

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

FİKİR KATEGORİSİ

TAKIM ADI

BİYOFAJ

PROJE ADI

Listeria monocytogenes'in Suşlarına Karşı Bakteriyofaj Geliştirilmesi

BAŞVURU ID

322136

KATEGORİ

Fikir Kategorisi

İçindekiler

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Gıda güvenliğinin sağlanması için gıdalarda patojen bakterilere karşı bakteriyofajlar kullanılmaktadır. *Listeria monocytogenes* ise gıda kaynaklı bir patojen olup yüksek tuzluluk, asitlik ve soğutma sıcaklıkları gibi muhafaza koşullarında yaşama ve çoğalma özelliğine sahip olduğundan gıda endüstrisinde ciddi bir endişe kaynağıdır.

Proje, *Listeria monocytogenes*'in suşlarını enfekte eden yerel bakteriyofajları saptayıp izole etmek, bakteriyofajların *Listeria monocytogenes*'e karşı konak özgüllüğü ile litik aktivitesini değerlendirmek ve izole edilen bakteriyofajları genetik olarak karakterize etmektir. *Listeria monocytogenes* suşlarına karşılık seçeceğimiz bakteriyofajlar litik aktivite gösterenleri olacaktır. Yerel olarak izole edilen bakteriyofajların genetik olarak güçlü hale getirilmesi ile sütte listeria monocytogenes etkinliğinin azaltılması sağlanacaktır.

Amacımız:

- *Listeria monocytogenes* suşlarını enfekte eden bakteriyofajları izole etmek ve saptamak
- Bakteriyofajların konak özgüllüğünü saptamak
- Bakteriyofajların litik aktivitelerini araştırmak
- Bakteriyofajları moleküler düzeyde tanımlamak
- *Listeria monocytogenes* suşlarını enfekte edecek bakteriyofajları üretmektir.

2. Problem/Sorun:

Gıda zincirine zararlı mikroorganizmaların girişinin engellenmesi ve salgınların önlenmesi için işlem ve hasat öncesinde zararlı bakterilerin elimine edilmesi önemli bir rol oynar. Her yıl milyonlarca insanın zararlı bakteri (patojen) bulaşmış gıdaları tüketmesi nedeniyle hastalanmadan ölüme kadar giden vakalar meydana gelmektedir. Hasat, kesim, sağım, işleme, paketleme, depolama gibi aşamalarda gıdalara bulaşan *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* gibi zararlı bakterilerin neden oldukları gıda kaynaklı enfeksiyonlar, halk sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır.

Listeria monocytogenes çubuk şeklinde gram pozitif, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve fakültatif anaerobik bakterilerdir. Çevrede doğal olarak bulunmakta olup toprak, su, kanalizasyon, silaj, bitki ve hayvanlar gibi yerlerde bulunur. Bu organizma 1 ile 45 °C arasında değişen sıcaklıklarda büyür, ayrıca %10'a kadar tuz konsantrasyonlarını ve 3,6–9,5 pH'ı tolere eder. *Listeria monocytogenes*, listeriosis adlı bir hastalığa neden olan fırsatçı insan için zararlı bakteridir. Listeriosis hem hayvanlarda hem de insanlarda görülmektedir. İnsan da bağırsak epitelini, kan-beyin bariyerini ve hamilelerde plasentayı geçebilme özelliğindedir. Menejit, hamilelerde düşük, öldürücü septisemi, endokarditis en sık görülen sağlık sorunlarındanır.

İnsan ve hayvan türleri için patojen mikroorganizmalar arasında son dönemlerde üzerinde en çok araştırma yapılanlardan bir tanesi de *Listeria monocytogenes*'dir. *Listeria* türleri çevreye geniş ölçüde yayılabilen, buzdolabı sıcaklığında gelişebilen, soğutma, dondurma, ısıtma ve kurutma işlemleri gibi olumsuz koşullar altında bile canlılığını koruyabilen halk sağlığı açısından önemli bir

zararlı bakteridir. Bu bakteriler gıdalara doğrudan kontamine olabildiği gibi, enfekte materyal veya kişiler tarafından gıdaların işlenmesi, muhafazası, paketlenmesi, satışı ve tüketimine kadar geçen süre içinde sekonder(ikincil) olarak da kontamine olabilmektedir.

Gıdalarda *L. monocytogenes*'in belirlenmesinde sıfır tolerans politikası geçerli olup sayım yerine doğrudan 25 g örnekte var/yok testi uygulanmaktadır. Bu doğrultuda Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu tarafından ele alınan *L. monocytogenes* kriterleri esas olarak tüketime hazır gıdaları kapsamaktadır ve ilgili koşulları aşağıdaki gibidir;

1. Bebekler ve özel tıbbi amaçlara yönelik tüketime hazır gıdaların 25 g'ında *L. Monocytogenes* bulunmamalıdır.
2. Piyasadaki diğer tüketime hazır gıdaların raf ömrü süresince 100 kob/g düzeyinden daha fazla *L. monocytogenes* bulunmamalıdır.
3. Üretim alanında bırakıldığında bakteri gelişmesine uygun ürünlerin 25 g'ı *L. monocytogenes* içermemelidir.

Yapılan literatür araştırmalarında süt işleme alanlarından alınan örneklerin %12.6'sında *Listeria* türlerini izole etmişler ve bunların yarısı *L. monocytogenes* olarak tanımlamışlardır. Çiğ süt, önemli bir *L. monocytogenes* kaynağı olarak bilinmektedir ve bu doğrultuda ABD'de yapılan çalışmalarda incelenen 100 kadar çiğ süt örneğinin %12'sinden *Listeria monocytogenes* izole etmişlerdir.

