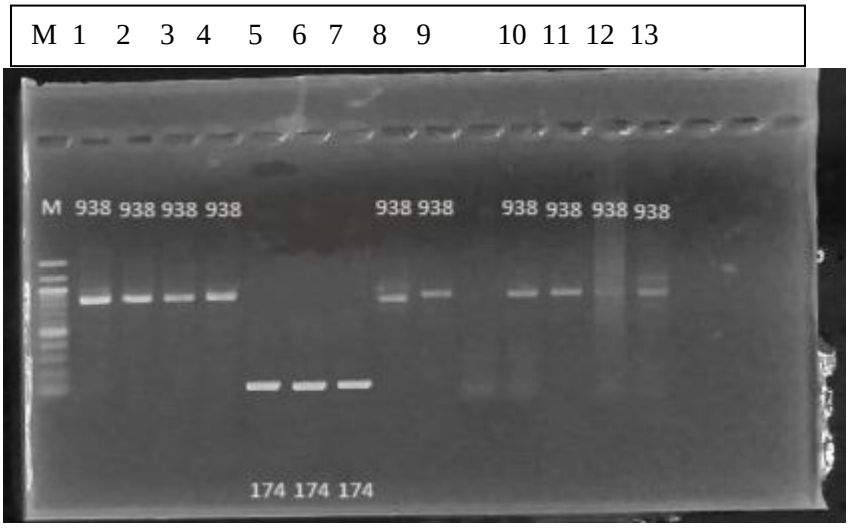
Pusztahelyi ve ark (2016) yaptıkları çalışmada standart kullanılan ALOA besiyerinin, fosfolipaz enzimi pozitif *Listeria* kolonilerini diğer fosfatidilinositol negatif *Listeria* kolonilerinden ayırdığını bildirmiştir. Bu besiyerinde, gıda kaynaklı tüm *Listeria* izolatlarının, opak bir hale ile çevrili mavi-yeşil koloniler oluşturduğunu belirtmişlerdir. Ancak, *Listeria monocytogenes* dışındaki diğer bazı türler de (örneğin, *Listeria seeligeri* ve *Listeria ivanovii*) plcA geni ile kodlanan fosfolipaz (PI-PLC) aktivitesine sahip olabileceğinden ve bunun yanısıra diğer bakteri türlerinin (örn. *Bacillus circulans*) kolonilerinin fosfolipaz ve β-glukosidaz aktivitesine sahip olmasından dolayı aynı şeklilde hale oluşturdukları ve mavi-yeşil renk verdikleri belirtilmiştir. Bu nedenle, ALOA ortamının ön seçici zenginleştirme veya diğer seçici ortamların (aynı zamanda en az iki günlük inkübasyona ihtiyaç duyan) uygulanmasından bağımsız olarak uygulanmasının yanlış pozitif sonuçlara yol açabileceğini bildirmişlerdir.

Nucera ve ark (2016) analiz edilen 80 adet silajın 21'inde *Listeria* spp. ve bunların da 6'sını *L. monocytogenes* olarak tespit etmişlerdir. *Listeria* spp.'lerin %67'si numune alım noktalarında küflü bölgeler de yer almaktadır.

Sołtysiuk ve ark (2022) Polonya'da 500 adet yarı mamul süt örneğinden yapılan analizlerde biyokimyasal özelliklere göre 8 izolatın (%1,6) *Listeria* cinsine ait olduğunu tepit etmişlerdir. *Listeria* suşlarının daha ileri düzeyde tanımlanması Microbact *Listeria* 12L ile yapılmış olup 3 suşun (%37,5) *L. monocytogenes* türüne ve 5 suşun (%62,5) *L. innocua* türüne ait olduğunu göstermiştir.

4.1.3. *Listeria* spp.'lerin Tür Bazında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Tanımlanması

Morfolojik ve biyokimyasal olarak doğrulanmış *Listeria* izolatlarına, 938-bp'lik 16S rRNA gen bölgesini hedef alan *Listeria* spp. için U1 ve LI1 primerleri ve *L. monocytogenes* için Lis-1 ve Lis-2 primerleri; *L. monocytogenes* için ayrıca Lmo1030 genini hedef alan Lmo1030F ve Lmo1030R primerleri; *L. grayi* için Oxidoreductasi genini hedefleyen PrsF ve PrsR primerleri; *L. innocua* için Lin0464 genini hedefleyen JOgrayiF ve JOgrayiR primerleri; *L. monocytogenes* için Lmo1030 genini hedefleyen Lmo1030F ve Lmo1030R primerleri; *L. seelingeri* için Lmo0333 genini hedefleyen IseelinF ve IseelinR primerlerini; *L. ivanovii* için namA genini hedefleyen Liv22228F ve Liv22228R primerlerini; *L. welshimeri için* scrA genini hedefleyen Lwe1801F ve Lwe1801R primerleri kullanılarak polimer zincir reaksiyonuna göre moleküler olarak tanımlamalar yapılmıştır. Bant görselleri Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3. *Listeria* spp. (938 bp) cinsine ve *L. monocytogenes* (174 bp) türüne ait primer çifti ile yapılan PCR görüntüsü

Çizelge 4.3. *Listeria* spp.'lerin Tür Bazında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Tanımlanması

Örnek No.	***Listeria* spp.**	**Örnek No.**	***Listeria* spp.**	**Örnek No.**	***Listeria* spp.**
AŞg1	*L.innocua*	**ABg2**	*L.monocytogenes*	**AFb1**	*L.innocua*
AŞk1	*L.welshimeri*	**ABb2**	*L.welshimeri*	**AFg2**	*L.ivanovii*
AŞys1	*L.welshimeri*	**Abtt2**	*L.innocua*	**AFtt2**	*L.monocytogenes*
AŞb2	*L.welshimeri*	**ABys2**	*L.welshimeri*	**AFg3**	*L.welshimeri*
AŞg2	*L.innocua*	**ABk3**	*L.welshimeri*	**AFb4**	*L.monocytogenes*
AŞys2	*L.seeligeri*	**ABg3**	*L.monocytogenes*	**AFg4**	*L.monocytogenes*
AŞg4	*L.ivanovii*	**ABtt3**	*L.innocua*	**AFtt4**	*L.innocua*
AŞk4	*L.welshimeri*	**ABk4**	*L.monocytogenes*	**AFys4**	*L.monocytogenes*
7BHÇSi28	*L.ivanovii*	**ABg4**	*L.monocytogenes*	**4BHÇSa20**	*L.ivanovii*
NS40	*L.welshimeri*	**ABys4**	*L.seeligeri*	**5BHÇSa23**	*L.monocytogenes*
SKLs63	*L.welshimeri*	**8BHÇSi29**	*L.innocua*	**9KEG32**	*L.ivanovii*
9KESi33	*L.monocytogenes*	**9KESi33**	*L.welshimeri*	**StAs53**	*L.innocua*
9KESi34	*L.innocua*	**KESi54**	*L.ivanovii*		

Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi moleküler doğrulama sonucunda 38 *Listeria* spp. izolatının 11'i *L. welshimeri*, 10'u *L. monocytogenes*, 9'u *L innocua*, 6'sı *L. ivanovii* ve 2'si *L. seeligeri* olarak tespit edilmiştir.

Aynı çizelgede 38 *Listeria* spp. izolatının 21'i gıda örneklerinden, 6'sı silajdan, 5i yıkama sularından, 2'şer adedi atık su ve saman örneklerinden, birisinin gübreden ve nehir suyundan izole edildiği tespit edilmiştir.

Frece ve ark (2009) yaptıkları çalışmada Zagreb-Hırvatistan'ın dört farklı bölgesinden alınan pastörize edilmemiş yerli süt, taze peynir ve çiğ süt kremasında *Listeria monocytogenes*'in tanımlanmasında konvansiyonel (biyokimyasal-API testi) ve PCR yöntemlerini kullanmışlardır. Test edilen 180 süt ürünü örneğinin %27,6'sı PALCAM agarda *Listeria* için tahminen pozitif bulunmuşken, API *Listeria* testi ile analiz edilen örneklerin yalnızca %21,3'ünün *Listeria* pozitif olduğu ve hly geninin (64 bp) PCR amplifikasyonu ile %17,3'ünün *Listeria monocytogenes* için pozitif olduğu doğrulanmıştır.

Silva ver ark (2020) biyokimyasal testlerden (katalaz, motilite, β hemoliz ve karbonhidrat fermantasyonu) elde edilen sonuçlar ile listeriosis patogenezinde önemli bir faktör olan hly genine ait PCR analizi sonucunda analiz edilen et örneklerinin %50'sinde *Listeria* spp. tespit etmişler aynı zamanda bu örneklerde *L. monocytogenes* bulunma oranının %54,16 olduğunu tespit etmişlerdir.

Rossi ve ark (2020) Kuzey İtalya'daki üç tanı laboratuvarı tarafından alınan 653 gıda ve gıda ile temas eden örneğin analizinden elde edilen 75 izolat *Listeria* spp. tür bazında tanımlaması içi PCR ile analiz etmişlerdir. Örneklerin %76'sında *L. innocua*, %16'sında *L. monocytogenes*, %6,6'sında *L. welshimeri* ve %1,3'ünde *L. seeligeri* olarak tanımlamışlardır. Tüm *L. monocytogenes* izolatlarının 1/2a serotipe ait olduğunu ve inlJ internalin geninin varlığı nedeniyle virülan olduklarını belirtmişlerdir.

Martinez ve ark (2022)'nın tavuk örnekleri ile yaptıkları çalışmada 100 örnekten 73'ünde *Listeria* spp. tespit edilmiştir. Tür bazında yapılan tanımlamaya göre 56 örnekte *L. monocytogenes*, 32 örnekte *L. innocua*, 3 örnekte *L. grayi* ve 1 örnekte *L. seeligeri* belirlenmiştir. 24 örnekte birden fazla *Listeria* türü olduğu belirtilmiştir. 21 örnekte *L. monocytogenes* ve *L. innocua; 2 örnekte L. monocytogenes* ve *L. grayi; 1 örnekte L. monocytogenes, L. grayi* ve *L. seeligeri* tespit edildiği bildirilmiştir.

Rincon-Gamboa ve ark (2024) 2019 ve 2020 yılları arasında 4 farklı et üretim tesislerinde yapılan araştırmada ISO 11290-1 metodu ile moleküler serotipleme ve ERIC-PCR ile klonal karakterizasyon aracılığı ile *Listeria* spp. izolasyonu ve tanımlanması yapmışlardır. Çalışmaya ait üretim tesislerindeki *L. monocytogenes* sıklığı %5,9 ile %28,6 arasında değişmiştir; *Listeria* spp. için A ve D tesisinde tespit edilmiştir. *L. monocytogenes* sıklığı A tesisinde en yüksek orana sahipken, *L. monocytogenes* için en sık görülen serotip 4b olmakla birlikte 1/2a, 1/2c, 4a-4c, 4b, 4d - 4e serotipleri de izole etmişlerdir.

4.2. Listex™ P100 Bakteriyofajının *Listeria* spp. Üzerine Antimikrobiyal Etkisi

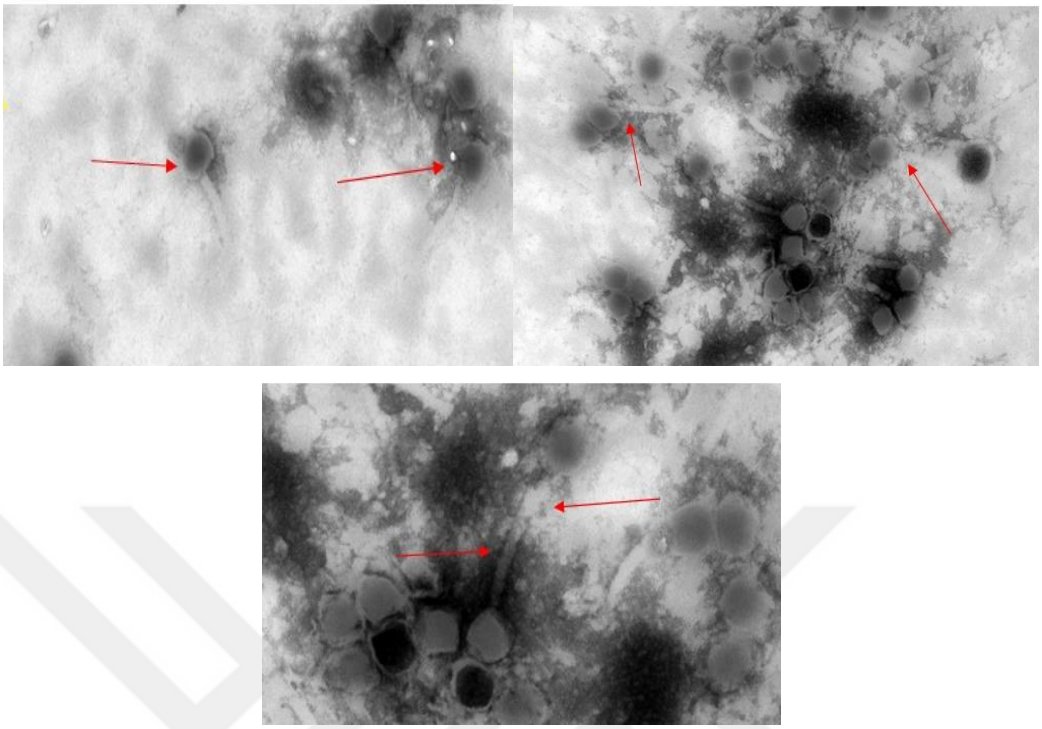
4.2.1. Listex™ P100 Bakteriyofajının *Listeria* Vejetatif Hücreleri Üzerine Antimikrobiyal Etkisi

İki farklı hazır bakteriyofaj preparatı (~10^{11} pob/ml), 100 µl *Listeria* spp. (*Listeria monocytogenes* ATCC #13932, *Listeria ivanovii* ATCC #19119, *Listeria inncoua* ATCC #33070, *Listeria seeligeri* ATCC #35967) ekimleri yapılmış Tryptone Soy Agar (TSA)'a 10 µl damlatma (spot) testi uygulanmış ve petriler 30°C de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyon süresinin sonunda bakteriyofajların lizis oluşumu kontrol edilmiştir.

Bu çalışmada aynı zamanda farklı yıllarda tedarik edilen Listex™ P100 bakteriyofajlarının *Listeria* türleri üzerinde etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

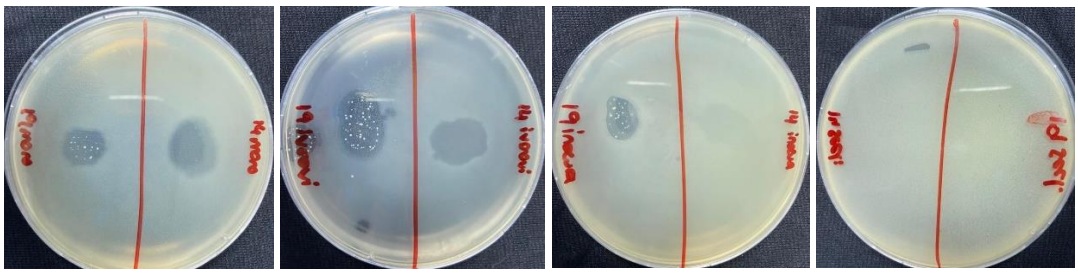
Şekil 4.4'te Listex™ P100 bakteriyofajının Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) görüntüleri verilmiştir. Her iki fajın da bir başı ve boyundan ayrılan bir kuyruğu olduğu tespit edilmiştir. Fajlardan birinde ikosahedral baş ve bir kuyruk açıkça görülmektedir. Diğer fajın başı ve

kuyruğu helikal yapıya benzemektedir. Bu özellikleriyle bu fajların *Myoviridae* familyasına ait oldukları görülmüştür.



Şekil 4.4. Listex^{TM} P100 TEM görüntüleri

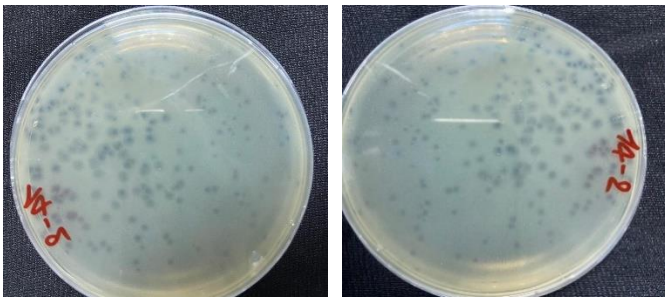
Damlatma (spot) testi uygulanan örneklerden referans *Listeria monocytogenes, Listeria ivanovii* ve *Listeria innocua* üzerine Listex^{TM} P100'ün etki düzeyleri Çizelge 4.4'te gösterilmiştir. *Listeria seeligeri* ATCC #35967 üzerine Listex^{TM} P100'ün herhangi bir etkisi gözlemlenmemiştir. Sonuçlar Şekil 4.5'te verilmiştir. 30°C de 18-24 saat inkübasyonun sonucunda TSA besiyeri üzerinde Listex^{TM} P100'ün zon oluşumları incelenmiştir.



Listeria monocytogenes ATCC #13932 *Listeria ivanovii* ATCC #19119 *Listeria inncoua* ATCC #33090 *Listeria seeligeri* ATCC #35967

Şekil 4.5. *Listeria* spp. referans suşlarına Listex^{TM} P100'ün etkisi

Kullanılan Listex^{TM} P100 bakteriyofajının çift tabaka agar yöntemi ile mevcut konsantrasyonu ölçülmüştür. *L. monocytogenes* ATCC #13932 ile yapılan antibakteriyel etkinlik ölçümüne göre faj konsantrasyonu 10^{11} pob/ml olarak alınmıştır ve spot testi bu konsantrasyon ile gerçekleştirilmiştir. Şekilde 4.6'da Listex^{TM} P100 bakteriyofajının oluşturduğu lizis alanlar görülmektedir.



Şekil 4.6. *Listeria* faj plaklarının çift tabaka agar üzerinde görüntüsü

Belli konsantrasyondaki Listex^{TM} P100 hazır bakteriyofaj preparatı (~10^{11} pob/ml), 100 µl ekilen *Listeria* spp. ekimi yapılmış Tryptone Soy Agar (TSA) üzerine 10 µl damlatma (spot) testi uygulanmış ve petriler 30°C de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi boyunca bakteriyofajların lizis oluşumu kontrol edilmiştir (Çizelge 4.4).

Listex^{TM} P100 Preparatının Farklı Tarihlere Ait Etkinliğinin İncelenmesi

Çizelge 4.3'e göre farklı üretim tarihlerine sahip iki Listex^{TM} P100 hazır bakteriyofaj preparatının vejetatif *L. monocytogenes, L. ivanovii* ve *L.innocua* üzerinde etkili olduğu görülmüştür. *L. seeligeri* üzerine her iki Listex^{TM} P100 bakteriyofajının hiçbir etkisi tespit edilememiştir. Uygulama 1'in sonucu değerlendirildiğinde *L. innocua* üzerine etki Uygulama 2'ye göre daha az etkili olup çok belirgin olmayan bir zon oluşumu gözlenmiştir. Bu çalışma bize ticari olarak piyasaya sürülen Listex^{TM} P100'ün içerik bakımından birbirinden farklı ve ileriki tarihlerinin (Uygulama 1) spektrumunun genişletilmiş olabileceğini göstermiştir. Ayrıca raf ömrünü tamamlamış önceki tarihlerinin de ambalajı açılmadan uygun şartlarda saklandığın taktirde antibakteriyel etkinliğini devam ettiğini göstermiştir. Yapılan inceleme sonucu ambalajı açılmadan yaklaşık 7^{+} yıl uygun şartlar altında depolanmış bir önceki tarihe ait Listex^{TM} P100 hazır bakteriyofaj preparat konsantrasyonunda 4 logluk (10^{11} pob/ml'den 10^{7} pob/ml'e inmiş) azalma olduğu buna karşın bakteriyofajın aktivitesinin devam ettiği tespit edilmiştir.

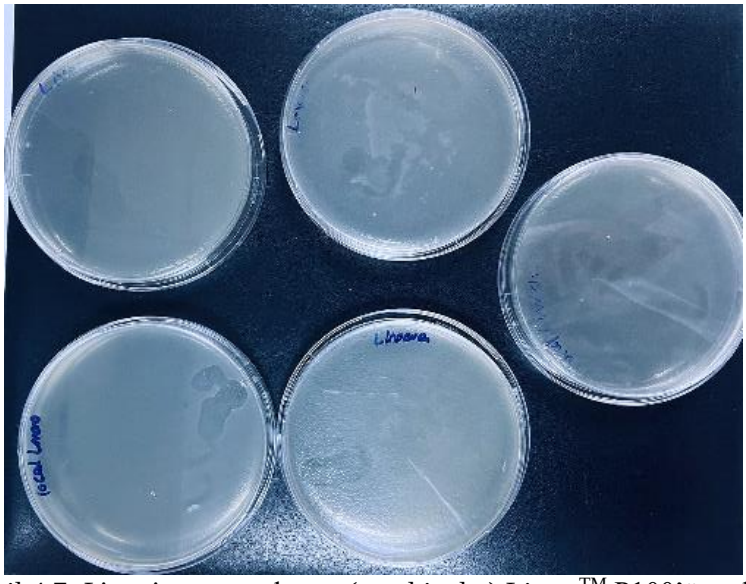
Çizelge 4.4. Listex^{TM} P100 bakteriyofajının referans *Listeria* spp. ler üzerine lizis etkisi.

***Listeria* spp.**	**Listex^{TM} P100'ün *Listeria* vejetatif hücreleri üzerine lizis etkisi**	
	Listex^{TM} P100 Uygulama 1	**Listex^{TM} P100 Uygulama 2**
***Listeria monocytogenes* ATCC #13932**	+++	+++
***Listeria ivanovii* ATCC #19119**	+++	+++
***Listeria innocua* ATCC #33070**	+++	+
***Listeria seeligeri* ATCC #35967**	–	–

*Fajların lizis etkisi + + + (çok yoğun etki), + + (yoğun etki), + (az etki) ve – (etki yok) olarak verilmiştir.

Var ve ark (2014) tarafından Çukurova bölgesinde faaliyet gösteren tavuk işletmelerinden izole edilen *Listeria* izolatlarına ticari Listex^{TM} P100 fajının etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmada; Listex^{TM} P100 bakteriyofajının en etkili olduğu türler sırasıyla insan patojeni olarak belirtilen *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* olarak gözlenirken *L. innocua, L. welshimeri* ve *L. seeligeri* üzerine bakteriyofajın etkisi sınırlı bulunmuştur. Bu durum yerel izolatlar ve referans suşlar arasında fajın etki mekanizmasında farklılıklar olduğunu göstermiştir. Ayrıca her ticari fajın yereldeki her bakteri türüne aynı derece etki etmeyeceğini de göstermiştir.

Ticari olarak satın alınan ileri tarihli olana ait Listex^{TM} P100 bakteriyofajı ile yerli izolatlarımızdan olan *Listeria* spp. türleri üzerine damlatma tekniği ile etkinlik testi yapılmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *Listeria* spp. suşlarına (yerel izolat) Listex^{TM} P100'ün etkisi

Çizelge 4.5 incelendiğinde yerel izolatlarda Listex™ P100 bakteriyofajının etkisi en fazla *Listeria monocytogenes* üzerine gözlemlenirken en az etki *Listeria welshimeri* üzerine olmuştur. Ancak 4 tür için de farklı düzeylerde etkinlik olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Listex™ P100 bakteriyofajının *Listeria* spp. izolatları üzerine lizis etkisi.

***Listeria* spp.**	**Listex™ P100'ün *Listeria* vejetatif hücreleri üzerine lizis etkisi**
Listeria monocytogenes yerel izolat	+++
Listeria ivanovii yerel izolat	++
Listeria innocua yerel izolat	++
Listeria welshimeri yerel izolat	+

*Fajların lizis etkisi + + + (çok yoğun etki), + + (yoğun etki), + (az etki) ve – (etki yok) olarak verilmiştir.

Listex™ P100 bakteriyofajının referans *Listeria* spp. ler üzerine lizis etkisinin incelenmiş olduğu Çizelge 4.4 ile birlikte Çizelge 4.5'in değerlendirmesi yapıldığında bakteriyofajın etkinlik düzeyinin incelenen tüm izolatlar üzerine etkisinin suşlara göre farklılık oluşturabileceğini ve bu bakteriyofajın izole edilen her bakteri türüne aynı derecede etki etmeyeceğini göstermiştir.

Zhou ve ark (2020) atık sulardan izole ettikleri ve *Myoviridae* familyasına ait olan SH3-3 fajının *L. monocytogenes, L. innocua* ve *L. welshimeri* suşları üzerinde litik aktivitesinin olduğunu gözlemlemişlerdir.

4.2.2. Listex™ P100 Bakteriyofajının Mikroplakada Geliştirilen *Listeria* spp. Biyofilmleri Üzerine Etkisi

Bu çalışmada 0,5 McFarland (yaklaşık $1{,}5x10^8$ kob/ml) konsantrasyonundaki 18 saatlik *Listeria* spp. kültürü ile 37°C'de 72 saat boyunca oluşturulan biyofilmleri üzerine farklı konsantrasyonlardaki Listex™ P100 faj uygulamasının kontrol biyofilmine göre % azalma etkileri belirlenmiştir. Mikroplaka çalışmasında Listex™ P100 bakteriyofajının 10^4, 10^6 ve 10^8 pob/ml konsantrasyonları kullanılmıştır. Çalışma 96 kuyucuklu mikroplaka üzerinde ve 3 tekerrür olarak yapılmıştır. Hücre yoğunluğu (OD) ölçümleri üzerinden yapılan değerlendirmelerde sonuçların ortalaması alınmış ve istatistiksel değerlendirmesi yapılmıştır.

Çizelge 4.6.'da detayları verilen *Listeria* spp. biyofilmleri üzerine Listex™ P100 bakteriyofajının 10^8 pob/ml konsantrasyonunun 24. saatteki etkinlik sonuçlarına göre ortalama değerler karşılaştırıldığında Listex™ P100 bakteriyofajının 24. saatte *Listeria* spp. türleri üzerine etkileri arasındaki farklılık $p<0.05$ güven aralığında önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.6. Listex^{TM} P100 Bakteriyofajının 10^8 pob/ml konsantrasyonda *Listeria* spp. biyofilmleri üzerine 24 saatteki % azalma oranları

***Listeria* spp.**	**Başlangıç Mikroorganizma Yükü**	**Ortalama**
***L. monocytogenes* ATCC #13932**	$1,2x10^8$ kob/ml	73,84±1,14 a
***L. monocytogenes* yerel izolat**	$1,5x10^8$ kob/ml	66,93±1,14 b
***L. ivanovii* yerel izolat**	$1,4x10^8$ kob/ml	58,53±1,15 c
***L. innocua* yerel izolat**	$5,2x10^8$ kob/ml	34,11±1,15 d
***L. welshimeri* yerel izolat**	$3,2x10^8$ kob/ml	15,56±1,13 e

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark önemlidir($p<0.05$)

Her bir *Listeria* spp. için başlangıç konsantrasyonlarına göre Listex^{TM} P100 bakteriyofajının 10^8 pob/ml konsantrasyonu ile muamele sonucunda *L. monocytogenes* ATCC #13932 için azalma %73,84 ile en yüksek oranda olup bunu takiben %66,93 azalma oranı ile yerel *L. monocytogenes* izolatı ve %58,53 azalma ile *L. ivanovii* yerel izolatı gelmektedir.

