



Sultan ve Hürmetçi Sazlıklarından Belirli Gıda Patojenlerine Karşı İzole Edilen Litik Fajların Fenotipik Karakterizasyonu

Nurhan ERTAŞ ONMAZ ¹ Yasin ÖZKAYA ² Rümeyşa Nur Karakuş ²

¹ Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi, Veterinerlik Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kayseri/Türkiye

² Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri/Türkiye

◆ Geliş Tarihi/Received: 29.04.2025

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 30.05.2025

◆ Yayın Tarihi/Published: 30.06.2025

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Ertas-Onmaz N, Özkaya Y ve Karakuş RN. Sultan ve Hürmetçi Sazlıklarından Belirli Gıda Patojenlerine Karşı İzole Edilen Litik Fajların Fenotipik Karakterizasyonu. Bozok Vet Sci (2025) 6, (1):26-34.

Özet: Bu çalışmada, Sultan ve Hürmetçi sazlıklarından spesifik gıda patojenlerine karşı litik bakteriyofajların izole edilmesi, fenotipik ve biyolojik özelliklerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Bu kapsamda, toplanan su örnekleri; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerine özgü litik fajların izolasyonu amacıyla zenginleştirildi. Faj varlığı spot test yöntemiyle ön değerlendirmeye tabi tutuldu ve pozitif sonuç veren örnekler çift tabaka agar yöntemiyle saflaştırıldı. İzole edilen litik fajların optimal enfeksiyon çokluğu (MOI) değerleri, adsorpsiyon kinetikleri ve tek aşamalı büyüme eğrileri çift tabaka agar yöntemiyle; konak spektrumları ile çevresel stabiliteyi ise spot test yöntemiyle karakterize edildi. Çalışmada, *L. monocytogenes* hariç diğer test bakterilerine karşı çapları 1-3 mm arasında değişen toplam 40 litik faj izole edildi. Elde edilen fajların titreleri 10^9 - 10^{10} pfu/mL arasında bulundu, tüm faj izolatları 0.1-100 MOI seviyelerinde bakteriyel büyümeyi inhibe etti ve 1 MOI düzeyinde en yüksek çoğalma gözlemlendi. Fajların adsorpsiyon süreleri 15-20 dakika, latent periyotları 15-25 dakika ve lizis süreleri 20-30 dakika arasında değişirken, patlama boyutlarının 100-120 pfu/cfu arasında olduğu belirlendi. İzole edilen fajların, pH 3.0-9.0 aralığında ve 50 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda stabiliteyi korudukları gözlemlendi. Ayrıca, izole edilen fajların 4°C'de altı ay boyunca aktiviteyi koruduğu ve yalnızca hedef bakterilere karşı litik etkinlik göstererek yüksek konak özgüllüğü sergilediği tespit edildi. Sonuç olarak, çalışmada sazlıklardan izole edilen fajlar, geniş litik spektrumları, yüksek özgüllükleri ve çevresel koşullara karşı gösterdikleri stabilite özellikleri ile biyokontrol ve terapötik uygulamalarda kullanılabilecek ajan adayları olabilecekleri gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyofaj, litik aktivite, çevresel stabilite, konak spektrumu, gıda kaynaklı patojenler, Sultan ve Hürmetçi Sazlığı

Phenotypic Characterization of Lytic Phages Targeting Specific Food Pathogens Isolated from Sultan and Hürmetçi Marshes

Abstract: This study aimed to isolate lytic bacteriophages against specific foodborne pathogens from the Sultan and Hürmetçi marshes and to evaluate their phenotypic and biological characteristics. For this purpose, water samples collected from the marshes were enriched for the isolation of lytic phages specific to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, and *Pseudomonas aeruginosa*. The presence of phages was assessed using the spot test, and positive samples were subsequently purified through the double-layer agar method. The optimal multiplicity of infection (MOI) values, adsorption kinetics, and one-step growth curves of the isolated lytic phages were characterized using the double-layer agar method, while their host range and environmental stability were evaluated using the spot test method. A total of 40 lytic phages were isolated against all test bacteria except *L. monocytogenes*, producing plaques with diameters ranging from 1 to 3 mm. The phage titers ranged between 10^9 and 10^{10} pfu/mL, and all phage isolates inhibited bacterial growth at MOI levels between 0.1 and 100, with the highest proliferation observed at an MOI of 1. The adsorption times of the phages ranged from 15 to 20 minutes, latent periods from 15 to 25 minutes, and lysis durations from 20 to 30 minutes, while their burst sizes were determined to be between 100 and 120 pfu/cfu. The isolated phages remained stable across a pH range of 3.0 to 9.0 and at temperatures up to 50 °C. Additionally, the phages retained their activity after six months of storage at 4°C and exhibited lytic activity exclusively against their target bacteria, demonstrating high host specificity. In conclusion, it was shown that phages isolated from reeds in the study could be candidate agents that can be used in biocontrol and therapeutic applications with their broad lytic spectrum, high specificity and stability against environmental conditions.

Keywords: Bacteriophage, lytic activity, environmental stability, host range, foodborne pathogens, Sultan and Hürmetçi Marshes

1. Giriş

Antibiyotiklerin klinik, veterinerlik, hayvancılık, tarım ve gıda işleme alanlarında uzun süreli ve yaygın kullanımı bu ajanların etkinliğini ciddi biçimde azaltmıştır. Antibiyotik direnç genlerinin varlığı ve bu genlerin yatay gen transferi yoluyla yayılabilme yetisi, patojen mikroorganizmaların