Listeriozise neden olan vakalar her zaman görülmekle birlikte, 1980 yıllarından başlayarak özellikle Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinde *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş süt, yumuşak peynir, lahana salatası, az pişmiş tavuk, sosis, çiğ et ürünleri, balık ve kabuklu deniz ürünleri gibi gıdaların toplu tüketimleri sonucu büyük epidemiler ortaya çıkmış ve % 30'lara varan ölümler görülmüştür.

Türkiye' de epidemiler şeklinde bilinen insan listeriozları görülmemiştir. Buna karşılık yapılan araştırmalar çiğ süt ve tüketime hazır gıdalarda *L. monocytogenes*'in bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. Anadolu'nun değişik yörelerindeki çiğ sütlerin % 18.2'inde *L. monocytogenes* varlığı belirlenmiştir.

3. Çözüm

Doğada en fazla bulunan biyolojik topluluklardan birini temsil eden bakteriyofajlar, kendilerine özgü hedef bakteriyi öldürebilen bakteri virüsleri olarak tanımlanmaktadır. Bakterileri enfekte etmelerine rağmen insanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde zararlı etkileri bulunmamaktadır. Bakteriyofajlar basit genetik ve morfolojik yapıları ile moleküler biyoloji çalışmalarında kolayca manipüle edilebilir olduklarından rekombinant DNA teknolojisi, biyoteknoloji ile enfeksiyon hastalıklarında tedavide amaçlı kullanılmaktadır. Fajlar çoklu antibiyotik direncine sahip bakterilere karşı antibiyotikler yerine alternatif tedavi ajanı (faj terapi) olarak kullanılmaları yanında tarım ve petrol endüstrisinde de biyokontrol ajanı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, fajlar patojen bakterilerin tiplendirilmesinde (faj tiplendirme), DNA ve protein aşılı için taşıyıcı vektör olarak ve birçok protein ve antikorun üretiminde (phage display = faj sunumu) kullanılmaktadır. Bu nedenle yeni fajların izolasyonu ve karakterizasyonu büyük önem arz etmektedir.

Günümüzde antibiyotikler bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yaygın tedavi seçeneklerindedir ve enfeksiyon etkeni fırsatçı patojenlere karşı hala potansiyel tedavi yöntemi olduğu, bilinçsiz ve

sıklıkla kullanım sonucu önlenemez bir hızla antibiyotik direncinin arttığı hakkında raporlar yayınlanmaktadır. Gelişen antibiyotik dirençliliği, özellikle de çoklu dirençlilik, yeni antibiyotiklerin devreye girmesini zorunlu hale getirmiştir. Ancak antibiyotik araştırmaları ve keşif hızı son yıllarda çok yavaşlamış olup, günümüzde araştırma aşamasında birkaç yeni antibiyotik bulunmaktadır. Bu durum Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO; World Health Organization) tarafından da dile getirildiği gibi, antibiyotikler dışında yeni tedavi stratejileri geliştirmeyi ve kullanmayı zorunlu hale getirmiştir. Bu soruna karşı, bakteri türlerine özgü olan ve bakterileri yok eden bakteriyofajlar, önemli bir cevap olarak karşımıza çıkmaktadır. Bakteriyofaj terapisi, en basit ifadeyle infeksiyondan sorumlu bakteriye karşı tedavi amaçlı fajın uygulanmasıdır. Antibiyotiklerle karşılaştırıldığında fajlar, oldukça spesifik konak özelliğine sahip olmaları sebebiyle, hedef olmayan bakterilere ve vücut dokularına karşı çok az etkinlik gösterirler. Ek olarak, faj preparatlarının üretim maliyetleri oldukça düşüktür ve antibiyotik hedeflerinden bağımsız olarak hızlı bakterisid etki gösterirler.

Fajlar, litik ve lizojenik siklus olmak üzere iki tür yaşam döngüsüne sahiptir. Litik (virulent) fajlar; sayılarının gittikçe artması (otodozajlama), normal florada minimal bozulma, düşük toksisite, antibiyotiklerle çapraz direnç oluşturmama, hızlı iyileşme sağlama gibi bir dizi doğal özellikleri nedeni ile potansiyel antibakteriyeldirler. bakteriyofajın biyokontrol ya da tedavi amaçlı kullanılabilmesi için “litik faj” karakteri göstermesi gereklidir. Bakteriyofajlar, doğal mikrofloraya zarar vermeden ve fermente ürünlerdeki kültürleri etkilemeksizin direkt olarak türe özgü olarak uygulanabilmektedir.

Bakteriyofajlar gıda üretiminde bakteri üretiminin kısıtlanmasını sağlamakta bu nedenle fajlar bakterilerin biyokontrolünde kullanılmaktadırlar. Gıdalarda zararlı bakterilerin yok edilmesinde fajlar genel olarak “çiftlikten sofraya” kadar tüm gıda zinciri aşamalarında uygulanabilmektedir. Bakteriyofajların kullanımlarına baktığımızda canlı hayvanda kolonizasyon ve hastalığın önlenmesi, karkas, taze meyve ve sebze gibi ham ürünlerin dekontaminasyonu(arındırılma), ekipman ve temas yüzeylerinin dezenfeksiyonu, kolay bozulabilir ürünlerde doğal koruyucu olarak kullanım ile raf ömrünün uzatılmasıdır.

Güvenli gıda ürünleri sağlamak ve yasal gerekliliklere uygunluk gıda üreticileri için hala büyük bir zorluk olduğundan, gıda ürünlerinden *Listeria* suşlarının ortadan kaldırılması için yeni yöntemler gerekmektedir. Bunun için *Listeria* suşlarını hedefleyerek ortadan kaldıracak yeni kontrol ajanları olarak bakteriyofajları kullanmak gerekmektedir.

4. Yöntem

Listeria monocytogenes suşları Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Bakterioloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Bölüm’ünden temin edilecektir. Temin edilen *Listeria monocytogenes* suşları *Listeria* Enrichment Broth besi yerine ekilerek 24 saat süre ile 37 derecede inkübe edilecektir.

