

Gıdalarda Patojen Kontrolünde Bakteriyofaj Kullanımı

Seran Temelli*

Ece Çetin**

Geliş Tarihi: 23.06.2011

Kabul Tarihi: 30.09.2011

Özet: Bakteriyofajlar, yalnız bakteri hücrelerini enfekte eden ve parçalayan viruslardır. Günümüzde bakteriyofajların potansiyel uygulamaları arasında, antibiyotiklere alternatif olarak hayvan sağlığında terapötik amaçlı kullanımları ile gıda zinciri boyunca patojen bakterilerin tespitinde ve gıda biyopreservasyonunda kullanımları yer almaktadır. Son yıllarda ise gıda katkı maddesi olarak kullanımlarının onaylanması, yenilebilir viruslar hakkında yapılan çalışmaların artmasına neden olmuştur.

Bu makalede, gıda kaynaklı patojenlerden *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Enterobacter sakazakii*'nin kontrolünde bakteriyofajların kullanım olanakları ile ilgili yapılan çalışmalar hakkında bilgiler verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyofaj, kontrol, patojen, gıda

Use of Bacteriophages in Control of Food Pathogens

Abstract: Bacteriophages are viruses, which only infect and lyse bacterial cells. Today, within the potential applications for bacteriophages are: their use as therapeutic agents, alternative to antibiotics, in sustaining animal health; their use as biopreservation applications and for pathogen reduction in the food chain. Also, their recent approval in use as food additives has caused an increase in research on these edible viruses.

In this article, studies on the control of foodborne pathogens namely, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Enterobacter sakazakii*, by the use of bacteriophages, have been reviewed.

Key Words: Bacteriophage, control, pathogen, food

Giriş

Bakteriyel patojenlerden özellikle *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Listeria* ile bunların dışında diğer bazı patojenlerin neden oldukları gıda kaynaklı infeksiyonlar halk sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bakteriler gıdaya hayvanın kesimi veya sağım işlemleri sırasında bulaşabildiği gibi fermentasyon, paketlenme ya da depolama gibi bazı üretim aşamalarında da gıdayı kontamine edebilmektedir⁸.

Gıda endüstrisinde patojen kontaminasyonunu azaltmak amacı ile kullanılan kimyasal

maddelerin taze meyve, sebze ve yemeye hazır gıdalar üzerine direkt uygulanması sakınca yaratmaktadır. Bu nedenle, ham maddede mikrobiyal yükü düşürmek, bakteriyel patojenlerin gıda zinciri içerisinde yer almalarının önüne geçebilmek ve 'minimum düzeyde kimyasal koruyucu içeren minimal düzeyde işlenmiş gıda' talebi olan tüketici gereksinimlerini karşılamak amacı ile yeni kontrol stratejilerine gereksinim duyulmaktadır^{1,17,24}.

Bakteriyofajlar, bakteri hücrelerini invaze eden viruslar olarak tanımlanmakta, litik özellikte olanları ayrıca bakteriyel metabolizmayı bozarak bakterinin lize olmasına neden olmak-

* Doç. Dr., Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Görükle Kampusu, 16059, Bursa, Türkiye. seran@uludag.edu.tr

** Doktora Öğrencisi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Görükle Kampusu, 16059, Bursa, Türkiye

tadırlar. İlk kez 1896 yılında Ernest Hankin tarafından keşfedilen bakteriyofajların antibakteriyel aktivitesi, 1915'te Frederick Twort tarafından tanımlanmıştır. Bununla birlikte, 1919 yılında Felix d'Herelle, bakteriyofajları tedavi amaçlı olarak dizanteri vakalarında kullanan ilk bilim adamı olarak bilinmektedir^{13,22}.

Fajların uygulama alanları, su ve gıda güvenliği ile tarım ve hayvan sağlığı konularını içermektedir. Son yıllarda, faj moleküler biyolojisi üzerinde yapılan araştırmalar, bunların nanoteknoloji, aşı geliştirme, ilaç uygulamaları, bakteriyel deteksiyon sistemleri, antibiyotiklere dirençli bakterilere karşı yeni antimikrobiyallerin geliştirilmesi gibi farklı alanlara ait biyoteknolojik uygulamalarda kullanım alanı bulmasını sağlamıştır. Fajların bir diğer umut verici uygulama alanı ise tüketici tarafından da kabul görebileceği bildirilen 'gıdalarda istenmeyen bakterileri inhibe etmeleri amacı ile doğal antimikrobiyaller olarak kullanımı' çalışmalarıdır^{17,30}. Bu kullanımın sebebi olarak bakteriyofajların insanların sindirim sistemi ve ayrıca yer altı suları, nehirler, irrigasyon suları, atık sular, okyanuslar, bioaerosoller ve gıdaları içerisine alan çok geniş bir çevresel dağılıma sahip olup yüksek sayılarda bulunmaları gösterilmektedir^{13,14}.

Bu derlemede, fajların özellikle gıda güvenliği uygulamalarında patojenlerin kontrolünde antibakteriyel ajan olarak kullanımları hakkında yapılan çalışmalara ait güncel bilgilere yer verilmiştir.

Gıdalarda Patojenlerin Biyokontrolünde Bakteriyofajların Kullanımı.

Bakteriyofaj kullanımına bağlı biyokontrol önlemleri, mikrobiyal güvenlik sağlanmasında özellikle güvenli olarak kullanımlarını bildiren kayıtlarının varlığı, uygulanmalarının nisbeten kolay olması, ayrıca yüksek ve özgün antimikrobiyal aktivitelerinin bulunması ile günümüzde büyük bir kullanım potansiyeline sahiptir^{5,14}.