özellikle hastane ve diğer klinik ortamlarda adaptif avantaj kazanmasına neden olmuştur (1). Yeni antibiyotiklerin geliştirilmesine yönelik araştırmaların neredeyse durma noktasına gelmesi, çoklu ilaç dirençli (MDR) bakteri suşlarının hızla yaygınlaşmasına neden olmakta; bu durum, küresel düzeyde ciddi bir halk sağlığı tehdidi oluşturmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), antibiyotik dirençli enfeksiyonların neden olduğu ölümlerin giderek arttığını ve bu sayının 2050 yılına kadar yıllık 10 milyona ulaşarak kanserden daha fazla ölüme yol açabileceğini öngörmektedir (2). Bu nedenle, DSÖ, araştırmacıları öncelikli antibiyotik dirençli enfeksiyonları tedavi etmek için yenilikçi antibakteriyel yaklaşımlar tasarlamayı önermiştir (3). Bakteriyofajlar, bakterileri spesifik olarak enfekte eden ve onları lizis yoluyla ortadan kaldıran doğal biyolojik ajanlardır; bu yönleriyle geleneksel olarak bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaları önerilmiştir. Ancak sonraki on yıllarda antibiyotiklerin kolay erişilebilirliği ve büyük ölçekte kullanımı, bakteriyofajların tedavi amaçlı kullanımını gölgede bırakmıştır. Modern tıpta antibiyotikler, enfeksiyon hastalıklarının yönetiminde temel bir araç haline gelmiştir; ancak mevcut anti-enfektif tedavi seçeneklerinin hızla azalması, küresel sağlık açısından ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Bu bağlamda, bilim insanları ve klinisyenler bakteriyofaj uygulamalarındaki gelişmeleri umut verici ve uygulanabilir alternatifler olarak değerlendirmektedir (1,4). Konak özgüllüğü, kendi kendine çoğalabilme kapasitesi, düşük toksisite ve mikrobiyotayı etkilememe gibi özellikleri sayesinde faj terapisi, antibiyotiklere karşı umut vadeden bir alternatif tedavi stratejisi olarak değerlendirilmektedir (5). Bakteriyofajlar; bakterilerin tespiti, kontrolü ve eliminasyonu amacıyla, tedavi, gıda koruma, biyosanitasyon uygulamaları ile spesifik sensörlerin tasarımı gibi çeşitli yöntem ve alanlarda etkili bir şekilde kullanılabilir (6,7). Bakteriyofajlar, çeşitli ekosistemlerde yaygın olarak bulunan ve yalnızca belirli bakteri türlerini enfekte edebilen bakteriyel özgüllüğü yüksek virüslerdir (8,9). Konak hücrede izledikleri replikasyon stratejilerine göre litik ya da lizojenik tipte sınıflandırılmaktadır. Litik fajlar, konak hücrede hızlı çoğalarak hücre lizisine yol açarak yeni fajların çevreye yayılmasını sağlar. Lizojenik fajlar ise genomlarını konak bakterinin DNA'sına entegre eder ve hücre bölünmeleriyle birlikte kalıtsal olarak aktarılır (10). Litik fajlar, gıda kaynaklı patojenlerin çoğalmasını etkin biçimde baskılayarak, gıda endüstrisinde kontaminasyon kaynaklı kayıpların azaltılmasında önemli bir potansiyel sunmaktadır (11). Gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlarda en sık karşılaşılan bakteriler; *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp., *Brucella* spp. ve *Aeromonas* spp.'dir (12). Bakteriler; insan, hayvan ve bitki konakçıların yanı sıra toprak, su ve atmosfer gibi çeşitli çevresel habitatlarda yaygın olarak bulunmaktadır. (13). Bakterilerin bu denli yaygınlığı, onları enfekte eden bakteriyofajların da çevresel ortamlarda yüksek oranda bulunmasına neden olmaktadır. Nitekim yapılan çalışmalar, bakteriyofajların özellikle sucul ortamlarda bakterilerden yaklaşık 10 kat daha fazla sayıda bulunduğunu göstermektedir (8,9,14). Fajların, her gün okyanuslardaki bakterilerin %20-40'ını lize ettikleri

düşünüldüğünde, bakteri seviyelerini düzenleyerek ekosistemlere önemli katkılarda bulunabilirler. Bu durum, bakteriyofajların çevresel dinamiklerdeki rolü ve baskın bakterilerin döngüsünü etkileme kapasitesiyle tutarlıdır (15,16,17). Benzer şekilde, Kayseri il sınırları içerisinde yer alan Sultan Sazlığı ve Hürmetçi Sazlığı, yalnızca biyolojik çeşitliliğin korunması açısından değil, aynı zamanda bölgesel kırsal yaşamla kurdukları güçlü etkileşimler bakımından da önem taşıyan, doğal kaynak suları ve geniş mera alanlarıyla karakterize edilen sulak alanlardır (18,19). Tatlısu ekosistemlerinin önemli örneklerini oluşturan bu alanlar, zengin mikrobiyal çeşitlilikleriyle ekolojik açıdan hassas habitatlar sunmakta ve potansiyel bakteriyofaj-bakteri etkileşimlerinin araştırılması açısından dikkat çekici birer model oluşturmaktadır. Bu nedenle, Kayseri il sınırları içerisinde yer alan Sultan ve Hürmetçi sazlıklarından toplanan su örneklerinde, gıda kaynaklı patojen bakterilere karşı litik etkili bakteriyofajların izolasyonu ve bu fajların fenotipik ve biyolojik özelliklerinin (litik etkinlik, özgüllük, stabilite gibi) karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Örneklem Noktaları

Çalışma kapsamında, İç Anadolu'nun güney kesimi ile Toros Dağları'nın birbirine yaklaştığı bir konumda, Orta Kızılırmak Bölümü içerisinde yer alan Kayseri iline bağlı iki önemli sulak alanda örneklem gerçekleştirilmiştir. Bu alanlardan biri olan Sultan Sazlığı, yaklaşık 1000 km²'lik yüzölçümüne sahip Develi Ovası'nın güneybatısında, Develi, Yahyalı ve Yeşilhisar ilçelerinin idari sınırlarının kesişim noktasında yer almakta olup, yaklaşık 243,57 km²'lik bir alana sahiptir. Coğrafi olarak 38,33° kuzey enlemi ve 35,27° doğu boylamı koordinatlarında konumlanmaktadır (19). İkinci örneklem alanı olan Hürmetçi Sazlığı ise, Kayseri il merkezinin yaklaşık 13 km güneybatısında, Hacılar ve İncesu ilçeleri sınırları içerisinde yer almakta olup yaklaşık 95,92 km²'lik bir yüzölçümüne sahiptir. Alan, 1030–1270 metre arasında değişen rakımıyla dikkat çekerken; sulak alan kısmı yaklaşık 31 km² olarak bildirilmektedir. Coğrafi olarak 38,72° kuzey enlemi ve 35,34° doğu boylamı koordinatlarında konumlanan Hürmetçi Sazlığının güneyinde Erciyes Dağı, güneybatısında ise Sultan Sazlığı yer almaktadır (18).



Şekil 1. Çalışmada örneklemenin yapıldığı Sultan ve Hürmetçi sazlıklarının konumu

2.2. Çalışma Kapsamında Kullanılan Bakteri Kültürleri

Çalışmada, ziyaret edilen sazlıklardan farklı gıda kaynaklı patojenlere karşı faj izolasyonu amacıyla, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan *S. aureus*

ATCC 25923, *S. Typhimurium* ATCC 13311, *L. monocytogenes* RSKK 472 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *E. coli* ATCC 25922 suşları kullanıldı. Çalışma kapsamında izole edilen her bir fajın konak spektrumunu belirlemek amacı ile Tablo 1’de belirtilen fenotipik özellikleri belirtilen izolatlar kullanıldı.

Tablo 1. Fajların konak spektrumunun belirlenmesinde kullanılan test mikroorganizmaları ve fenotipik özellikleri.