Niğde ve çevre illerde bulunan 3 farklı süt işletmesinden 50 adet atık su örneği alınacaktır. Toplam 150 adet örnek kullanılacaktır.

Bakteriyofaj izolasyonu: Alınacak örnekler öncelikle 10.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilip partiküller uzaklaştırılarak, süpernatant kısmı 0.22 um(mikrometre) membran filtrasyonundan geçirilecektir. Elde edilecek filtrat bakteriyofaj saflaştırılmasında kullanılacaktır.

Elde edilen filtratlarda faj varlığı saptamak için zenginleştirme yapılacaktır. Filtratlar, *Listeria monocytogenes* suşları ile LB(Lurian Bertani) besiyeri içerisinde inkübe edilecek ve bakterilerin liziz olması beklenecektir. Daha sonra kültürler 7000 rpm'de 20 dakika santrüfjü edilip süpernatantlar 4°C'de muhafaza edilecektir. Faj varlığı spot test ve çift tabaka varlığı ile belirlenecektir.

- **Spot Test ve Çift Tabaka Agar Yöntemi:**

Bakteriyofaj varlığının tespitinde yararlanılan spot yönteminde, aktif olarak geliştirilen test bakteri kültürlerinden 300 µl alınarak 45-50°C'deki LB yumuşak agara (%0,7 agar) ilave edilip karıştırıldıktan sonra bu karışım, katılaşmış LB içeren petriler üzerine yayılacaktır. Yumuşak agar katılaştıktan sonra (30 dakika sonra) zenginleştirme yapılmış su örneğinden 20 µl nokta şeklinde konulacak ve kuruması için yaklaşık 30 dakika bekletildikten sonra petriler ters çevrilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılacaktır. İnkübasyon işlemini takiben berrak zon oluşup oluşmadığı belirlenecektir.

Faj varlığı tespit edilen örneklerin faj titrelerinin belirlenmesinde de çift tabaka agar plak metodu kullanılacaktır. Bunun için faj süspansiyon örneklerinden seri dilüsyon hazırlanacaktır. Dilüsyonlardan alınacak 100 µl'lik faj örneği ile 100 µl konakçı hücre örneği 45-50°C'deki LB yumuşak agara ilave edilip karıştırıldıktan sonra, katılaşmış LB agar içeren petriler üzerine yayılacaktır. 37°C'de 24-48 saat inkübasyon işleminden sonra plak sayımı yapılacak ve faj titresi plak oluşturma birimi (pob/mL) şeklinde ifade edilecektir.

Bakteriyofaj saflaştırılması: Faj varlığı saptanan faj süspansiyonlarını saflaştırmak için tek plak izolasyon yöntemi kullanılacaktır. Besiyerine tek düşen plaklardan herhangi biri, steril cam Pastör pipet ile alınıp LB besiyeri içerisine konulacak ve 2 saat çalkalamalı inkübatörde 37°C'de inkübe edilecektir. İnkübasyonu takiben bu çözelti, kloroform ekstraksiyonu (50 µl/ml) ve santrifjü işlemine (4°C ve 8000 × rpm'de 20 dakika) tabi tutulacaktır. Elde edilen süpernatant, steril bir tüpe aktarılacak ve ardından seri dilüsyonlar hazırlanıp çift tabaka agar yöntemi ile ekim yapılacaktır. Konakçı hücreyi yeniden enfekte etme ve plak saflaştırma işlemi en az üç kez tekrar edilecektir.

- **Konak Hücreye Karşı Bakteriyofajların Litik Aktivitelerinin Belirlenmesi:**

Listeria monocytogenes suşları'nın faj varlığında gelişiminin belirlenmesi amacıyla bir gece önce geliştirilen konakçı hücre, %0,1 oranında 10 mM CaCl₂ içeren taze LB besiyerine (600 mL) inoküle edilip 4, 25 ve 37°C'de çalkalamalı (120 rpm) inkübatörde inkübe edilecektir. İnkübasyon işleminin 3'üncü saatinde kültür, eşit kısımlara (100'er mL) steril koşullarda bölünerek, 108 -109 pob/mL düzeyinde enfeksiyon etmeni fajlar ile tek tek ve kombine olarak inoküle edildikten sonra aynı inkübasyon koşullarında inkübe edilecektir. İnkübasyon işlemi süresince (8 saat) belirli aralıklarla örnek alınarak spektrofotometrede 600 nm'de okuma yapılacaktır. Pozitif kontrol örneği olarak sadece *Listeria monocytogenes* suşlarını içeren LB besiyerleri, negatif kontrol örneği olarak da LB besiyeri kullanılacaktır.

- **Bakteriyofajın Dinamiklerinin Değerlendirilmesi:**

Fajların etki ettiği konakçı aralığının belirlenmesi: İzole edilen fajların etki ettiği konakçı

spektrumunu belirlemek için izolasyon aşamasında kullanılan *Listeria monocytogenes* suşları kullanılacaktır. Konak hücre aralığının belirlenmesi için aktif gelişen bakteri kültürlerinden (OD600=0,3) 0,3 mL alınıp 45-50°C'deki LB yumuşak agar içerisine ilave edilerek karıştırıldıktan sonra daha önce LB agar (%1,5) konulmuş petrilere dökülecektir. Yumuşak agar katılaştıktan sonra (yaklaşık 30 dakika) üzerine faj örneklerinden 10 µL nokta halinde konulacaktır. İnkübasyon işleminden (37°C'de 24 saat) sonra petrilere berrak zon oluşup oluşmadığı incelenecektir. Bu aşamada sadece izole edilip saflaştırılan bakteriyofaj örnekleri, *Listeria monocytogenes* suşlarına karşı test edilmiş olacaktır. Konak hücre aralığının belirlenmesi sonucunda inhibitör spektrumu geniş ve litik aktivitesi kuvvetli olan faj/lar seçilecek ve çalışmanın bundan sonraki aşamalarında bu faj /lar kullanılacaktır.