Gıdalarda patojenlerin yok edilmesinde fajlar genel olarak 'çiftlikten sofraya' kadar tüm gıda zinciri aşamalarında uygulanabilmektedir. Bakteriyofajların kullanımları aşağıdaki şekilde sıralanabilir: (i) Canlı hayvanda kolonizasyon ve hastalığın önlenmesi (faj tedavisi), (ii) karkas, taze meyve ve sebze gibi ham maddelerin dekontaminasyonu; ekipman ve temas yüzeylerinin dezenfeksiyonu (faj ile biyosanitasyon ve biyokontrol), (iii) kolay bozulabilir ürünlerde doğal koruyucu olarak kullanım ile raf ömrünün uzatılması (biyoprezervasyon). Ayrıca bakteriy-

yofajların diğer koruma yöntemleri ile kombine edilerek engel teknolojisinde kullanımları üzerinde de çalışmalar bulunmaktadır^{1,20}.

***E. coli* O157:H7 Kontrolü.**

Fekal bulaşma indikatörü olan *E. coli* içerisinde yer alan patojen türler arasında Enterohemorajik *E.coli* (EHEC), insanlarda hemorajik kolitis ve hemolitik üremik sendrom oluşturmaları nedeniyle büyük önem taşımaktadır. EHEC içerisinde yer alan serotipler arasında *E. coli* O157:H7 gıda kaynaklı infeksiyonlarda en sık rastlanan etken olarak bilinmektedir. Bakterinin, gıdalar ile 10-100 hücre kadar düşük konsantrasyonlarda alınması bile toksinlere maruz kalınmasına neden olabilmektedir. İnfeksiyon başta kıyma, hamburger gibi sığır ve diğer ruminantlardan elde edilen ve yeterli ısıl işlem görmeyen et ürünleri ile kontamine sulardan kaynaklanmaktadır^{7,13,16}.

Gıdalarda *E. coli* O157:H7 biyokontrolünde fajların kullanımı ile ilgili olarak yapılan çalışma sayısı oldukça az olup araştırmalar genellikle canlı hayvanlar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Gıdalarda direkt kullanımına ilişkin sadece 2004 yılında İrlanda'da yapılan bir çalışma bulunmaktadır. Sığır etlerinde *E. coli* O157:H7 gelişimini önlemede fajların kullanım olanaklarının incelendiği bu çalışmada, 2.0×10^8 fob/ml konsantrasyonunda üç farklı litik faj karışımı (e11/2, e4/1c ve pp01), daha önceden 10^3 kob/g düzeyinde *E. coli* O157:H7 (P1432) suşu ile kontamine edilen biftek yüzeyine uygulanmış, 37 °C'de 1 saatlik inkübasyon sonrasında 9 örneğin 7'sinde faj karışımının bakteri sayısını tamamen elimine ettiği, kalan 2 örnekte ise 10 kob/ml'den daha düşük düzeye indirdiği bildirilmiştir²⁶.

Salmonella Kontrolü.

Günümüzde *Salmonella* kaynaklı infeksiyonların sayısında çok hızlı bir artış gözlenmekte ve bu durum ciddi bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. Bakterinin en sık rastlanan serotipleri *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ve *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) olarak bilinmektedir. İnfeksiyonlar çocuk ve yaşlılar hariç diğer kişilerde sadece enterik ateş ile nispeten hafif seyretmektedir. Kanatlı hayvan etleri ve yumurta ile ürünleri başta olmak üzere kırmızı et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri ve su ürünleri salmonelloz için en önemli kaynakları oluşturmaktadır^{7,13,16}.

Salmonella'nın biyokontrolü ile ilgili farklı gıdalarda yapılan oldukça fazla sayıda araştırma bulunmaktadır. Kanada'da yapılan bir çalışmada, SJ2 fajının varlığında *S. Enteritidis*'in çiğ süttten ve pastörize süttten yapılan Cheddar peynirlerinin, yapım, olgunlaşma ve depolama süreci boyunca canlılığı incelenmiştir. Bu amaçla, çiğ ve pastörize süt öncelikle 10^4 kob/ml *S. Enteritidis* ve 10^8 fob/ml SJ2 fajı ile inokule edilmiş, bu süttlerden üretilen Cheddar peynirleri 8°C 'de 99 günlük depolamaya alınmıştır. Faj ilave edilmeden yapılan peynirlerde, bakteri sayısı depolama sonunda 10^3 kob/g olarak bulunmasına rağmen faj ilaveli pastörize süttten yapılan peynir örneklerinde 89 günlük depolama sonrasında bakterinin canlı kalmadığı, çiğ süttten yapılan örneklerde ise 99 günlük depolama sonrasında bakteri sayısının 50 kob/g düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Sonuçta, faj ilavesinin Cheddar peynirlerinde *Salmonella*'nın canlı kalma kabiliyetini azaltmada yararlı olduğu bulunmuştur²³.

Leverentz ve ark.¹⁹, farklı sıcaklıklarda ($5-20^{\circ}\text{C}$) depolanan taze kesilmiş kavun ve elma örneklerinde *S. Enteritidis* kontrolü için litik *Salmonella* spesifik faj karışımının etkisini inceledikleri çalışmalarında, 5 ve 10°C 'de depolanan kavun dilimlerinde bakteri sayısında 3.5 log birimlik, 20°C 'de saklanan dilimlerde ise 2.5 log birimlik düşüşe neden olduğu, bu düşüşün kimyasal dezenfektanlara göre daha yüksek düzeyde ve bununla birlikte faj karışımının elma dilimlerinde incelenen 3 farklı sıcaklıkta *Salmonella* sayısında bir azalma oluşturmadığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, faj karışımlarının titresinin 48 saatlik sürede kavun dilimlerinde sabit kaldığı elma dilimlerinde ise sınırın altında olduğu, bu durumun kavun dilimlerinde 5.8 olan pH'ın elma dilimlerinde 4.2 olması nedeni ile fajların inaktive olmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir. Sonuçta, düşük pH'a sahip taze kesilmiş meyve dilimlerindeki *Salmonella* kontaminasyonunu azaltmak için bu faj karışımının kullanımının uygun olduğunu rapor etmişlerdir.