Yerel *L. innocua* ve yerel *L. welshimeri* izolatları üzerine sırasıyla %34,11 ve %15,56 azalma belirlenmiş olup 10^8 pob/ml faj konsantrasyon uygulamasında en düşük etki yerel *L. welshimeri* izolatı üzerine tespit edilmiştir.

Listex^{TM} P100 bakteriyofajının 10^6 pob/ml konsantrasyonunun *Listeria* spp. biyofilmleri üzerine 24. saatteki etkileri Çizelge 4.7.'de verilmiştir. Her bir *Listeria* spp. için başlangıç konsantrasyonlarına göre Listex^{TM} P100 bakteriyofajının 10^6 pob/ml konsantrasyonu ile muamele sonucunda *L. monocytogenes* ATCC #13932 için azalma %49,49 ile en yüksek oranda iken bunu takiben %49,14 azalma oranı ile yerel izolat *L. monocytogenes* ve %42,49 azalma ile *L. ivanovii* yerel izolat gelmektedir. Yerel izolatlar *L. innocua ve L. welshimeri* üzerine sırasıyla %18,48 ve %10,02 azalma belirlenmiş olup 10^6 pob/ml faj konsantrasyon uygulamasında en düşük etki yerel izolat *L. welshimeri* üzerine tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Listex^{TM} P100 Bakteriyofajının 10^6 pob/ml konsantrasyonda *Listeria* spp. biyofilmleri üzerine 24 saatteki % azalma oranları

***Listeria* spp.**	**Başlangıç Mikroorganizma Yükü**	**Ortalama**
***L. monocytogenes* ATCC #13932**	$1,2x10^8$ kob/ml	49,49±2,30 a
***L. monocytogenes* yerel izolat**	$1,5x10^8$ kob/ml	49,14± 2,31 b
***L. ivanovii* yerel izolat**	$1,4x10^8$ kob/ml	42,49±2,31 c
***L. innocua* yerel izolat**	$5,2x10^8$ kob/ml	18,48±2,32 d
***L. welshimeri* yerel izolat**	$3,2x10^8$ kob/ml	10,02±2,30 e

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark önemlidir($p<0.05$)

Ortalama sonuçlar karşılaştırıldığında Listex™ P100 bakteriyofajının 10^6 pob/ml konsantrasyonunun 24. saatte *Listeria* spp. türleri üzerine etkileri arasındaki farklılık $p<0.05$ güven aralığında önemli bulunmuştur.

Zhou ve ark. (2020) atık sulardan izole ettikleri SH3-3 fajının 30°C'de 48 saat boyunca biyofilmi oluşturulan *L. monocytogenes* üzerine 24 saat faj (10^6 pob/ml) muamelesinin ardından ölçtükleri etkinliğe göre 595 nm'de hücre yoğunluğu OD değerinde %69 azalma belirlemişlerdir.

Listeria spp. biyofilmleri üzerine Listex™ P100 bakteriyofajının 10^4 pob/ml konsantrasyonunun muamelesi sonucunda gözlemlenen etkinin detayları Çizelge 4.8'de verilmiştir. Her bir *Listeria* spp. için başlangıç konsantrasyonlarına göre Listex™ P100 bakteriyofajının 10^4 pob/ml konsantrasyonu ile muamele sonucunda *L. monocytogenes* ATCC #13932 üzerine azalma %16,11 ile en yüksek oranda iken bunu takiben %15,94 azalma oranı ile yerel izolat *L. monocytogenes* ve %11,43 azalma ile *L. ivanovi* yerel izolatları gelmektedir. Yerel izolatlar *L. innocua ve L. welshimeri* üzerine sırasıyla %6,10 ve %5,49 azalma belirlenmiş olup 10^4 pob/ml faj konsantrasyon uygulamasında en düşük etki yerel izolat *L. welshimeri* üzerine tespit edilmiştir.

Çizelge 4.8. Listex™ P100 Bakteriyofajının 10^4 pob/ml konsantrasyonda *Listeria* spp. biyofilmleri üzerine 24 saatteki % azalma oranları

***Listeria* spp.**	**Başlangıç Mikroorganizma Yükü**	**Ortalama**
***L. monocytogenes* ATCC #13932**	$1,2x10^8$ kob/ml	16,11±0,75 a
***L. monocytogenes* yerel izolat**	$1,5x10^8$ kob/ml	15,94±0,75 a
***L. ivanovii* yerel izolat**	$1,4x10^8$ kob/ml	11,43±0,74 b
***L. innocua* yerel izolat**	$5,2x10^8$ kob/ml	6,10±0,73 c
***L. welshimeri* yerel izolat**	$3,2x10^8$ kob/ml	5,49±0,72 c

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark önemlidir($p<0.05$)

Ortalama sonuçlar karşılaştırıldığında Listex™ P100 bakteriyofajının 10^4 pob/ml konsantrasyonunun 24. saatte *Listeria* spp. türleri üzerine etkileri arasındaki farklılık $p<0.05$ güven aralığında önemli bulunmuştur.

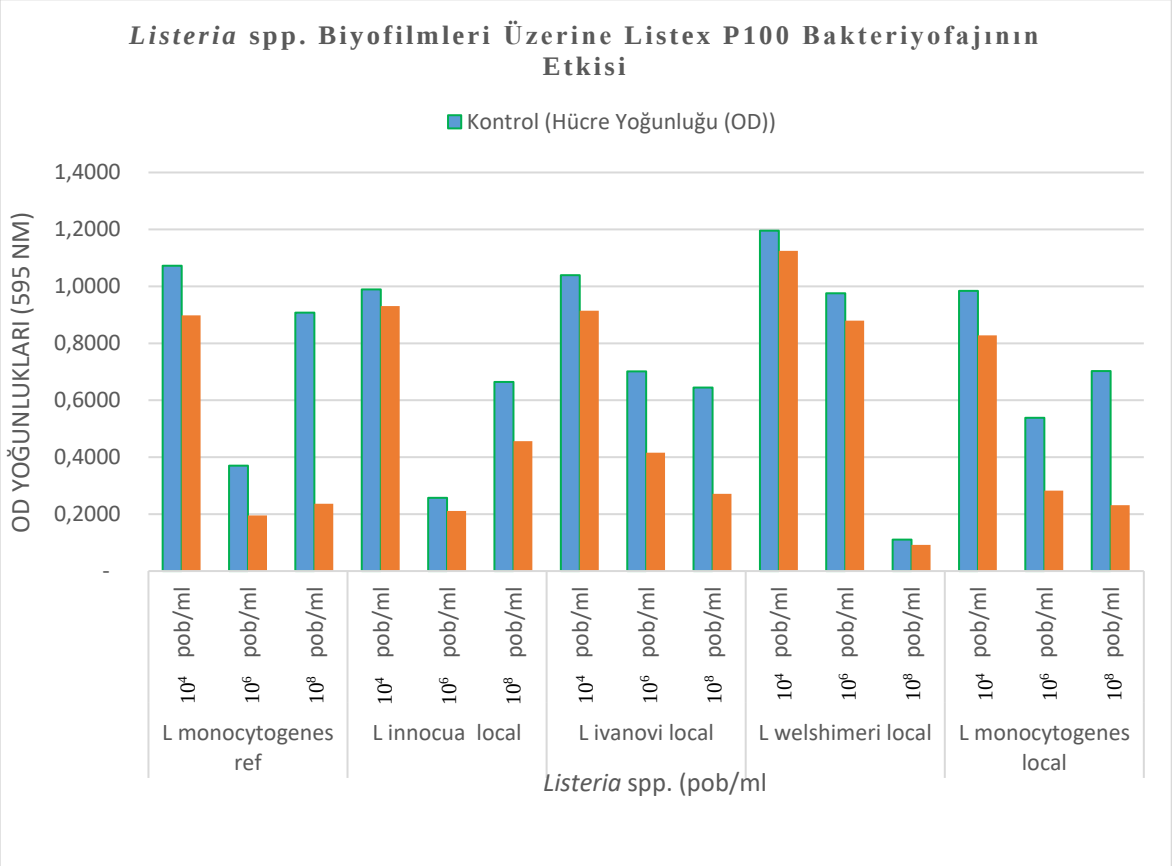
Çizelge 4.9. incelendiğinde Listex™ P100 bakteriyofajının üç farklı konsantrasyonunun (10^4, 10^6 ve 10^8 pob/ml) *Listeria* spp. biyofilmleri üzerine 24 saatte etkili olduğu görülmektedir. Ortalama sonuçlar karşılaştırıldığında Listex™ P100 bakteriyofajının 10^4 pob/ml konsantrasyonunun 24. saatte *Listeria* spp. türleri üzerine etkileri arasındaki farklılık $p<0.05$ güven aralığında önemli bulunmuştur. Sevgi ile yazılan paragraf gibi olacak

Çizelge 4.9. Listex™ P100 Bakteriyofajının 10^4 , 10^6 ve 10^8 pob/ml konsantrasyonda *Listeria* spp. biyofilmleri üzerine 24 saatteki % azalma oranları

***Listeria* spp.**	**Ortalama (10^8pob/ml)**	**Ortalama (10^6pob/ml)**	**Ortalama (10^4pob/ml)**
***L. monocytogenes* ATCC #13932**	73,84±2,09 a	49,49±2,09 b	15,94±2,09 c
***L. monocytogenes* yerel izolat**	66,93±1,67 a	49,14±1,67 b	16,11±1,67 c
***L. ivanovii* yerel izolat**	58,53±1,54 a	42,49±1,54 b	11,43±1,54 c
***L. innocua* yerel izolat**	34,11±1,27 a	18,48±1,27 b	5,49±1,27 c
***L. welshimeri* yerel izolat**	15,56±0,89 a	10,02±0,89 b	6,10±0,89 c

* Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark önemlidir($p<0.05$)

Şekil 4.9 incelendiğinde 595 nm'de kontrol örneklerinin hücre yoğunlukları (OD) ve 24. saat sonrasında ölçülen hücre yoğunluğu ölçümlerine temin edilen bakteriyofajın her suşa ve onun oluşturduğu biyofilme etkisinin aynı olmayacağını göstermiştir.



Şekil 4.8. *Listeria* spp Biyofilmleri Üzerine Listex P100 Bakteriyofajının Etkisi

Ticari olarak satılan faj preparatlarının, farklı bakteriyel suşlara karşı daha geniş bir virülans etkisi sağlamak amacıyla kokteyl formatında hazırlanmasının daha uygun olabileceği düşünülmektedir. Tekil fajların etkinliği, bakteriyel direnç gibi faktörler nedeniyle sınırlı kalabilir.

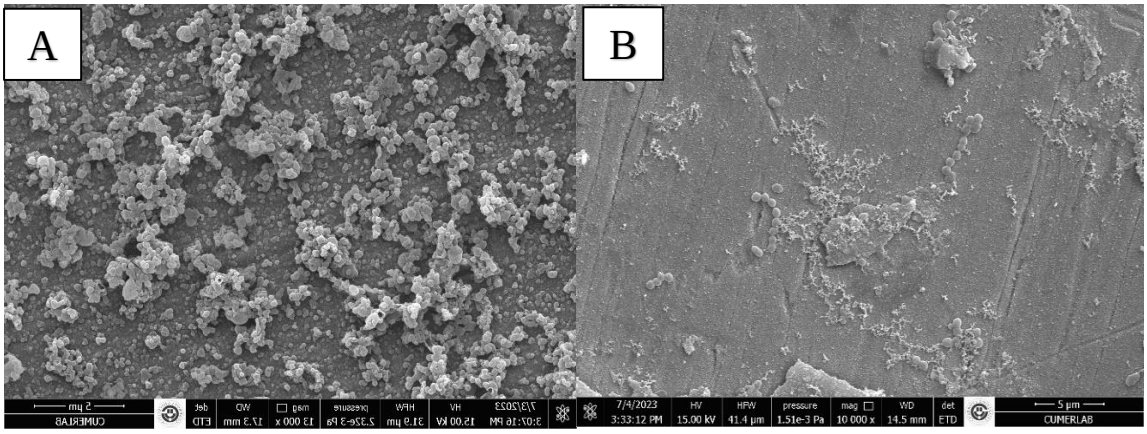
Bu nedenle, faj kokteyllerinin kullanılması, bakteriyofaj tedavilerinde daha etkili sonuçlar elde edilmesine katkı sağlayabilir. Ayrıca, fajların kokteyl şeklinde uygulanması, bakterilerin fajlara karşı geliştirebileceği olası direnç mekanizmalarını da engelleyebilir.

4.2.3. Listex^{TM} P100 Bakteriyofajının 37 Derecede Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz) Oluşturulan *Listeria* spp. Biyofilmleri Üzerine Etkisi

Bu çalışmada 37°C'de 9 günlük inkübasyon sonrasında farklı yüzeylerde (paslanmaz çelik, plastik ve galvaniz) oluşturulan biyofilmlerin Scanning Elektron Mikroskobu (SEM) ile bir suş için aynı zamanda kontrol olarak da yüzeylerde biyofilm oluşturularak görüntüleri alınmıştır. Çalışmada *Listeria* spp. olarak referans *L. monocytogenes* ATCC #13932, yerel izolat *L. innocua*, yerel izolat *L. monocytogenes*, yerel izolat *L. ivanovii* ve yerel izolat *L. welshimeri* olarak çalışılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22'de verilmiştir.

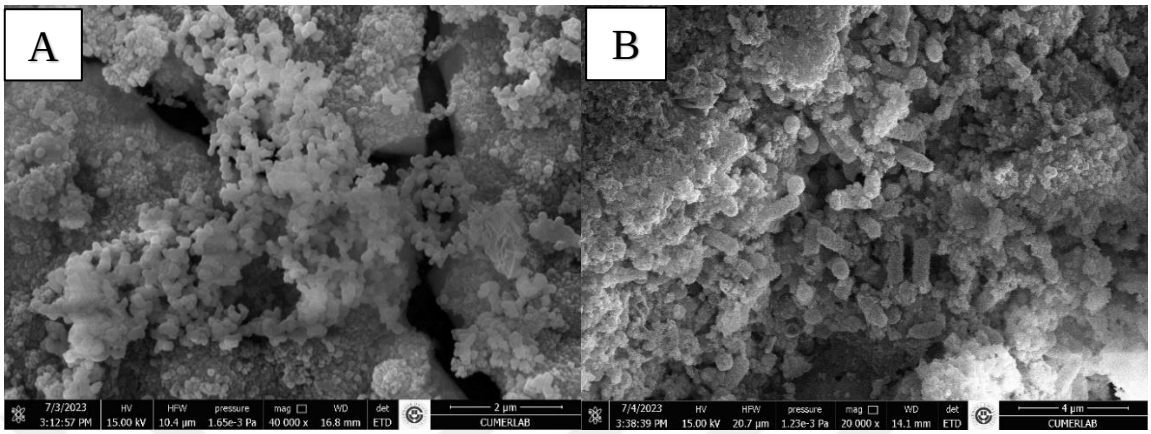
Buna göre kullanılan suştan 0,5 McFarland (yaklaşık $1{,}5x10^8$ kob/ml) konsantrasyonda TSB besiyeri içerisine 100 µl eklenerek, 37°C'de 9 gün boyunca inkübasyona bırakılan tüm türlerin belirlenen yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturduğu ve 10^6 pob/ml konsantrasyonda Listex^{TM} P100 fajın 24 saat muamelesi sonrasında bakteriyofajın etkili olduğu ve bu konsantrasyonun biyofilmin fiziksel yapısında değişim yarattığı gözlenmiştir. Uygulamalar Ç.Ü Gıda Mühendisliği mikrobiyoloji laboratuvarında yapılmıştır. Fiksasyonu yapılan preparatlar Ç.Ü Merkez laboratuvarında Scanning Elektron Mikroskobu (SEM) görselleri ile değerlendirilmiştir.

Şekil 4.9 A incelendiğinde *Listeria monocytogenes* ATCC #13932 referans suşunun paslanmaz çelik yüzeyde biyofilm oluşturabildiği görülmüştür. Çelik yüzeyde oluşan bu biyofilmin üzerine Listex^{TM} P100 fajının 24 saat muamelesinden sonra etkili olduğu görülmüştür (Şekil 4.9 B). Bu yüzeyde referans *Listeria monocytogenes* ATCC #13932 suşunun biyofilm oluşumunun galvaniz ve plastik yüzeye göre daha belirgin olduğu gözlenmiştir.



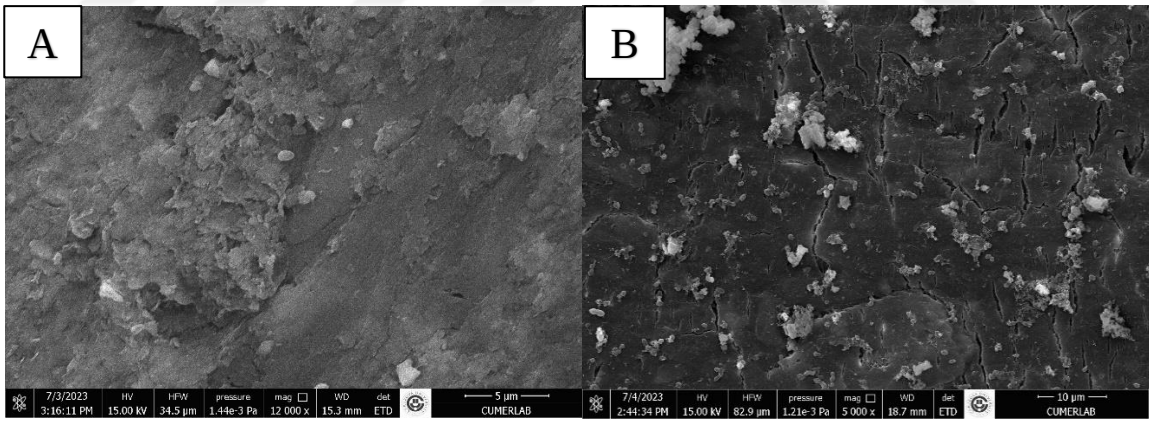
Şekil 4.9. SEM Görüntüleri **A**. *Listeria monocytogenes* ATCC #13932 - Paslanmaz Çelik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex^{TM} P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Listeria monocytogenes ATCC #13932 referans suşunun galvaniz yüzeyde biyofilm oluşturduğu görülmektedir (Şekil 4.10 A). Galvaniz yüzeyde oluşan bu biyofilmin üzerine Listex™ P100 fajının 24 saat muamelesinden sonra etkili olduğu görülmüştür (Şekil 4.10 B).



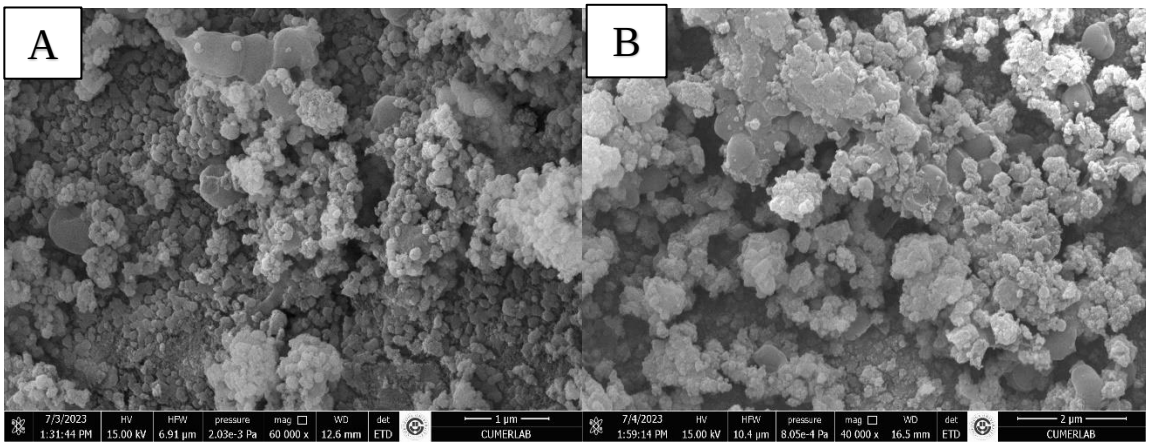
Şekil 4.10. SEM Görüntüleri **A**. *Listeria monocytogenes* ATCC #13932 - Galvaniz Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex™ P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Listeria monocytogenes ATCC #13932 referans suşunun plastik yüzeyde iyi bir biyofilm oluşturamadığı Şekil 4.11 A'da görülmektedir. Plastik yüzeydeki bu biyofilm üzerine Listex™ P100 fajının 24 saat muamelesinden sonra etki tam olarak değerlendirilememiştir (Şekil 4.11 B).



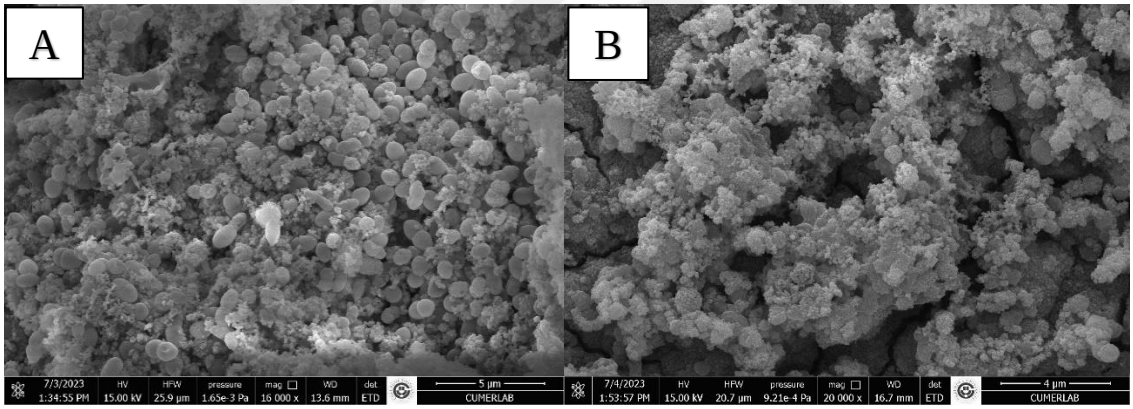
Şekil 4.11. SEM Görüntüleri **A**. *Listeria monocytogenes* ATCC #13932 - Plastik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex™ P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Şekil 4.12 A'da yerel izolatlardan olan *Listeria ivanovii* suşunun paslanmaz çelik yüzeyde iyi bir biyofilm oluşturduğu ve Şekil 4.12 B'de paslanmaz çelik yüzeyde oluşan biyofilm üzerine Listex™ P100 bakteriyofaj uygulamasının 24 saat muamelesinden sonra hücre morfolojisinde değişiklik yaratarak etkili olduğu görülmüştür.



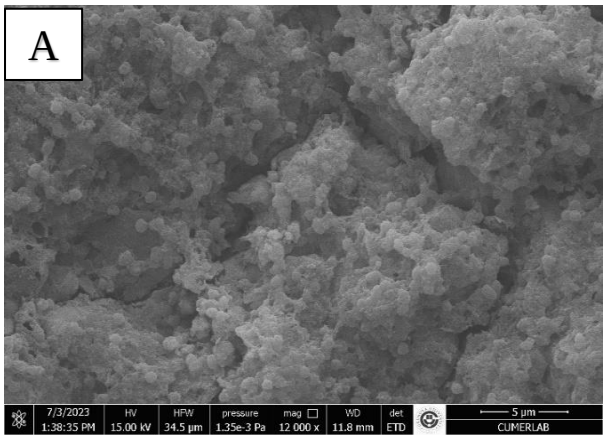
Şekil 4.12. SEM Görüntüleri **A**. Yerel izolat *Listeria ivanovii*-Paslanmaz Çelik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex^{TM} P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Şekil 4.13 A'da yerel izolatlardan olan *Listeria ivanovii* suşunun galvaniz yüzeyde iyi bir biyofilm oluşturduğu ve Şekil 4.13 B'de galvaniz yüzeyde oluşan biyofilm üzerine Listex^{TM} P100 bakteriyofaj uygulamasının 24 saat muamelesinden sonra hücre morfolojisinde değişiklik yaratarak etkili olduğu görülmüştür.



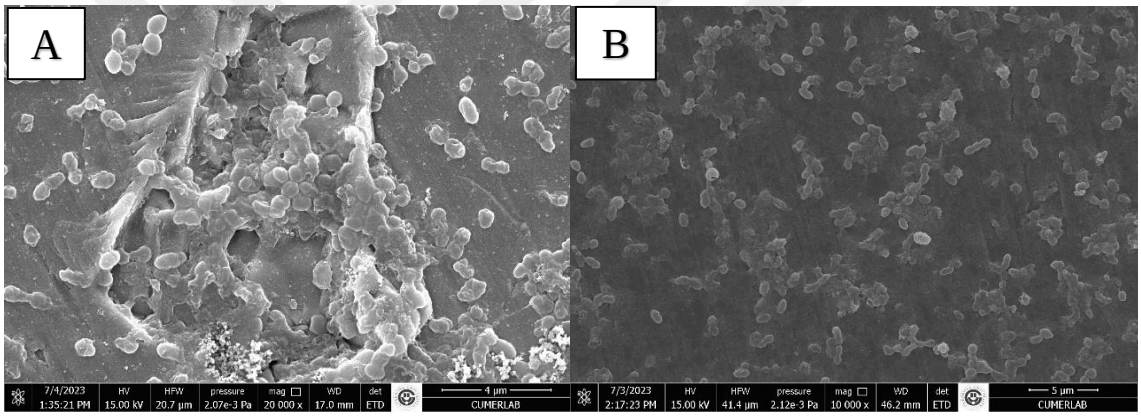
Şekil 4.13. SEM Görüntüleri **A**. *Listeria ivanovii*-Galvaniz Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex^{TM} P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Şekil 4.14'te yerel izolatlardan olan *Listeria ivanovii* suşunun plastik yüzeyde iyi bir biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. *Listeria ivanovi* suşunun plastik yüzeyde oluşturduğu biyofilm yapısı üzerine malzemeyle ilgili bir tedarik sıkıntısı nedeniyle Listex^{TM} P100 bakteriyofaj uygulaması yapılamadığından bu yüzeyde bakteriyofaj uygulaması yapılamamıştır.



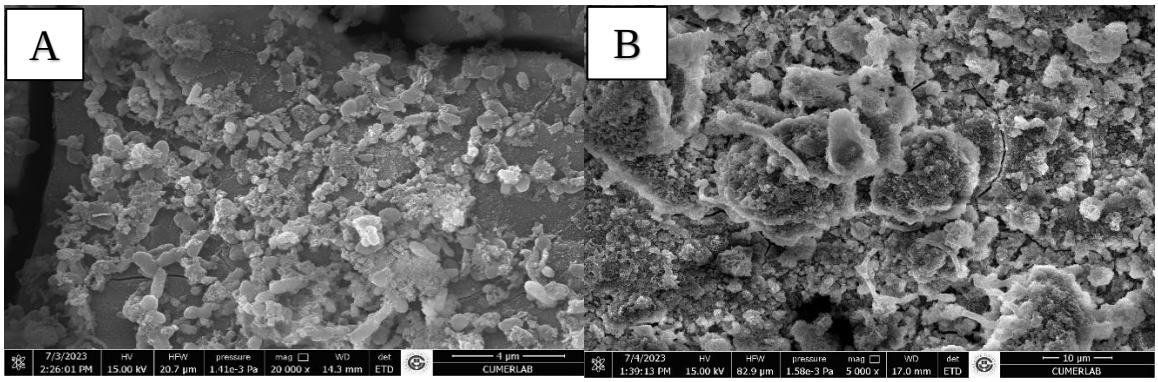
Şekil 4.14. SEM Görüntüleri **A**. *Listeria ivanovii*-Plastik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm

Şekil 4.15 A incelendiğinde yerel izolat *Listeria innocua* suşunun paslanmaz çelik yüzeyde biyofilm oluşturabildiği görülmektedir. Paslanmaz çelik yüzeyde oluşan bu biyofilmin üzerine Listex^{TM} P100 fajının 24 saat muamelesinden sonra etkili olduğu görülmüştür (Şekil 4.15 B).