İnfeksiyon çokluğu değerinin belirlenmesi: İnfeksiyon çokluğu değerinin (MOI) belirlenmesi için aktif gelişen konakçı hücre yaklaşık 108 kob/mL seviyesinde steril ependorf tüplere konulacak ve bu tüplere bakteriyofaj stok solüsyonundan hazırlanan dilüsyonlar ilave edilerek karıştırılacaktır. Adsorpsiyon için 15 dakika bekletildikten sonra santrifüj (5000 × rpm'de 10 dakika) edilecek ve serbest bakteriyofaj içeren süpernatantlar uzaklaştırılacaktır. Tüplerde kalan pelet, LB besiyeri ile süspanse edilerek 37°C'de 4 saat inkübasyon işlemine tabi tutulacaktır. Bu sürenin sonunda bakteriyofaj titresi, çift tabaka agar plak yöntemi ile belirlenecektir. Faj örneklerinin MOI değeri aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplanacaktır.

$$\text{MOI Değeri} = \frac{\text{(Başlangıç faj titresi-Adsorpsiyon sonrası faj titresi)}}{\text{Bakteri Sayısı}}$$

Bakteriyofajların Tek Aşamalı Gelişim Kurvelerinin Belirlenmesi (Faj Patlama Büyüklüğü):

Bakteriyofajların tek aşamalı gelişim kurvelerinin belirlenmesi için aktif olarak LB besiyerinde geliştirilmiş (OD600=0,4-0,5) bakteri konakçı hücrelerinden 50 mL alınıp santrifüj (6000 × g'de 15 dakika) edilecektir. Santrifüj sonrası elde edilen pelete, 0,5 mL taze LB besiyeri ilave edilecek daha sonra 0,5 mL faj solüsyonuyla (yaklaşık 108 kob/mL) karıştırılacaktır. Fajın konakçı hücreye adsorpsiyonunu sağlamak amacıyla 15 dakika bekletilip devamında 8000 × rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi yapılacaktır. Serbest fajlar uzaklaştırılıp kalan pelet kısmı, 100 mL taze LB besiyeri içinde süspanse edilecek ve 37°C'de inkübasyon işlemine tabi tutulacaktır. İnkübasyon süresi boyunca 5 dakika aralıklarla örnek alınıp çift tabaka agar plak yöntemi ile faj titresi tespit edilecektir. Fajların patlama büyüklüklerinin hesaplanmasında aşağıda verilen eşitlik kullanılacaktır.

$$\text{Patlama büyüklüğü} = \frac{\text{En yüksek faj titresi } \left(\frac{\text{pfu}}{\text{mL}}\right)}{\text{Latent dönemdeki faj titresi } \left(\frac{\text{pfu}}{\text{mL}}\right)}$$

Fajların konakçı hücreye adsorpsiyon oranının belirlenmesi: Fajların konakçı hücreye adsorpsiyon oranları, aktif olarak gelişen *Listeria monocytogenes* suşları'na MOI değeri 0,0005 olacak şekilde faj ilave edilerek belirlenecektir. Fajların konakçı hücreye adsorpsiyonu üzerine iki değerlikli iyonların etkisini belirlemek için de ayrı bir tüpte konakçı-faj karışımına 10 mM CaCl₂ ilave edilecek ve 37°C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyon işlemine tabi tutulacaktır. İnkübasyon işleminin 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60'ncü dakikalarında örnek (150 µL) alınıp, 1:10 oranında SM tamponu ve kloroform (50 µL/mL) ile karıştırılıp santrifüj (7000 × rpm'de 10 dakika) edilecektir. Süpernatant yeni bir tüpe aktarılıp adsorbe olmayan bakteriyofaj sayısı, çift tabakalı agar plak metodu ile belirlenecektir. Faj adsorpsiyon oranı, inkübasyon işlemi süresince plak oluşum biriminde meydana gelen azalmanın oranı olarak belirlenecektir. Faj adsorpsiyon oranı aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplanacaktır.

$$\% \text{ Adsorpsiyon} = \frac{\text{Başlangıç faj titresi} - \text{Adsorbsiyon sonrası faj titresi} * 100}{\text{Başlangıç faj titresi}}$$

- **Bakteriofajın Moleküler Ve Morfolojik Özelliklerinin Saptanması**

Bakteriofajın moleküler incelemesi yapılması: Bakteriofaj DNA'larını izole etmek için NORGEN faj DNA izolasyon kiti kullanılacaktır. Elde edilen faj DNA'sının miktarı spektrometrik olarak ölçülerek, kalitesi değerlendirildi ve büyüklüğü tespit edildi.

Bakteriofajların elektron mikroskopuyla incelenmesi: Faj örnekleri, karbon kaplı bakır grid üzerine damlatılıp kurutulacaktır. Sonra, %2 uranil asetat (pH 4) ile negatif olarak boyanacaktır. Boya kuruduktan sonra örnekler, geçirimsiz (transmisyon) elektron mikroskopunda (TEM) 100 kV'ta incelenecektir.

- **Fajların Biyokoruyucu Olarak Sütte Kullanım Olanaklarının Belirlenmesi**

Sütte inhibisyon testi: Fajın litik yeteneği, sütte *Listeria monocytogenes* suşları ile incelenecektir. Süt 1.5 ml ependorf tüpünde gece boyu *Listeria monocytogenes* suşları ile aşılacak şekilde kültürlenecektir. Tüplere 10 ve 100 MOI değerlerinde seyreltilmiş faj ilave edilecektir. Negatif kontrol olarak LB besiyeri ile hazırlanmış kültür kullanılacaktır. Süspansiyonlar 30 derecede 20 saat inkübe edilecektir. *Listeria monocytogenes* suşları sayısının 8 saatlik inkübasyondan sonra 4 saatlik aralıklarla LB üzerine ekilerek plaka kültürü yöntemi kullanılarak sayılacaktır.