2009 yılında Ye ve ark.³² tarafından yapılan başka bir çalışmada, domateslerin üretimi sırasında *S. Javiana* üremesini baskılamak için *Enterobacter asburiae* JX1 ve 5 farklı litik bakteriyofaj kombinasyonu kullanılmış, sonuç olarak biyokontrol için kullanılan bu karışımın ancak gelişim sırasında etkili olduğu, hasat sonrasındaki uygulamalarda ise faj karışımının tek başına *Salmonella* kontrolünde etkili olmadığı bildirilmiştir.

Aynı araştırmacılar, benzer bakteri suşu ve 6 farklı faj karışımının bu kez fasulye filizi ile alfa alfa filizlerinde farklı *Salmonella* serovarlar-

rına karşı etkisini incelemişler, bakteri ve faj kombinasyonunun sıvı besiyerinde *Salmonella* sayısında 5.7 ile 6.4 log kob/ml düzeylerinde azalma sağladığını tespit etmişlerdir. *Salmonella* ile inokule edilen fasulyelerde 4 günlük filizlenme periyodu sonrasında bakteri sayısı 6.72 log kob/g olarak tespit edilmiş, sonrasında fajın tek başına kullanıldığı filizlenmeye bırakılan fasulyelerde sayının 3.31 log kob/g, *Enterobacter asburiae* suşunun tek başına kullanıldığı durumda ise 1.16 log kob/g seviyesinde olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte bakteri suşu ve faj kombinasyonunun kullanıldığı örneklerde ise *Salmonella* sayısı tespit edilebilecek düzeyin altında bulunmuştur. Sonuç olarak, kimyasal dezenfektan kullanılmadan faj ve bakterinin birlikte kullanımının bu gıdalarda *Salmonella* kontrolünde başarı ile uygulanabileceği belirlenmiştir³³.

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde tavuk sosislerinde Felix O1 fajı ile bunun bir varyantının *S. Typhimurium* DT104 üremesinin baskılanması üzerine yapılan bir çalışmada, iki varyantın da *Salmonella* üremesinin engellenmesinde aynı düzeyde etkili olduğu rapor edilmiştir³¹.

Bigwood ve ark.³ tarafından 2008 yılında Yeni Zelanda'da yapılan bir diğer çalışmada, çiğ sığır eti ve pişmiş sığır eti örnekleri *S. Typhimurium* PT160 ile düşük (<100 hücre/cm²) ve yüksek (10^4 hücre/cm²) düzeylerde kontamine edilmiştir. Daha sonra örnekler *S. Typhimurium* faj P7 ile düşük (10) ve yüksek (10^4) konsantrasyonlarda infekte edilerek 5 ve 24°C 'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. *Salmonella* sayısında gözlenen düşüş örnek tipine ve inkübasyon derecesine bağlı olarak değişkenlik göstermiş, faj ile infekte edilmeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, en önemli düşüşün 5°C 'de $2-3$ log₁₀/cm², 24°C 'de ise >5.9 log₁₀/cm² düzeylerinde olduğu bulunmuştur. Çalışma sonuçları bakteriyofajların gıda kaynaklı bir patojen olan *Salmonella*'nın kontrolünde başarı ile kullanılabileceğini göstermiştir.

İngiltere'de Goode ve ark.¹², tavuk derisinde deneysel *Salmonella* kontaminasyonunu azaltmak amacı ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında, *S. Enteritidis* PT4 suşu (P125589) ile 10^3 kob/cm² (3.91) düzeyinde inokule ettikleri tavuk derisini, *Salmonella* faj 12 ile 10^6 fob/cm² titresinde olacak şekilde infekte etmiş ve 4°C 'de 24 saatlik inkübasyon sonunda *Salmonella* sayısında yaklaşık % 78 oranında (3.27 kob) 48 saatlik inkübasyon sonunda ise % 89 oranında (2.96 kob) istatistiksel bakımdan önemli düzeyde azalma oluştuğunu rapor etmişlerdir.

Campylobacter jejuni Kontrolü.

Enterik patojenlerden biri olan *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), insanlarda akut bakteriyel gastroenteritlerin temel nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda insidansındaki artışta özellikle antibiyotiklere karşı geliştirdikleri direnç mekanizmasının rolü büyüktür. Düşük infeksiif doza sahip olan bu mikroerofilik bakterinin optimum üreme sıcaklığı 41.5°C'dir. *Campylobacter* infeksiyonlarının oluşumunda başlıca kanatlı etleri olmak üzere et ve et ürünleri ile çiğ süt ürünleri ve su ilk sıralarda bulunmaktadır^{7,13,16}.

2003 yılında, Goode ve ark.¹², tavuk derisinde deneysel *Campylobacter* kontaminasyonunu azaltmak amacı ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında, *C. jejuni* C222 suşu ile 10⁴ kob/cm² (4.05) düzeyinde inokule ettikleri tavuk derisini litik fajlardan biri olan *C. jejuni* faj 12673 ile 10⁶ fob/cm² titresinde infekte etmiş ve 4°C'de 24 saatlik inkübasyon sonunda *Campylobacter* sayısında yaklaşık % 95 oranında (1.74 kob/g) istatistiksel bakımdan önemli düzeyde azalma görüldüğünü tespit etmişlerdir.