Test Mikroorganizma (n, izolasyon kaynağı)	<i>E. coli</i> Fajı	<i>S. aureus</i> Fajı	<i>P. aeruginosa</i> Fajı	<i>S. Typhimurium</i> Fajı	Antibiyotik Direnci	Biyofilm Oluşumu
Konak Bakteriler*						
<i>S. aureus</i> ATCC 25923		✓				
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311				✓		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	✓					
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			✓			
Diğer Bakteriler**						
<i>E. coli</i> (5, atık su)	✓	✓	✓	✓	MDR	+
<i>E. coli</i> O157 (5, gıda)	✓	✓	✓	✓	MDR	+
<i>E. coli</i> (10, gıda)	✓	✓	✓	✓	MDR	+
<i>E. faecalis</i> (5, atık su)	✓	✓	✓	✓	MDR	+
<i>E. faecalis</i> (10, gıda)	✓	✓	✓	✓	MDR	+
<i>E. faecium</i> (10, gıda)	✓	✓	✓	✓	MDR	+
<i>S. aureus</i> (10, gıda)	✓	✓	✓	✓	MDR	+
MRSA (10, insan)	✓	✓	✓	✓	MDR	+
<i>L. monocytogenes</i> (13, gıda)	✓	✓	✓	✓	MDR	+
<i>Salmonella</i> spp. (15, gıda)	✓	✓	✓	✓	MDR	+

* Çalışmada sadece faj izolasyonu amacıyla kullanılan konak bakteriler

** Fajların özgüllük ve konak spektrumunu belirlemek amacıyla kullanılan diğer test bakterileri

2.3. Su Örneklerinin Toplanması

Araştırma kapsamında Sultan Sazlığı ve Hürmetçi Sazlığında iki farklı zaman diliminde, yaklaşık birer aylık aralıklarla yapılan ziyaretlerde su örneklemeleri gerçekleştirilmiştir. Her örnekleme sırasında, kıyıya yakın yüzeyden 100’er mL steril numune kaplarına doğrudan manuel daldırma yöntemiyle toplam 10 adet su örnekleri toplandı. Numune alma işleminden önce şişeler çalışma alanındaki suyla durulanmış, ardından her bir şişeye örnekleme zamanı ve istasyon bilgilerini içeren etiketler yapıştırıldı. Toplanan su örnekleri, aynı gün içinde laboratuvara taşınarak analizi gerçekleştirilene kadar 4 °C’de muhafaza edildi.

2.4. Su Örneklerinden Faj İzolasyonu ve Saflaştırılması

Çalışma kapsamında alınan su örneklerinin 20 mL’si, kaba partikülerini gidermek için 4.000× rpm’de 10 dk santrifüj (Gyrozen, Almanya) edildi. Daha sonra üstteki sıvı seri olarak 0,45 µm ve 0,22 µm gözenek boyutuna sahip membran filtrelerden (Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD) süzüldü. Elde edilen filtrat, 20 mL 2X Luria Bertani (LB; Merck, 110285, Almanya) broth içine alındı ve her bir hedef bakteri türü (Tablo 1) için ayrı ayrı olacak şekilde, üzerine 1 mL 18 saat LB broth’ta aktifleştirilmiş konak bakteri kültürü eklendi. Daha sonra, konak bakterisi *L. monocytogenes* ve *P. aeruginosa* olan süspansiyonların 30°C’de, diğerleri ise 37°C’de 24 saat inkübasyonun ardından örnekler 4.000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantlardaki hedef fajların varlığı spot test ile belirlendi. Bu amaçla, konakçı

bakteri kültüründen 100'er µL alınarak içinde 4' er mL LB yumuşak agar (%0,7 agar) içeren tüplere ilave edilerek karıştırıldı ve LB agar içeren petrilere dökülerek homojen olarak yayıldı ve petrilere kurumaya bırakıldı. Daha sonra katılaştıran agar üzerine, faj varlığı kontrol edilecek olan süpernatantlardan 10'ar µL damlatılarak daha önce belirtilen sıcaklıklarda 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası petrilere plak oluşumu açısından incelendi. Fajların varlığı doğrulandıktan sonra, saflaştırma ve zenginleştirme işlemleri yapıldı. Bu amaçla, 1 mL filtrat, 2 mL bakteri kültürü içeren 5 mL LB yumuşak agarla karıştırıldı ve LB agar üzerine yayılarak çift tabaka yöntemi ile her bir konak bakteri için belirtilen sıcaklıklarda bir gece inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda berrak zon oluşturan fajlar arasında farklı morfoloji gösteren beşe kadar şeffaf plak, steril bir filtre ucuyula saflaştırma için alınarak 1 mL fizyolojik tuzlu su içinde on kat seri dilüsyonları (10^{-1} - 10^{-9}) hazırlandı. Her bir dilüsyon, 1 mL kendi konak bakteri kültürü (yaklaşık 10^8 kob/mL) ve 3 mL LB yumuşak agar ile karıştırılarak LB agar üzerine homojen bir şekilde yayıldıktan sonra 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu işlem üç kere tekrarlandı. Son saflaştırmadan sonra, tek bir plak seçildi ve konak bakteri içeren LB broth'a aktarıldı. 37°C'de 100 rpm'de 18 saat çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültüre 100 µL kloroform eklendikten 20 dakika inkübe edildi ve ardından santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar 2 µm'lik filtreden geçirildi ve elde edilen filtrat 4°C'de stok faj olarak saklandı.

Stok fajların titreleri belirlemek için saline magnezyum (SM) tamponunda (5.8 g NaCl, 2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ve 50 mL 1M Tris-HCl) 10 kat dilüsyonlar hazırlandı. Bu dilüsyonlardan 100 µL konak bakteri ile karıştırıldı. Karışım, 37°C'de 15 dakika bekletildikten sonra 3 mL yumuşak agara eklendi ve LB agar üzerine yayıldıktan sonra 37°C'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda oluşan plaklar sayıldı ve stok fajların titreleri aşağıda belirtilen formül kullanılarak plak oluşturan birim/mL (pfu/mL) olarak hesaplandı (20-22). Elde edilen stok fajlar kullanılmaya kadar 4°C'de saklandı.

Titre (pob/mL) = plak sayısı / seyreltme faktörü x mL cinsinden seyreltilmiş bakteriyofaj hacmi

2.5. İzole Edilen Fajların İn Vitro Karakterizasyonu

2.5.1. Optimal İnfeksiyon Çokluğu Değerinin (Multiplicity of Infection Value; MOI) Belirlenmesi

Fajların çoğalma etkinliğini belirlemek amacıyla farklı MOI oranlarında optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaçla, faj süspansiyonları ve log fazındaki bakteri kültürleri farklı MOI değerlerine (0.01, 0.01, 0.1, 1, 10 ve 100) göre karıştırıldı. Karışımlar 37°C'de 3,5 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, serbest bakteriyofajların uzaklaştırılması amacıyla süspansiyonlar 1000 × g'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı 0.22 µm membran filtreden geçirilerek steril tüplere alındı. Elde edilen filtratlardan çift

tabaka agar yöntemi kullanılarak faj titreleri (pfu/mL) belirlendi. Farklı MOI seviyelerinde elde edilen faj titreleri karşılaştırıldı ve en yüksek faj çoğalmasının gözlemlendiği MOI değeri, optimal MOI olarak kabul edildi (23, 24).