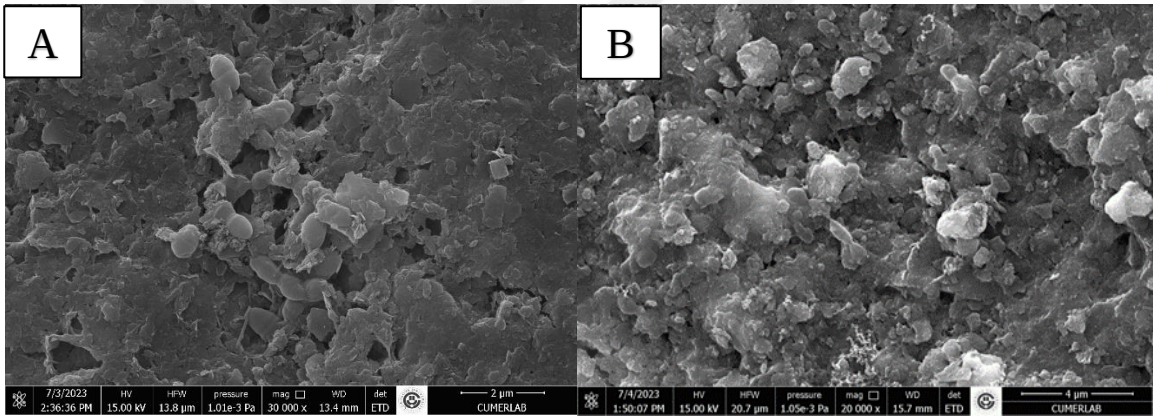
Şekil 4.15. SEM Görüntüleri **A**. Yerel izolat *Listeria innocua* - Paslanmaz Çelik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex^{TM} P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Şekil 4.16 A'da görüldüğü gibi yerel izolat *Listeria innocua* suşunun galvaniz yüzeyde iyi bir biyofilm oluşturamadığı gözlenmiştir. Galvaniz yüzeyde oluşan bu biyofilm üzerine Listex^{TM} P100 fajının 24 saat muamelesinden sonra etki tam olarak değerlendirilememiştir.



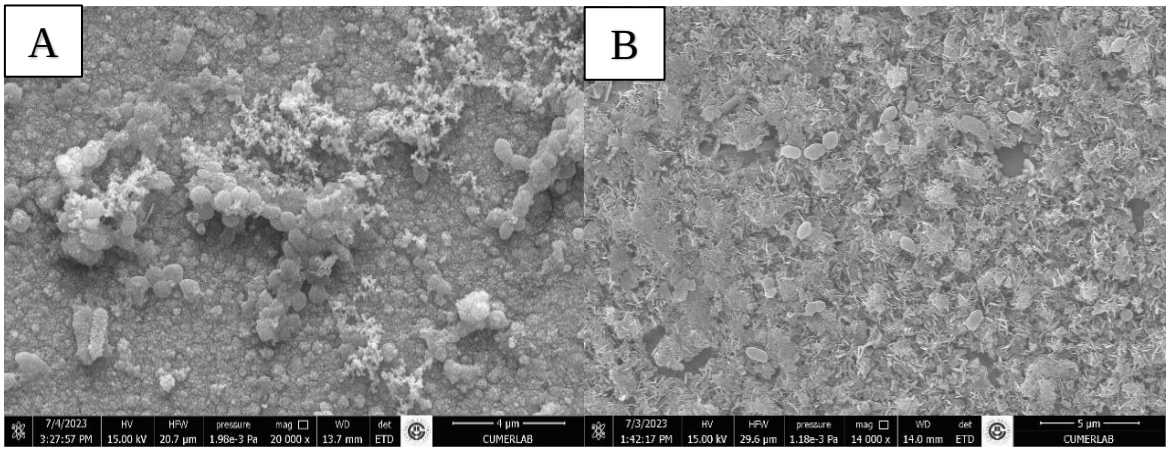
Şekil 4.16. SEM Görüntüleri **A**. *Listeria innocua* – Galvaniz Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex^{TM} P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Şekil 4.17 A incelendiğinde yerel izolat *Listeria innocua* suşunun plastik yüzeyde bir biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Plastik yüzey üzerinde oluşan yerel izolat *Listeria innocua* biyofilmine Listex^{TM} P100 fajının 24 saat muamelesinden sonra bu biyofilme etki ettiği gözlenmiştir (Şekil 4.17 B).



Şekil 4.17. SEM Görüntüleri **A**. *Listeria innocua* – Plastik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex^{TM} P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

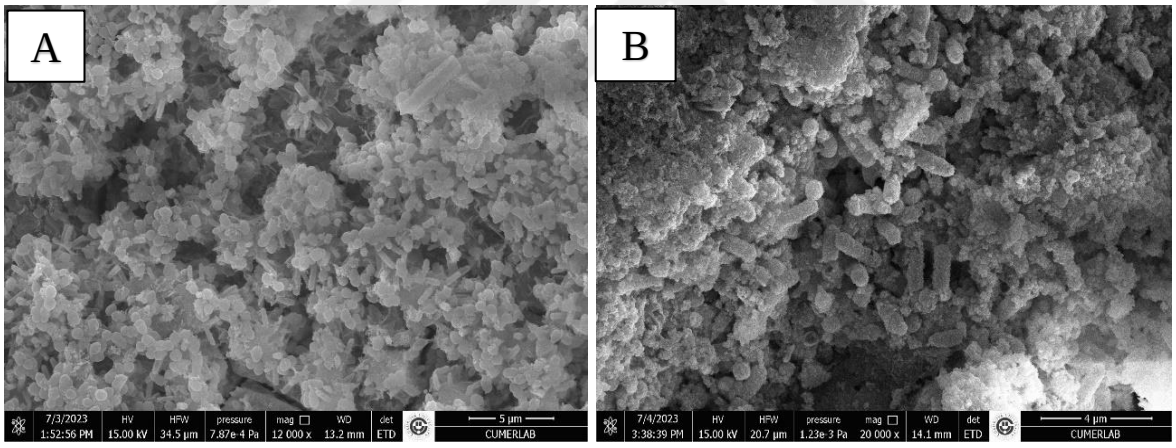
Şekil 4.18 A'da görüldüğü üzere yerel izolat *Listeria monocytogenes* suşunun paslanmaz çelikte bir biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Paslanmaz çelik yüzey üzerinde görüntülenen yerel izolat *Listeria monocytogenes*'in oluşturduğu biyofilmine Listex^{TM} P100 fajının 24 saat muamelesinden sonra bakteriyofajın biyofilme etki ettiği görülmüştür (Şekil 4.18 B).



Şekil 4.18. **A**. SEM Görüntüleri *Listeria monocytogenes* - Paslanmaz Çelik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex^{TM} P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

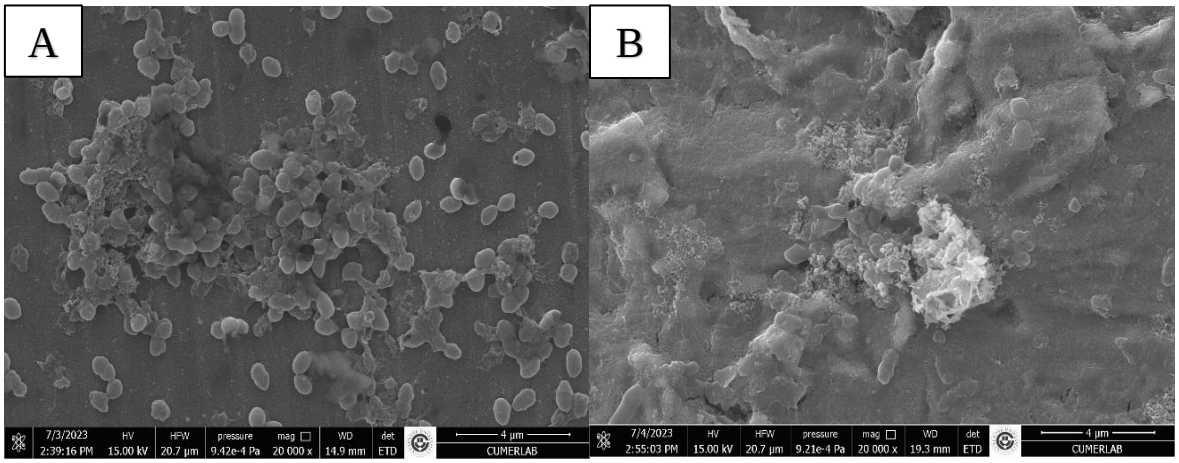
Yerel izolat *Listeria monocytogenes* suşunun galvaniz yüzeyde paslanmaz çelik yüzeye göre daha belirgin bir biyofilm oluşturduğu Şekil 4.19 A'da gözlenmiştir.

Galvaniz yüzeyde oluşan *Listeria monocytogenes* biyofilmine Listex^{TM} P100 fajının 24 saat muamelesinden sonra bakteriyofajın biyofilme etki ettiği görülmüştür (Şekil 4.19 B). Ayrıca hücre yapısı üzerinde fiziksel deformasyona sebep olduğu görülmektedir.



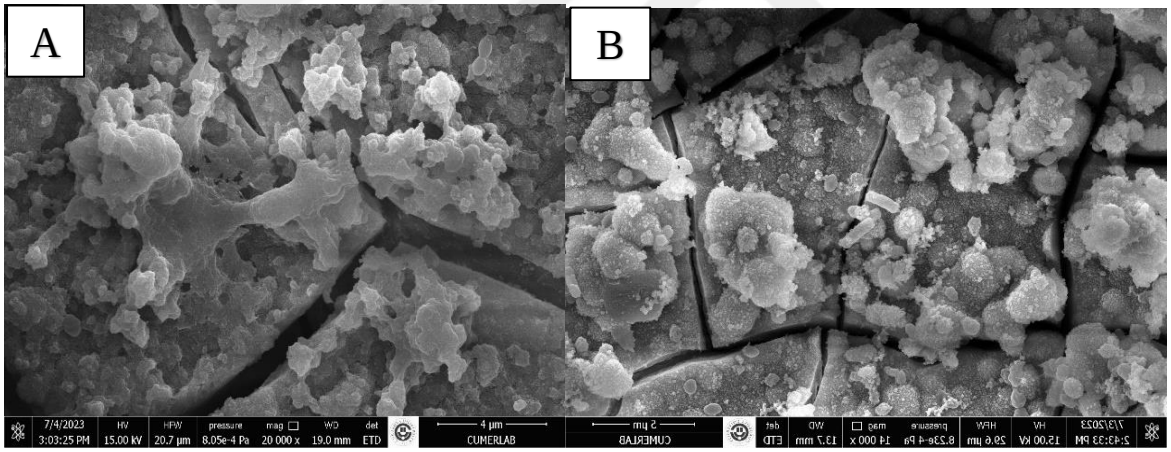
Şekil 4.19. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria monocytogenes* - Galvaniz Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex^{TM} P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Yerel izolat *Listeria welshimeri* suşunun paslanmaz çelik yüzeyde biyofilm oluşturduğu görülmektedir (Şekil 4.20 A). *Listeria welshimeri* biyofilmi üzerine Listex^{TM} P100 bakteriyofaj uygulamasının 24. saatte etkisi değerlendirildiğinde bakteriyofajın biyofilme etki ettiği gözlenmiştir (Şekil 4.20 B). Bu yüzeyde yerel izolat *Listeria welshimeri* hücreleri üzerinde faj uygulaması sonrasında ayrıca şekilsel bozulmalar meydana geldiği görülmüştür.



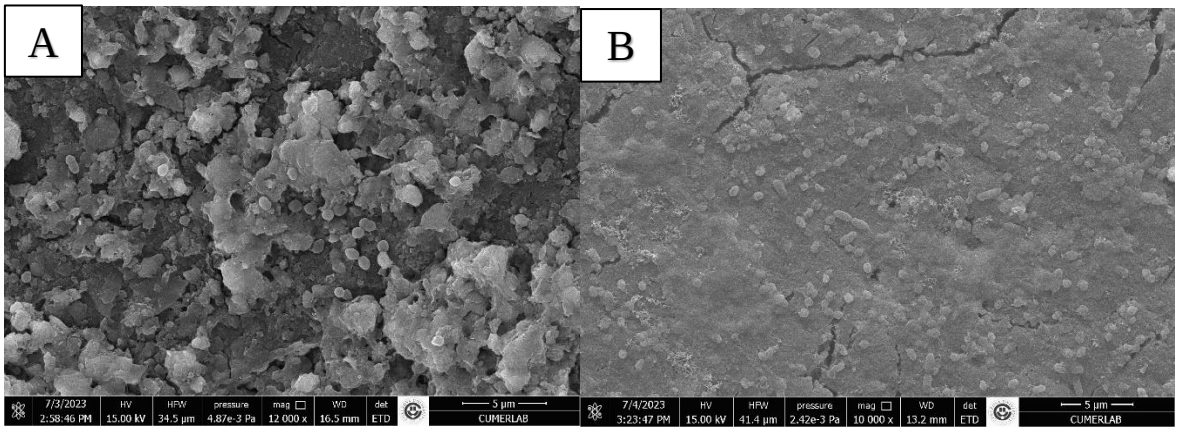
Şekil 4.20. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria welshimeri* - Paslanmaz Çelik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex^{TM} P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Yerel izolat *Listeria welshimeri* suşunun galvaniz yüzeyde iyi bir biyofilm oluşturduğu görülmektedir (Şekil 4.21 A). Galvaniz yüzeyde oluşan *Listeria welshimeri* biyofilmine Listex^{TM} P100 fajı ile 24 saat muameleden sonra değerlendirme yapıldığında bakteriyofajın biyofilme etki ettiği gözlenmiştir (Şekil 4.21 B).



Şekil 4.21. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria welshimeri* - Galvaniz Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex^{TM} P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Yerel izolat *Listeria welshimeri* suşunun plastik yüzeyde iyi bir biyofilm oluşturamadığı Şekil 4.22 A'da görülmektedir. Plastik yüzeydeki bu biyofilm üzerine Listex^{TM} P100 fajının 24 saat muamelesinden sonra etki tam olarak değerlendirilememiştir (Şekil 4.22 B).



Şekil 4.22. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria welshimeri* - Plastik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme Listex^{TM} P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Bu çalışmada Scanning Elektron Mikroskobu (SEM) ile yapılan değerlendirmeler sonucunda tüm yüzeylerde *Listeria* spp. türlerine göre değişiklik göstermekle birlikte farklı düzeylerde de olsa biyofilm varlığı gözlenmiştir. Paslanmaz çelik ve galvaniz yüzeylerde plastik yüzeylere göre daha iyi bir biyofilm yapısının oluştuğu, EPS matriksinin görülebildiği belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan *L. monocytogenes* suşları dahil kullanılan tüm suşların biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Hem hidrofobik hem de hidrofilik yüzeyler *L. monocytogenes* tarafından kolonizasyonu ve biyofilm gelişimini desteklemektedir.

Kalmokoff ve ark (2001), *L. monocytogenes*'in zayıf biyofilm oluşturma yeteneklerine sahip olduğunu ve paslanmaz çelik üzerinde yalnızca vejetatif olarak çoğalabildiklerini bildirmişlerdir.

Gu ve ark (2021) gıda ile temas eden yüzeylerde biyofilm oluşumu üzerine yüzeylerin etkilerini inceledikleri çalışmalarında üç farklı yüzey topografisine sahip (doğal yüzey (1), ticari fırçalanmış yüzey (2) ve yeni bir işlemle geliştirilen mikro yapılı sütunlara sahip doğal yüzey(3)) paslanmaz çelik kullanmışlardır. Her uygulamada yüzeylerin ya hiç kaplanmamış ya da beş FDA onaylı gıda teması uygun madde ile kaplandığını belritmişlerdir (krom nitrit, titanyum nitrit, Dursan, Ni–P-politetrafloroetilen (Ni–P-PTFE) ve Lectrofluor 641). *L. monocytogenes* biyofilm oluşumunda en fazla azalmanın, doğal yüzey üzerine kaplanan Dursan ile (3,4 log kob/cm²) ve mikropillar ile modifiye edilmiş doğal yüzey üzerine kaplanan Dursan ile (2,8 log kob/cm²) elde edildiğini belirtmişlerdir. Bu sonuçlara göre hidrojen bağı, elektrostatik ve hidrofobik-hidrofobik etkileşimlerin, hücre yapışmasını kolaylaştıran EPS polisakkaritleri ve proteinleri belirtilen destekleyici fonksiyonlar arasında olduğunu bildirmişlerdir.

Moltz ve Martin (2005), *L. monocytogenes* suşları ile (7644, 19112, 15313, Scott A, LCDC, 10403S, SLCC, and 1370) paslanmaz çelik yüzeyde biyofilm oluşumunu gözlemlemiştir. Bu çalışma ile bizim sonuçlarımız benzerlik göstermektedir.

Di Bonaventura ve ark (2007) yaptıkları çalışmada 4, 12 ve 22°C'lerde *L. monocytogenes*'in cam yüzeylerde paslanmaz çelik ve polistiren yüzeylere göre daha yüksek seviyelerde biyofilmler oluşturduklarını bildirmişlerdir. Ayrıca 37°C'de cam ve paslanmaz çelik üzerinde polistiren yüzeyler ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek seviyelerde biyofilm üretildiğini gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte, 37°C'de 4°C'ye göre önemli ölçüde daha yüksek bir biyofilm üretimi gözlemlemişlerdir. (Colagiorgi ve ark., 2017)

Bonsaglia ve ark (2014) farklı gıdalardan (süt ve sebzeler) ve gıda işleme ortamlarından izole edilen 32 adet *L. monocytogenes* suşunu gıda endüstrisinde sıkça kullanılan üç farklı yüzeyde (polistiren, cam ve paslanmaz çelik) biyofilm oluşturma yetenekleri açısından analiz etmişlerdir. Analizleri farklı sıcaklık koşullarında (4, 20 ve 35 °C) gerçekleştirmişlerdir. Buna göre tüm suşların değerlendirmeye tabi sıcaklık ve malzemelerden en az birinde biyofilm üretildiği bildirilmiştir. 20°C'de hidrofilik yüzeylerde (cam ve paslanmaz çelik) biyofilm üreten *Listeria* spp. suş sayısının (sırasıyla 31 suş ve 26 suş) daha fazla iken hidrofobik yüzeylerde (plastik polistrene) daha az (2 suş) olduğunu göstermişlerdir. 35 °C'de hidrofilik yüzeyde biyofilm üreten *Listeria* spp. suş sayısının 12'ye , hidrofobik yüzeyde ise 4 suşa indiğini bildirmişlerdir.

Mendez ve ark (2020) biyofilm oluşturan dinamik bir reaktör ortamında (CDC) *L. monocytogenes* suşu kullanarak 4 gün boyunca (30°C ve 37°C)'de iki farklı yüzeyde (polikarbonat plastik ve paslanmaz çelik) biyofilm oluşumu gerçekleştirmişler ve hem kullanılan besiyerlerinin hem de sıcaklığın biyofilm oluşumuna etkisini karşılaştırmışlardır. 37°C'ye kıyasla 30°C'de daha yüksek koloni sayımları tespit etmişlerdir. Ayrıca polikarbonat plastikte paslanmaz çeliğe kıyasla genel olarak daha fazla hücre sayımı almışlar ve biyofilm gelişiminin plastikte daha iyi olduğunu bildirmişlerdir.

Ramires ve ark (2021) somon içerikli suşiden izole ettikleri *L. monocytogenes* (L1, L10, L11, L16, L17, L20) suşları ile paslanmaz çelik yüzey üzerinde 37°C'de 24 saat boyunca biyofilm oluşturmuşlar ve çalışmada kullanılan tüm suşların biyofilm yaptıklarını belirtmişlerdir.

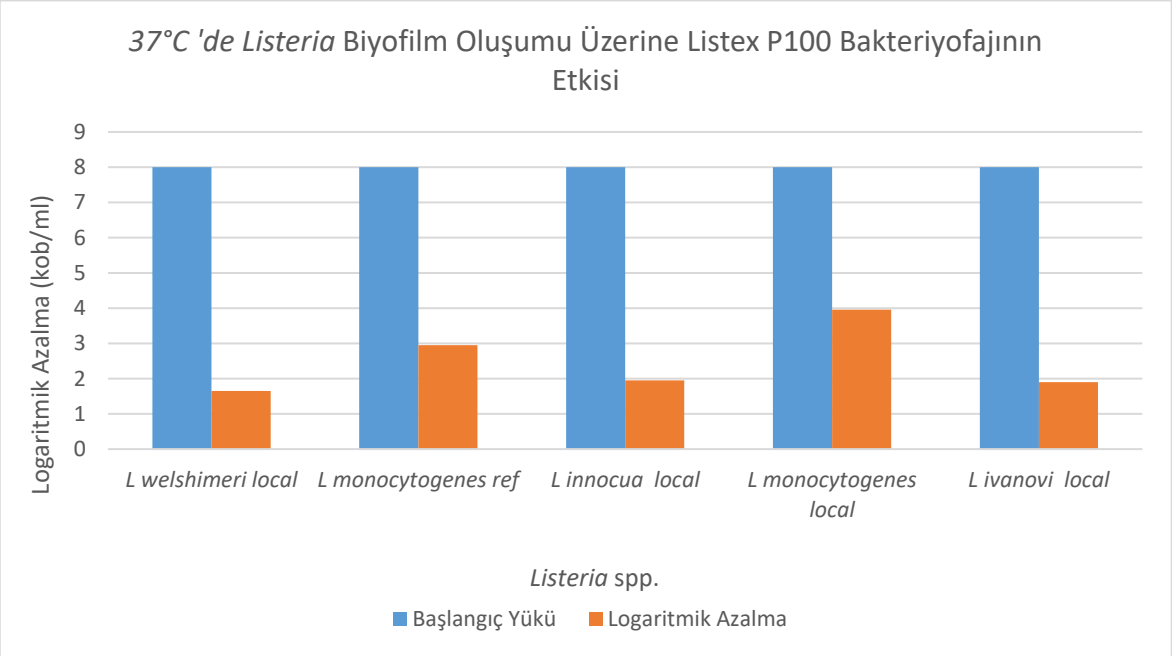
Byun ve ark (2022b) atık su, nehir ve topraktan izole ettikleri *Myoviridae* (LMPC01, LMPC02) ve *Siphoviridae* familyasına ait (LMPC03) *Listeria*'ya özgü bir faj kokteyli olan LMPC01 + 02 + 03'ün polipropilen, polietilen ve paslanmaz çelik dahil olmak üzere gıda ile temas eden malzemeler üzerinde *L. monocytogenes* tarafından oluşturulan biyofilmleri önemli ölçüde ortadan kaldırdığını bildirmişlerdir.

Çizelge 4.10'da Listex™ P100 uygulamasının oluşturulan *Listeria* spp. biyofilmlerine 24. saatte etkisi hücre üzerinde oluşan zarar derecesinde verilmiştir.

Çizelge 4.10. SEM Görüntüleri Değerlendirmesi (*Listeria* spp. Biyofilmleri ve Bu Biyofilmlere Listex™ P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24.saatte Etkisi)

***Listeria* spp.**	**Biyofilm Oluşumu**			**Listex™ P100 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi**		
	Paslanmaz Çelik	**Galvaniz**	**Plastik**	**Paslanmaz Çelik**	**Galvaniz**	**Plastik**
***Listeria monocytogenes* ATCC #13932**	Var, EPS Belirgin	Var, EPS Belirgin	Yok	Yapısal Bozulma	Yapısal Bozulma	Etki Gözlemlenemedi
***Listeria ivanovii* yerel izolat**	Var, EPS Belirgin	Var, EPS Belirgin	Var, EPS Belirgin	Yapısal Bozulma	Yapısal Bozulma	İncelenmedi
***Listeria innocua* yerel izolat**	Var, EPS Belirgin	Kolonizasyon var	Var, EPS Belirgin	Hücre Formunda Bozulma	Hücre Formunda Bozulma	Hücre Formunda Bozulma
***Listeria monocytogenes* yerel izolat**	Kolonizasyon var	Var, EPS Belirgin	İncelenmedi	Hücre Formunda Bozulma	Hücrede Fiziksel Bozulma	İncelenmedi
***Listeria welshimeri* yerel izolat**	Kolonizasyon var	Yok	Kolonizasyon var	Şekilsel Bozulmalar	Etki Gözlemlenemedi	Şekilsel Bozulmalar

Şekil 4.23'te incelendiğinde 37°C 'de 9 günlük inkübasyon sonrasında *Listeria* spp.'lerin biyofilmleri üzerine Listex™ P100 bakteriyofajının etkisi görülmektedir. Buna göre biyofilm oluşumun ardından 24 saat boyunca Listex™ P100 ile muamele sonrasında sayım sonuçlarına sonucunda kontrole göre en fazla azalmanın 3,96 log ile *L. monocytogenes* suşunda olduğu belirlenmiştir. Bunu 2,95 log azalma ile *L. monocytogenes* ATCC #13932, 1,95 log azalma ile *L. innocua,* 1,90 log azalma ile *L. ivanovii,* 1,65 log azalma ile *L. welshimeri* takip etmektedir.