Tavuk derisinde *Campylobacter* biyokontrolü ile ilgili bir diğer çalışmada Atterbury ve ark. (2), *C. jejuni* NCTC 12662 PT14 suşu ile 10⁶kob/cm² düzeyinde inokule ettikleri tavuk derisini *C. jejuni* faj φ2 ile 10⁷ fob/cm² konsantrasyonda infekte etmiş ve 4 ve -20°C'de 10 günlük depolamaya almıştır. Örneklerde 5.40 kob/cm² olan başlangıç bakteri sayısının 4°C'de depolama sonunda 5.10 kob/cm², 20°C'de ise 4.10 kob/cm² düzeylerine azaldığı saptanmıştır. Sonuçta, yeterli konsantrasyonda *Campylobacter*'e spesifik faj kullanımının 4 ve -20°C'de beklenen tavuk derisinde, *Campylobacter* sayısında sırası ile 1.0 log₁₀ kob ile 2.0 log₁₀ kob düzeylerinde düşüşe neden olduğu bildirilmiştir.

Listeria monocytogenes Kontrolü.

Fakültatif, hücre içi patojen bir bakteri olan *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) insanlarda menenjit ve septisemiye neden olmakta, immun sistemi baskılanmış kişilerde yüksek oranda ölüme yol açmaktadır. Listeriozun insidansı düşük olmakla birlikte mortalitesi % 30'lara ulaşmaktadır. *L. monocytogenes* kaynaklı gıda infeksiyonlarında, sorumlu gıdaların başında yumuşak peynirler olmak üzere süt ürünleri gelmektedir. Ancak salatalar, kırmızı et ve kanatlı etleri ile su ürünlerinin de önemli düzeyde kontamine olup infeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. Bakterinin doğada yaygın olarak bulunması, buzdolabı sıcaklığında üreyebilmesi ve geniş pH değerlerini tolere edebilmesi kontrolünü güçleştirmektedir^{7,13,16}.

L. monocytogenes'in farklı gıdalardaki biyokontrolü ile ilgili olarak yapılan araştırmaların diğer patojenlere göre nispeten daha fazla sayıda olduğu görülmektedir. Bu çalışmalardan birinde Dykes ve Moorhead⁶, 2 farklı *L. monocytogenes* suşunun gelişim ve canlılığı üzerine faj LH7 ile nisin tek başına ve kombine etkisini 4°C'de 4 hafta depolanan sıvı besi yerinde ve vakum paketlenmiş çiğ sığır etlerinde incelemişlerdir. Her iki antimikrobiyalin birlikte kullanımının sıvı besi yerinde bakteri sayısını tamamen azalttığını ancak et örneklerinde nisin tek başına kullanıldığında daha etkin olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, faj ile birlikte nisin kullanımının gıdalardaki *L. monocytogenes* kontrolü için bir potansiyel olduğu ancak bu kompleks sistemdeki ilişkilerin tam olarak anlaşılmasını takiben gıdalarda pratik olarak kullanılabileceğini de rapor etmişlerdir.

Leverentz ve ark.²⁰ ise çalışmalarında, nisin ile faj kombinasyonunu taze kesilmiş elma ve kavun dilimlerindeki *Listeria*'yı kontrol etmek için kullanmışlardır. *L. monocytogenes* spesifik LM-103 ve LMP-102 olmak üzere 2 ayrı litik faj içeren ve 10⁷ fob/ml titresinde hazırlanan karışımı tek başına ve ayrıca nisin ile birlikte, *L. monocytogenes* LCDC 81-861 serotip 4b ile 10⁵ ve 10⁶ kob/ml düzeylerinde kontamine ettikleri elma ve kavun örneklerine uygulamış ve takiben 10°C'de 7 gün depolamaya almışlardır. Kontamine kavun örneklerinde kontrol örneklerine göre patojen sayısında 2.0 ile 4.6 log birimlik azalma sağlanmış, elmalarda ise bu azalma 0.4 log birimin altında bulunmuştur. Faj titresinin kavun örneklerinde depolama sonuna kadar sabit kaldığı, pH'nın düşük olması nedeni ile elma örneklerinde ise hızla azaldığı, ancak nisin ile birlikte kullanımında elma örneklerinde (2.3 log) kavun örneklerine (5.7 log) oranla daha etkili bir azalma sağladığı, faj uygulamasının etkinliğinin başlangıç bakteri sayısı ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca çalışmada, fajın uygulanış şekillerinin bakteri canlılığı üzerine etkisi de araştırılmış, spreyleme şeklinde yapılan uygulamanın, dilimleri daha iyi kaplamasından dolayı pipetle yapılan uygulamadan daha etkili olduğu istatistiksel olarak da önemli bulunmuştur. Sonuç olarak, düşük pH'lı meyve ve sebzelerde fajların yüksek konsantrasyonlarının veya düşük pH'ı tolere edebilecek mutant fajların uygulanmasının başarılı sonuçlar getireceği bunun yanında fajların bakteriyosinler ile birlikte sinerjik bir şekilde etki gösterebi-

leceği vurgulanmıştır. 2003 yılında yapılmış olan bu çalışmada kullanılan LMP-102 fajı, 2006 yılında İnralytix ticari adı ile ABD Gıda ve İlaç Birliği (FDA) tarafından yemeye hazır gıdalarda gıda biyopreservasyonunda *L. monocytogenes* kontrolünde gıda biyopreservatifi gıda katkı maddesi olarak kullanım onayı almıştır²¹.