İstatistiksel analiz: Fajların etkinliği, 24 saat sonunda, faj uygulaması yapılmayan süt örneğinde canlı *Listeria monocytogenes* suşlarının sayısının, bakteriofaj ile muamele edilmiş canlı *Listeria monocytogenes* suşlarının sayısı ile karşılaştırılarak değerlendirilecektir. İstatistiksel değerlendirilme, SPSS (version 11.0; SPSS, Chicago, IL, USA) paket programı ile varyans analizi (ANOVA) kullanılarak gerçekleştirilecektir.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Gıda ürünlerinde ve gıda işleme ortamlarında *Listeria monocytogenes*'i hedef alan ticari olarak temin edilebilen iki faj bazlı ürün bulunmaktadır. Bunlardan ilki ListShield, Intralytix Inc(Baltimore, MD, ABD) ikincisi ise PhageGuard Listex Micros Food Safety(Wageningen, Hollanda) tarafından üretilir. ListShield altı farklı litik fajdan oluşan bir kokteyildir, PhageGuard Listex ise geniş bir P100 fajından oluşur. Kullanılan ticari ürünler su bazlı faj süspansiyonudur.

Bu iki ticari faj yaygın olarak kullanılıp güvenli bulunsada *Listeria monocytogenes*'in tüm suşları için etkili değildir. Ayrıca yapılan çalışmalarda işlenmemiş gıdalar(çiğ et, pastörize olmamış süt gibi) ve ileri işlemlerde işlenen gıdalarda(peynir, fermente et gibi) *Listeria monocytogenes*'in tamamen yok olmadığını sadece belirli bir düzeyin altına indirildiğini ve stabil kaldığını

göstermiştir. Bu su bazlı faj süspansiyonları *Listeria monocytogenes*'i tamamen yok etme konusunda zayıf kalmıştır.

Yenilikçi yönümüz;

- *Listeria monocytogenes* suşlarını enfekte edecek bakteriyofaj saptamak.
- Fajların, konak özgülüğü ve *Listeria monocytogenes*'e litik aktivite gösterenleri saptamak.
- Faj enfeksiyonu konakçı ölümüyle sonuçlandırılanması ve kesinlikle lizogenik dönüşümüyle sonuçlanmaması için "katı virülans" gerçekleştirilecektir.
- Fajları genetik düzeyde tanımlayarak daha güçlü ve etkili olanlarını seçmek.
- Tasarlanacak fajın hedeflenen dışında mikroflorayı etkilememesini sağlamak.
- Üretim için gerekli bakterilerle (LAB bakterileri gibi) etkileşime girmemesini sağlamak.
- Faj tamamen doğal bir ürün olacaktır ve hazırlanması sırasında hayvansal kaynaklı ortam ve bileşenler kullanılmayacaktır. Ayrıca koruyucu veya bilinen, potansiyel olarak alerjen maddeler (buğday, süt, soya vb.) içermeyecektir.
- Faj ile mümkün olduğunca çok sayıda *Listeria monocytogenes* suşu enfekte edilecektir.
- Bu tür spesifik hedefleme ile gıda işleyicilerinin sütün tadını, rengini, dokusunu veya aromasını değiştirmeden insan sağlığına faydalı bakterileri korurken *Listeria*'yı ortadan kaldırmasına olanak tanıyacaktır.
- Fajın oral beslenme çalışmalarında herhangi bir olumsuz etki gözlemlenmemesi hedeflenmektedir.
- Bu proje bakteriyofajların çeşitli ortamlarda bakteriyel enfeksiyonlarla başa çıkmak için en güvenli ve en çevre dostu, hedefli yaklaşımlardan birini sağladığı felsefesine dayanmaktadır.
- Bakteriyofajlar zararlı bakterileri, bu bakterilerin insan hastalığına veya başka sorunlara neden olabileceği sınırlı, belirli ortamlarda kontrol etmek için bu doğal yaklaşım kullanılacaktır.
- Fajların geliştirilmekte olduğu tek şey gıda zehirlenmesini önlemek değildir. Raf ömrünün uzatılması yalnızca üreticilere ve tüketicilere fayda sağlamakla kalmayacak, aynı zamanda gıda israfını azaltarak biyoçeşitliliğin korunmasına ve karbon emisyonlarının sınırlandırılmasına da yardımcı olacaktır.

6. Uygulanabilirlik

• Teknik Uygulanabilirlik

Listeria monocytogenes için geliştirilen ticari faj ürünleri incelenmiş olup; gıda ürünlerinde faj kullanımlarına ilişkin denemeler bulunmakta, birçok başarılı denemeye rağmen piyasadaki fajların kullanılmasına bazı ülkeler izin vermemektedir. Bunun nedeni mevcut ürünlerin gıdada *Listeria monocytogenes* varlığını güvenli olarak saydıkları düzeyin altına indirirse de tamamen yok edememeleridir. Elde ettiğimiz bu bilgiler ışığında bizim *Listeria monocytogenes* suşları için geliştireceğimiz ticari faj ürünü, *Listeria monocytogenes* suşlarını gıda ürünlerinden tamamen yok edebilmek ve güvenli gıda üretimine katkıda bulunmak amaçlı olacaktır.

Bakteriyofajın Saptanması: Burada süt işleme tesislerinden alacağımız atık su örneklerinde bakteriyofaj varlığı saptamak olacaktır. Aldığımız örnekleri santrifüj ve membran filtrelerden geçirerek bakteriyofaj elde edeceğiz.