2.5.2. Adsorpsiyon Hızlarının Belirlenmesi

Her bir faj süspansiyonuna belirlenen optimal MOI'ye göre bakteri kültürleri ilave edildikten sonra fajların konak bakterilerine adsorbe olması için 37°C'de 100 rpm'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda karışım 3000xg'de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet 5 mL LB broth ile süspanse edildikten sonra 37°C'de 100 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyonun 2, 4 ve 6. saatlerinde süspansiyondan 100'er µL alınarak çift tabaka agar yöntemi ile titreleri belirlendi (20, 25).

2.5.3. Tek Aşamalı Gelişim Eğrilerinin (One Step Growth Curve) Belirlenmesi

Her bir konak bakteri kültürü (10^8 kob/mL) ve optimal MOI'deki (MOI=1) faj süspansiyonları eşit oranda (her biri 5 mL) karıştırıldı ve 37°C'de 100 rpm'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda faj-bakteri süspansiyonu 3000xg'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra pelet 5 mL LB broth ile süspanse edilerek ve 37°C'de 100 rpm'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresince, ilk 30 dakika boyunca her 5 dakikada bir ve sonraki 30 dakika boyunca her 10 dakikada bir süspansiyondan 100'er µL örnek alınarak, çift tabaka agar yöntemiyle faj titreleri belirlendi (25).

2.5.4. Konak Spektrumlarının Belirlenmesi

İzole edilen fajların konak bakterileri hariç çeşitli kaynaklardan izole edilen 30 farklı izolatlarda (Tablo 1) litik etkinlikleri spot ekim yöntemi ile belirlendi. Bu amaç ile, -20°C'de saklanan izolatların LB broth içindeki 18 saatlik kültürleri (100 µL) yumuşak LB agar (4 mL) karıştırılarak LB agar üzerine döküldü ve kurumaya bırakıldı. Daha sonra her bir faj süspansiyonundan 10 µL alınarak test izolatlarının üzerine damlatıldı ve 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda LB agar üzerinde plakların (berrak zon) varlığı ilgili fajın hedef bakteriye karşı litik etkinliği olarak değerlendirildi (26).

2.5.5. Fajların Stabilité Analizleri

Farklı sıcaklık ve farklı pH aralıklarının izole edilen fajların canlılığı üzerindeki etkisi analiz edildi. Bu amaç ile 10^7 pfu/mL başlangıç titresine sahip faj izolatlarının, sırasıyla farklı sıcaklıklarda (4°C, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C) ve farklı pH aralığında (pH 2-11) ayarlanmış LB broth içinde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresince 10 dakika aralıklarla örnekler alındı. Deney üç kez gerçekleştirildi. pH ve sıcaklık muamelesi sonrası fajların titresini çift tabaka agar yöntemi belirlendi (20). Aynı zamanda 4°C'de depolama süresince 6 ay boyunca ayda bir kez örnekleme yapılarak faj aktivitesi kontrol edildi.

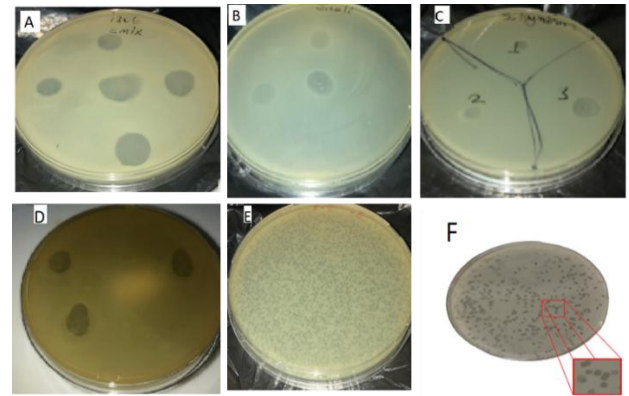
2.6. İstatistik Analiz

Fajların izole edildikleri konak bakterilere karşı 0.001-100 arası MOI seviyelerinde gösterdikleri log pfu/mL çoğalma düzeyleri ile tek aşamalı büyüme eğrisi verileri (adsorpsiyon süresi, latent periyot, lizis süresi ve patlama boyutu) için gruplar arası farklar, önce tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. ANOVA sonucu anlamlı bulunan parametrelerde gruplar arasındaki farklılıklar Tukey HSD testi ile belirlendi. Ayrıca, fajların, çeşitli kaynaklardan elde edilen test bakterilerine karşı gösterdiği litik aktivitenin türlere göre dağılımı Fisher's Exact Test ile analiz edildi. $p < 0.05$ olan tüm değişkenler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