Hollanda'da 2005 yılında P100 litik fajının *L. monocytogenes*'in yumuşak peynirlerde biyokontrolünde kullanım olanaklarının araştırıldığı Carlton ve ark.⁴ tarafından yapılan çalışmada, *L. monocytogenes* LmC (serovar 1/2c) suşu 1 ve 10 kob/g düzeylerinde olgunlaşmaya alınmadan önce peynirin yüzeyine inokule edilmiş, P100 fajı 10^6 ve 10^7 fob/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde salamura içerisine ilave edilerek 14°C 'de % 98 relatif rutubette 16 günlük olgunlaşmaya bırakılıp 6°C 'de depolanmıştır. Yüzeysel olgunlaştırılan yumuşak peynirlerde kullanılan fajın düşük (10^8) konsantrasyonda bakteri sayısı üzerinde 2-3 log birimlik indirgenme oluşturduğu, yüksek (10^9) konsantrasyonda ise tamamen bakterinin elimine olduğu tespit edilmiştir. Depolamanın 6. gününden sonra uygun konsantrasyonda olmak koşulu ile fajların peynirlerde kontrol amaçlı kullanımının güvenli ve etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmadan 1 yıl sonra da P100 fajı, Listex P100 ticari adı ile FDA tarafından gıda biyopreservasyonunda ve GRAS (Genellikle Güvenli Olduğu Kabul Edilen) olarak *L. monocytogenes* kontrolünde etlerde ve peynirlerde kullanım onayı almıştır²¹.

Konu ile ilgili olarak yapılan başka bir çalışmada ise Soni ve Nannapanneni²⁹, aynı fajın *L. monocytogenes* serotip 1/2a ve 4b karışımı ile 10^4 kob/g düzeyinde yüzeysel kontamine ettikleri çiğ kedi balığı filetolarındaki etkinliğini, farklı depolama sıcaklıklarında (4 , 10 ve 22°C), farklı faj konsantrasyonlarında (10^3 , 10^5 ve 10^7 fob/g) ve farklı inkübasyon sürelerinde (15 dakika, 30 dakika, 1 saat ve 10 gün) incelemişlerdir. *L. monocytogenes* sayısındaki azalmanın depolama sıcaklıkları, temas süresi ve konsantrasyona bağlı olarak önemli derecede etkilendiği, 10^7 konsantrasyonda ve 30 dakikalık uygulamada yeterli azalmanın oluştuğunu ve 10 gün boyunca faj titresinin sabit kaldığını ortaya koymuşlardır.

Aynı araştırmacılar 2010 yılında, aynı fajı aynı bakteri suşlarına karşı bu kez alabalık filetolarında farklı depolama sıcaklıklarında (4 , 10 ve 30°C), farklı faj konsantrasyonlarında (10^4 , 10^6 ve 10^8 fob/g) 10 günlük depolama boyunca

inceledikleri çalışmalarında, depolamanın 1. gününde patojenin sayısında 1.4 log birimlik azalma gözleendiği, depolama sonunda kalan sayının 0.3 log kob/g ve istatistiksel olarak da kontrol grubuna (2.6 log kob/g) oranla daha düşük sayıda olduğu, ayrıca yüksek faj konsantrasyonunun (10^8) diğer uygulanan konsantrasyonlara göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir²⁸.

Guenther ve ark.¹⁵, 2009 yılında, İsviçre'de sıklıkla *L. monocytogenes* taşıyan gıdalar arasında sayılan yemeye hazır gıdalarda bu patojenin kontrolünde virulent A511 ve P100 fajlarının etkinliğini araştırmışlardır. *L. monocytogenes*'in serovar 4b ve serovar 1/2a suşları ile 10^3 kob/g düzeyinde kontamine edilen farklı gıdalara 10^6 ve 10^8 fob/g konsantrasyonlarında iki farklı faj ilave edilip 6°C 'de 6 gün depolamaya alınmıştır. Sıvı gıdalarda (çikolata üretiminde kullanılacak pastörize süt ve pastörize edilmiş Mozzarella peynir altı suyu) bakteri sayısının hızla tespit edilebilir seviyenin altına düştüğü, katı gıdalarda (sosis, parça hindi eti, dumanlanmış alabalık, deniz ürünleri, lahana dilimi ve marul yaprağı) ise bakteri sayısında 5.0 log birimlik bir azalma sağladığı saptanmıştır. Ayrıca daha fazla sayıda ilave edilen fajın (10^8) düşük konsantrasyonda uygulananlara göre daha etkili olduğu, uygulama için gereken faj miktarının bakteriye özgü olmasının yanı sıra kullanılacak gıda örneğine bağlı olarak da ayarlanması gerektiği, fajların sıvı gıdalara katı gıdalara göre daha kolay dağılabildiği, uzatılmış depolama süresi boyunca faj etkinliğinin kaybolmadığı ve sonuç olarak *L. monocytogenes* kontaminasyonuna hassas olan yemeye hazır gıdalarda spesifik biyokontrol için oldukça etkili olduğu belirtilmiştir.

Staphylococcus aureus Kontrolü.

Günümüzde *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) tarafından gıdalarda oluşturulan enterotoksinlerin alınması ile meydana gelen gıda zehirlenmesi vakaları ile sıklıkla karşılaşmaktadır. *S. aureus* patojen bir bakteri olmasına rağmen insan ve hayvanların burun mukozası ve deri florasında bulunmakta dolayısı ile gıdaların kontaminasyonunda personelin payı da büyük olmaktadır. İntoksikasyondan sorumlu gıdalar arasında başlıca mastitli hayvanlara ait sütlerden elde edilen süt ve süt ürünleri olmak üzere ısıl işlem görmüş et ve et ürünleri ile salatalar gelmektedir^{7,13,16}.