Bakteriyofajın Litik Aktivitesinin Saptanması: Varlığını saptadığımız ve saflaştırdığımız bakteriyofajın en kritik aşaması fajın litik özelliğinin saptanmasıdır. Fajın litik özelliği, fajın konak hücre üzerindeki öldürücü etkisidir. Bu işlemde *Listeria monocytogenes* suşlarının bakteriyofaj varlığında yaşayıp yaşamadığını saptayacağız. Besiyeri üzerinde gözlemleyeceğimiz berrak zon oluşumu bize yol gösterecektir.

Bakteriyofajın Moleküler ve Morfolojik Özelliklerinin Saptanması: Litik aktiviteye sahip fajın toksin gen ve lizogenik(ılıman) döngüye girip girmediğini anlayabilmek için tüm genom dizisine bakılacaktır. Trans Emisyon Mikroskopun'da (TEM) da fajın hangi aileye ait olduğu tanımlanacaktır.

Bakteriyofajın Faj Dinamiklerinin Belirlenmesi: Litik aktivitesi belirlenmiş fajın adsorbsiyon süresi, latent dönem ve çoğalma oranı belirlenecektir. Adsorbsiyon süresi fajın *Listeria* suşlarına bağlanmasındaki geçen süredir. Latent dönem adsorbsiyon (bağlanma) işlemi sona erdikten sonra bakteriyofaj genomunun konak hücreye aktarılmasından konak hücrenin yeni fajlar tarafından lize edilmesine kadar geçen süreyi ifade etmektedir. Çoğalma oranı ise başlangıçta belli bir miktarda bakteriyofaj enfekte eden bakteriyofaj sayısının enfeksiyon sonrasında oluşan yeni bakteriyofaj sayısının oranını ifade etmektedir.

Sütte İnhibisyon Testi ve İstatiksel Analiz: Süt ve süt ürünleri listerozise daha çok yatkın olduğu için, bakteriyofajın litik yeteneği, sütte *Listeria monocytogenes* suşları ile incelenecektir. Sütte inhibisyon testi ve istatiksel analiz yaparak bakteriyofajın sütte bulunan *Listeria* için öldürücü etkisine bakılacaktır. Fajların etkinliği, 24 saat sonunda, faj uygulaması yapılmayan süt örneğinde canlı *Listeria monocytogenes* suşlarının sayısının, bakteriyofaj ile muamele edilmiş canlı *Listeria monocytogenes* suşlarının sayısı ile karşılaştırılarak değerlendirilecektir.

- **Ticari Uygulanabilirlik**

Pazar analizi yaptığımızda gıda ürünlerinde ve gıda işleme ortamlarında *Listeria monocytogenes*'i hedef alan ticari olarak temin edilebilen iki faj bazlı ürün bulunmaktadır. Bunlardan ilki ListShield, Intralytix Inc(Baltimore, MD, ABD) ikincisi ise PhageGuard Listex Micros Food Safety(Wageningen, Hollanda) tarafından üretilir. ListShield altı farklı litik fajdan oluşan bir kokteyldir, PhageGuard Listex ise geniş bir P100 fajından oluşur. Kullanılan ticari ürünler su bazlı faj süspansiyonudur.

Bu iki ticari faj yaygın olarak kullanılıp güvenli bulunsa da *Listeria monocytogenes*'in tüm suşları için etkili değildir. Ayrıca yapılan çalışmalarda işlenmemiş gıdalar(çiğ et, pastörize olmamış süt gibi) ve ileri işlemlerde işlenen gıdalarda(peynir, fermente et gibi) *Listeria monocytogenes*'in tamamen yok olmadığını sadece belirli bir düzeyin altına indirildiğini ve stabil kaldığını göstermiştir. Bu su bazlı faj süspansiyonları *Listeria monocytogenes*'i tamamen yok etme konusunda zayıf kalmıştır.

Ülkemizde bakteriyofajların antibakteriyel ajan olarak kullanımı ile ilgili gerekli yasal düzenlemelerin yapılabilmesine ışık tutabilecek nitelikte de bir çalışma olacaktır. Ürün hizmeti için

FDA tarafından GRAS (Genel Olarak Güvenli Olarak Tanınan) olarak kabul edilmektedir. Pek çok ülkenin gıda kanunları fajın etkin olduğunun kabul edilmesi için ticari faj uygulandıktan sonra *Listeria monocytogenes*'in gıda da 25 g(ml) birimini aşmamalı veya daha altında olmalıdır. Bazı Batı Avrupa ülkeleri güvenli gıda için 0.01 g gıda da *Listeria monocytogenes* olmaması gerekir.

Güvenli gıdalar (süt, peynir, et gibi) üretebilmek, hijyenik ve raf ömrünün uzun olması için geliştireceğimiz bakteriyofajlar ile birlikte araştırmalara yurtiçi biyolojik araştırmalarına da ivme kazandırmayı hedeflemekteyiz.

Rakiplerimiz olan ListShield Intarltix ürününü 20 ml için 100 \$; Phage Guard Listex ise 20 ml için ürününü 90 €' dan satışa sunmuşlardır. Ürünümüz 20 ml için 1.250 Türk Lirası olarak belirlenmiş olup, rakiplerimize oranla daha uygun bir fiyat sunmuş olacağız.