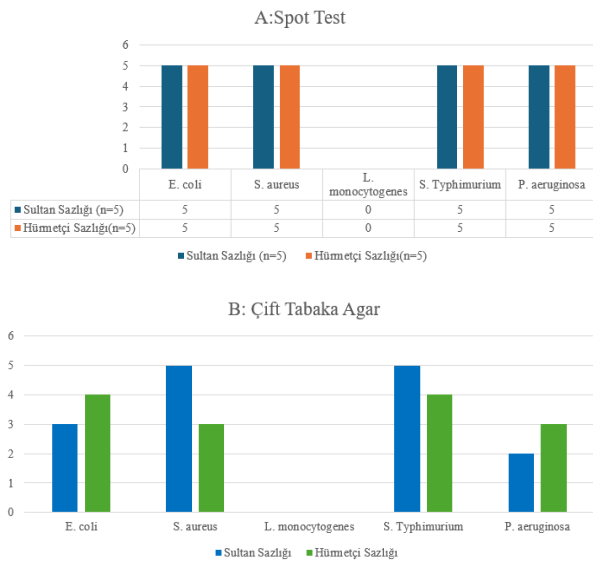
Bulgular

Sazlıklardan alınan 10 adet su örneği ile gerçekleştirilen spot testlerde, *L. monocytogenes* dışındaki tüm konak bakterilere karşı 10-15 mm çap aralığında toplam 40 faj plağı gözlemlenmiştir. Çift tabaka agar yönteminde ise bu plakların 24'ü, fajların konak bakteriler üzerinde belirgin litik aktivite sergilediğini gösteren, genellikle 1-3 mm çapında, yuvarlak ve net sınırlı plaklar oluşturdu (Şekil 2, Şekil 3). Tüm fajlar, test edilen 0.001-100 aralığındaki MOI seviyelerinde bakteriyel büyümeyi inhibe etmede etkili olurken, en yüksek çoğalma düzeyi ($\geq 10^8$ pfu/mL) 1 MOI'de gözlemlenmiş ve bu seviye, diğer MOI gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu durum, 1 MOI'nin in vitro koşullarda en etkili enfeksiyon oranı olduğunu göstermektedir (Şekil 4a). Buna ilaveten, konak bakterilere ait fajların adsorpsiyon süreleri *E. coli*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* ve *P. aeruginosa* için sırasıyla 15, 18, 15 ve 20 dakika olarak belirlenmiş; bu süreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Buna karşın, *S. aureus* fajının latent periyodu 15 dakika ile en kısa süreyi gösterirken, bu süre *P. aeruginosa* fajında 25 dakikaya kadar uzamıştır. *E. coli* ve *S. Typhimurium* fajları için ise latent periyot sırasıyla 18 ve 20 dakika olarak belirlenmiş ve gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Benzer şekilde, lizis süresi *S. aureus* ve *S. Typhimurium* fajlarında 20 dakika iken, *E. coli* fajında 25 dakika ve *P. aeruginosa* fajında 30 dakika olarak belirlenmiştir; bu farklılık da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Patlama boyutu, *S. aureus* fajında yaklaşık 120 pfu/cfu ile en yüksek, *P. aeruginosa* fajında ise 68 pfu/cfu ile en düşük seviyede belirlenmiştir ($p < 0.05$). *E. coli* ve *S. Typhimurium* fajları için bu değerler sırasıyla 100 ve 85 pfu/cfu olarak saptanmıştır ($p > 0.05$) (Şekil 4b). Ayrıca, izole edilen fajların tamamı 3.0 - 9.0 gibi geniş bir pH aralığında ve 50°C'ye kadar olan sıcaklıklarda analiz edilen bütün zaman periyotlarında iyi stabilite gösterdi. Fakat 50°C'de *P. aeruginosa* ve *S. aureus* fajları 20. dakikadan sonra aşamalı olarak titrelerinde azalma sergilerken, *S. Typhimurium* ve *E. coli* fajının titresi ise 30. dakikadan sonra azaldı. 50 °C'ye kadar fajların titrelerinde ortalama 1.0 log

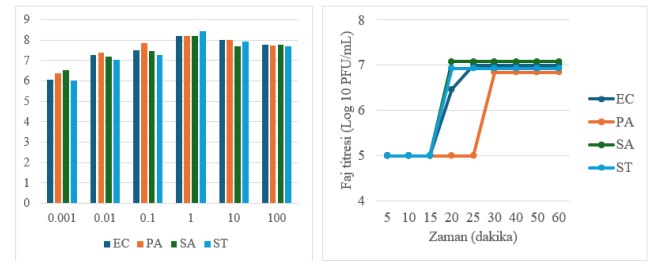
azalma belirlenirken, bu sıcaklıktan sonra ortalama 4.6 log azalma tespit edildi. Ayrıca 60 °C de hiçbir faj tespit edilmedi. Aynı şekilde, fajların titresi pH 4-7 aralığında önemli değişiklik göstermedi (ortalama 0.8 log). Bu pH değerlerinin altında ve üzerinde fajlarda titrenin 1.78-3.52 log arasında azalma saptandı. pH 10'da ise hiçbir faj tespit edilmedi. Ayrıca her bir fajın 4 °C'de altı ay boyunca saklanması süresince, spot test ile aylık yapılan kontrollerde aktivitesini koruduğu belirlendi. Yapılan spot testte, izole edilen fajların her biri yalnızca kendi hedef türüne ait, farklı kaynaklardan elde edilen izolatlar karşı litik etki göstermiş; diğer bakteri türlerine karşı herhangi bir plak oluşmamıştır. Litik aktivitenin bakteri türüne bağlı olarak farklılık göstermesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($p < 0.05$) ve bu durum, fajların tür düzeyinde yüksek özgüllüğe sahip olduğunu göstermektedir (Tablo 2).



Şekil 2. Çalışmada izole edilen fajlara ait plak görünüşleri. A–D: Spot testlerde faj aktivitesinin gözlemlendiği plaklar. A: *S. aureus* konak bakterisi üzerinde oluşan faj plaklarının çapı yaklaşık 10-15 mm'dir. B: *E. coli* konak bakterisi üzerinde oluşan plak çapları yaklaşık 8-12 mm'dir. C: *S. Typhimurium* konak bakterisi için üç farklı numuneye ait spotlarda gözlenen plakların çapı yaklaşık 10-12 mm'dir. D: *P. aeruginosa* konak bakterisi üzerinde gelişen plakların çapı yaklaşık 10-15 mm'dir. E–F: Çift tabaka agar yönteminde oluşan faj plaklarının genel görünümünü göstermektedir.



Şekil 3. Sultan ve Hürmetçi Sazlığından İzole Edilen Fajların Bakteriyel Konaklara Karşı Etkinliği. A: Spot Testte konak bakterilerine karşı faj aktivitesi, B: Çift tabaka agarda konak bakterilerine karşı faj aktivitesi



Şekil 4. İzole edilen fajların optimal MOI değerleri (A) ve Tek aşamalı büyüme eğrileri (B), EC: *E. coli* Faj, SA: *S. aureus* faj, ST: *S. Typhimurium* faj, PA: *P. Aeruginosa* fajı

Tablo 2. Fajların, farklı kaynaklardan izole edilen bakteri suşlarına karşı spot test yöntemiyle değerlendirilen litik etkinlik sonuçları

Test Bakterisi	İzolat sayısı	Kaynağı	Fajların test edilen izolatlara karşı litik aktivitesi			
			EC	SA	ST	PA
<i>E. coli</i>	5	Atık Su	1	0	0	0
<i>E. coli</i> O157:H7	5	Gıda	1	0	0	0
<i>E. coli</i>	10	Gıda	1	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	5	Atık Su	0	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	10	Gıda	0	0	0	0
<i>E. faecium</i>	10	Gıda	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	10	Gıda	0	1	0	0
MRSA	10	İnsan	0	1	0	0
<i>L. monocytogenes</i>	13	Gıda	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> spp	15	Gıda	0	0	1	0
<i>P. aeruginosa</i>	10	İnsan	0	0	0	1

EC: *E. coli* faj, SA: *S. aureus* faj, ST: *S. Typhimurium* faj, PA: *P. aeruginosa* faj. “1” plak oluşumu gözlenen izolatları (litik aktivite pozitif); “0”değeri ise plak oluşumu gözlenmeyen izolatları (litik aktivite negatif) temsil etmektedir. *L. monocytogenes* izolatlarında litik etki tespit edilmemiştir. Diğer türlerde, her faj izolatu sadece kendi konak türlerine özgü olup, bu türlerin tamamına karşı litik aktivite göstermiştir.