İrlanda'da çiğ sütte stafilokokal bakteriyofaj K'nın *S. aureus* inhibisyon yeteneğini

değerlendirmek üzere O'Flaherty ve ark.²⁵ tarafından yapılan çalışmada, *S. aureus* DPC5246 suşu ile inokule edilen çiğ ve 90°C'de 10 dakikalık ısıtma işlemi gören süt, faj K ile inokule edilmiştir. Çalışmada, ısıtma işlemi görmüş sütlerde 2 saat sonra bakteri tespit edilebilir seviyenin altında bulunurken çiğ sütte bakteri sayısında herhangi bir azalma görülmemiştir. Araştırmacılar, çiğ sütte bulunan ısıya duyarlı immunglobulinlerin fajın bakteriye bağlanmasını engellediğini ve buna bağlı olarak fajın etkinliğinin azaldığını rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada, çiğ süte 45°C'de uygulanan homojenizasyon işleminin immunglobulinlerin kümeleşmesini engelleyerek stafilokoklara karşı faj aktivitesini geliştirme üzerine çok büyük bir etkisinin olmadığı da tespit edilmiştir. Isıtma işlemi görmüş peynir altı suyunda yapılan denemelerde ise 2 saat sonra bakteri tespit edilebilir seviyenin altında bulunurken ısıtma işlemi görmemiş peynir altı suyunda ise ancak 4 saat sonrasında bakterinin tamamen indirildiği saptanmıştır.

Benzer şekilde Kanada'da yapılan bir çalışmada, aynı faj kullanılarak bu kez peyniraltı suyunda *S. aureus*'un canlılığı incelenmiş, bakterinin inhibisyonu için kullanılan faj K'nın peynir altı suyu proteinlerinin yüksek molekül ağırlıklarına bağlı olarak bakteri hücre yüzeyine bağlanma ve lize etme kapasitesini azalttığı belirtilmiştir¹¹.

2010 yılında İspanya'da yapılan bir başka çalışmada, pastörize sütlerde faj endolizini ile birlikte nisin kullanımının etkisi araştırılmıştır. Ticari pastörize sütler, düşük (10^2 kob/ml) ve yüksek (10^5 kob/ml) düzeylerde *S. aureus* Sa9 suşu ile inokule edilmiş, sonrasında nisin ve endolisin LysH5 ilave edilerek 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Her iki antimikrobiyalin kullanıldığı denemede, patojenin 6 saatlik inkübasyon sonrasında tespit edilemediğini, düşük ve yüksek kontaminasyonlu örneklerde 4 saatlik inkübasyon sonrasında bakteri sayısında kontrol örneklerine oranla sırası ile 4.0 ve 6.0 log birimlik azalma sağlandığı ve gıdalardaki patojenlerin inhibisyonunda bu kombinasyonun etkili bir şekilde kullanılabileceğini bildirmişlerdir¹⁰.

Garcia ve ark.⁹ tarafından 2009 yılında, farklı süt çeşitlerinde *S. aureus*'u infekte eden bakteriyofajların prevalansları incelenmiştir. Farklı *S. aureus* konaklarına spesifik olarak izole edilen 8 farklı faj kullanılan bu çalışmada, fajların karışım halinde kullanılmasının daha etkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca fajların UHT, pastörize ve tam yağlı sütlerde *S. aureus*'u inhi-

be ettiği, fakat yarım yağlı sütlerde daha düşük bir faj aktivasyonunun gözlemlendiği bildirilmiştir. Tam yağlı çiğ sütte ise faj aktivitesinin en düşük seviyede olduğu rapor edilmiştir. Fajların *S. aureus* üzerine inhibe edici etkisinin oda sıcaklığında ve 37°C'de gözlemlendiği, fakat bu etkinin buzdolabı sıcaklığında (4°C) gerçekleşmediği bildirilmiştir.

2010 yılında Obeso ve ark.²⁷ tarafından İspanya'da yapılan bir çalışmada, 2 litik faj varlığında pastörize sütte *S. aureus* gelişiminin tahmini lojistik regresyonu incelenmiştir. Bu çalışmada tasarımı yapılan iki farklı model üzerinden stafilokokların bakteriyofaj ilavesi sonrasındaki davranışları, yaşama ve ölüm olasılıkları belirlenmiştir. Modellerin, pastörize süte son üründe *S. aureus* bulunmaması için ne kadar faj ilave edilmesi gerektiğini belirten sistemler olarak pratik biyokontrol uygulamalarında kullanılabileceği belirtilmiştir.

Enterobacter sakazakii Kontrolü.

Enterobacter sakazakii (*E. sakazakii*), yaygın olmamakla birlikte % 40-80 mortalite oranına sahip menenjit ve enteritlere neden olan fırsatçı bir patojendir⁸.