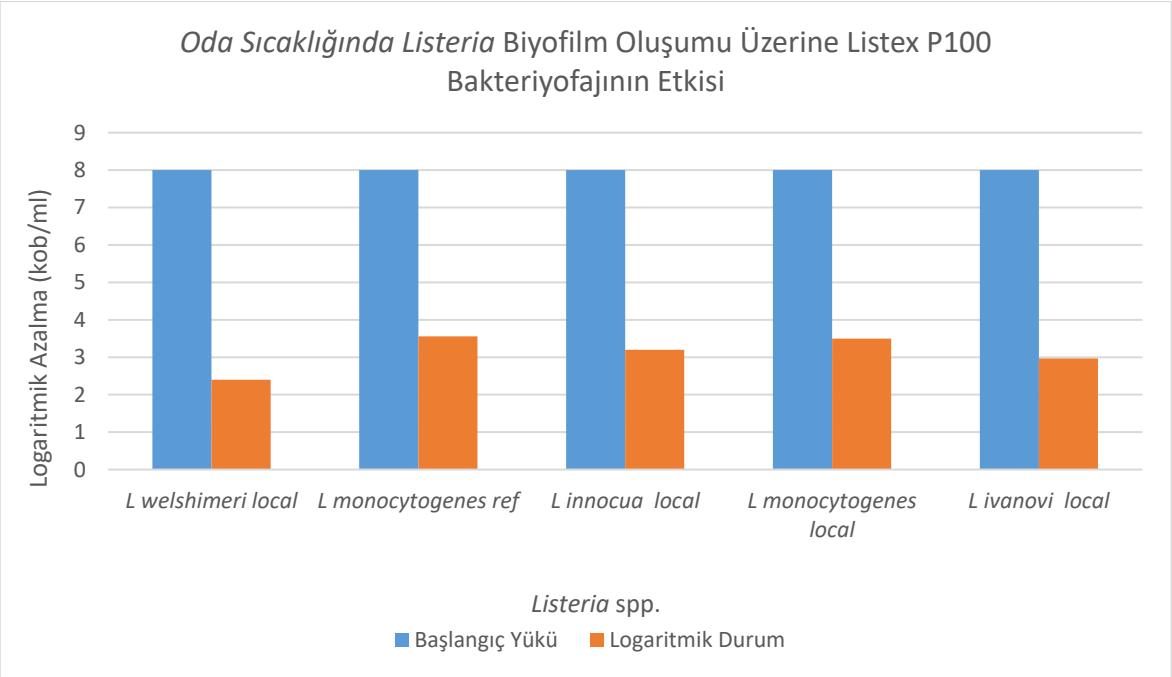
Şekil 4.23. 37°C 'de *Listeria* Biyofilm Oluşumu Üzerine Listex™ P100 Bakteriyofajının Etkisi

Soni ve Nannapaneni (2010b) çalışmalarında paslanmaz çelikte oluşturulan *L. monocytogenes* biyofilmi üzerinde Listex™ P100 etkisini inceledikleri çalışmada 25°C'de 7 günlük inkübasyon sonunda yaklaşık 3 log azalma sağladığını belirtmişlerdir.

4.2.4. Listex™ P100 Bakteriyofajının Oda Sıcaklığında Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz) Oluşturulan *Listeria* spp. Biyofilmleri Üzerine Etkisi

Bu çalışmada 25°C'de 9 günlük inkübasyon sonrasında farklı yüzeylerde oluşturulan biyofilmlerin PALCAM agara ekimleri yapılarak bakteriyofajın (10^7 pob/ml konsantrasyonda) etkinliği belirlendi.

Şekil 4.24 incelendiğinde 25°C 'de 9 günlük inkübasyon sonrasında *Listeria* spp.'lerin biyofilmleri üzerine Listex™ P100 bakteriyofajının etkisi görülmektedir. Buna göre biyofilm oluşumun ardından 24 saat boyunca Listex™ P100 ile muamele sonrasında sayım sonuçlarına sonucunda kontrole göre en fazla azalmanın *L. monocytogenes* ATCC #13932 suşunda 3,56 log olduğu belirlenmiştir. Bunu 3,50 log azalma ile *L. monocytogenes,* 3,20 log azalma ile *L. innocua,* 2,97 log azalma ile *L. ivanovii,* 2,4 log azalma ile *L. welshimeri* takip etmektedir.



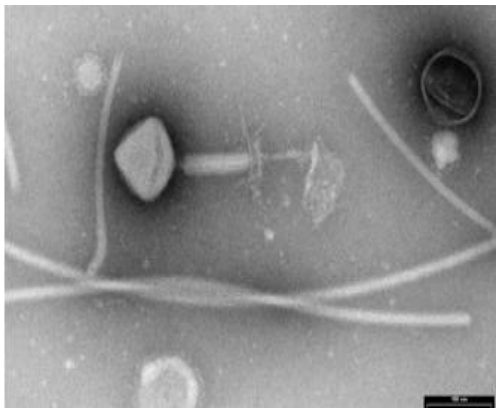
Şekil 4.24. Oda Sıcaklığında *Listeria* Biyofilm Oluşumu Üzerine Listex™ P100 Bakteriyofajının Etkisi

4.3. FMWLLM3 Bakteriyofajının Listeria spp. Üzerine Antimikrobiyal Etkisi

4.3.1. FMWLLM3 Bakteriyofajının *Listeria* Vejetatif Hücreleri Üzerine Antimikrobiyal Etkisi

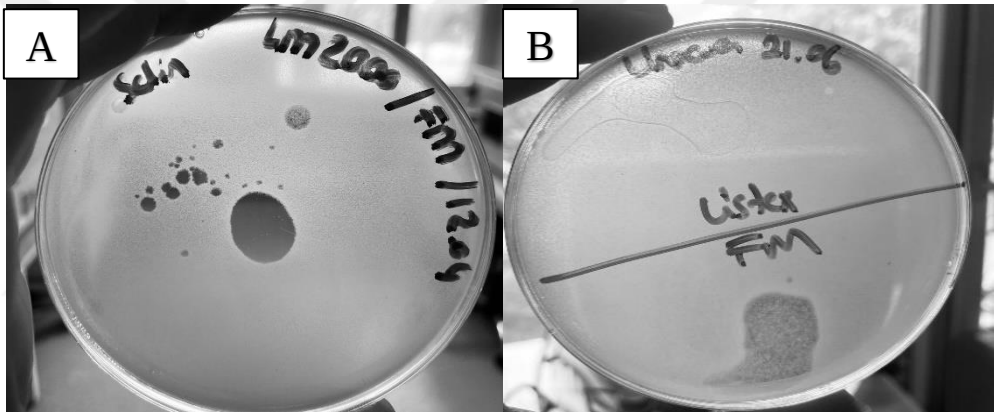
Bu çalışmada Yeni Zelanda Canterbury Üniversitesi Çevre Bilimleri ve Araştırma Enstitü'sinden temin edilen *Listeria* bakteriyofajının (FMWLLM3) *Listeria* türleri üzerine etkisi damlatma (spot) test ile ölçülmüştür.

FMWLLM3 fajı, çok küçük (0,5 mm) ve berrak bir plak şeklindedir ve TEM görüntüleri Şekil 4.25'te gösterilmektedir. Fajın 206 nm uzunlukta kasılabilir bir kuyruğa ve ortalama çapı 88 nm ikosohedral başa sahip olduğu ve dolayısıyla *Myoviridae*'nin bir üyesi olduğu görülmüştür (Bigot ve ark., 2011).

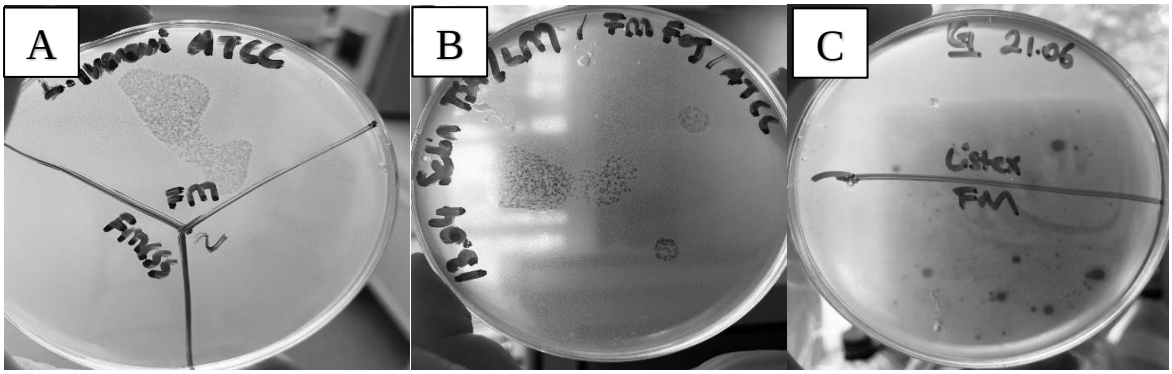


Şekil 4.25. FMWLLM3 fajının TEM görüntüleri (Bigot ve ark., 2011)

FMWLLM3 fajı çift tabaka agar yöntemi ile mevcut faj konsantrasyonu 10^7 pob/ml olarak belirlenmiştir. FMWLLM3 fajının orijinal konsantrasyonunun damlatma tekniği ile lizis oluşumu gözlenen *Listeria* spp.türleri Şekil 4.26 ve 4.27'de gösterilmiştir.



Şekil 4.26. **A**. *Listeria monocytogenes* Lm 2000/47 üzerine FMWLLM3 fajının etkisi **B.** *Listeria innocua* üzerine FMWLLM3 fajının etkisi



Şekil 4.27. **A.** *Listeria ivanovii* ATCC #19119 üzerine FMWLLM3 fajının etkisi **B.** *Listeria monocytogenes* Lm 2000/47 üzerine FMWLLM3 fajının etkisi ***C.*** Yerel izolat *Listeria welshimeri üzerine* FMWLLM3 fajının etkisi

Kullanılan 4 türde de lizis pozitif plaklar görülmüştür. FMWLLM3 fajının 10^7 pob /ml konsantrasyonunun *Listeria monocytogenes* Lm 2000/47, *Listeria monocytogenes* ATCC #13932, *Listeria ivanovi, Listeria innocua* üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca yerel izolatlarımızdan olan *L.welshimeri* üzerine daha küçük zonlar şeklinde lizis oluşumları gözlenmiştir.

FMWLLM3 fajının üretim tarihinden 6 ay sonra bile aktivitesini koruduğu yapılan spot test çalışmaları ile belirlenmiştir.

4.3.2. FMWLLM3 Bakteriyofajının Mikroplakada Geliştirilen *Listeria* spp. Biyofilmleri Üzerine Etkisi

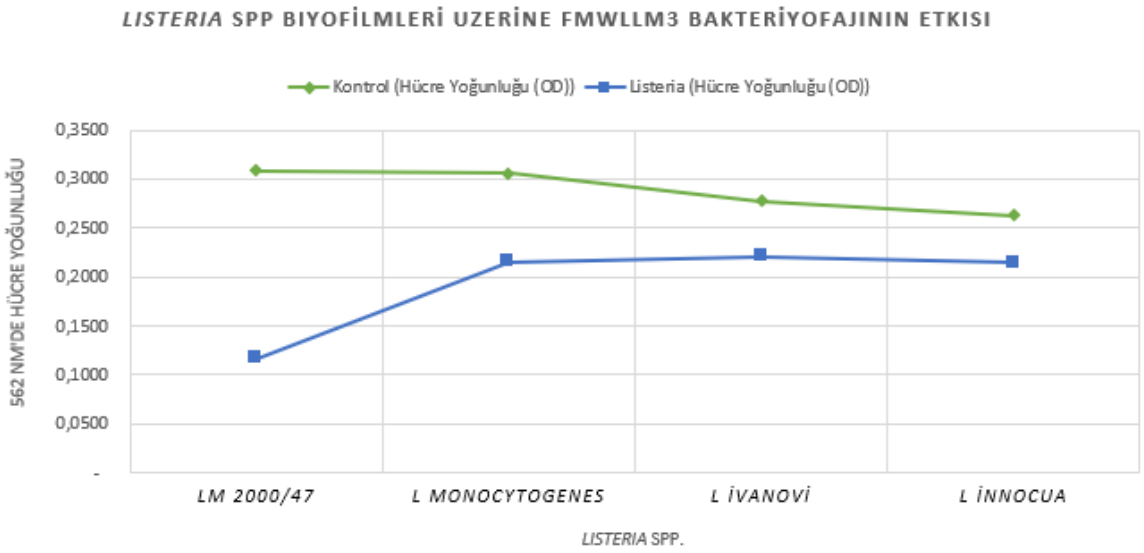
Bu çalışmada farklı konsantrasyonlardaki FMWLLM3 fajının 37°C'de 72 saat boyunca oluşturulan *Listeria* spp. biyofilmleri üzerine etkinliğinin 24. saatteki % azalma oranları ayrı ayrı incelenmiştir. Tek bir faj konsantrasyonu (10^6 pob/ml) ile çalışılmıştır. Çalışma 96 kuyucuklu mikroplaka üzerinde ve 3 tekerrür olarak yapılmıştır. Hücre yoğunlukları hesaplanarak sonuçların ortalaması alınmış ve istatistiksel değerlendirmesi yapılmıştır.

Çizelge 4.11. FMWLLM3 Bakteriyofajının *Listeria* spp. biyofilmleri üzerine 24. saatteki % azalma oranları

***Listeria* spp.**	**Başlangıç Mikroorganizma Yükü**	**Ortalama**
***Lm* 2000/47**	$5,3x10^8$ kob/ml	62,10±1,77 a
L monocytogenes	$1,5x10^8$ kob/ml	29,53±1,76 b
L ivanovii	$1,4x10^8$ kob/ml	20,40±1,77 c
L innocua	$5,2x10^8$ kob/ml	18,10±1,75 c

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark önemlidir($p<0.05$)

Çizelge 4.11 incelendiğinde FMWLLM3 Bakteriyofajının *Listeria* spp. biyofilmleri üzerine 24 saatte belirli oranlarda % azalma ile etkili olduğu görülmektedir. Buna göre *Listeria* spp. biyofilmleri üzerine FMWLLM3 bakteriyofajının 10^6 pob/ml konsantrasyonunun muamelesi sonucunda her bir *Listeria* spp. için başlangıç konsantrasyonlarına göre değerlendirme yapıldığında %62,10 ile en yüksek oranda azalma *L. monocytogenes* Lm 2000/47 üzerine olduğu tespit edilmiştir. FMWLLM3 bakteriyofajının spesifik olarak bu bakteriye etki ettiği bilinmektedir. Ayrıca yerel izolatlarımız *L. monocytogenes* üzerine azalma %29,53 iken *L. ivanovii* üzerinde %20,40 azalma ve *L. innocua üzerinde* %18,10 azalma belirlenmiştir.



Şekil 4.28. *Listeria* spp. Biyofilmleri Üzerine FMWLLM3 Bakteriyofajının Etkisi

Şekil 4.28'e göre hücre yoğunlukları kontrol örnekleri ve FMWLLM3 bakteriyofajının 24. etkisinin sonuçlarını içerecek şekilde verilmiştir.

Ortalama sonuçlar karşılaştırıldığında ve FMWLLM3 bakteriyofajının 10^6 pob/ml konsantrasyonunun 24. saatte *Listeria* spp. türleri üzerine etkileri arasındaki farklılık $p<0.05$ güven aralığında önemli bulunmuştur.

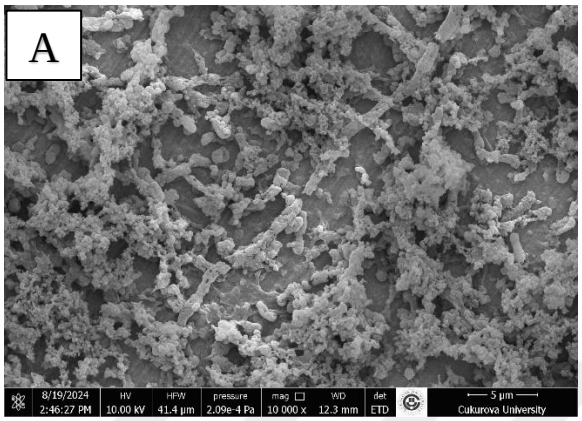
4.3.3. FMWLLM3 Bakteriyofajının 37 Derecede Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz yüzeyler) Oluşturulan *Listeria* spp. Biyofilmleri Üzerine Etkisi

Bu çalışmada 37°C'de 9 günlük inkübasyon sonrasında farklı yüzeylerde (paslanmaz çelik, plastik ve galvaniz) oluşturulan biyofilmlere FMWLLM3 bakteriyofajının etkinliği Scanning Elektron Mikroskobu (SEM) ile belirlenmiştir. Her bir suş için aynı zamanda kontrol test çubuğu kullanılarak yüzeylerde biyofilm oluşturulmuş ve görüntüleri alınmıştır. Sonuçlar aşağıda verilmiştir (Şekil 4.29, Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32, Şekil 4.33, Şekil 4.34, Şekil 4.35, Şekil 4.36, Şekil 4.37, Şekil 4.38, Şekil 4.39). Çalışmada *Listeria* spp. olarak referans *L. monocytogenes* ATCC #13932, yerel izolat *L. innocua,* yerel izolat *L. monocytogenes* ve yerel izolat *L. ivanovii* çalışılmıştır.

Buna göre kullanılan 0,5 McFarland (yaklaşık $1,5x10^8$ kob/ml) konsantrasyonda TSB besiyeri içerisinde 37°C'de 9 gün inkübasyona bırakılan tüm türlerin belirlenen yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturduğu ve 10^6 pob/ml konsantrasyonda FMWLLM3 faj uygulaması sonrasında bakteriyofajın etkili olduğu ve bu konsantrasyonun biyofilmin fiziksel yapısında değişim yarattığı Scanning Elektron Mikroskobu (SEM) görselleri üzerinden değerlendirilmiştir.

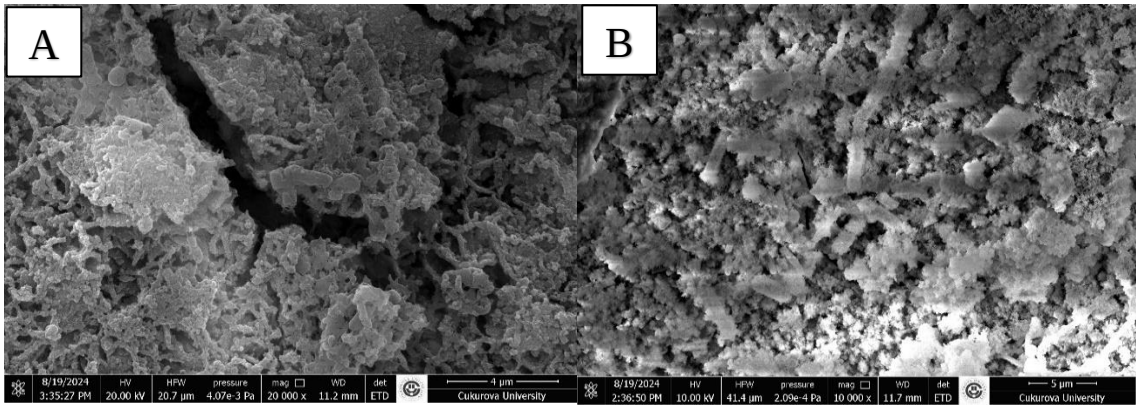
Şekil 4.29 incelendiğinde yerel izolat *Listeria monocytogenes* suşunun paslanmaz çelik yüzeyde biyofilm oluşturabildiği görülmektedir. EPS yapısının oluşması ile hücrelerin bir arada

bulunduğu durum bu görseller üzerinde görülmektedir. *Listeria monocytogenes* suşunun bu yüzeyde oluşturduğu biyofilm yapısı üzerine FMWLLM3 bakteriyofaj uygulaması malzemeyle ilgili bir tedarik sıkıntısı nedeniyle yapılamadığından bu yüzeyde bakteriyofaj uygulaması değerlendirilememiştir.



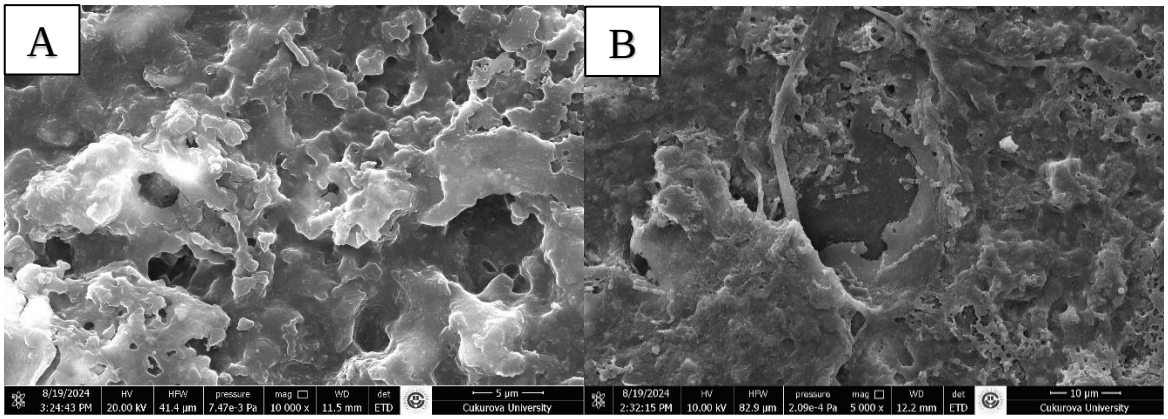
Şekil 4.29. SEM Görüntüleri **A.** Yerel izolat *Listeria monocytogenes* – Paslanmaz Çelik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm

Şekil 4.30 A incelendiğinde yerel izolat *Listeria monocytogenes* suşunun galvaniz yüzeyde biyofilm oluşturabildiği görülmektedir. *Listeria monocytogenes* biyofilminin FMWLLM3 fajı ile 24 saat muamelesinden sonra değerlendirme yapıldığında bakteriyofajın bu yüzeye etki ettiği gözlenmiştir (Şekil 4.30 B). Hücre morfolojisinde deformasyon görülmüştür.



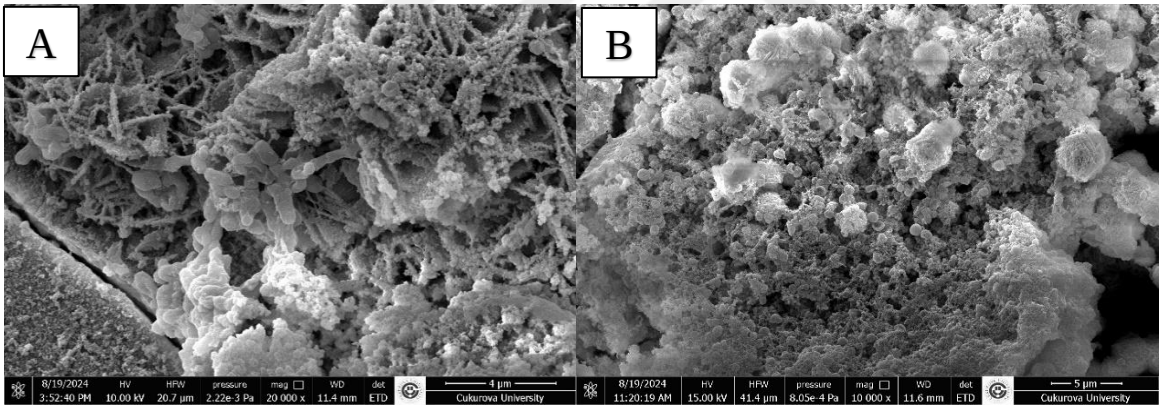
Şekil 4.30. SEM Görüntüleri **A.** Yerel izolat *Listeria monocytogenes* - Galvaniz Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Şekil 4.31 A incelendiğinde yerel izolat *Listeria monocytogenes* suşunun plastik yüzeyde biyofilm oluşturamadığı görülmektedir. Plastik yüzeydeki bu biyofilm üzerine FMWLLM3 fajının 24 saat muamelesinden sonra etki tam olarak değerlendirilememiştir.



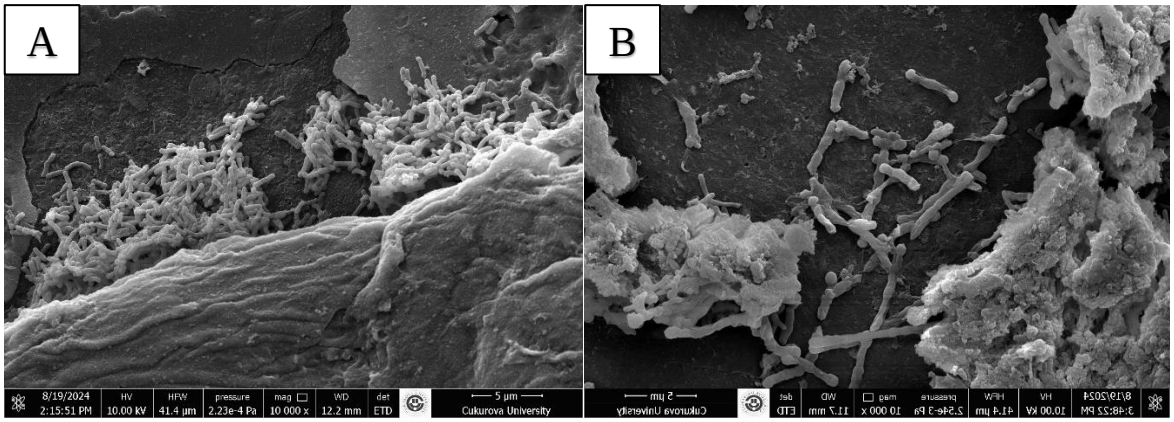
Şekil 4.31. SEM Görüntüleri **A.** Yerel izolat *Listeria monocytogenes* – Plastik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Listeria monocytogenes Lm2000/47 suşunun galvaniz yüzeyde biyofilm oluşturabildiği görülmektedir (Şekil 4.32 A). Galvaniz yüzeyde FMWLLM3 fajı ile 24 saat muamelesinden sonra değerlendirme yapıldığında biyofilme FMWLLM3 bakteriyofaj uygulamasının hücreye fiziksel olarak zarar verdiği gözlenmiştir (Şekil 4.32 B).



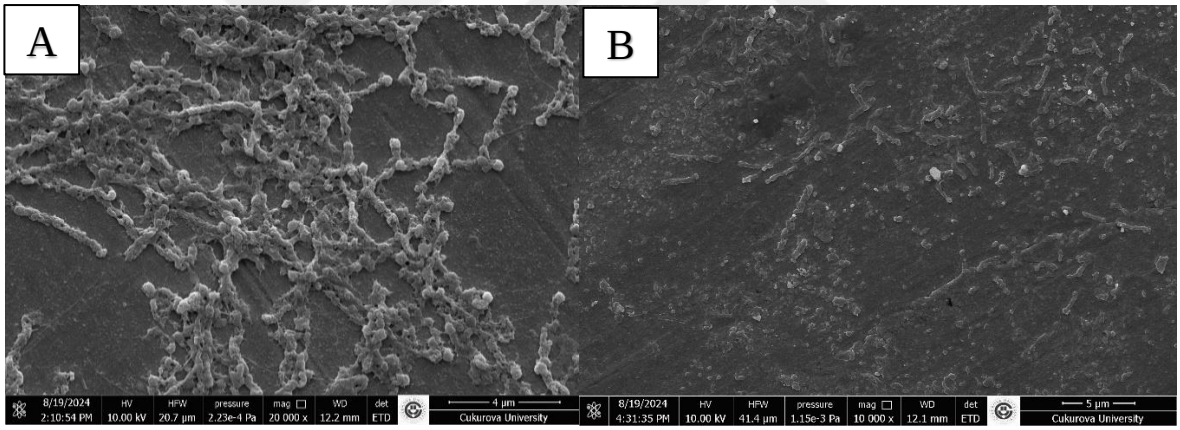
Şekil 4.32. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria monocytogenes* Lm2000/47 - Galvaniz Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Şekil 4.33 A'ya göre *Listeria monocytogenes* Lm2000/47 suşunun plastik yüzeyde biyofilm oluşturabildiği görülmektedir. Plastik yüzeyde FMWLLM3 fajı ile 24 saat muamelesinden sonra değerlendirme yapıldığında biyofilme FMWLLM3 bakteriyofaj uygulamasının etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.33 B).