Tartışma ve sonuç

Bakteriyofajlar, mikrobiyal toplulukların yapısını şekillendirme ve mikrobiyal çeşitliliği etkileme kapasiteleriyle doğada önemli bir ekolojik role sahiptir (27). Özellikle antibiyotik direncinin küresel ölçekte hızla yayılması, bu virüsleri hem tedavi hem de biyokontrol ve tanı amaçlı alternatif biyolojik ajanlar olarak ön plana çıkarmaktadır (6,7). Bu çalışmada, sazlık sularından *E. coli*,

S. aureus, *S. Typhimurium* ve *P. aeruginosa* suşlarına karşı litik aktivite gösteren 24 faj izole edilmiştir. Benzer şekilde, literatürde de çeşitli çevresel kaynaklardan (nehir suyu, atık su ve kanalizasyon) patojenlere özgül bakteriyofajların izole edildiği bildirilmektedir (27-34). Daha önce yapılan bazı çalışmalarda, *L. monocytogenes*’e karşı litik etkili fajların özellikle atık su, kanalizasyon ve gıda kaynaklı örnekler gibi farklı çevresel kaynaklardan başarıyla izole edildiği

bildirilmiştir (35) Ancak bu çalışmada, sazlık suyu örneklerinden yapılan izolasyonlarda *L. monocytogenes*'e karşı faj elde edilememiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda bu bakterinin faj enfeksiyonuna karşı doğal direnç geliştirebildiği bildirilmektedir. Bu direnç, özellikle fajın konak hücreye bağlanmasını engelleyen yüzey reseptörlerinin kaybı veya yapısal değişimi, faj DNA'sının hücre içine girdikten sonra CRISPR-Cas sistemleri veya restriksiyon-modifikasyon sistemleriyle parçalanması, ya da abortif enfeksiyon (Abi) sistemleri gibi faj replikasyonunu baskılayan hücrel savunma mekanizmalarından kaynaklanabilmektedir (36-38). Ayrıca, *L. monocytogenes* suşları arasında faj duyarlılığında genetik çeşitliliğin yüksek olması, çevresel kaynaklardan izolasyon yapılırken faj-konak uyumunu olumsuz yönde etkileyebilir. Bu durum, çalışmada elde edilen su örneklerinin içerdiği suşların, izole edilmeye çalışılan fajlara karşı dirençli olmasıyla ilişkili olabilir. Dolayısıyla, *L. monocytogenes*'e özgü fajların elde edilememesi, yalnızca kaynakla sınırlı kalmayıp, bakteriyel fizyoloji, faj spesifikliği ve ekolojik etkileşimlerin birlikte değerlendirilmesini gerektirmektedir

Mevcut çalışmada izole edilen fajların konak özgülüğü açısından elde edilen veriler, bu fajların yalnızca hedef tür içerisindeki farklı suşlara karşı etkili olduğunu, farklı türlere karşı ise etkisiz kaldığını göstermektedir. Bu durum, izolatların tür düzeyinde yüksek özgülüğe sahip olduğunu ve hem terapötik uygulamalarda hem de biyokontrol stratejilerinde hedef odaklı kullanım için uygun adaylar olduklarını düşündürmektedir. Faj terapisinde, hedef bakteri türü içinde mümkün olduğunca çok sayıda suş enfekte edebilen ancak diğer türleri etkilemeyen fajlar tercih edilmekte; bu yaklaşım, hem enfeksiyonların daha isabetli tedavisine olanak tanımakta hem de konak mikrobiyotasının korunmasına katkı sağlamaktadır. Benzer şekilde, gıda güvenliği ve çevresel biyokontrol uygulamalarında da tür düzeyinde dar, fakat suş düzeyinde geniş konak aralığına sahip fajlar, istenmeyen bakterilerin seçici olarak elimine edilmesinde önemli avantajlar sunmaktadır (39,40).

Bakteriyofajların konak hücrelerle olan etkileşimlerinin anlaşılması, moleküler biyolojiye yönelik önemli bilgiler sunmakta ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı geliştirilecek tedavi yaklaşımlarının daha iyi kavranmasına katkı sağlamaktadır (41). Fajların başlangıç konsantrasyonu, adsorpsiyon süresi, latent periyodu, lizis süresi ve patlama boyutu; üretim süreçlerinin optimizasyonu ve uygulama stratejilerinin belirlenmesinde kritik öneme sahiptir (42,43). Bu çalışmada, izole edilen fajların konak bakterilerine adsorpsiyon süreleri arasında anlamlı fark gözlenmezken ($p>0.05$), *S. aureus* fajının latent periyodu 15 dakika ile en kısa süreyi göstermiş ve *P. aeruginosa* fajında bu süre 25 dakikaya kadar uzamıştır ($p<0.05$). Benzer şekilde, lizis süresi *S. aureus* ve *S. Typhimurium* fajlarında 20 dakika iken, *E. coli* fajında 25 dakika ve *P. aeruginosa* fajında 30 dakika

olarak belirlenmiştir ($p<0.05$). Patlama boyutu ise *S. aureus* fajında yaklaşık 120 pfu/cfu ile en yüksek değeri gösterirken, *P. aeruginosa* fajında 68 pfu/cfu ile en düşük seviyede kalmıştır ($p<0.05$). Bu farklılıklar, fajların konak hücredeki çoğalma verimliliğinin ve konak-faj etkileşimlerinin bakteriyel türler arasında önemli ölçüde değişebileceğini göstermektedir. Önceki çalışmalarda *E. coli* fajlarının latent periyotlarının 10–15 dakika, adsorpsiyon sürelerinin 20–80 dakika ve patlama boyutlarının 87–364 pfu/cfu arasında değiştiği bildirilmiştir (29, 31). Benzer şekilde, *S. aureus* fajları için latent süreler 10–25 dakika arasında, patlama boyutları ise 18–170 pfu/cfu aralığında rapor edilmiştir (20, 27). Bu çalışmada elde edilen veriler, genel olarak literatürde bildirilen aralıklarla uyumlu olmakla birlikte; latent periyot, lizis süresi ve patlama boyutu gibi temel biyolojik parametrelerde, özellikle konak bakteriye bağlı olarak bazı farklılıklar göstermiştir. Bu durum, fajların biyolojik karakteristiklerinin hem farklı bakteri türleri arasında hem de aynı türden izole edilen farklı fajlar arasında anlamlı düzeyde varyasyon gösterebildiğini düşündürmektedir. Bu biyolojik farklılıklar, fajların konak üzerindeki çoğalma stratejileri ve enfeksiyon verimliliği hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Özellikle kısa latent periyot ve yüksek patlama boyutu gösteren fajlar, hızlı replikasyon ve etkili lizis özellikleri sayesinde terapötik uygulamalarda daha avantajlı adaylar olarak değerlendirilmektedir (44).