E. sakazakii salgınlarından sorumlu tutulan rekonstitüye yeni doğan formülasyonlarında bakteriyofaj kullanımının bu patojene karşı kontrol etkinliği 2007 yılında Kim ve ark.¹⁸ tarafından İsviçre'de yapılan bir çalışmada incelenmiştir. Patojen olarak *E. sakazakii* ATCC 29544 suşu ile 10^2 kob/ml düzeyinde inokule edilen ve steril su ile hazırlanan rekonstitüye yeni doğan formülasyonu, sonrasında ESP 1-3 ve ESP 732-1 fajları ile 10^7 , 10^8 ve 10^9 kob/ml konsantrasyonlarında infekte edilmiş, 12, 24 ve 37°C'lerde inkübasyona bırakılmıştır. ESP 1-3 fajının 37°C'de 3 farklı konsantrasyonda da patojenin gelişimini önemli derecede inhibe ettiği, ESP 732-1 fajının ise 10^9 'luk düzeyinin 37°C'de 4 saatlik inkübasyon sonunda patojeni tamamen yıkımladığı, 10^7 'lik seviyede 24°C'de inkübasyonda bakteri gelişmesi gözlenirken 12°C'lik inkübasyonda sadece en yüksek konsantrasyondaki (10^9) faj uygulamasının bakteri sayısını tespit edilebilir seviyenin altına düşürdüğü belirtilmiştir. Sonuç olarak, inkübasyon sıcaklığının fajların etkinliği açısından çok önemli bir faktör olduğu, her iki fajın da bu bakteriyi inhibe etme yeteneğinin yüksek bulunduğu ve *E. sakazakii* biyokontrolünde kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Sonuç.

Gıda kontaminasyonlarına bağlı olarak ortaya çıkan problemlerin çözümünde özellikle kimyasal koruyucuların kullanımları kısıtlandıkça bakteriyofaj uygulamalarına dayalı biyokontrol yöntemlerinin kullanımı ümit verici bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır. Gelecekte bu konuda yapılacak olan çalışmaların daha çok güvenlik ve teknolojik konular çerçevesinde ve ayrıca bakteriyofajların antimikrobiyal yetenekleri üzerinde olacağı düşünülmektedir⁸.

Bakteriyofajlar istenmeyen bazı genetik elementlerin (virulans ve antibiyotik direnç genleri) transferinde vektör olabilmekte, ayrıca temperate fajlar lizojenik değişimde rol alarak güvenlik yönünden bazı problemlere neden olabilmektedirler. Bakteriyofaj kullanımları üzerindeki çalışmaların gerçekleştirilebilmesi için ise geniş kapasiteli üretimlerin yapılabilmesi güvenli çalışma ortamlarına gereksinim duyulmaktadır. Faj üretiminde, konak olarak kullanılacak olan bakterilerin virulan olmamaları ve genetik olarak iyi karakterize edilmiş bakteriler olmaları büyük önem taşımaktadır. Bunun yanında fajların laboratuvar koşullarında gösterdikleri antimikrobiyal aktiviteleri gıda sistemlerinde uygulandıklarında büyük ölçüde düşüş gösterebilmektedir. Bu duruma neden olabilecek kısıtlayıcı faktörler arasında; fajın yayılma oranının düşmesi sonucu konak-faj çarpışma olasılığının azalması, fajın karşılaştığı mikrobiyal yükün mekanik bariyer ve dolayısı ile de spesifik olmayan faj bağlanma alanları oluşmasına neden olması, sıcaklık, pH ve inhibitör bileşikler yer almaktadır. Gıda biyoprezervatiflerinde olduğu gibi, bakteriyofaj etkinliğinin değerlendirilmesinde sistemler tek tek ele alınmalıdır. İyi bir faj performansı elde edilebilmesi için, fajların ait oldukları spesifik ortamdaki izole edilmeleri en doğru yaklaşımdır. Bunun en önemli nedeni, bu fajların ait oldukları ortam koşullarına en kolay ve hızlı şekilde adapte olabilmeleri, üreyebilmeleri ve yaşamlarını sürdürebilmeleridir. Bakterilerin fizyolojik durumları da fajların infeksiyon oranını etkiler. Konağa selektif olarak bağlanan ve bakterinin farklı fizyolojik durumlarında da üreyebilen fajlar seçilmeli ve kullanılmalıdır. Bununla birlikte günümüzde fajlar üzerinde yapılan çalışmalar, gıdaların yapay kontaminasyonuna dayalı yöntemlere ait sonuçları içermektedir^{8,14,16}.

Faj-tabanlı biyokontrol ve biyoprezervasyon teknolojilerinin önünü açacak olan birçok

makalenin yayınlanıyor ve konu ile ilgili ticari firmaların sayısının gün geçtikçe artıyor olması bu yaklaşımın ileride daha da fazla kullanılacak olduğunu göstermektedir. Kapsamlı ticari uygulamaları içeren sistemlerin kurulması ancak bakteriyofaj biyolojisi hakkında güncel ve reel bilgilerin varlığına bağlı olarak gerçekleşecektir. Bunun sonucunda da tüketici bu tür içinde 'yenilebilir viruslar' olan ürünleri güvenilir olarak tüketecektir. Özellikle doğal koşullardaki etkileşimlerin incelenebileceği düzeneklerin kurulduğu çalışmalara ve farklı gıdalara adapte edilebilecek sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tür etkin çalışmaların sonuçları ile gelecekte güncel kanuni yaptırımlara ve standartlara uyum sağlayacak veriler elde edilebilir. Ancak bu şekilde elde edilen veriler Avrupa Birliği'nde Avrupa İlaç Birliğinin, ABD'de ise FDA'nın onayını alabilecek yetkinlikte olacaktır^{5,24,30}.

Kaynaklar.