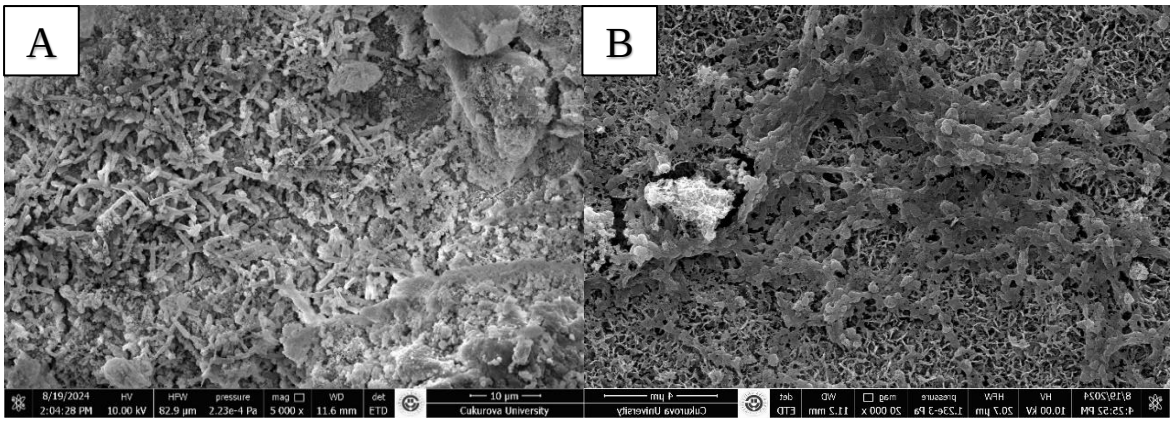
Şekil 4.33. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria monocytogenes* Lm 2000/47 - Plastik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Şekil 4.34'e göre yerel izolat *Listeria ivanovii* suşunun paslanmaz çelik yüzeyde biyofilm oluşturabildiği görülmektedir. Paslanmaz çelik yüzeyde FMWLLM3 fajı ile 24 saat muamelesinden sonra değerlendirme yapıldığında FMWLLM3 bakteriyofaj uygulamasının etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.34 B).



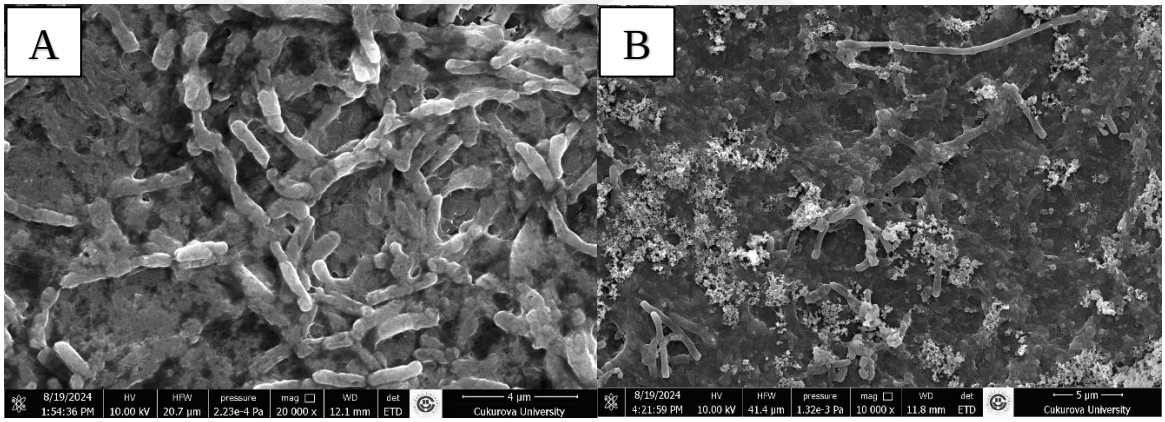
Şekil 4.34. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria ivanovii* - Paslanmaz Çelik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Şekil 4.35 A incelendiğinde yerel izolat *Listeria ivanovii* suşunun galvaniz yüzeyde iyi bir biyofilm oluşturabildiği görülmektedir. Galvaniz yüzeyde FMWLLM3 fajı ile 24 saat muamelesinden sonra değerlendirme yapıldığında biyofilme FMWLLM3 bakteriyofaj uygulamasının etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.35 B).



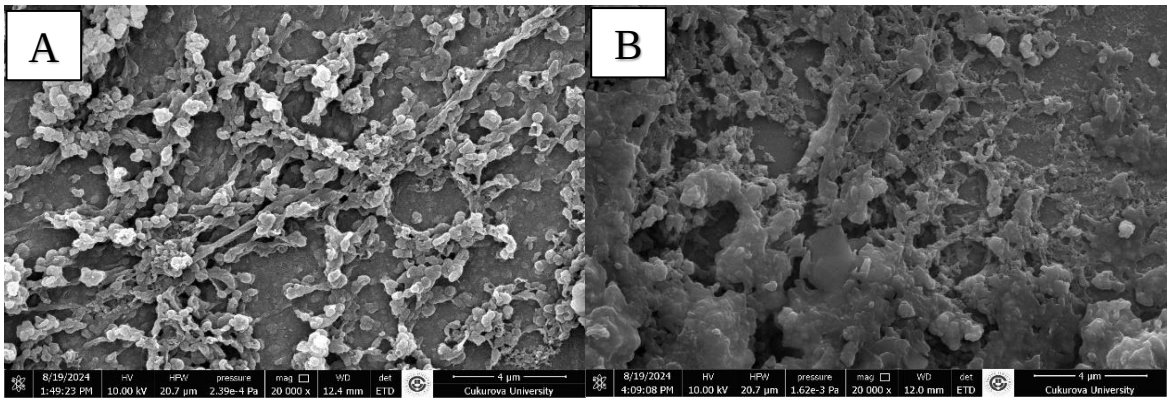
Şekil 4.35. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria ivanovii* - Galvaniz Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Şekil 4.36 A incelendiğinde yerel izolat *Listeria ivanovii* suşunun plastik yüzeyde iyi bir biyofilm oluşturabildiği görülmektedir. Plastik yüzeyde FMWLLM3 fajı ile 24 saat muamelesinden sonra değerlendirme yapıldığında FMWLLM3 bakteriyofaj uygulamasının biyofilme etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.36 B).



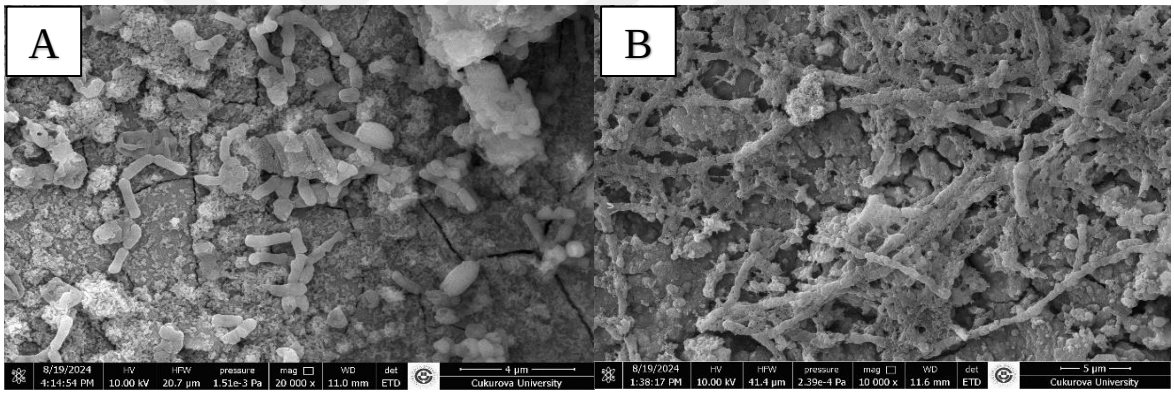
Şekil 4.36. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria ivanovii* – Plastik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Şekil 4.37 A incelendiğinde yerel izolat *Listeria innocua* suşunun paslanmaz çelik yüzeyde iyi bir biyofilm oluşturabildiği görülmektedir. Paslanmaz çelik yüzeyde FMWLLM3 fajı ile 24 saat muamelesinden sonra değerlendirme yapıldığında biyofilme FMWLLM3 bakteriyofaj uygulamasının etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.37 B).



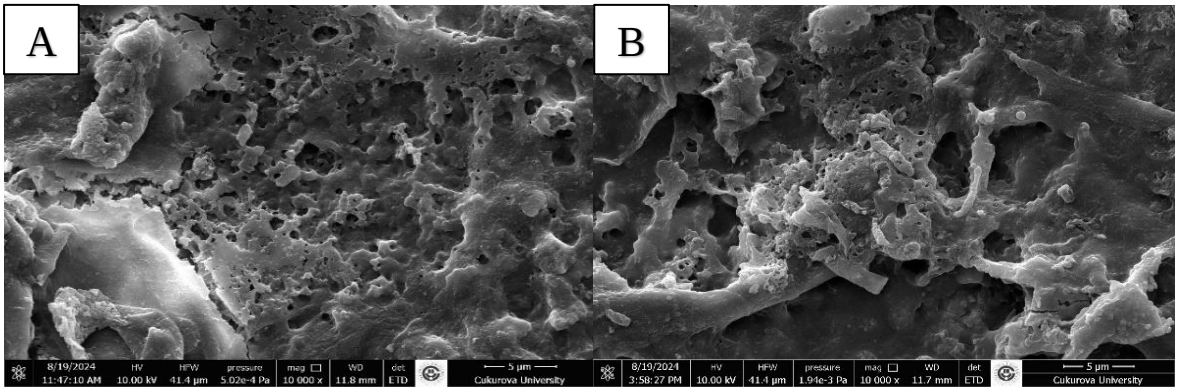
Şekil 4.37. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria innocua* - Paslanmaz Çelik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Şekil 4.38 A incelendiğinde yerel izolat *Listeria innocua* suşunun galvaniz yüzeyde iyi bir biyofilm oluşturabildiği görülmektedir. Bu yüzeyde FMWLLM3 fajı ile 24 saat muamelesinden sonra değerlendirme yapıldığında FMWLLM3 bakteriyofaj uygulamasının biyofilme etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.38 B).



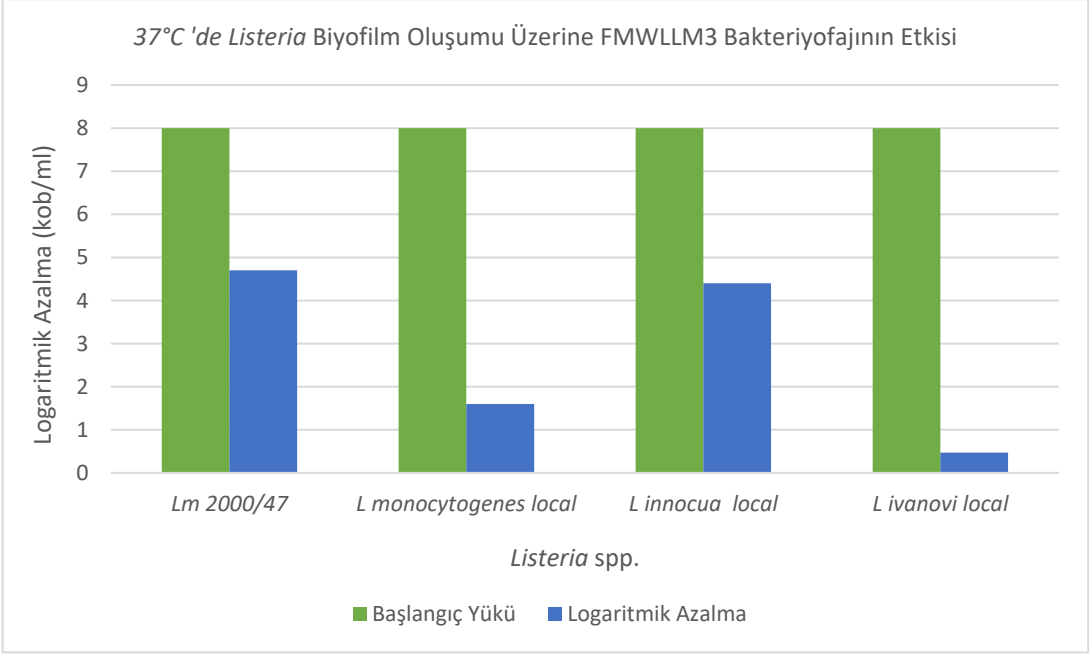
Şekil 4.38. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria innocua* - Galvaniz Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Şekil 4.39 A incelendiğinde yerel izolat *Listeria innocua* suşunun plastik yüzeyde iyi bir biyofilm oluşturamadığı görülmektedir. Plastik yüzeyde FMWLLM3 fajı ile 24 saat muamelesinden sonra değerlendirme yapıldığında FMWLLM3 bakteriyofaj uygulamasının biyofilme etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.39 B).



Şekil 4.39. SEM Görüntüleri **A.** *Listeria innocua* – Plastik Yüzeyde Oluşturulan Biyofilm **B.** Biyofilme FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi

Şekil 4.40 incelendiğinde 37°C 'de 9 günlük inkübasyon sonrasında *Listeria* spp.'lerin biyofilmleri üzerine FMWLLM3 bakteriyofajının etkisi görülmektedir. Buna göre biyofilm oluşumun ardından 24 saat boyunca FMWLLM3 ile muamele sonrasında sayım sonuçları sonucunda kontrole göre en fazla azalmanın 4,7 log ile *L. monocytogenes* Lm 2000/47 suşunda olduğu belirlenmiştir. Bunu 4,4 log azalma ile *L. innocua*, 1,60 log azalma ile *L. monocytogenes* ATCC #13932, 0,47 log azalma ile *L. ivanovii* takip etmektedir.



Şekil 4.40. *37°C 'de Listeria* Biyofilm Oluşumu Üzerine FMWLLM3 Bakteriyofajının Etkisi

Ayrıca Çizelge 4.12'de *Listeria* spp. biyofilmleri ve bu biyofilmlere FMWLLM3 bakteriyofaj uygulamasının 24. saatte etkisine dair biyofilm oluşumları ve fajın hücre formuna etkisi belirtilmiştir.

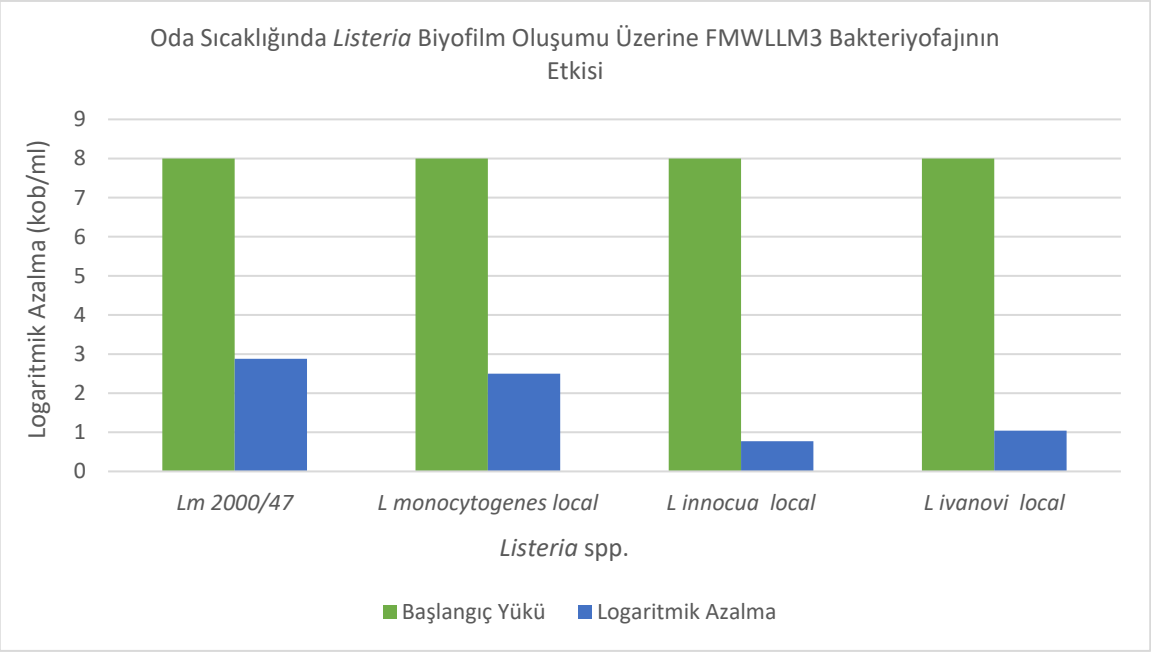
Çizelge 4.12. SEM Görüntüleri Değerlendirmesi (*Listeria* spp. Biyofilmleri ve Bu Biyofilmlere FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24.saatte Etkisi)

***Listeria* spp.**	**Biyofilm Oluşumu**			**FMWLLM3 Bakteriyofaj Uygulamasının 24. Saatte Etkisi**		
	Paslanmaz Çelik	**Galvaniz**	**Plastik**	**Paslanmaz Çelik**	**Galvaniz**	**Plastik**
***L. monocytogenes* Lm 2000/47**	İncelenmedi	Var	Kolonizasyon var	İncelenmedi	Hücre formunda deformasyon	Yapısal formda değişiklik
L. monocytogenes yerel izolat	Var	Var	Kolonizasyon var	Hücre formunda deformasyon	Hücre formunda deformasyon	Yapısal formda değişiklik
L. ivanovii yerel izolat	Var	Var	Var	Hücre formunda deformasyon	Hücre formunda deformasyon	Hücre formunda deformasyon
L. innocua yerel izolat	Var	Var	Kolonizasyon var	Hücre formunda deformasyon	Hücre formunda deformasyon	Yapısal formda değişiklik

4.3.4. FMWLLM3 Bakteriyofajının Oda Sıcaklığında Gıda ile Temas Eden Yüzeylerde (Paslanmaz Çelik, Plastik ve Galvaniz) Oluşturulan *Listeria spp.* Biyofilmleri Üzerine Etkisi

Bu çalışmada 25°C'de 9 günlük inkübasyon sonrasında farklı yüzeylerde oluşturulan biyofilmlerin PALCAM agara ekimleri yapılarak bakteriyofajın (10^6 pob/ml konsantrasyonda) etkinliği belirlenmiştir.

Şekil 4.41'de 25°C 'de 9 günlük inkübasyon sonrasında *Listeria* spp.'lerin biyofilmleri üzerine FMWLLM3 bakteriyofajının etkisi görülmektedir. Buna göre biyofilm oluşumun ardından 24 saat boyunca FMWLLM fajı ile muamele sonrasında kontrole göre en fazla azalmanın *L. monocytogenes* Lm 2000/47 suşunda 2,88 log olduğu belirlenmiştir. Bunu 2,50 log azalma ile *L. monocytogenes*, 0,77 log azalma ile *L. innocua* ve 1,04 log azalma ile *L. ivanovii* takip etmiştir.



Şekil 4.41. Oda Sıcaklığında *Listeria* Biyofilm Oluşumu Üzerine FMWLLM3 Bakteriyofajının Etkisi

4.4. *Listeria* Bakteriyofaj İzolasyonu ve Tanımlanması

4.4.1. Farklı Metotlarla *Listeria* Bakteriyofaj İzolasyonu

Listeria bakteriyofaj izolasyonu için Çukurova bölgesinde 2019-2023 yılları Ekim-Mayıs ve Haziran-Temmuz aylarında toplamda 76 adet farklı örnek (Nehir suları, tavuk çiftliklerinden alınan silaj, gübre ve saman örnekleri, meyve-sebze tesisi atık suları, buzağı çiftliklerinden alınan silaj, gübre ve saman örnekleri, kanalizasyon suları, tavuk işletme yıkama suları, süt işletme yıkama suları, kırmızı et atıkları, balık parçaları) çalışılmıştır.

Tüm örnekler için Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarı ve Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Merkez Laboratuvarlarında bakteriyofaj izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Bakteriyofaj izolasyon metodunu belirlemek amacıyla Çizelge 3.2'de belirtilen örnekler 7 farklı metot ile çalışılmıştır. Her birine ait sonuçlar aşağıda verilmiş olup metot doğrulaması 2 numaralı metot ile yapılmıştır. Bu metot, referans metot olarak belirlenmiştir.

Ön Zenginleştirme Metodu Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

Metot 1 Değerlendirme Sonuçları

Bu metot ile farklı lokasyonlardan alınan 22 farklı örnek (BÇSi10, BÇSi11, BÇSi12, BÇSi13, BÇF10, BÇF11, 1BHÇSi10, 1BHÇSa11, 1BHÇSi12, 1BHÇG13, 2BHÇSi10, 2BHÇSa11, 2BHÇSi12, 2BHÇG13, 3BHÇSi10, 3BHÇSa11, 3BHÇSi12, 3BHÇG13, NS12, NS13, KSK10, KSBp, KSBa14, KSBa15) çalışılmıştır. Çizelge 4.13'te çalışılan örneklerin lokasyon, örnek sayısı, örnek alınan dönem bilgileri ve örnek numaraları verilmiştir. Katı örneklerden 10 g, sıvı örneklerden 10 ml; 90 ml steril LB MOPS (50 mM MOPS ile zenginleştirilmiş ortam) içeren steril kavanoz içerisinde karıştırılmış ve bu karışıma 0,5 McFarland (yaklaşık $1,5x10^8$ kob/ml) oranına seyreltilen her bir suştan (Referans *Listeria monocytogenes,* yerel izolat *Listeria monocytogenes,* yerel izolat *Listeria inncoua* ve yerel izolat *Listeria welshimeri*) 250 µl mikroorganizma kültürü eklenmiştir. Karışımın son hali, 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Zenginleştirilmiş örneklerden alınan 15 ml, 6000xg 20 dakika santrifüje bırakılmıştır. Santirifüj işlemi tamamlandıktan sonra her bir örnek, önce 0.45 µm'lik, ardından 0.22 µm'lik bir steril membran filtreden süzdürülmüştür.

Bir konak suşun bir gecelik kültürünün 0,5 McFarland (yaklaşık $1,5x10^8$ kob/ml) seyreltilen dilüsyonundan 100 µl ile 100 µl örnek filtratı ve 4 ml yumuşak agar, %0,7 LB MOPS/Glu/salts agaroz (50 mM MOPS, pH 7,6 ve 10 mM [her biri] $MgCl_2$ ve $CaCl_2$ ile tamponlanmış LB ortamı) ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Bu karışım yeni hazırlanmış bir alt agar (%1,5 LB MOPS/tuz agarozu) üzerine dökülmüştür. Ayrıca örnek filtratından 10 µl kullanılarak bu çalışma için damlatma testi de uygulanmıştır. Her bir süzüntü için bu işlem gerçekleştirilmiştir. Petriler 24 saat boyunca 30°C'de inkübe edilmiştir. Örneklerin hiç birisinde herhangi bir zon oluşumu gözlenmemiştir.

Metot 2 Değerlendirme Sonuçları

Bu metot ile farklı lokasyonlardan alınan 22 farklı örnek (BÇSi10, BÇSi11, BÇSi12, BÇSi13, BÇF10, BÇF11, 1BHÇSi10, 1BHÇSa11, 1BHÇSi12, 1BHÇG13, 2BHÇSi10, 2BHÇSa11, 2BHÇSi12, 2BHÇG13, 3BHÇSi10, 3BHÇSa11, 3BHÇSi12, 3BHÇG13, NS12, NS13, KSK10, KSBp, KSBa14, KSBa15) çalışılmıştır (çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. Bakteriyofaj izolasyonunda Metot 1 ve Metot 2 ile çalışılan lokasyon, örnek sayısı, örnek alınan dönem bilgileri ve örnek numaraları

Malzeme	**Lokasyon**	**Örnek Sayısı**	**Dönem**	**Örnek Adı**
Buzağı Çiftliği, silaj	Adana Merkez	2	Ekim 2019	BÇSi10, BÇSi11
Buzağı Çiftliği, silaj	Adana Merkez	2	Kasım 2020	BÇSi12, BÇSi13
Buzağı Çiftliği, fekal örnek	Adana Merkez	2	Kasım 2020	BÇF10, BÇF11
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (silaj saman gübre)	Adana Merkez	4	Aralık 2020	1BHÇSi10, 1BHÇSa11, 1BHÇSi12, 1BHÇG13
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (silaj saman gübre)	Adana Merkez	3	Aralık 2020	2BHÇSi10, 2BHÇSa11, 2BHÇSi12, 2BHÇG13
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (silaj saman gübre)	Adana Merkez	3	Aralık 2020	3BHÇSi10, 3BHÇSa11, 3BHÇSi12, 3BHÇG13
Durgun Nehir Suyu	Adana Merkez Seyhan Nehri	2	Temmuz 2023	NS12, NS13
Kasaplar çarşısı (kırmızı et, balık parçaları&atık)	Adana Merkez	4	Temmuz 2023	KSK10, KSBp KSBa14, KSBa15
Toplam		**22**		

BHÇ: Büyükbaş Hayvan Çiftliği, BÇ: Buzağı Çiftliği, NS: Nehir Suyu, KS: Kasaplar çarşısı, Si: Silaj, Sa: Saman, G: Gübre, Bp: Balık parçaları, Ba: Balık atıkları

Örneklerden 20 g/m alınarak 180 ml steril BHI broth içeren steril kavanoz içerisinde karıştırılmış, ardından bu karışım 0,5 McFarland (yaklaşık $1,5x10^8$ kob/ml) oranına seyreltilen her bir konakçı suştan 250 µl kültür (Referans *Listeria monocytogenes,* referans *L. ivanovii)* eklenmiştir. Karışımın son hali, 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bakteri kültürü ile zenginleştirilmiş bu örneklerden alınan 15 ml, 6000xg 20 dakika santrifüje bırakılmıştır. Santirifüj işlemi tamamlandıktan sonra her bir örnek, önce 0.45 µm'lik, ardından 0.22 µm'lik bir steril membran filtreden süzdürülmüştür. Her bir süzüntüden 10 µl *Listeria* spp. (Referans *Listeria monocytogenes,* referans *L. ivanovii,* referans *L. innocua,* referans *L. weshimeri)* içeren TSA agar (%0,6 agar Tyriptic Soy Broth ve 10 mM $MgCl_2$ ve 10 mM $CaCl_2$ ile zenginleştirilmiş) üzerine damlatılarak petriler 18-24 saat boyunca 30°C'de inkübe edilmiştir.

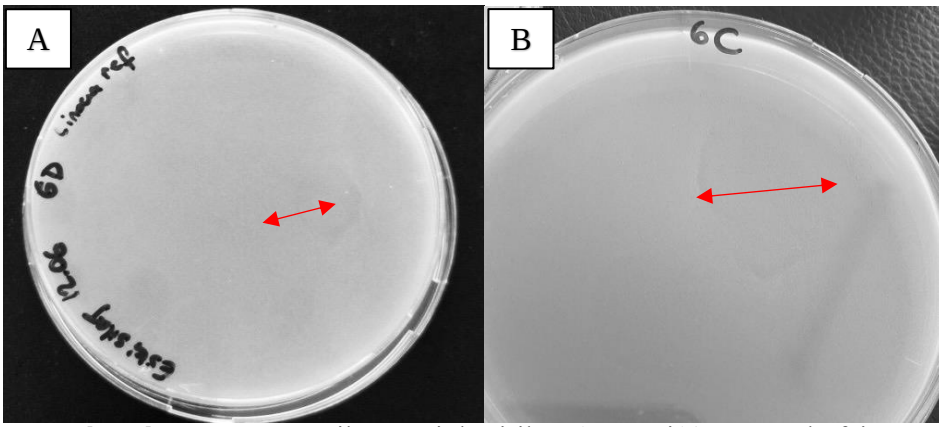
Bu çalışmada kullanılan ve lizis oluşumları görüntülenen *Listeria* bakteriyofajlarının örnek alım noktaları Şekil 4.42'de gösterilmiştir.