Fajların terapötik potansiyelinin değerlendirilmesinde enfeksiyon çokluğu (MOI) değeri, hem antimikrobiyal etkinliğin sağlanması hem de dozaj optimizasyonu açısından kritik bir parametredir. Bununla birlikte, yüksek MOI uygulamaları, bakterilerde direnç gelişimini teşvik edebileceğinden bu risk göz önünde bulundurulmalıdır (20, 30, 31, 45). Çalışmamızda, fajların farklı MOI seviyelerinde (0.001–100) çoğalma düzeyleri karşılaştırıldığında, her dört faj için de 1 MOI seviyesinde anlamlı düzeyde daha yüksek log pfu/mL değerleri gözlenmiştir ($p<0.05$). Bu durum her bir bakteri hücresinin ortalama bir faj partikülü ile enfekte olduğunu göstermektedir. MOI'nin bu düzeyde tutulması, fajların kontrollü çoğalmasına olanak tanıyarak tedavi sürecinde hem etkinliği artırmakta hem de direnç gelişimini azaltma potansiyeli taşımaktadır (30, 45).

Fajların terapötik uygulamalarda ve biyokontrol amaçlı kullanımlarda etkili olabilmesi için, geniş pH ve sıcaklık aralıklarına karşı stabil olmaları ve çevresel stres faktörlerine (özellikle pH ve sıcaklık değişimleri) dayanıklı olmaları gerekmektedir (33,46). Çevresel faktörlere karşı gösterdikleri bu stabilite, fajların formülasyon güvenilirliğini artırırken, biyolojik etkinliğinin sürekliliğini de sağlar (43). Daha önce yapılan çalışmalarda, *E. coli* fajları için 5-9 pH ve 25-70°C, *S. aureus* fajları için 4-12 pH ve 40-60°C, *P. aeruginosa* fajları için ise 4-50°C aralığında stabilite bildirilmiştir (27,29,31,33,47). Benzer şekilde, bu çalışmada izole edilen fajlar, pH 3.0–9.0 aralığında ve 50 °C'ye kadar olan

sıcaklıklarda yüksek stabilite sergilemiştir. Ancak 60 °C ve üzeri sıcaklıklarda ve pH 4-7 dışındaki koşullarda etkinliklerinde belirgin azalmalar gözlemlenmiştir. Elde edilen faj izolatlarının pH ve sıcaklık stabilitesinin yüksek olması, biyokontrol ve terapötik amaçlı uygulamalarda kullanım potansiyellerini desteklemektedir. Bununla birlikte, bu çalışmanın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Elde edilen veriler laboratuvar ortamında in vitro koşullarda değerlendirilmiş olup, bu sonuçların in vivo sistemlerde ve gıda endüstrisine yönelik uygulamalarda geçerliliği henüz doğrulanmamıştır. Ayrıca, izole edilen fajların biyokontrol potansiyelinin gerçek saha koşullarındaki etkinliği ile uzun süreli stabilite özellikleri bu çalışma kapsamında incelenmemiştir. Dolayısıyla, fajların gıda ürünleri üzerinde pratik uygulanabilirliğinin belirlenebilmesi için ileriye dönük saha temelli çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada Sultan ve Hürmetçi sazlıklarından izole edilen litik bakteriyofajlar, hedef patojen bakterilere karşı yüksek özgüllük ve geniş litik spektrum sergilemiş; kısa latent periyotları ve yüksek patlama boyutları ile güçlü antibakteriyel etki göstermiştir. Çevresel koşullara karşı stabilite, uzun süreli etkinliklerini sürdürebilmelerine olanak tanımakta ve bu özellikleri, biyokontrol ile terapötik uygulamalarda kullanılmalarını desteklemektedir. Bununla birlikte, söz konusu fajların moleküler karakterizasyonlarının yapılması ve biyokontrol potansiyellerinin saha koşullarında veya belirli gıda model sistemlerinde (örneğin et ve süt ürünleri) test edilmesi, gelecekteki çalışmalar için önem arz etmektedir. Bu doğrultuda, özellikle kesimhane yüzeyleri, işleme ekipmanları ya da paketlenmiş et ürünleri gibi gerçek gıda üretim ortamlarında gerçekleştirilecek uygulamalı denemeler, bu fajların pratik kullanım potansiyelini değerlendirmek açısından kritik öneme sahiptir.

Kaynaklar

- Chavan R, Purandare K. Bacteriophage therapy inspired new age technologies to control antimicrobial resistance. *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences* 2025; 1-22.
- O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016.
- Asokan GV, Ramadhan T, Ahmed E, Sanad H. WHO global priority pathogens list: a bibliometric analysis of Medline-PubMed for knowledge mobilization to infection prevention and control practices in Bahrain. *Oman medical journal* 2019; 34(3):184.
- Egido JE, Costa AR, Aparicio-Maldonado C, Haas PJ, Brouns S.J. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS microbiology reviews* 2022; 46(1):fuab048.
- Jaglan AB, Anand T, Verma R, Vashisth M, Virmani N et al. Tracking the phage trends: a comprehensive review of applications in therapy and food production. *Frontiers in Microbiology* 2022; 13: 993990.
- Alomari MMM, Dec M, Urban-Chmiel R. Bacteriophages as an alternative method for control of zoonotic and foodborne pathogens. *Viruses* 2021; 13(12): 2348.
- Abril AG, Carrera M, Notario V, Sánchez-Pérez Á, Villa TG. The use of bacteriophages in biotechnology and recent insights into proteomics. *Antibiotics* 2022; 11(5): 653.
- Ling H, Lou X, Luo Q, He Z, Sun M et al. Recent advances in bacteriophage-based therapeutics: Insight into the post-antibiotic era. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2022; 12(12): 4348-4364.
- Jia HJ, Jia PP, Yin S, Bu LK, Yang G et al. Engineering bacteriophages for enhanced host range and efficacy: insights from bacteriophage-bacteria interactions. *Frontiers in microbiology* 2023; 14: 1172635.
- Hitchcock NM, Devesqui Gomes Nunes D, Shlach J, Valeria Saraiva Hodel K, Dantas Viana Barbosa J et al. Current clinical landscape and global potential of bacteriophage therapy. *Viruses* 2023; 15(4): 1020.
- Ge H, Fu S, Guo H, Hu M, Xu Z et al. Application and challenge of bacteriophage in the food protection. *International Journal of Food Microbiology* 2022; 380: 109872.
- Abebe E, Gugsu G, Ahmed M. Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. *Journal of tropical medicine* 2020; (1): 4674235.
- Oraç A. Tarihçe Ve Gıda Mikrobiyolojisinin Gelişimi. *Gıda Mikrobiyolojisi* 2024: 1
- Nair A, Ghugare GS, Khairnar K. An appraisal of bacteriophage isolation techniques from environment. *Microbial ecology* 2022; 1-17.
- Suttle CA. Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nature reviews microbiology* 2007; 5(10): 801-812.
- Puxty RJ, Millard AD. Functional ecology of bacteriophages in the environment. *Current Opinion in Microbiology* 2023; 71: 102245.
- Brown TL, Charity OJ, Adriaenssens EM. Ecological and functional roles of bacteriophages in contrasting environments: marine, terrestrial and human gut. *Current Opinion in Microbiology* 2022; 70: 102229.
- Şimşek T, Aykar S. Kayseri Hürmetçi Sazlığı'nın Mevcut Durumu Ve Turizme Konu Olma Yeterliliği. *Enderun* 2022; 6(2): 181-201.
- Sönmez ME, Somuncu M. Sultansazlığı'nın alansal değişiminin sürdürülebilirlik açısından değerlendirilmesi. *Türk Coğrafya Dergisi* 2016; (66): 1-10.
- Gungor C, Onmaz NE, Gundog DA, Yavas GT, Koskeroglu K et al. Four novel bacteriophages from slaughterhouse: Their potency on control of biofilm-forming MDR *S. aureus* in beef model. *Food Control* 2024; 156: 110146.
- Çufaoğlu G, Derinöz AN, Ayaz ND. An investigation on biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7 by a bacteriophage cocktail in pastirma. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2019; 66: 7-11.
- Stipnice L, Rezevska D, Kroica J, Racenis K. Effect of the Biopolymer Carrier on *Staphylococcus aureus* Bacteriophage Lytic Activity. *Biomolecules* 2022; 12(12): 1875.
- Khalatbari-Limaki S, Hosseinzadeh S, Shekarforoush SS, Berizi E. The morphological and biological characteristics of a virulent PI phage isolated from slaughterhouse sewage in Shiraz, Iran. *Iranian Journal of Microbiology* 2020; 12(6): 616.
- Tan CW, Rukayadi Y, Hasan H, Abdul-Mutalib NA, Jambari NN, et al. Isolation and Characterization of Six Vibrio parahaemolyticus Lytic Bacteriophages from Seafood Samples. *Frontiers in Microbiology* 2021; 12: 616548.