1. Abedon, S.T., 2009. Kinetics of phage-mediated biocontrol of bacteria. *Foodborne*
2. *Pathog. Dis.*, 6, 807-815.
3. Atterbury, R.J., Connerton, P.L., Dodd, C.E.R., Rees, C.E.D., Connerton, I.F., 2003.
4. Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microb.*, 69, 6302-6306.
5. Bigwood, T., Hudson, J.A., Billington, C., Carey-Smith, G.V., Heinemann, J.A.,
6. 2008. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiol.*, 25, 400-406.
7. Carlton, R.M., Noordman, W.H., Biswas, B., de Meester, E.D., Loessner, M.J., 2005.
8. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regul. Toxicol. Pharm.*, 43, 301-312.
9. Coffey, B., Mills, S., Coffey, O., McAuliffe, O., Ross, R.P., 2010. Phage and their
10. lysins as biocontrol agents for food safety applications. *Ann. Rev. Food Sci. Tech.*, 1, 449-468.
11. Dykes, G.A., Moorhead, S.M., 2002. Combined antimicrobial effect of nisin and a
12. listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer on raw beef. *Int. J. Food Microbiol.*, 73, 71-81.
13. Erol, İ., Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Pozitif Matbaacılık, Ankara, 2007.
14. Garcia, P., Martinez, B., Obeso, J.M., Rodriguez, A., 2008. Bacteriophages and

15. their application in food safety. *Lett. Appl. Microbiol.*, 47, 479-485.
16. Garcia, P., Madera, C., Martinez, B., Rodriguez, A., Evaristo, Suarez, J., 2009. Prevalence of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potential as biocontrol agents. *J. Dairy Sci.*, 92, 3019-3026.
17. Garcia, P., Martinez, B., Rodriguez, L., Rodriguez, A., 2010. Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 141, 151-155.
18. Gill, J.J., Sabour, P.M., Leslie, K.E., Griffiths, M.W., 2006. Bovine whey proteins inhibit the interaction of *Staphylococcus aureus* and bacteriophage K. *J. Appl. Microbiol.*, 101, 377-386.
19. Goode, D., Allen, V.M., Barrow, P.A., 2003. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Appl. Environ. Microb.*, 69, 5032-5036.
20. Goodridge, L.D., 2008. Phages, bacteria, and food. In: Abedon, S.T. (Ed.), *Bacteriophage Ecology. Population Growth, Evolution, and Impact of Bacterial Viruses*. Cambridge University Press, UK, pp. 302-321.
21. Greer, G.G., 2005. Bacteriophage control of foodborne bacteriophage. *J. Food Prot.*, 68, 1102-1111.
22. Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., Loessner, M. J., 2009. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods. *Appl. Environ. Microb.*, 93-100.
23. Hagens, S., Loessner, M.J., 2007. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Appl. Microbiol. Biot.*, 76, 513-519.
24. Hagens, S., Loessner, M.J., 2010. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and consideration. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 11, 58-68.
25. Kim, K.P., Klumpp, J., Loessner, M.J., 2007. *Enterobacter sakazakii* bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula. *Int. J. Food Microbiol.*, 115, 195-203.
26. Leverentz, B., Conway, W.S., Alavidze, Z., Janisiewicz, W.J., Fuchs, Y., Camp, M.J., Chighladze, E., Sulakvelidze, A., 2001. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. *J. Food Prot.*, 64, 1116-1121.
27. Leverentz, B., Conway, W.S., Camp, M.J., Janisiewicz, W.J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R., Sulakvelidze, A., 2003. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Appl. Environ. Microb.*, 69, 4519-4526.
28. Mahony, J., Auliffe, O.M., Ross, R.P., van Sinderen, D., 2011. Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Curr. Opin. Biotech.*, 22, 157-163.
29. Mao, C., Miu, A., Cao, B., 2009. Virus-based chemical and biological sensing. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48, 6790 - 6810.
30. Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A., Griffiths, M.W., 2001. Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of Cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *J. Food Prot.*, 64, 927-933.
31. Monk, A.B., Rees, C.D., Barrow, P., Hagens, S., Harper, D.R., 2010. Bacteriophage applications: where are we now? *Lett. Appl. Microbiol.*, 51, 363-369.
32. O'Flaherty, S., Coffey, A., Meaney, W.J., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., 2005. Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk. *Lett. Appl. Microbiol.*, 41, 274-279.
33. O'Flynn, G., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Coffey, A., 2004. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microb.*, 70, 3417-3421.
34. Obeso, J.M., Garcia, P., Martinez, B., Arroyo-Lopez, F.N., Garrido-Fernandez, A., Rodriguez, A., 2010. Use of logistic regression for prediction of the fate of *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk in the presence of two lytic phages. *Appl. Environ. Microb.*, 76, 6038-6046.
35. Soni, K. A., Nannapaneni, R., 2010. Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue. *J. Food Prot.*, 73, 32-38.
36. Soni, K. A., Nannapaneni, R., Hagens, S., 2010. Reduction of *Listeria monocytogenes* on the surface of fresh channel catfish fillets by bacteriophage Listex P100. *Foodborne Pathog. Dis.*, 7, 424-434.
37. Strauch, E., Hammerl, J.A., Herrtwig, S., 2007. Bacteriophages: New tools for safer food? *J. Verbr. Lebensm.*, 2, 138-143.
38. Whichard, J.M., Sriranganathan, N., Pierson, F.W., 2003. Suppression of *Salmonella* growth by wild-type and large-plaque variants of bacteriophage Felix O1 in liquid culture and on chicken frankfurters. *J. Food Prot.*, 66, 220-225.
39. Ye, J., Kostrzynska, M., Dunfield, K., Warriner, K., 2009. Evaluation of a biocontrol preparation consisting of *Enterobacter asburiae* JX1 and a lytic bacteriophage cocktail to suppress the growth of *Salmonella* Javiana associated with tomatoes. *J. Food Prot.*, 72, 2284-2292.
40. Ye, J., Kostrzynska, M., Dunfield, K., Warriner, K., 2010. Control of *Salmonella* on sprouting mung bean and alfalfa seeds by using a biocontrol preparation based on antagonistic bacteria and lytic bacteriophages. *J. Food Prot.*, 73, 9-17.