Şekil 4.42. **A.**Su örneği **B.** Balık parçaları örneği **C.** Mısır silaj örneği **D.** Saman örneği

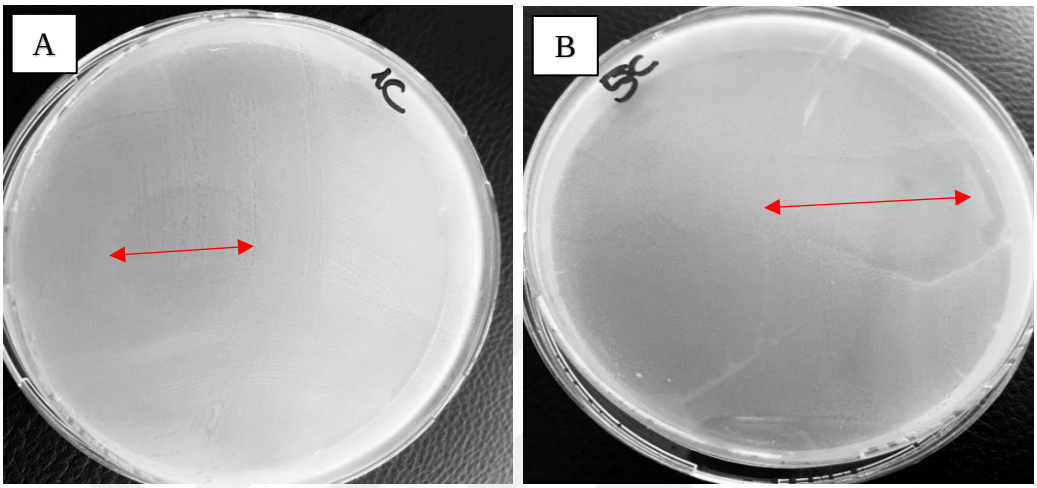
Bu çalışmaya göre 1BHÇSi10 (silaj), 1BHÇG13(gübre), 2BHÇSa11 (Saman), NS12 (durgun nehir suyu) ve KSBp (balık parçaları) numaralı toplamda 5 ana örnekte *Listeria* bakteriyofaj tespit edilmiştir. 2020 yılında yapılan izolasyonlarda 1BHÇSi10 (silaj), 1BHÇG13(gübre), 2BHÇSa11 örneklerinde, 2023 yılında yapılan izolasyonlarda ise NS12 (durgun nehir suyu) ve KSBp (balık parçaları) kodlu örneklerde lizis oluşumları gözlenmiştir.

Silaj örneğine inoküle edilen yerel izolat *L. innocua* ile ön zenginleştirmeye tabi 1BHÇSi10 numaralı fajın *L.innocua* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü Şekil 4.43. A'da, yerel izolat *L. innocua* ile zenginleştirilen silaj örneğinin (1BHÇSi10 numaralı fajın) *L. monocytogenes* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü Şekil 4.43. B'de verilmiştir.



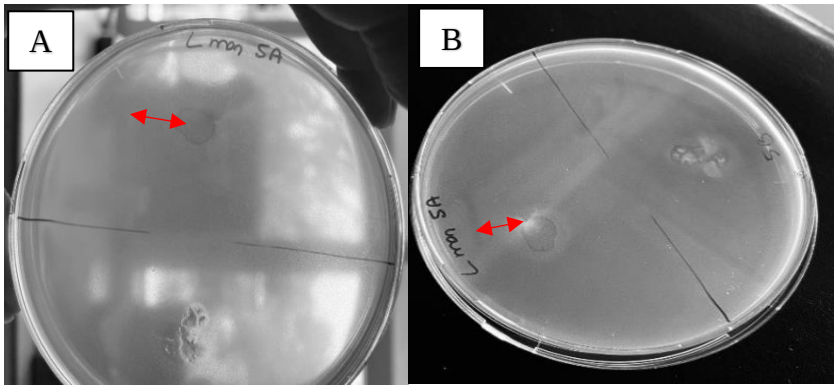
Şekil 4.43. **A.**Yerel izolat *L. innocua* ile zenginleştirilen 1BHÇSi10 numaralı fajın *L.innocua* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (silaj) (1,2 mm) **B.**Yerel izolat *L. innocua* ile zenginleştirilen 1BHÇSi10 numaralı fajın *L. monocytogenes* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (silaj) (2,3 mm)

Şekil 4.44 A'ya göre yerel izolat *L. monocytogenes* ile zenginleştirilen saman örneğinin (2BHÇSa11 numaralı örnek) *L. monocytogenes* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü verilmiştir. Yerel izolat *L. monocytogenes* ile zenginleştirilen gübre örneğinin (1BHÇG13 numaralı örnek) *L. monocytogenes* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü Şekil 4.44 B'de verilmiştir.



Şekil 4.44. **A.** Yerel izolat *L. monocytogenes* ile zenginleştirilen 2BHÇSa11 numaralı fajın *L. monocytogenes* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (saman) (1,7 mm) **B.** Yerel izolat *L. monocytogenes* ile zenginleştirilen 1BHÇG13 numaralı fajın *L. monocytogenes* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (gübre) (2,6 mm)

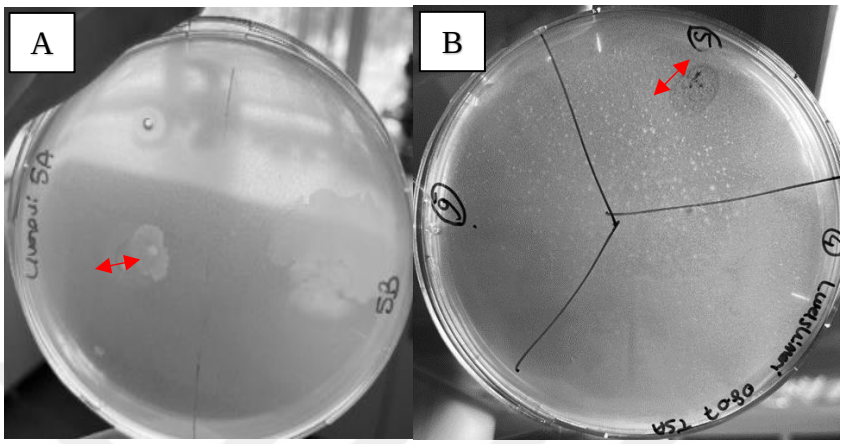
Referans *Listeria ivanovii* ile ön zenginleştirmeye tabi tutulan KSBp (kaynağı balık parçaları) *L. monocytogenes* üzerinde lizis görüntüsü Şekil 4.45'te verilmiştir.



Şekil 4.45. **A ve B.** *Listeria ivanovii* ile zenginleştirilen KSBp numaralı fajın *L. Monocytogenes içeren* TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (0,9 mm)

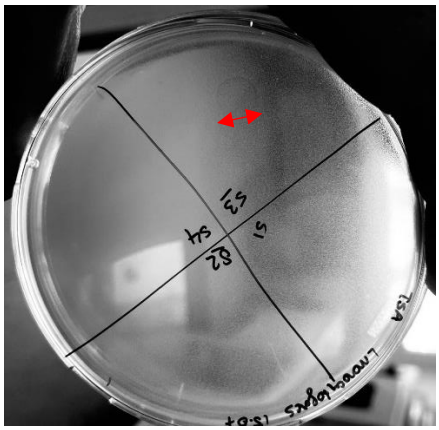
Şekil 4.45'te A ve B numaaralı görseldeki KSBp numaralı fajından alınan plak yukarıda anlatılan metotla faj çoğaltma işlemi yapılmak istediğinde *L. monocytogenes* ile ön zenginleştirmeye tabi tutulmuştur. Burada ikinci pasajlama işleminde lizis oluşumu gözlenmemiştir.

Şekil 4.46 A'da ise *L. ivanovii* ile zenginleştirilen KSBp numaralı fajın *L. ivanovii* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü verilmiştir. Şekil 4.46 B'de görüldüğü üzere *L. monocytogenes* ile zenginleştirilen KSBp numaralı fajın *L. weshimeri* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüleri yer almaktadır.



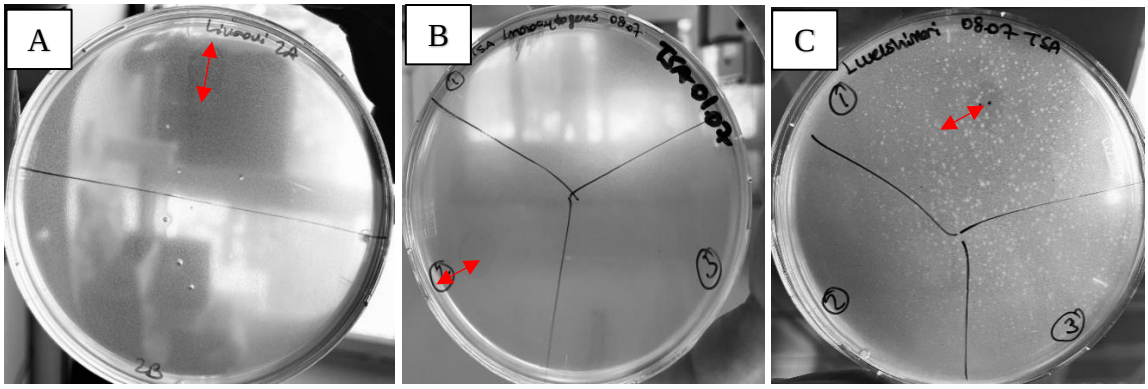
Şekil 4.46. **A.** *L. ivanovii* ile zenginleştirilen KSBp numaralı fajın *L. ivanovii* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (0,8 mm) **B.** *L. monocytogenes* ile zenginleştirilen KSBp numaralı fajın *L. weshimeri* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (0,9 mm)

Şekil 4.46'te A numaralı görseldeki KSBp A numaralı fajından alınan plak yukarıda anlatılan metotla faj çoğaltma işlemi yapılmak istediğinde *L. monocytogenes* ile ön zenginleştirmeye tabi tutulmuştur. Filtrasyon işlemlerini takiben tekrar damlatma testi uygulandığında referans *L. monocytogenes* üzerinde Şekil 4.47'da görüldüğü üzere lizis oluşumu gözlenirken *L. ivanovi* üzerinde ikinci pasajlama sonrasında herhangi bir etki görülmemiştir.



Şekil 4.47. Faj çoğaltma işlemi sonrasında *L. monocytogenes* üzerine lizis oluşumu (0,8 mm)

Referans *Listeria ivanovii* ile ön zenginleştirmeye tabi tutulan NS12 (durgun nehir suyu) fajı *L. monocytogenes, Listeria ivanovii, L. weshimeri* üzerinde lizis etkisi görülmüştür (Şekil 4.48).



Şekil 4.48. **A.** *L. ivanovii* ile zenginleştirilen NS12 numaralı fajın *L. ivanovii içeren* TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (1,6 mm) **B.** *L. ivanovii* ile zenginleştirilen NS12 numaralı fajın *L. monocytogenes* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (1,1 mm) **C.** *L. ivanovii* ile zenginleştirilen NS12 numaralı fajın *L. weshimeri* içeren TSA çift tabaka agar üzerinde oluşturduğu lizis görüntüsü (0,9 mm)

Çizelge 4.14. İzole edilen 5 bakteriyofajın *Listeria* spp.'ler üzerine duyarlılık testleri

***Listeria* spp.**	**1BHÇSi10**	**1BHÇG13**	**2BHÇSa11**	**NS12**	**KSBp**
Yerel *L. innocua*	1,2 mm	İncelenmedi	İncelenmedi	İncelenmedi	İncelenmedi
Yerel L. monocytogenes	*2,3 mm*	2,6 mm	1,7 mm	İncelenmedi	İncelenmedi
L monocytegenes	-	-	-	1,1 *mm*	0,9 *mm*
L. ivanovi	-	-	-	1,6 *mm*	0,8 *mm*
L. welshimeri	-	-	-	0,9 *mm*	0,9 *mm*
L. inncoua	-	-	-	-	-

mm: milimetre, -: etki yok

Bu çalışmada iki farklı *Listeria* spp. (*L. ivanovii* ve L. *monocytogenes*) ile zenginleştirmeye tabi tutulan 5 farklı örnekte lizis görülerek fajın varlığı gösterilmiştir (Çizelge 4.14).

Lizis oluşumu gözlemlenen 5 örnekte [(1BHÇSi10 (silaj), 1BHÇG13(gübre), 2BHÇSa11 (Saman), NS12 (durgun nehir suyu) ve KSBp (balık parçaları)] oluşan plaklar üzerinden faj çoğaltma işlemi uygulanmıştır. Bu fajların bir kısmında ikinci kez saflaştırma aşamasına geçildiğinde tekrar bir lizis oluşumu gözlense de çalışmanın devamlılığı sağlanamamış ve fajların ileri tanımlamaları yapılamamıştır. Dolayısı ile antimikrobiyal etkinlik değerlendirmesi için gerekli olan fajların familya ve görselleri paylaşılamamıştır. Aksine Şanlıbaba ve Tezel (2019) 68 örnekte *Listeria* faj izolasyonu yaptıkları çalışmalarında fajların familyaları veya görselleri iletilmemiş olsa da 4 farklı *Listeria* fajı izole ettiklerini belirtmişlerdir. Benzer şekilde Mutlu (2015) de toplamda 50 örnekten litik faj izolasyonu ve mitomisin-C ile lizojenik faj izolasyonu şeklinde 12 bakteriyofaj izolasyonu gerekleştirmiş olduklarını bizim çalışmamızdaki gibi lizis oluşumları şeklinde göstermişlerdir. Ancak elde edilen fajların RAPD-PCR görüntülemesi dışında hangi familyaya ait olduklarına dair bilgiye bu yayınlarda ulaşılamamıştır.

Çalışmamızda özellikle izolasyon sonrası ilk damlatma testinde *Listeria* spp'nin bir türü üzerine etki varken oluşan bu lizis (plak) üzerinden faj çoğaltma işleminde ikinci kez aynı tür ile yapılan çalışmada herhangi bir etki gözlemlenememiştir. Bu çalışmada bakteriyofaj lizis oluşumları gözlemlenen fajın çoğaltılmasında sürekliliğin sağlanamamasının bir çok sebebi olabilir. Bu sebeplerden birisi olarak *Listeria* bakterilerinin L-forma geçmiş olabileceği düşünülmektedir (Wohlfarth ve ark., 2022). Her ne kadar L-formda olan *Listeria* spp. bakterilerinin çoğalması etkilenmese de hücre duvarındaki yapısal bileşenlerin yetersizliğinden dolayı bakteri farklı şekil ve büyüklüklerde olabilmektedir (Dell'Era ve ark., 2009).

L-forma dönüşüm genellikle antibiyotikler, hücre duvarını hidroliz eden enzimler veya glisin veya lizin gibi yüksek konsantrasyonlarda peptidoglukan sentezine de müdahale edebilen amino asitler gibi hücre duvarı sentezi inhibitörlerinden birisi olan bakteriyofajların varlığında bu durum gerçekleşebilmektedir (Dell'Era ve ark., 2009). Yapılan çalışmalar ozmotik olarak stabilize edilmiş ortamlarda, *Listeria monocytogenes*'in hücre duvarı eksikliği olan L-formu durumuna geçici olarak dönüşerek fajların kendilerini öldürmesinden kaçabildiğini (predasyon) göstermektedir (Wohlfarth ve ark., 2022). L-formu dönüşümü hücre duvarıyla ilişkili faj reseptörlerinin (örneğin hücre duvarında bulunan teioik asitler) tamamen kaybına yol açtığından, L-formlarının bu yolla faj enfeksiyonuna dirençli olduğu varsayılmaktadır. (Wohlfarth ve ark., 2022). Ayrıca her ne kadar *Listeria* teikoik asitler olmadan, hatta L-form bakterileri gibi bir hücre duvarı formundayken hayatta kalabilse de, L-formlarını normal bakterilerden ayıran özellikler arasında spesifik büyüme gereksinimleri, peptidoglikan (PG) ile ilişkili moleküllerin ve bunların fonksiyonlarının kaybı ve β-laktamlar gibi hücre duvarı sentezine müdahale eden antibiyotiklere karşı içsel direnç yer alır (Dell'Era ve ark., 2009; Trudelle ve ark., 2022). Bu nedenle, L-form bakterilerde hücre duvarının bulunmaması, bağışıklık sisteminin bu hücreleri patojen olarak tanıyamamasına neden olabilmektedir (Dell'Era ve ark., 2009).

Metot 3 Değerlendirme Sonuçları

Bu metot ile farklı lokasyonlardan alınan 18 farklı örnek (4BHÇSa20, 4BHÇY21, 4BHÇTz22, 5BHÇSa23, ÜÇSi24, ÜÇSi25, ÜÇSi26, 6BHÇG27, 7BHÇSi28, 8BHÇSi29, 9BaÇGS30, 9KEG31, 9KEG32, 9KESi33, 9KESiS34) çalışılmıştır. Laboratuvara getirilen örneklere direkt santrifüj işlemi yapılmıştır. Örneklerden 10 ml alınmıştır, ardından steril kavanoz içerisinde bulunan modifiye edilmiş Scholten's (MS) Broth içerisine alınarak 100 µl *Listeria monocytogenes* eklenmiştir. Ayrıca 50 µl 10 mM $CaCl_2$ ilavesi yapılmıştır. Karışımın son hali, 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu karışım 6000 xg, 30 dakika, 4°C olarak seçilen santrifüje bırakılmıştır. Bu amaçla önce 0.45 µm'lik, ardından 0.22 µm'lik bir steril membran filtreden süzdürülmüştür.

Çizelge 4.15. Bakteriyofaj izolasyonunda Metot 3 ile çalışılan lokasyon, örnek sayısı ve örnek alınan dönem bilgileri

Malzeme	Lokasyon	Örnek Sayısı	Dönem	Örnek Adı
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (saman yem tezek)	Adana Merkez	3	Ekim 2022	4BHÇSa20 4BHÇY21 4BHÇG22
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (saman)	Adana Merkez	1	Ekim 2022	5BHÇSa23
Üniversite Çiftliği, silaj	Adana Sarıçam	3	Ekim 2022	ÜÇSi24, ÜÇSi25, ÜÇSi26
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (gübre)	Adana Merkez	1	Haziran 2023	6BHÇG27
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (silaj yeni)	Adana Merkez	1	Haziran 2023	7BHÇSi28
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (silaj eski)	Adana Merkez	1	Haziran 2023	8BHÇSi29
Balık çiftliği, göl suyu	Adana Merkez	2	Haziran 2023	9BaÇGS30
Köy evleri (gübre-silaj)	Adana Ceyhan	4	Haziran 2023	9KEG31 9KEG32 9KESi33 9KESi34
Nehir Suyu (Seyhan)	Adana Merkez	2	Haziran 2023	NS35, NS36
Toplam		**18**		

BHÇ: Büyükbaş Hayvan Çiftliği, ÜÇ: Üniversite çiftliği, Ba: Balık çiftliği, KE: Köy evleri, NS: Nehir suyu, GS: Göl suyu, Sa: Saman, Si: Silaj Y: Yem, G: Gübre

Çizelge 4.15'te paylaşılan örneklerin tamamı steril membran filtreden geçirilen örneğin 10 µl'si, *Listeria* spp. içeren ve LB agar üzerine damlatılarak 20 dakika ortam sıcaklığında besiyerine adsorpsiyonun gerçekleşmesi için bırakılmıştır. Her bir örnek için bu işlem gerçekleştirilmiştir. Petriler 18-24 saat boyunca 30°C'de inkübe edilmiştir. Metot 3 sonucunda herhangi bit lizis oluşumu gözlenmemiştir.

Metot 4 Değerlendirme Sonuçları

Bu mettotta faj izolasyonu için örnekler (25 g/25 ml) 225 ml steril kavanoz içinde bulunan BLEB (Buffered *Listeria* Enrichment Broth) içerisine alınmıştır. Çizelge 4.16'da belirtildiği üzere toplam 14 örnek (TİYs30, TİYs31, TİYs32, TİYs33, TİYs34, TİYs35, SK36, SK37, SK38, SK39, NS40, NS41, MS42, MS43) çalışılmıştır.

Çizelge 4.16. Bakteriyofaj izolasyonunda Metot 4 ve Metot 7 ile çalışılan lokasyon, örnek sayısı ve örnek alınan dönem bilgileri

Malzeme	**Lokasyon**	**Örnek Sayısı**	**Dönem**	**Örnek Adı**
Tavuk işletme yıkama suları/chiller suyu	Adana Merkez	6	Ekim 2019	TİYs30, TİYs31, TİYs32, TİYs33, TİYs34, TİYs35
Sulama Kanalı	Adana Merkez	4	Ekim 2019	SK36,SK37, SK38, SK39
Nehir Suyu (Seyhan Nehri)	Adana Merkez	2	Ekim 2019	NS40, NS41
Meyve Sebze İşleme (Atık su)	Karaman	2	Ocak 2020	MS42, MS43
Toplam		**14**		

BHÇ: Büyükbaş Hayvan Çiftliği, Ti: Tavuk İşletmesi ÜÇ: Üniversite çiftliği, Ba: Balık çiftliği, KE: Köy evleri, NS: Nehir suyu, GS: Göl suyu, Sa: Saman, Si: Silaj Y: Yem, G: Gübre

Çalışmada, örnek içerisinde var olabilecek *Listeria* spp.'lerin de hasar görmemesi amaçlanarak *Listeria* izolasyonunda kullanılan metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu karışıma 4 saatin sonunda supplement (*Listeria* Selective Enrichment Supplement FDA-BAM) ilave edilip inkübasyon 24 saate tamamlanmıştır. Bu karışım 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Zenginleştirilmiş örneklerden alınan 10 ml, 3200xg 10 dk 4°C'de santrifüje bırakılmıştır. Santrifüj edilen filtrat 0.22 µm'lik steril bir membran filtreden süzdürülmüştür.

Her bir süzüntünün 100 µl'si 3 ml yumuşak agar (%0,6 agar Tyriptic Soy Broth) ile karıştırılarak TSA (Tyriptic Soy Agar) alt agar üzerine dökülerek 20 dk ortam sıcaklığına bırakılmıştır. Her bir süzüntü için bu işlem gerçekleştirilmiştir. Petriler 24 saat boyunca 30°C'de inkübe edilmiştir. Metot 4 sonucunda herhangi bit lizis oluşumu gözlenmemiştir.

Direkt İzolasyon Metodu Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

Metot 5 Değerlendirme Sonuçları

Metot 5 ile Çizelge 4.17'de verilen toplam 10 örnek (DS50, GS51, ASTAs52, StAs53, KESi54, KEp55, BHÇG56, BHÇSa57, BHÇG56, BHÇSa57) çalışılmıştır. Örnekler (10 g/10 ml) 90 ml steril kavanoz içinde fosfat tamponlu peptonlu su (PBS) içerisine alınmıştır. Her örnek daha sonra 0,45 µm'lik filtreden süzülmüş ve ardından 1 ml'lik bir süzüntünün 0.22 µm'lik bir steril membran filtreden süzdürülmüştür. 0.22 µm'lik gözenek boyutu kullanımının bazı büyük fajların geri kazanımını tehlikeye atabileceği öngörülse de diğer pek çok çalışma gibi 0,22 µm filtre fa izolasyonu için kullanılmıştır. 0.22 µm steril membran filtreden alınan süzüntüler, çift tabakalı agar yöntemi kullanılarak faj izolasyonu için kullanılmıştır.

Çizelge 4.17. Bakteriyofaj izolasyonunda Metot 5 ile çalışılan lokasyon, örnek sayısı ve örnek alınan dönem bilgileri

Malzeme	**Lokasyon**	**Örnek Sayısı**	**Dönem**	**Örnek Adı**
Dere Suyu	Adana Merkez	1	Aralık 2020	DS50
Göl Suyu	Adana Merkez	1	Aralık 2020	GS51
Atık su tesisi, atık suyu	Adana Merkez	1	Ekim 2022	ASTAs52
Süt işletme yıkama atık suyu	Adana Sarıçam	1	Ekim 2022	StAs53
Köy evleri (silaj, pancar küspesi)	Adana Ceyhan	2	Ekim 2022	KESi54, KEp55
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (gübre - saman)	Adana Ceyhan	2	Haziran 2023	BHÇG56, BHÇSa57
Büyükbaş Hayvan Çiftliği (gübre - saman)	Adana Ceyhan	2	Haziran 2023	BHÇG56, BHÇSa57
Toplam		**10**		

DS: Dere suyu, GS: Göl suyu, AST: Atık Su Tesisi, As: Atık su p: Pancar küspesi, G: Gübre, Sa: Saman

Bir konak suşun bir gecelik kültürünün 0,5 McFarland (yaklaşık $1,5x10^8$ kob/ml) oranına seyreltilen dilüsyonundan 300 µl, 100 µl örnek filtratı ve 4 ml yumuşak agar, %0,7 LB MOPS/Glu/salts agaroz (50 mM MOPS, pH 7,6 ve 10 mM [her biri] $MgCl_2$ ve $CaCl_2$ ile tamponlanmış LB ortamı) ile karıştırılarak bir besiyeri hazırlanmıştır. Bu karışım yeni hazırlanmış bir alt agar (%1,5 LB MOPS/ tuz agarozu) üzerine dökülmüştür.

Her bir süzüntü için bu işlem gerçekleştirilmiştir. Metot 5 sonucunda herhangi bit lizis oluşumu gözlenmemiştir.

Metot 6 Değerlendirme Sonuçları

Metot 6'da toplam 10 örnek (TÇF60, TÇF61, SKLs62, SKLs63, TiAs64, TiAs65, TiAs66, TiAs67, TiAs68, TiAs69) ile çalışılmıştır.

Çizelge 4.18. Bakteriyofaj izolasyonunda Metot 6 ile çalışılan lokasyon, örnek sayısı ve örnek alınan dönem bilgileri

Malzeme	**Lokasyon**	**Örnek Sayısı**	**Dönem**	**Örnek Adı**
Tavuk çiftliği, fekal örnek	Adana Sarıçam	2	Kasım 2020	TÇF60, TÇF61
Sulama Kanalı, lağım suyu	Adana İmamoğlu	2	Kasım 2020	SKLs62, SKLs63
Tavuk işletme yıkama atık suları	Adana İşletme A	2	Aralık 2020	TiAs64, TiAs65
Tavuk işletme yıkama atık suları	Adana İşletme B	2	Aralık 2020	TiAs66, TiAs67
Tavuk işletme yıkama atık suları	Adana İşletme D	2	Aralık 2020	TiAs68, TiAs69
Toplam		**10**		

TÇ: Tavuk çiftliği, SK: Sulama Kanalı, Ls: Lağım suyu, Ti: Tavuk işletme, F: Fekal, As: Atık suyu

Çizelge 4.18'de belirtilen her bir örnek 225 ml tamponlanmış peptonlu su içerisinde zenginleştirmeye tabi tutulmuştur. Zenginleştirme sonrasında her bir örnek karışımı 4°C'de, 15 dakika boyunca 15,285 xg devirde santrifüj edilmiş ve üstte kalan kısım 0.22 µm steril membran filtreden geçirilmiştir.