25. Abdelsattar AS, Safwat A, Nofal R, Elsayed A, Makky S et al. Isolation and characterization of bacteriophage ZCSE6 against *Salmonella* spp.: phage application in milk. *Biologics* 2021; 1(2):164-176.
26. Chen Y, Li X, Song J, Yang D, Liu W et al. Isolation and characterization of a novel temperate bacteriophage from gut-associated *Escherichia* within black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.[Diptera: Stratiomyidae]). *Archives of Virology* 2019; 164: 2277-2284.
27. Wang J, Zhao F, Sun H, Wang Q, Zhang C et al. Isolation and characterization of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB_SauS_SA2. *AIMS microbiology* 2019; 5(3): 285.
28. Yildirim Z, Sakin T, Çoban F. Isolation of lytic bacteriophages infecting *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis. *Acta Biologica Hungarica* 2018; 69(3): 350-369.
29. Litt PK, Jaroni D. Isolation and Physiomorphological Characterization of *Escherichia coli* O157: H7-Infecting Bacteriophages Recovered from Beef Cattle Operations. *International journal of microbiology* 2017; 2017(1): 7013236.
30. Huang C, Shi J, Ma W, Li Z, Wang J et al.). Isolation, characterization, and application of a novel specific *Salmonella* bacteriophage in different food matrices. *Food research international* 2018; 111: 631-641
31. Sada TS, Tessema TS. Isolation and characterization of lytic bacteriophages from various sources in Addis Ababa against antimicrobial-resistant diarrheagenic *Escherichia coli* strains and evaluation of their therapeutic potential. *BMC Infectious Diseases* 2024; 24(1): 310.
32. Jiang YH, Liu JQ, Zhao CY, Yu S, Sun Y et al. Isolation and genome sequencing of a novel *Pseudomonas aeruginosa* phage PA-YS35. *Current Microbiology* 2020; 77: 123-128.
33. Akreimi I, Merabishvili M, Jlidi M, Haj Brahim A, Ben Ali M et al. Isolation and characterization of lytic *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages isolated from sewage samples from Tunisia. *Viruses* 2022; 14(11): 2339.
34. Alonso MDC, Rodríguez J, Borrego JJ. Characterization of marine bacteriophages isolated from the Alboran Sea (Western Mediterranean). *Journal of plankton research* 2022; 24(10): 1079-1087.
35. Cufaoglu G, Ayaz ND. *Listeria monocytogenes* risk associated with chicken at slaughter and biocontrol with three new bacteriophages. *Journal of Food Safety* 2019; 39(3): e12621.
36. Kim JW, Siletsky RM, Kathariou S. Host ranges of *Listeria*-specific bacteriophages from the turkey processing plant environment in the United States. *Applied and Environmental Microbiology* 2008; 74(21): 6623-6630.
37. Brown P, Chen Y, Parsons C, Brown E, Loessner MJ et al. Whole genome sequence analysis of phage-resistant *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a strains from turkey processing plants. *Pathogens* 2021; 10(2): 199.
38. Byun KH, Han SH, Choi MW, Park SH, Ha SD. Isolation, characterization, and application of bacteriophages to reduce and inhibit *Listeria monocytogenes* in celery and enoki mushroom. *Food Control* 2022; 135: 108826.
39. Hyman P. Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth. *Pharmaceuticals* 2019; 12(1): 35.
40. de Jonge PA, Nobrega FL, Brouns SJ, Dutilh BE. Molecular and evolutionary determinants of bacteriophage host range. *Trends in microbiology* 2019; 27(1): 51-63.
41. Bolger-Munro M, Cheung K, Fang A, Wang L. T4 bacteriophage average burst size varies with *Escherichia coli* B23 cell culture age. *J Exp Microbiol Immunol* 2013; 17: 115-119.
42. Nabergoj D, Modic P, Podgornik A. Effect of bacterial growth rate on bacteriophage population growth rate. *MicrobiologyOpen* 2018; 7(2): e00558.
43. Pradeep AN, Ramasamy S, Veniemilda JK, Kumar CV. Effect of pH & temperature variations on phage stability-a crucial prerequisite for successful phage therapy. *Int. J. Pharm. Sci. Res* 2022; 13: 5178-5182.
44. Nilsson AS. Phage therapy—constraints and possibilities. *Upsala journal of medical sciences* 2014; 119(2): 192-198.
45. Benala M, Vaiyapuri M, Visnuvinayagam S, George JC, Raveendran K et al. A revisited two-step microtiter plate assay: Optimization of in vitro multiplicity of infection (MOI) for Coliphage and Vibriophage. *Journal of Virological Methods* 2021; 294: 114177.
46. Fernández L, Gutiérrez D, García P, Rodríguez A. The perfect bacteriophage for therapeutic applications—a quick guide. *Antibiotics* 2019; 8(3): 126.
47. Mohammed-Ali MN, Jamalludeen NM. Isolation and characterization of bacteriophage against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microb Diagn* 2015; 5(213): 2161-0703.