Projenin ilk yılı Ar-Ge çalışması yapılacağı için ürün satışı planlanmamaktadır. Ancak, projemiz başarıyla tamamlandıktan sonra ürünümüzün müşterilerimizin kullanımına uygun ve uygulanabilir mevzuat şartlarını karşılayan ürünleri sağlama yeteneği olduğunu kanıtlaması gerektiğinde ve müşteri memnuniyetini artırmayı amaçladığımız için ISO 9001 Kalite Yönetim Sistemi Sertifikası alınacaktır. Bunu takiben ürünümüz piyasaya sürülecektir.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

- İş-Zaman Çubuğu Grafiği

Proje Adı: BİYOF AJ- Listeria monocytogenes'in Suşlarına Karşı Bakteriyofaj Geliştirilmesi															
Proje Adımları	Başlama Tarihi	Bitiş Tarihi	Süresi(Ay)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
				Bakteriyofaj Numune Alınması, Saflaştırılması ve Çoğaltılması			4	x	x	x	x				
Bakteriyofajın Litik Aktivitesinin Ölçülmesi, Genomik Ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi, Faj Dinamiklerinin Belirlenmesi			4					x	x	x	x				
Sütte İnhibisyon Tesiti Ve İstatiksel Analiz Yapılması, Fajın Ticarileştirilmeye Başlanması			4									x	x	x	X

- İş-Zaman Tablosu

İş Fikri Adı	Listeria monocytogenes'in Suşlarına Karşı Bakteriyofaj Geliştirilmesi	
İş Paketi /Adı	Bakteriyofaj Numune Alınması, Saflaştırılması ve Çoğaltılması	
Başlama-Bitiş Tarihi ve Süresi (ay)	4 Ay	
<p>İş paketi faaliyetlerini listeleyiniz:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Atık Sulardan Alınacak Bakteriyofaj Örnekleri _Saflaştırılacaktır. ▪ Faj varlığı saptanacaktır. ▪ Faj varlığı saptanan filtre sıvılarından faj stoğu elde edilecektir. 		

İş Fikri Adı	Listeria monocytogenes'in Suşlarına Karşı Bakteriyofaj Geliştirilmesi	
İş Paketi /Adı	Bakteriyofajın Litik Aktivitesinin Ölçülmesi, Genomik Ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi,Faj Dinamiklerinin Belirlenmesi	
Başlama-Bitiş Tarihi ve Süresi (ay)	4 Ay	
<p>İş paketi faaliyetlerini listeleyiniz:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Fajın Listeria monocytogenes üzerindeki öldürücü etkisi (litik spektrumu) belirlenecektir. ▪ Litik spektruma saip yeni bakteriyofajın moleküler ve morfolojik özellikleri saptanacaktır. ▪ Son olarak faj dinamikleri yani fajın adsorbsiyon süresi, latent dönemi ve çoğalma oranları belirlenecektir. 		

İş Fikri Adı	Listeria monocytogenes'in Suşlarına Karşı Bakteriyofaj Geliştirilmesi	
İş Paketi /Adı	Sütte İnhibisyon Testi Ve İstatiksel Analiz Yapılması, Fajın Ticarileştirilmeye Başlanması	
Başlama-Bitiş Tarihi ve Süresi (ay)	4 Ay	
<p>İş paketi faaliyetlerini listeleyiniz:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Sütte İnhibisyon Testi Yapılarak Bakteriyofajın Sütte Bulunan Listeria Suşları Üzerindeki Öldürücü Etkisine Bakılacaktır. ▪ Sütte faj uygulanarak canlı Listeria suşları karşılaştırılacaktır. ▪ İstatiksel Veriler Elde Edilecektir. 		

Tahmini Maliyet Tablosu

ALET/TEÇHİZAT/YAZILIM/YAYIN ALIMLARI: Proje Geneli Kullanım					
	Malzeme Adı:	Malzeme Miktarı (Adet)	Birim Fiyatı (TL)	Toplam Tutar (TL)	
1	Spektrofotometre	1	38.000	38.000	
2	RT-PCR	1	110.000	110.000	
3	Otoklav	1	32.000	32.000	
4	Buzdolabı	1	3.900	3.900	
5	Santrifüj	1	12.465	12.465	
6	İnkübatör	1	34.200	34.200	
7	Distile Su Cihazı	1	20.000	20.000	
8	Laptop	1	20.000	20.000	
9	Mikroskop	1	33.000	33.000	
10	Manyetik Karıştırıcı	1	1.900	1.900	
11	Korumalı Hassas Terazî	1	5.150	5.150	
12	Vorteks	1	3.100	3.100	
Toplam:				313.715	

Tablo.1.a. Alet/teçhizat/yazılım/yayın alımları

MALZEME ALIMLARI : Proje Geneli Kullanım					
	Malzeme Adı:	Malzeme Miktarı (Adet)	Birim Fiyatı (TL)	Toplam Tutar (TL)	
1	Membran Filtre	1	2.100	2.100	
2	Listeria Enrichment Broth	1	2.600	2.600	
3	Lurian Bertani Broth	1	4.000	4.000	
4	Gliserol	1	350	350	
5	Petri Kabı	1	1.350	1.350	
6	Falkon Tüp	1	1.200	1.200	
7	Ependorf	1	1.000	1.000	
8	Parafilm	1	1.350	1.350	
9	Mikropipet 3'lü	1	7.500	7.500	
10	Erlen Takımı	1	1.300	1.300	
11	Mezür Takımı	1	635	635	
12	Mikropipet Uç Takımı	1	3.000	3.000	
Toplam:				26.385	

Tablo.1.b. Malzeme alımları

Rakip Analizi:

	BİYOFAJ	ListShield INTRALTYX	PhageGuard Listex
Faj Özelliği	Litik Faj	Faj Kokteyli	Geniş P100 Fajı
Enfekte Edilen Bakteri	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Uygulama Alanı	Süt ve Süt Ürünleri	Süt ve Süt Ürünleri	Süt Ürünleri
Ürün Başına Düşen Satış Miktarı	20 mL	20 mL	20 mL
Menşei	TÜRKİYE	Amerika	Hollanda
Ürün Fiyatı	1.250 TL	100 \$	90 €

Tablo 3. Benzer bakteriyofaz üretimi yapan rakip firmaların analiz tablosu.