Filtratın 5 ml'si, 5 ml TSB (Tryptic Soy Broth) ve 0,5 McFarland (yaklaşık $1{,}5x10^8$ kob/ml) oranına seyreltilen 100 µl *Listeria* spp. (daha önce gıda ve su örneklerinden izole edilmiş) örneği ile karıştırılmıştır. Bir gece boyunca 37°C'de inkübatör içerisinde inkübasyona bırakılan bu karışım, inkübasyondan sonra 4°C'de, 10 dakika boyunca 15.285 xg devirde santrifüjlenerek parçalanan bakterilerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Üstte kalan kısım 0.22 µm steril membran filtreden tekrar geçirilmiştir.

Son filtratın 10 µl'si, *Listeria* spp. içeren TSA yumuşak agar (%0,6 agar içeren Tyriptic Soy Broth) ile karıştırılarak TSA agar üzerine damlatılmış ve 20 dakika ortam sıcaklığında besiyerine adsorpsiyonun gerçekleşmesi için bırakılmıştır. Her bir örnek için ayrı ayrı bu işlem gerçekleştirilmiştir. Petriler 18-24 saat boyunca 30°C'de inkübe edilmiştir. Metot 6 sonucunda herhangi bit lizis oluşumu gözlenmemiştir.

Metot 7 Değerlendirme Sonuçları

Toplam 14 örnek (TİYs30, TİYs31, TİYs32, TİYs33, TİYs34, TİYs35, SK36, SK37, SK38, SK39, NS40, NS41, MS42, MS43) çalışılmıştır. Çizelge 4.16'da verilen her bir sıvı örnekten 25 ml, katı örneklerden 25 g örnek alınarak 225 ml peptonlu su içerisine koyulmuştur. Bu örneklerden alınan 50 ml, 3000xg 10 dakika 4°C'de santrifüje bırakılmıştır. Santrifüj edilen örnekten 15 ml, 0.22 µm'lik steril bir membran filtreden süzdürülmüştür.

Membran filtreden geçen filtratın 10 ml'si, 10 ml TSB (Tryptic Soy Broth) ve 0,5 McFarland (yaklaşık $1,5x10^8$ kob/ml) oranına seyreltilen 100 µl *Listeria* spp. örneği ile karıştırılmıştır. Bu karışım bir gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra bu karışım 4°C'de, 10 dakika boyunca 3000xg devirde santrifüjlenerek parçalanan bakterilerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Üstte kalan kısım 0.22 µm steril membran filtreden tekrar geçirilmiştir.

Bu filtratın 10 µl'si, *Listeria* spp. içeren TSA agar (%0,6 agar ve ve 0,5% agaroz içeren Tyriptic Soy Broth; 1,25 mM $CaCl_2$ ile zenginleştirilmiş) üzerine damlatılarak 20 dakika ortam sıcaklığında besiyerine adsorpsiyonun gerçekleşmesi için bırakılmıştır. Her bir örnek için bu işlem ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Petriler 18-24 saat boyunca 30°C'de inkübe edilmiştir. Metot 7 sonucunda herhangi bir lizis oluşumu gözlenmemiştir.

Çalışılan tüm metotlarda Metot 2 hariç katı besiyerlerinde lizis etkisi görülememiştir.

Kim ve ark (2008)'nın çevre örnekleri üzerinden yaptığı *Listeria* bakteriyofajı izolasyon çalışması bizim çalışmamızda Metot 2 olarak uyarlanmış ve istenen sonuçlara ulaşılmıştır.

Lee ve ark (2017) çalışmalarında tavuk dışkılarından iki farklı *Listeria* bakteriyofajı, Elsayed ve ark (2023) çalışmalarında silaj ve gübre örneklerinden altı farklı fenotipte *Listeria* bakteriyofajı izole etmişler ve bu fajların *L. monocytogenes* suşlarını inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Bu araştırmacıların çalışmalarında faj izolasyonu amacıyla kullanılan metotları bizim çalışmamızda Metot 3 olarak uyarlanmıştır fakat çalışmamızda bu metot ile faj izolasyonu yapılamamıştır.

Vongkamjan ve ark (2012) silaj örneklerinden direkt izolasyon ile 33 adet faj izolasyonu gerçekleştirmişler ve bu fajların *Listeria monocytogenes* üzerine lizis etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Elsayed ve ark (2023) tarafından yapılan çalışmalar sonucunda silaj ve gübre örneklerinden *Listeria* bakteriyofajı izole edilmiştir. Bu araştırmacıların çalışmalarında kullanılan metot bizim çalışmamıza Metot 5 olarak uyarlanmıştır ancak faj izolasyonunda başarılı olunamamıştır.

Li ve ark (2022) mezbaha kanalizasyonundan bakteriyofaj izolasyonu yaptıkları çalışmada *L. monocytogenes* ve *L. welshimeri* üzerine lizis etki olduğu gösterilen LP8 kodlu fajı izole etmişlerdir. Daha sonra bu fajın *Myoviridae* familyasına ait olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada kullanılan yöntem bizim çalışmamızda Metot 7 olarak uyarlanmış ancak herhangi bir sonuç alınamamıştır.

Heshmati (2019) yılında *Salmonella* bakteriyofaj izolasyonu için yaptığı çalışmada 8 farklı atık su örneğinin sadece 4'ünden 5 farklı *Salmonella* bakteriyofajı izole ettiğini bildirmiştir. Bu çalışmada kullanılan faj izolasyon yöntemi bizim çalışmamıza Metot 6 olarak uyarlanmış ancak bu metoda göre çalışmamızda herhangi bir sonuç alınamamıştır.

4.4.2. Seçilen Bakteriyofaj İzolasyon Metodu İçin Validasyon Çalışması

Bu çalışmada bakteriyofaj izolasyonu için farklı örneklerle uygulaması yapılan 7 farklı metot içerisinden en iyi sonuç alınan Metot 2'nin validasyonu yapılmıştır. Bu amaçla ticari olarak satın alınan Listex™ P100 bakteriyofajının 10^7 pob/ml konsantrasyonu ve bakteri suşu olarak *L. monocytogenes* ATCC #13932 kullanılmıştır.

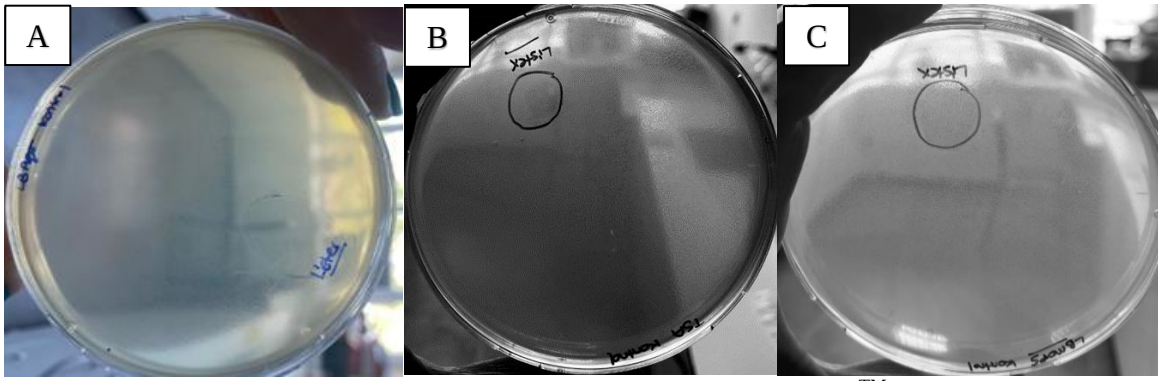
Ayrıca, Metot 2'de belirlenen ve katı agar olarak kullanılan TSA'nın yanı sıra diğer besiyerleri ile deneme yapılarak en uygun katı agar besiyerinin belirlenmesi sağlanmıştır.

Metot 2'de kullanılan alt ve üst agarlar aşağıda verilmiştir.

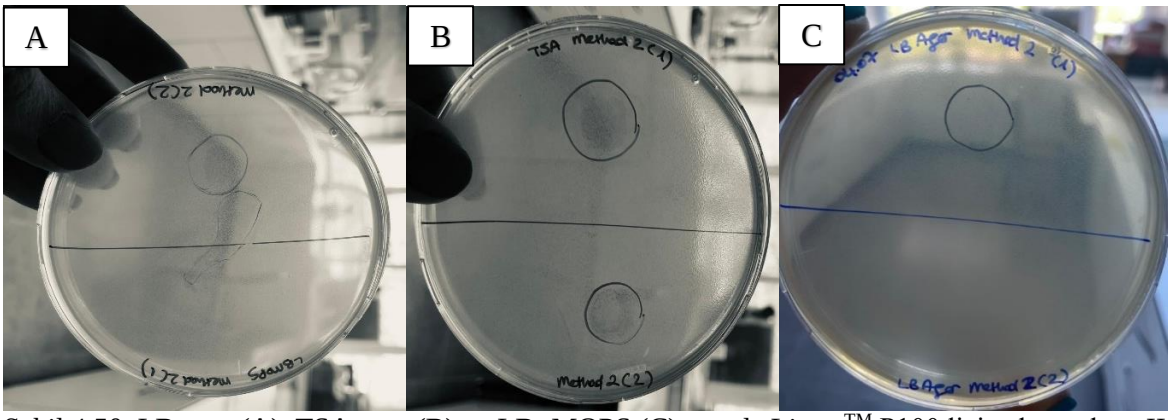
- Luria Bertani agar (LB agar)
- MOPS ile zenginleştirilmiş Luria Bertani agar, (%0,6 LB MOPS (50 mM MOPS, pH 7,6 ve [her biri] 10 mM $MgCl_2$ ve $CaCl_2$ ile tamponlanmış LB ortamı) agar
- Tryptic Soy Agar (TSA)
- Mueller Hinton agar (MH agar)

Steril su örneğinden 10 ml örnek alınmıştır. Bu örnek Metot 2'de belirtildiği üzere 90 ml BHI broth içerisine eklenmiştir. Besiyeri içerisine 10^7 pob/ml 100 µl Listex™ P100 bakteriyofajı ve 100 µl *Listeria monocytogenes* ATCC eklenmiştir. Ayrıca 50 µl $CaCl_2$ ilavesi yapılmıştır. Bu karışım 37°C 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Genellikle bu tür çalışmalarda ilave edilen iyonların (örneğin, kalsiyum) olup örneğin adsorpsiyonda detsekleyici olduğu belirtilmektedir. Metal iyonları fajların latent döneminde ikili bir rol oynamaktadır. Penetrasyon için gerekli olmalarının yanı sıra, (kalsiyum veya magnezyum) faj mekanizmalarını da kontrol etmektedirler (Shafiai ve Thompson, 1964).

İnkübasyon ardından örneklerden 10 ml alınmış ve santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj aşamasında aynı devirde iki farklı süre ile deneme gerçekleştirilmiştir. Buna göre 6000 xg devirde 10 dakika santrifüj işlemini takiben örnek 0.22 µm steril filtreden geçirilmiştir.



Şekil 4.49. LB agar (A), TSA agar (B) ve LB+MOPS (C) agarda Listex™ P100 lizis oluşumları-I



Şekil 4.50. LB agar (A), TSA agar (B) ve LB+MOPS (C) agarda Listex^{TM} P100 lizis oluşumları -II

Bu çalışmada alt agar olarak yukarıda belirtilen agarların her biri ile ayrı ayrı denemeler yapılırken aynı zamanda üst agar olarak TSA soft agar kullanılmıştır. Damlatma testi sonucunda petriler 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Sonuçlar değerlendirildiğinde (Şekil 4.49 ve Şekil 4.50) LB agar, LB MOPS agar ve TSA agar besiyerlerinde lizis oluşumu görülmüştür. En belirgin lizis oluşumu bu konuda genel yaygın besiyeri olarak kullanılan TSA besiyeri olduğu gözlenmiştir. MH agarda hiçbir zon oluşumu gözlemlenmemiştir. Ayrıca ön zenginleştirme ortamı olarak belirlenen BHI besiyeri başlangıç besiyeri olarak seçilmiş olup Stepanovic ve ark. (2004) ile benzer sonuçları göstermiştir.

Bu çalışma ile ortama sonradan eklenen Listex^{TM} P100 bakteriyofajının geri kazanımının sağlanmış olduğu ve ortamda bu düzeyde bir bakteriyofaj olduğunda bu metotla izolasyonun gerçekleştirilebildiği belirlenmiştir. Ayrıca Metot 2'nin *Listeria* fajı eldesinde çalışır durumda olduğu doğrulanmıştır. Sonraki denemeler için referans metot olarak belirlenmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada analize alınan 154 örnekten, 45'inde *Listeria* spp. şüpheli koloniler bulunduğu tespit edilmiştir. Bu *Listeria* spp. izolatlarının 24'ü gıda örneklerinden, 7'sı silajdan, 7'si yıkama sularından, 2'şer adedi atık su, gübre ve saman örneklerinden ve birinin nehir suyundan izole edildiği gözlenmiştir.

Listeria spp. şüpheli koloniler olarak değerlendirilen 45 örnekten elde edilen izolatların biyokimyasal tanımlanmalarında 38 izolatın *Listeria* spp. olduğu belirlenmiştir. *Listeria* spp. pozitif bulunan örneklerin hepsinin *prs* genini hedeflemekte olan 938 bp ve diğer bp büyüklükte primer çiftleri kullanarak *Listeria* spp. tür bazında doğrulanması amacıyla PCR işlemi yapılmıştır ve biyokimyasal testler ile tanımlanan izolatların hepsinde pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre tür bazında değerlendirme yapıldığında 38 *Listeria* spp. izolatının 11'i *L. welshimeri*, 10'u *L. monocytogenes*, 9'u *L innocua*, 6'sı *L. ivanovii* ve 2'si *L. seeligeri* olarak belirlenmiştir.

Canterbury Üniversitesi Çevre Bilimleri ve Araştırma Enstitüsü (Yeni Zelanda)'den talep edilen FMWLLM3 bakteriyofajı ve Micreos Food Safety (Hollanda) firmasından ticari olarak temin edilen Listex^{TM} P100 bakteriyofajı, *Listeria* spp. ile yapılan biyofilmler üzerine etkileri araştırılmıştır.

Listex^{TM} P100 ve FMWLLM3 bakteriyofajlarının çalışmada kullanılan tüm türler üzerine mikroplaka yöntemi ile yapılan uygulama sonrası sonuçlar değerlendirildiğinde faj konsantrasyonlarına bağlı olarak kullanılan *Listeria* spp. vejetatif hücreleri ve onların oluşturdukları biyofilmleri üzerine belli oranlarda inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle anti-*Listeria* spp. olarak satışa sunulan Listex^{TM} P100 fajının bu çalışmada kullanılan *Listeria seeligeri* ATCC #35967 üzerine herhangi bir etkinliği belirlenememiştir.

FMWLLM3 bakteriyofajı ise spesifik olarak etkinlik gösterdiği *L. monocytogenes* Lm 2000/47 ile birlikte antibakteriyel etkinlik çalışmasında kullanılan diğer tüm türler (*L. monocytogenes* yerel izolat, *L. ivanovii* yerel izolat, *L. innocua* yerel izolat), için hem vejetatif hücreler hem de biyofilmleri üzerine belli oranlarda inhibisyon etkisi göstermiştir.

Burada özellikle iki bakteriyofajın (Listex^{TM} P100 ve FMWLLM3) birlikte kullanılması ile antimikrobiyel etki için hedef *Listeria* spp. türü sayısı artırılabilir. Böylelikle çalışmada antimikrobiyal etki gözlemlenmeyen tür olan *L. seeligeri* üzerine antimikrobiyal etkisi incelenebilir.

Ayrıca bu çalışmaya göre Listex^{TM} P100 bakteriyofajının önerilen raf ömrü süresinin üzerinde uygun koşullarda saklandığında hala etkisini sürdürebiliyor olması fajın gıda endüstrisine alternatif bir sanitasyon önerisi olarak sunulabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmada Scanning Elektron Mikroskobu (SEM) ile yapılan incelemelerde çalışmada kullanılan tüm test çubukları (paslanmaz çelik, plastik ve galvaniz) üzerinde biyofilm oluşumları gözlenmiştir. Özellikle paslanmaz çelik ve galvaniz, plastik malzemeye göre hidrofilik yapıları

sebebiyle literatürde de çoğunlukla belirtildiği gibi biyofilm gelişimini daha destekleyici materyaller olarak karşımıza çıkmıştır.

Bu çalışmada ayrıca 5 farklı örnekte (Balık atıkları, nehir suyu, gübre, saman ve silaj) *Listeria* bakteriyofajları (lizis oluşumu) gözlemlenmiştir. Bu çalışma kapsamında faj çoğaltma işlemleri yapılmasına rağmen fajların çoğlatılmasında süreklilik sağlanamadığı için bakterilerin L-forma geçme gibi faj entegrasyonundan kaçınma mekanizmalarının ileri çalışmalarla incelenmesi gerekliliği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abay, S., 2004. Sağlıklı sığır dışkılarından *Listeria* spp. izolasyon ve identifikasyonu. Yüksek Lisans Tezi, E.Ü. Veteriner Fakültesi, İzmir, 65s.

Acemel, R. D., Govantes, F. ve Cuetos, A., 2018. Computer simulation study of early bacterial biofilm development. Scientific Reports, 8, 5340.

Ackermann, H. W., 2007. *5500 Phages examined in the electron microscope. Archives of Virology, 152(2), 227-243.*

Allan, N. D. ve Beveridge, T. J., 2003. L-forms and their role in infection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 51(3), 459-461.

Alsheikh, I., Alsheikh, A. D. I., Mohammed, G. E. ve Abdalla, M. A., 2013. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Retail Broiler Chicken Ready to Eat Meat Products in Sudan. International Journal of Animal and Veterinary Advances, 5(1): 9-14.

Alsheikh, A. D. I., Mohammed, G. E., Abdalla M.A., ve Bakhiet, A. O., 2014. First Isolation and Identification of *Listeria* Monocytogenes Isolated from Frozen and Shock Frozen Dressed Broiler Chicken in Sudan. Microbiology Research Journal International, 4(1):28-38.

Aswani, V. H. ve Shukla. S. K., 2021. An Early History of Phage Therapy in the United States: Is it Time to Reconsider? Clinical Medicine and Research, 9(2):82-89.

Andritsos, N. D., Mataragas, M., Paramithiotis, S., Nychas, G. J. E. ve Drosinos, E. H., 2012. Estimating the diagnostic accuracy of three culture-dependent methods for the *Listeria* monocytogenes detection from a Bayesian perspective. International Journal of Food Microbiology, 156 (2), 181-185.

Anonim, 2011. Merck Mikrobiyoloji El Kitabı (Hızlı Erişim) 2. Baskı. Editörler (A.Kadir Halkman, Özlem Etiz Sağdaş), Ankara, 234 s.

Anonymus, 2019. Plaque and Spot Assay. In vitro Protcol. iGEM ETH Zurich https://static.igem.org/mediawiki/2019/8/8d/T--ETH_Zurich--spot-plaque-assay protocol.pdf [Erişim Tarihi: 22.08.2024].

Anonymous, 2024a. https://tr.wikipedia.org/wiki/Listeriosis [Erişim Tarihi: 22.08.2024].

Anonymus, 2024b. Genus *Listeria*, Genus: *Listeria* (https://www.bacterio.net/genus/*Listeria*) [Erişim Tarihi: 22.08.2024].

Anonymus, 2024c. https://tr.wikipedia.org/wiki/Listeriosis [Erişim Tarihi: 22.08.2024].

Anonymus, 2024d. Identifying & Verifying Putative Plaques (Spot Tests), PhageHunting Protocol, University of Pittsburgh. https://phagesdb.org/media/workflow/protocols/pdfs/Identifying__Verifying_Putative_Plaques_Spot_Tests_62013_PDF_1.pdf [Erişim Tarihi: 22.08.2024].

Arachchi, G. J. G, Mutukumira, A. N., Dias-Wanigasekera, B. M., Cruz, C. D., McIntyre, L., Young, J., Flint, S. H., Hudson, A. ve Billington, C., 2013. Characteristics of three *Listeria*phages isolated from New Zealand seafood environments. Journal of Applied Microbiology, 115, 1427-1438.

Azizoglu, R. O., Dutta, V., Freidt, F. ve Kathariou, S., 2015. Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms to Sanitizing Agents. Biofilms in the Food Environment, Second Edition. Edited by Anthony L. Pometto III and Ali Demirci., pp. 51-83.

Barbalho, T. C. F., Almeida, P. F., Almeida R. C. C. ve Hofer, E., 2005. Prevalence of *Listeria* spp. at a pultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid confirmation of suspect colonies. Food Control, 16: 211-216.

Batt, C. A., 2014. *Listeria* | *Listeria monocytogenes*. Editor: Carl A. Batt and Mary Lou Tortorello. ncyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), s. 490-493.

Belak, A., H´eher, B. ve Kisk´o, G., 2012. Formation and removal of *Listeria* monocytogenes and *Lactococcus lactis* biofilms. Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria, 5 (2012): 5–17.

Bielke, L. R., Tellez, G. ve Hargis, B. M., 2012. Successes and failures of bacteriophage treatment of enterobacteriaceae infections in the gastrointestinal tract of domestic animals. In Bacteriophages. Rijekas (Croatia): Ipek Kurtboke, IntechOpen, pp. 159–178.

Bigot, B., Lee, W. J., McIntyre, L., Wilson, T., Hudson, J. A., Billington, C. ve Heinemann, J. A., 2011. Control of *Listeria* monocytogenes growth in a ready-to-eat poultry product using a bacteriophage. Food Microbiology, 28 (2011): 1448-1452.

Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Júnior, A. F., Júnior, J. P. A., Tsunemi, M. H. ve Rall, V. L. M., 2014. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. Food Control, 35(1), 386-391.

Brown, T. A., 1997. Gene cloning: an introduction. Published by Chapman&Hall, London, UK, 334s.

Brown, P., Chen, Y., Parsons, C., Brown, E., Loessner, M. J., Shen, Y. ve Kathariou, S., 2021. Whole Genome Sequence Analysis of Phage-Resistant *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a Strains from Turkey Processing Plants. Pathogens, 13;10(2):199.

Brüssow, H., Canchaya, C., ve Hardt, W. D., 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 68(3), 560-602.

Byun, K. H., Han, S. H., Choi, M. W., Park, S. H., Ha, S. D., 2022a. Isolation, characterization, and application of bacteriophages to reduce and inhibit *Listeria monocytogenes* in celery and enoki mushroom. Food Control, 135, 108826.

Byun, K. H., Han, S. H., Choi, M. W., Kim, B. H., Park, S. H. ve Ha, S. D., 2022b. Biofilm eradication ability of phage cocktail against *Listeria monocytogenes* biofilms formed on food contact materialsand effect on virulence-related genes and biofilm structure. Food Research International, 157:111367.

Byun, K. H. ve Kim, H. J., 2023. Survival strategies of *Listeria monocytogenes* to environmental hostile stress: biofilm formation and stress responses. Food Science Biotechnology, 32, 1631–1651.

Carlton, R. M., Noordman, W. H., Biswas, B., De Meester, E. D. ve Loessner, M. J., 2005. Bacteriophage P100 for control of *Listeria* monocytogenes in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 43 (2005): 301–312.

Campanac, C., Pineau, L., Payard, A., Baziard-Mouysset, G. ve Roques, C., 2002. Interactions between biocide cationicagents and bacterial biofilms. Antimicrobialagents and chemotherapy, 46 (5): 1469–1474.

CDC, 2018. Estimates of Foodborne Illness in the United States | Estimates of Foodborne Illness | CDC. Table 3. Estimated annual number of hospitalizations and deaths casued by 31 pathogens transmitted commonly by food, Amerika Birleşik Devletleri. https://www.cdc.gov/foodborneburden/pdfs/scallan-estimated-illnesses-foodborne-pathogens.pdf. [Erişim Tarihi: 22.08.2024].

Charpentier, E. ve Courvalin, P., 1999. Antibiotic Resistance in *Listeria* spp. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 43(9): 2103–2108.

Chavant, P., Martinie, B., Thierry, M., Marie-Noëlle, B. F. ve Michel, H., 2002. *Listeria monocytogenes* LO28: Surface Physicochemical Properties and Ability To Form Biofilms at Different Temperatures and Growth Phases. Applied and Environmental Microbiology, 68, 728–737.

Chhibber, S. ve Kumari S., 2012. Bacteriophages: Application of Therapeutic Phages in Medicine, Bacteriophages, Dr. Ipek Kurtboke (Ed.), s.139-158.

Chmielewski, R. A. N. ve Frank, J. F., 2003. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2(1):22-32.

Colagiorgi, A., Di Ciccio, P., Zanardi, E., Ghidini, S., Ianieri, A. A, 2016. Look inside the *Listeria monocytogenes* Biofilms Extracellular Matrix. Microorganisms, 4(3):22.

Colagiorgi, A, Bruini, I., Di Ciccio, P. A., Zanardi, E., Ghidini, S. ve Ianieri A., 2017. *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Wonderland of Food Industry. Pathogens, 6(3):41.

Clokie, M. R., ve Kropinski, A. M., 2009. Bacteriophages: methods and protocols, volume 1: Isolation, characterization, and interactions. Humana Press

Dell'Era, S., Buchrieser, C., Couvé, E., Schnell, B., Briers, Schuppler, M. ve Loessner, M. J., 2009. *Listeria monocytogenes* L-forms respond to cell wall deficiency by modifying gene expression and the mode of division. Molecular Microbiology, 73(2), 306–322.

Delavar, M. A. ve Wang, J., 2021. Lattice Boltzmann Method in Modeling Biofilm Formation, Growth and Detachment. Sustainability, 13, 7968.

Dewey-Mattia, D., Manikonda, K., Hall, A. J., Wise, M. E. ve Crowe, SJ., 2018. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2009–2015. MMWR Surveillance Summeries, 67: 1–11.

Diriba, K., Awulachew, E. ve Diribsa, K., 2021. The prevalence of *Listeria* species in different food items of animal and plant origin in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. European Journal of Medical Research, 26(1): 60.

Doghri, I., Cherifi, T., Goetz, C., Malouin, F., Jacques, M. ve Fravalo, P., 2021. Counteracting Bacterial Motility: A Promising Strategy to Narrow *Listeria monocytogenes* Biofilm in Food Processing Industry. Frontiers in Microbiology, 12:673484.

Doğruöz, N., Minnos, B, Ilhan-Sungur, E. ve Çotuk A., 2009. Biofilm Formation on Copper and Galvanized Steel Surfaces in a Cooling-Water System. IUFS Journal of Biology, 68(2):105-111.

Doijad, S. P., Barbuddhe, S. B., Garg, S., Poharkar, K. V. ve Kalorey, D. R., 2015. Biofilm-Forming Abilities of *Listeria* monocytogenes Serotypes Isolated from Different Sources. PLoS One, 10(9): e0137046.

Domingue, G. J. ve Woody, H. B., 1997. Bacterial persistence and expression of disease. Clinical Microbiology Reviews, 10(3), 320-344.

Donovan, S., 2015. Listeriosis: a rare but deadly disease. Clinical Microbiology Newsletter, 37(17), 135-140.

Durupınar, B., 2005. Bakteriyofajlar antibiyotiklerin yerine kullanılabilir mi?. Klinik Dergisi, 18:80-81.

Dutta, V., 2007. The Effects of Stress on Respiratory Disease and Resulting Colonization of Turkeys with *Listeria monocytogenes* Scott A. University of Arkansas, Yüksek Lisans Tezi, Amerika Birleşik Devletleri, 82s.

Egido, J. E., Costa, A. R., Aparicio-Maldonado, C., Haas, P. J. ve Brouns, S. J. J., 2022. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. FEMS Microbiology Reviews, 9;46(1): fuab048.

Elsayed, M. M., Rasha, Elkenany, M., Zakari, A.I. ve Badawy, B. M, 2023. Isolation and characterization of bacteriophages for combating multidrug-resistant *Listeria monocytogenes* from dairy cattle farms in conjugation with silver nanoparticles. BMC Microbiology, 23:146.

Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, R. P., Mcauliffe, O. ve Coffey, A., 2014. Phage Therapy in the Food Industry. Annual Review of Food Science and Technology, 5(2014): 327-349.

Endersen, L. ve Coffey, A., 2020. The use of bacteriophages for food safety. Current Opinion in Food Science, 36:1-8.

EFSA, 2021. *Campylobacter* and *Salmonella* cases stable in EU | European Food Safety Authority (europa.eu).

EFSA, 2023. Scientific Report: The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. EFSA Journal, 2023;21:e8442; 222 s.

Errington, J., Mickiewicz, K., Kawai, Y., ve Wu, L. J., 2016. L-form bacteria, chronic diseases and the origins of life. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 371(1707), 20150494.

Farber, J. M. ve Peterkin, P. I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiology Reviews, 55, 476-511.

Fortier, L. C. ve Sekulovic, O., 2013. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. Virulence, 4(5), 354-365.

FDA, 1998. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A. [Erişim tarihi: 22.08.2024].

FDA, 2018. BAM Protocol: Simultaneous Confirmation of *Listeria* species and *L. monocytogenes* isolates by real-time PCR. https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-protocol-simultaneous-confirmation-Listeria-species-and-l-monocytogenes-isolates-real-time-pcr. [Erişim tarihi: 22.08.2024].

Finn, L., Onyeaka, H. ve O'Neill, S., 2023. *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food-Associated Environments: A Persistent Enigma. Foods, 6;12(18):3339.

Feng, Y., Yao, H., Chen, S., Sun, X., Yin, Y. ve Jiao, X., 2020. Rapid Detection of Hypervirulent Serovar 4h *Listeria monocytogenes* by Multiplex PCR. Frontiers in Microbiology, 11:1309.

Flach, J., Grzybowski, V., Toniazzo, G. ve Corção, G., 2014. Adhesion and Production of Degrading Enzymes by Bacteria Isolated from Biofilms in Raw Milk Cooling Tanks. Food Science and Technology (Campinas), 34(3): 571-576.

Flemming, H. C. ve Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology, 8(9), 623-633.

Folsom, J. P., Siragusa, G. R. ve Frank, J. F., 2006. Formation of Biofilm at Different Nutrient Levels by Various Genotypes of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection, 69 (4): 826–834.

Gasanov, U., Hughes, D. ve Hansbro, P.M., 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review, FEMS Microbiology Reviews, 29(5): 851–875.

George, S., Menon, K. V., Latha, C., Sunil, B., Sethulekshmi, C. ve Jolly, D., 2014. Isolation of *Listeria*-specific bacteriophage from three different towns in Kerala, India. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3(9): 667-669.

Glover, W. A., Yang, Y., ve Zhang, Y., 2009. Insights into the molecular basis of L-form formation and survival in Escherichia coli. PLoS ONE, 4(10), e7316.

Greer, G. G., 2005. Bacteriophage control of foodborn bacteria. Journal of Food Protection, 68 (5): 1102-1111.

Gu, T., Meesrisom, A., Luo, Y., Dinh, Q. N., Lin, S., Yang, M., Sharma, A., Tang, R., Zhang, J., Jia, Z., Millner, P. D., Pearlstein, A. J. ve Zhang, B., 2021. *Listeria monocytogenes* biofilm formation as affected by stainless steel surface topography and coating composition. Food Control, 130, 108275.

Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., Loessner, M. J., 2009. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Applied and Environmental Microbiology, 75 (1): 93-100.

Hagens, S. ve Loessner, M. J., 2010. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. Current Pharmaceutical Biotechnology, 11: 58-68.

Harper, D. R., Parracho, H. M. R. T., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., Lehman, S. ve Morales, S., 2014. Bacteriophages and Biofilms. Antibiotics, 3, 270-284.

Hill, C., Cotter, P. D., Sleator, R. D., ve Gahan, C. G. M., 2002. Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. International Dairy Journal, 12, 273‑283.

Hof, H., 2003. History and epidemiology of listeriosis. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 35: 199-202.

Iacumin, L., Manzano, M. ve Comi, G., 2016. Phage Inactivation of *Listeria monocytogenes* on San Daniele Dry-Cured Ham and Elimination of Biofilms from Equipment and Working Environments. Microorganisms, 5, 4(1):4.

Jain, K., Parida, S., Mangwani, N., Dash, H. R. ve Das, S., 2013. Isolation and characterization of biofilm-forming bacteria and associated extracellular polymeric substances from oral cavity. Annals of Microbiology, 63(4): 1553–1562.

Frece, J., Markov, K., Cvek, D., Kolarec, K. ve Delas, F., 2010. Comparison of conventional and molecular methods for the routine confirmation of *Listeria monocytogenes* in milk products produced domestically in Croatia. Journal of Dairy Research, 77(1):112-6.

Kalmokoff, M. L., Austin, J. W., Wan, X. D., Sanders, G., Banerjee, S. ve Farber, J. M., 2001. Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. Journal of Applied Microbiology, 91:725–734.

Kawacka, I., Olejnik-Schmidt, A., Schmidt, M., Sip, A., 2020. Effectiveness of Phage-Based Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Food Products and Food Processing Environments. Microorganisms. 10;8(11):1764.

Keary, R., McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C., O'Mahony, J. ve Coffey, A., 2013. Bacteriophages and their endolysins for control of pathogenic bacteria. In: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education (A. Méndez-Vilas, Ed.), 1028-1040.

Khelef, N., Lecuit, M., Buchrieser, C., Cabanes, D., Dussurget, O. ve Cossart, P., 2006. Chapter 1.2.11. *Listeria* monocytogenes and the Genus *Listeria*, In Prokaryotes, 4:404–476.

Kim, J. K., D'Sa, E. M., Harrison, M. A., Harrison, J. A. ve Andress, E. L., 2005. *Listeria monocytogenes* survival in refrigerator dill pickles. Journal of Food Protection, 68(11), 2356-2361.

Kim, J. W., Siletzky, R. M. ve Kathariou, S., 2008. Host Ranges of *Listeria*-Specific Bacteriophages from the Turkey Processing Plant Environment in the United States Applied And Environmental Microbiology, 74 (21):6623–6630.

Lake, F. B., Chen, J., van Overbeek, L. S., Baars, J. J. P., Abee, T. ve den Besten, H. M. W., 2024. Biofilm formation and desiccation survival of *Listeria monocytogenes* with microbiota on mushroom processing surfaces and the effect of cleaning and disinfection. International Journal of Food Microbiology, 2;411:110509.

Lakicevic, B., Stjepanovic, A., Mlijasevic, A., Vidojevic, A. T., Gloic, N. ve Topisirovic, L., 2010. The presence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a choosen food processing establishment in Serbia. Archives of Biological Sciences, 62(4): 881-887.

Lavilla, M., Domingo-Calap, P., Sevilla-Navarro, S. ve Lasagabaster, A., 2023. Natural Killers: Opportunities and Challenges for the Use of Bacteriophages in Microbial Food Safety from the One Health Perspective. Foods, 12(3):552.

Lee, S. H. I., Barancelli, G. V., Corassin, C. H., Rosim, R. R., Coppa, C. F. S. C., de Oliveira, C.A.F., 2017. Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Listeria monocytogenes* strains isolated from a Brazilian cheese processing plant. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 53(3):e00071.

Lee, B. H., Cole, S., Mioche, L. ve Badel-Berchoux, S., 2019, Biofilm Formation of *Listeria monocytogenes* Strains Under Food Processing Environments and Pan-Genome-Wide Association Study. Frontiers Microbiology, 2698.

Lee, Y. J., 2019. Biofilm formation and physiological heterogeneity of *Listeria monocytogenes*. Doktora Tezi, Mississippi State Üniversitesi, ABD, 123 s.

Lemaître, J., Duroux, A., Pimpie, R., Duez, J. ve Milat, M., 2015. *Listeria* Phage and Phage Tail Induction Triggered by Components of Bacterial Growth Media (Phosphate, LiCl, Nalidixic Acid, and Acriflavine). Applied Environmental Microbiology, 81(6).

Lemon, K. P., Higgins, D. E. ve Kolter, R., 2007. Flagellar Motility Is Critical for *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. Journal of Bacteriology, 189(12): 4418–4424

Limoli, D. H., Jones, C. J., ve Wozniak, D. J., 2015. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. Microbiology Spectrum, 3(3): 223-247.

Liu, D., 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria* monocytogenes, an important foodborne pathogen. Journal of Medical Microbiology, 55: 645–659.

Li, T., Zhao, X., Wang, X., Wang, Z., Tian, C., Shi, W., Qi, Y., Wei, H., Song, C., Xue, H. ve Gou, H., 2022. Characterization and Preliminary Application of Phage. Isolated From *Listeria monocytogenes*. Frontiers in Veterinary Science, 9:946814.

Lourenco, A. C. A. A., 2014. Biofilm forming ability and exoproteomic analysis of *Listeria monocytogenes*. Lizbon Üniversitesi, Doktora Tezi, 121 s.

Lourenco, A., Linke, K., Wagner, M. ve Stessl, B., 2022. The Saprophytic Lifestyle of *Listeria monocytogenes* and Entry Into the Food-Processing Environment. Frontiers in Microbiology, 13:789801.

Loessner, M. J., 2005. Bacteriophage endolysins—current state of research and applications. Current Opinion in Microbiology, 8(4), 480-487.

Mazaheri, T., Cervantes-Huam´an, B. R. H., Turitich, L., Ripolles-Avila, C. ve Rodríguez-Jerez, J. J., 2022. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces through conventional and alternative cleaning solutions. International Journal of Food Microbiology, 381:109888.

Mah, T. F. ve O'Toole, G. A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology, 9:34–39.

Mahmood, M. S., Ahmed, A. N., ve Hussein, I., 2003. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Poultry Meat Products and Other Related Inanimates at Faisalabad. Pakistan Journal of Nutrition, 2(6): 346-349.

Mao, P., Wang, Y., Li, L., Ji, S., Li, P., Liu, L., Chen, J., Sun, H., Luo, X. ve Ye, C., 2023. The Isolation, Genetic Analysis and Biofilm Characteristics of *Listeria* spp. from the Marine Environment in China. Microorganisms, 11: 2166.

Mazza, R., Piras, F., Ladu, D., Putzolu, M., Consolati, S.G. ve Mazzette, R., 2015. Identification of *Listeria* spp. strains isolated from meat products and meat production plants by multiplex polymerase chain reaction. Italian Journal of Food Safety, 4:5498.

Mendez, E., Walker, D. K., Vipham, J., ve Trinetta, V., 2020. The use of a CDC biofilm reactor to grow multi-strain Listeria monocytogenes biofilm. Food Microbiology, 92: 103592.

McLauchlin, J., Rees, C. E. D., Trujillo, M. E., Dedysh, S., DeVos, P., Hedlund, B., Kämpfer, P., Rainey, F. A. ve Whitman, W. B, 2015. *Listeria.* In Whitman WB (ed), Ber-gey's manual of systematics of archaea and bacteria. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, p. 1–29.

Moltz, A. G. ve Martin, S. E., 2005. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. Journal of Food Protection, 68(1):92-7.

Moye, Z. D., Woolston, J., ve Sulakvelidze, A., 2018. Bacteriophage applications for food production and processing. Viruses, 10(4), 205.

Mosquera-Fernández, M., Sanchez-Vizuete, P., Briandet, R., Cabo, M. L., Balsa-Canto, E., 2016. Quantitative image analysis to characterize the dynamics of *Listeria monocytogenes* biofilms. International Journal of Food Microbiology, 236, pages 130-137.

Mutlu, N., 2015. Çevresel örneklerden *Listeria monocytogenes*'e özgü faj izolasyonu ve genotipik kararakterizasyonu. Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars, 83 s.

Nayak, D. N., Savalia, C. V., Kalyani, I. H., Kumar, R. ve Kshirsagar, D. P., 2015. Isolation, identification, and characterization of *Listeria* spp. from various animal origin foods, Veterinary World, 8(6): 695-701.

Nonis, J., 2016. Bacteriophage as a biocontrol tool for foodborne pathogens. Canterbury Üniversitesi, Biyoloji Bilimleri Okulu, Yüksek Lisans Tezi, 107s.

Nucera, D. M., Grassi, M. A., Morra, P., Piano, S., Tabacco, E. ve G. Borreani, G., 2016. Detection, identification, and typing of *Listeria* species from baled silages fed to dairy cows. Journal of Dairy Science, 99:6121–6133

Nwaiwu, O., 2020. What are the recognized species of the genus *Listeria*?. Access Microbiology 2020:2.

Oliveira, M. A., Ribeiro, E. G. A., Bergamini, A. M. M. ve De Martinis, E. C. P, 2010. Quantification of *Listeria monocytogenes* in minimally processed leafy vegetables using a combined method based on enrichment and 16S rRNA real-time PCR. Food Microbiology, 27(1):19-23.

Oliveira, I. C., Almeida, R. C. C., Hofer, E., Almeida, P. F., 2012. Bacteriophage Amplification Assay For Detection Of *Listeria* spp. Using Virucidal Laser Treatment. Brazilian Journal of Microbiology, 43(3):1128-1136.

Orsi, R. H. ve Wiedmann, M., 2016. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. Applied Microbiology and Biotechnology, 100(12): 5273–5287.

Oovermann, A., Zurbriggen A. ve Vandevelde, M., 2010. Rhombencephalitis Caused by *Listeria monocytogenes* in Humans and Ruminants: A Zoonosis on the Rise? Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 2010:632513.

Osek, J., Lachtara, B. ve Wieczorek, K., 2022. *Listeria monocytogenes* – How This Pathogen Survives in Food-Production Environments? Frontiers in Microbiology, 13:866462.

Pusztahelyi, T., Szabó, J., Dombrádi, Z., Kovács, S. ve Pócsi, I., 2016. Foodborne *Listeria monocytogenes*: A Real Challenge in Quality Control. Scientifica. 2016:6, 5768526.

Ramires, T., Kleinubing, N. R., Iglesias, M. A., Vitola, H. R. S., Núncio, A. S. P., Kroning, I. S., Garcia Moreira, G. M. S., Fiorentini, A. M., ve Silva, W. P., 2021. Genetic diversity, biofilm and virulence characteristics of *Listeria monocytogenes* in salmon sushi. Food Research International, 140: 109871.

Rincon-Gamboa, S. M., Poutou-Pinales, R. A., Camacho, A. K. C., 2024. Distribution of *Listeria* spp., and *Listeria monocytogenes* in microand small-scale meat product processing plants. Heliyon 10 (2024) e28662.

Rodrigues, L. B., dos Santos, L. R., Tagliari, V. Z., Rizzo, N. N., Trenhago, G., de Oliveira, A. P., Goetz, F., 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: 1082-1085.

Rolon, M. L., Voloshchuk, O., Bartlett, K. V., LaBorde, L. F. ve Kovac, J., 2024. Multi-species biofilms of environmental microbiota isolated from fruit packing facilities promoted tolerance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride. Biofilm. 14;7:100177.

Rossi, F., Amadoro C., Conficoni, D., Giaccone, V. ve Colavita, G., 2020. Occurrence, Diversity of *Listeria* spp. Isolates from Food and Food-Contact Surfaces and the Presence of Virulence Genes. Microorganisms, 8: 294.

Sağlam, H. N., 2017. Marul iri damar hastalığı Lettuce big-vein disease) ve marul mozaik virüsü (Lettuce mosaic virus)'nün tanılanması ve karakterizasyonu. Bitki Koruma Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstütisü, Çukurova Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 89 sayfa.

Santos, S. B., Carvalho, C. M., Sillankorva, S., Nicolau, A., Ferreira, E. C., Azeredo J., 2009. The use of antibiotics to improve phage detection and enumeration by the double-layer agar technique. BMC Microbiology, 23:9:148.

Schamp, C. N., Dhowlaghar, N., Hudson, L. K., Bryan, D. W., Zhong, Q., Fozo, E. M., Gaballa, A., Wiedmann, M. ve Denes, T. G., 2023. Selection of mutant *Listeria* phages under food-relevant conditions can enhance application potential. Applied and Environmental Microbiology, 31;89(10):e0100723.

Schlech, W. F., 2000. 3rd. Foodborne listeriosis. Clinical Infectious Diseases, 200031(3):770-775.

Seeliger, H. P. R. ve Höhne, K., 1979. Chapter II Serotyping of *Listeria* monocytogenes and Related Species, Editor(s): T. Bergan, J.R. Norris, Methods in Microbiology, Academic Press, 13: 31-49.

Shafia, F. ve Thompson, T. L., 1964. Calcium Ion Requirement For Proliferation Of Bacteriophage $\acute{o}\mu^{-4}$. Journal Of Bacteriology, 88(2): 293-296.

Sharma, S., Mohler, J., Mahajan, S. D., Schwartz, S. A., Bruggemann, L. ve Aalinkeel, R., 2023. Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. Microorganisms, 11(6):1614.

Siqueira, M. G. F. M., Silva, J. C. R. S., Lúcio, É. C., Kim, P. C. P., Lins, L. F., Junior, J. W. P., Mota, R. Q. ve Moura, A. P. B. L., 2017. Detection of *Listeria* spp. in food handling areas of retail food stores in the state of Pernambuco, Brazil. Brazilian Journal of Food Technology, 20, e2016138.

Sillankorva, S. M., Oliveira, H. ve Azeredo, J., 2012. Bacteriophages and their role in food safety. International Journal of Microbiology, 2012:863945

Silva, E. N., Figueiredo, A. C., Miranda, F.A. ve Almeida, R. C. C., 2014. Control of *Listeria* monocytogenes growth in soft cheeses by bacteriophage P100. Brazilian Journal of Microbiology, 19, 45(1):11-6.

Silva, A. S., Duarte, E. A. A., Oliveira, T. A. S. ve Barreto, N. S. E., 2020. Identification of *Listeria* monocytogenes in cattle meat using biochemical methods and amplifi cation of the hemolysin gene. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 92: e20180557

Silva, A., Silva, V., Gomes, J. P., Coelho, A., Batista, R., Saraiva, C., Esteves, A., Martins, Â., Contente, D., Diaz-Formoso, L., Cintas, L. M., Igrejas, G., Borges, V. ve Poeta, P., 2024. *Listeria monocytogenes* from Food Products and Food Associated Environments: Antimicrobial Resistance, Genetic Clustering and Biofilm Insights. Antibiotics, 13(5):447.

Sleator, R. D., Gahan, C. G. M. ve Hill, C., 2003. A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. Applied Environmental Microbiology. 69: 1‑9.

Smelt, J. P. P. M., ve Brul, S., 2014. Thermal inactivation of microorganisms. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 54, 1371‑1385.

Stepanović, S., Cirković, I., Ranin, L. ve Svabić-Vlahović, M., 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Letter Applied Microbiology, 38(5):428-432.

Soni, K. A. ve Nannapaneni, R., 2010a. Bacteriophage Significantly Reduces *Listeria monocytogenes* on Raw Salmon Fillet Tissue. Journal of Food Protection, 73(1): 32–38.

Soni, K. A. ve Nannapaneni, R., 2010b. Removal of *Listeria* monocytogenes Biofilms with Bacteriophage P100. Journal of Food Protection, 73(8):1519-24.

Sołtysiuk M., Wiszniewska-Łaszczych A., Wojtacka J., Wysok B., 2022. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Listeria* spp. isolated from bulk raw milk in north-eastern Poland. Medycyna Weterynaryjna, 78 (3), 137-141.

Spickler, A. R., 2019. Listeriosis. http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php

Stone, E., Lhomet, A., Neve, H., Grant, I. R., Campbell, K. ve McAuliffe, O., 2020. Isolation and Characterization of *Listeria monocytogenes* Phage vB_LmoH_P61, a Phage With Biocontrol Potential on Different Food Matrices. Frontiers in Sustainable Food Systems, 4:521645.

Şanlıbaba, P. ve Uymaz Tezel, B., 2019. Isolation of Phages Infecting *Listeria monocytogenes*. Gıda, 44 (3): 463-471

Tarhan, H., Yiğit, A., Yüksel, Y. ve Eryalçın, Y., 2007. Bakteriyofajlar ve Kullanım Alanları (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Işıl VAR). Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Mezuniyet Çalışması, Adana, 19s.

Tokman, J. I., Kent, D. J., Wiedmann, M. ve Denes, T., 2016. Temperature Significantly Affects the Plaquing and Adsorption Efficiencies of *Listeria* Phages. Frontiers in Microbiology, 7:631.

Tompkin, R. B., 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. Journal of Food Protection, 65:709–725.

Townsend, A., Strawn, L. K., Chapman, B. J. ve Dunn, L. L. A., 2021. Systematic Review of *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* Prevalence, Persistence, and Diversity throughout the Fresh Produce Supply Chain. Foods, 10: 1427

Trudelle, D. M., Bryan, D. W., Ray, S., Munafo, J. P. ve Jr Denes, T. G., 2022. Analysis of Derivatized Wall Teichoic Acids Confirms that a Mutation in Phage-Resistant *Listeria* monocytogenes Impacts Rhamnose Decoration. ACS Omega, 7(20):17002-17013.

Tunail, N., 2000. "*Listeria monocytogenes*", http://www.orlab.net/mikrobiyoloji/ 210010306.pdf [Erişim tarihi: 21 Temmuz 2024].

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

Trang, P. N., Ngoc T. T. A., Masuda, Y., Hohjoh, K. I. ve Miyamoto, T., 2023. Biofilm Formation From *Listeria* monocytogenes Isolated From Pangasius Fish-processing Plants. Journal of Food Protection, 86(3):100044.

Var, I., Sağlam, S. ve Zorlugenç B., 2020. An Investigation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. at Poultry Processing Plants and Retail Markets. Journal of Biotechnology Science Research. 7(1):1-9.

Varabioff, Y., 1990. Incidence and Recovery of *Listeria* from Chicken with a Pre-enrichment Technique. Journal of Food Protection, 53(7):555-558.

Vongkamjan, K., Switt, A. M., den Bakker, H. C., Fortes, E. D. ve Wiedmann, M., 2012. Silage Collected from Dairy Farms Harbors an Abundance of *Listeria* phages with Considerable Host Range and Genome Size Diversity. Applied and Environmental Microbiology, 78(24): 8666–8675.

Walker, K., 2006. Use of Bacteriophages as Novel Food Additives. Food Regulation in the United States, Federal Register, 71: 10

Wardani, A. K., Buana, E.O. G. H. N. ve Sutrisno, A., 2023. The potency of bacteriophages isolated from chicken intestine and beef tribe to control biofilm-forming bacteria, *Bacillus subtilis*. Scientific Reports, 13(1):8222.

Wesley, I. V., Harmon, K. M., Dickson, J. S. ve Schwartz, A. R., 2002. Application of a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for the Simultaneous Confirmation of *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria* Species in Turkey Sample Surveillance. Journal of Food Protection, 65(5): 780–785.

WHO, (2018). Listeriosis, https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis

Wohlfarth, J. C., Feldmüller, M., Schneller, A., Kilcher, S., Burkolter, M., Meile, S., Pilhofer, M., Schuppler, M. ve Loessner, M. J., 2022. L-form conversion in Gram-positive bacteria enables escape from phage infection. Nature Microbiology, 8: 387–399.

Yang, Y., Kong, X., Niu, B., Yang, J. ve Chen, Q., 2024. Differences in Biofilm Formation of *Listeria monocytogenes* and Their Effects on Virulence and Drug Resistance of Different Strains. Foods, *13*, 1076.

Young, R., 1992. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. Microbiological Reviews, 56(3), 430-481.

Yin W., Xu, S., Wang, Y., Zhang, Y., Chou, S.H., Galperin, M. Y. ve He, J., 2021. Ways to control harmful biofilms: prevention, inhibition, and eradication. Critical Reviews in Microbiology, 47(1):57-78.

Yun, H. S., Kim, Y., Park, M. R., Kim, S.H. ve Oh, S., 2014. Inhibitory effects of the κ-casein macropeptide isolated from milk protein on the biofilm formation and virulence of *Listeria monocytogenes*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 78:3, 490-498.

Zhao, A., Sun, J. ve Liu, Y., 2023. Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 13:1137947.

Zhou, C., Zhu, M., Wang, Y., Yang, Z., Ye, M., Wu, L., Bao, H., Pang, M., Zhou, Y., Wang, R., Sun, L., Wang, H., Zheng, C. ve Zhang, H., 2020. Broad host range phage vB-LmoM-SH3-3 reduces the risk of *Listeria* contamination in two types of ready-to-eat food. Food Control, 108:106830.

Zou, X., Xiao, X., Mo, Z., Ge, Y., Jiang, X., Huang, R., Li, M., Deng, Z., Chen, S., Wang, L. ve Lee, S.Y., 2022. Systematic strategies for developing phage resistant *Escherichia coli* strains. Nature Communication, 13: 4491.

ÖZGEÇMİŞ

Selin SAĞLAM, ilk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2007 yılında başladığı Çukurova Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 2011 yılında mezun oldu ve aynı yıl Gıda Mühendisliği Anabilimdalı'nda yüksek lisansa başladı. 2014 yılında Gıda Mikrobiyolojisi alanında yüksek lisans eğitimini tamamladı.

Temmuz 2012 - Aralık 2013 tarihleri arasında TCERT Belgelendirme Şirketi'nde Kalite Yönetim Sistemi Denetçisi olarak çalıştı.

Ocak 2014 - Nisan 2015 tarihleri arasında Alltech Biotechnology şirketinde Kalite ve Üretim Sorumlusu olarak çalıştı.

Ağustos 2016 - Şubat 2017 tarihleri arasında İstanbul Aydın Üniversitesi'nde Öğretim Görevlisi olarak çalıştı.

Şubat 2017 - Mayıs 2018 tarihleri arasında ADM şirketinde Kalite Kontrol Mühendisi olarak çalıştı.

Mayıs 2018 yılından beri Döhler Gıda bünyesinde Kalite Kontrol Mühendisi olarak başladığı kariyerine şu anda aynı şirkette Planlama Yönetici olarak devam etmektedir.

EKLER

Ek. 1. Agaroz Jel Elektroforezde Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. **TBE Buffer (89 mM Tris, 89 mM borik asit, 2 mM EDTA) (pH:8,3)**
   10.777 g Tris-Base, 5.502 g borik asit ve 0.744 g EDTA alınarak 900 ml saf su içinde eritildikten sonra çözeltinin pH'sı 8.3 olarak ayarlanarak ve hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 1X TBE buffer hazırlanmıştır.
2. **TAE Buffer (10 mM Tris, 5 mM Sodium acetate, 0,5 mM EDTA) (pH:8,3)**
   1.211 g Tris-Base, 0.680 g sodyum asetat ve 0.186 g EDTA alınarak 900 ml saf su içinde eritildikten sonra çözeltinin pH'sı 8.3 olarak ayarlanarak ve hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 1X TAE buffer hazırlanmıştır.
3. **Etidyum Bromid**
   10 mg etidyum bromid 1 ml saf su içerisinde eritilmiş ardından 30 µl alınıp 100 ml saf su içine eklenmiştir.