Rakiplerimizin ürünlerine göre:

- ✓ Fajın, ürünün (süt, peynir gibi) özelliğini ve yapısını değiştirmemesini sağlayarak,
- ✓ Fajın oral beslenme çalışmalarında herhangi bir olumsuz etki gözlemlenmemesi ile daha sağlıklı ürün üretimini sağlayarak
- ✓ Bu tür spesifik hedefleme ile gıda işleyicilerinin sütün tadını, rengini, dokusunu veya aromasını değiştirmeden insan sağlığına faydalı bakterileri korurken *Listeria*'yı ortadan kaldırmasına olanak sağlayarak,

tercih edilir olmayı hedefliyoruz.

Global alanda yapılan araştırmalara göre Türkiye pazarında rakibimizin bulunmaması ile avantaj sağlamaktayız.

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar):

Ülkemiz ve yurt dışı ülkelerinde yapılan araştırmalara göre içinde *Listeria monocytogenes* çiğ süt, pastörize olduğu sanılan süt, peynir, fermente çiğ et sosleri, çiğ ve pişmiş kümes hayvanı etlerinin bütün tipleri ve tütsülenmiş balık gibi gıdalarda bulunabilir. Bu ürünler milyonlarca insan tarafından tüketilmekte olup insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. *Listeria monocytogenes* bakterisiyle kontamine olmuş gıdaların yenmesi sonucunda ciddi enfeksiyon hastalıkları oluşmakta ve ölüm oranı %30'ları bulmaktadır.

Projede, bakteriyofajların ticari amaçlı üretilmesi hedeflenen süt ürünlerinin Türkiye pazarına bakıldığında;

- Türkiye'de ticari süt işletmeleri tarafından toplanan inek sütünün büyük bir kısmı (%16,1) içme sütü olarak tüketime arz edilmektedir. Türkiye'de süt üretimi 2019 yılında bir önceki yıla göre %3,8 oranında artmış ve yaklaşık 23 bin ton olarak gerçekleşmiştir. Üretilen toplam içme sütü miktarının yaklaşık %88,6'sını (1,3 milyon ton) UHT kutu sütler oluştururken, kalan miktar 72

°C'de 15 saniye veya 63 °C'de 30 dakika süreyle süte ısıl işlem uygulandığı pastörize sütler ve sterilize sütler oluşturmaktadır.

- Toplam Yurtiçi Kullanım 1.521.873 (2020 verileri) ton süt kullanılmaktadır.

Bu nedenle bakteriyofaj üreterek; ülkemize daha sağlıklı süt ürünü ve ekonomiye katma değer sağlamayı hedeflemekteyiz.



Grafik.1 Hedef müşteri grafiği.

9. Riskler

- Bakteriyofajların antimikrobiyal özelliğinden faydalanılabilmemesi için, üretiminde kullanılan gıdanın fizikokimyasal özellikleri (sıcaklık, pH vb.), koruyucu bileşenleri ve depolama koşulları gibi olumsuzluklara karşı direnç göstermektedir.
- Laboratuvar da kullanılacak besiyerleri kontamine olabilmektedir. Bunun için çözüm olarak; daha fazla sayıda yedek oluşturularak ekim yapmaktır.
- Bakteriyofajların saptanamaması durumunda bunun için çözüm olarak deneylerin tekrar edilmesi gerekecektir.
- Saflaştırma işleminde aşamalarında, saflaştırma basamağında hata yapılması durumunda işlem basamaklarını yeniden tekrar etmek gerekecektir.
- Faj titresinin yeterince elde edilememesinde durumunda bir sonraki işlem olan fajın litik aktivitesinin belirlenmesinde zorluklar yaşanabilir.
- Bakteriler her zaman evrimleştiğinden, her fajın etkinliğinin sürekli olarak izlenmesi ve karışımın gerektiği gibi ayarlanması gerekir. Aksi takdirde deneyin işleyişinde sorunlar çıkar ve istenen sonuçlara ulaşılamaz.
- Alınacak numunelerin içinden litik aktivite gösteren faj çıkmaması durumunda yeniden numune alınması gerekecektir.
- *Listeria monocytogenes*'in faj direnci oluşturması istenmeyen bir durumdur. Böyle bir durumda projeyi olumsuz etkileyecektir.

10. Kaynaklar

Hyman, P. (2019). Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. *Pharmaceuticals*, 12(1), 35. doi:10.3390/ph12010035

Çelik, B.(2017). Çoğul Dirençli *Acinetobacter Baumannii* Suşuna Özgü Litik Bakteriyofaj Araştırılması. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi 2017

Aydoğan, D. ve Hadımlı, H.(2016). Bakteriyofaj Tedavisi. *Etlik Veteriner Mikrobiyal Dergisi*, 2016;27(1), 38-47

Yılmaz, N.(2021). *Pseudomonas Aeruginosa*'yı İnhibe Eden Bakteriyofajların İzole ve Karakterize Edilmesi ve Tavuk Etinde Biyokoruyucu Olarak Kullanılma Potansiyellerinin Belirlenmesi. Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ağustos 2021

Torun, E. ve Müştak, H.(2019). Tavuk Dışkıları ve Çevresel Örneklerden *Salmonella Infantis* Fajlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 2019; 30(2): 149-157

Öztürkcan, A. ve Acar, S.(2017). Yaygın Olarak Kullanılan Antimikrobiyal Gıda Katkı Maddeleri İle İlgili Genel Bir Değerlendirme. *IGUSABDER*, 1(2017): 1-174

Yılmaz, Ö. ve Ark.(2018). Sütte Antibiyotik Kalıntısının İncelenmesi. *Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 15(2), 169-178, 2018

Demirer, B. ve Özdemir, M.(2021). Gıdalarda Antibiyotik Kalıntıları. *Journal of Halal Lifestyle* 2021: 1(1), 17-25

11. Görsel



Görsel.1 Gıdalarda bulunan *Listeria monocytogenes*'i sınırlı düzeyin altında tutmak için gerekli faj ürününün formu.