



T.C.
NIĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

TAVUK ETİNDE *SALMONELLA* ENTERITİDİS'İN GELİŞİMİ ÜZERİNE
SALMONELLA ENTERITİDİS BAKTERİYOFAJLARININ ETKİSİ

ÖZGÜL DEMİRASLAN AYDIN

Eylül 2018

T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

TAVUK ETİNDE *SALMONELLA* ENTERITİDİS'İN GELİŞİMİ ÜZERİNE
SALMONELLA ENTERITİDİS BAKTERİYOFAJLARININ ETKİSİ

ÖZGÜL DEMİRASLAN AYDIN

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM

Eylül 2018

Özgül DEMİRASLAN AYDIN tarafından **Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM** danışmanlığında hazırlanan “**Tavuk etinde *Salmonella Enteritidis*’in gelişimi üzerine *Salmonella Enteritidis* bakteriyofajlarının etkisi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ayşe ÖZBEY, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Nilgün ÖNCÜL, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun/...../20.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Doç. Dr. Murat BARUT
MÜDÜR V.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Özgül DEMİRASLAN AYDIN

ÖZET

TAVUK ETİNDE *SALMONELLA* ENTERITIDIS'İN GELİŞİMİ ÜZERİNE *SALMONELLA* ENTERITIDIS BAKTERİYOFAJLARININ ETKİSİ

DEMİRASLAN AYDIN, Özgül
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM
Eylül 2018, 52 sayfa

Bu tezin amacı *Salmonella* Enteritidis MET-S1-411'e karşı enfektif olan 4 farklı bakteriyofajın virülant etkilerini tavuk göğüs eti ve tavuk derisinde belirlemektir. *S. Enteritidis* ile 10^3 ve 10^6 kob/g düzeyinde kontamine edilen tavuk göğüs eti ve tavuk derisi örnekleri 10^9 pob/g düzeyinde SEnt-fajları ile muamele edilmiş ve bu işlemi takiben 4°C ve 25°C 'de muhafaza edilmişlerdir. Ayrıca SEnt-fajlarının tavuk göğüs etinde buzdolabı koşullarında meydana gelebilecek *S. Enteritidis* kontaminasyonlarına karşı etkisi de belirlenmiştir. *S. Enteritidis*'i 10^3 kob/mL düzeyinde içeren tavuk göğüs ve derisi örneklerine SEnt-fajları tek tek ve kokteyl olarak 10^9 pob/g seviyesinde uygulandığında, buzdolabı ve oda sıcaklığında konak bakteri sayısını belirlenemeyecek seviyenin altına düşürdükleri, 10^6 kob/g *S. Enteritidis*'i içeren tavuk göğüs ve derisi örneklerinde ise SEnt-fajlarının konak hücre sayısını depolamanın 1'inci gününde 4,11-6,42 log kob/g düzeyinde azalttığı saptanmıştır. SEnt-fajlarının depolama süresince hem buzdolabı hem de oda sıcaklığında stabilitelerini korudukları gözlenmiştir. SEnt-fajlarının enfektif etkilerinin 4°C 'ye göre 25°C 'de daha yüksek olduğu belirlenmiştir. SEnt-fajlarının tavuk göğüs eti örneklerinde stabilitelerini korudukları ve sonradan olabilecek *Salmonella* kontaminasyonunu etkili bir şekilde önledikleri belirlenmiştir. Sonuç olarak, SEnt-fajları kanatlı et endüstrisinde gıda kaynaklı patojen bakteri *S. Enteritidis*'e karşı biyokoruyucu ajan olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Bakteriyofaj, *Salmonella* Enteritidis, tavuk eti, tavuk derisi, biyokoruyucu

SUMMARY

EFFECT OF *SALMONELLA* ENTERITIDIS BACTERIOPHAGES ON THE GROWTH OF *SALMONELLA* ENTERITIDIS IN CHICKEN MEAT

DEMİRASLAN AYDIN, Özgül

Nigde Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

Supervisor : Professor Dr. Zeliha YILDIRIM

September 2018, 52 pages

The aim of this thesis was to investigate the virulent effects of 4 different SEnt-phages infecting *Salmonella* Enteritidis MET-S1-411 in chicken breast and chicken skin. Chicken breast and chicken skin samples contaminated with *S. Enteritidis* at 10^3 and 10^6 CFU/g were treated with SEnt-phages at a level of 10^9 PFU/mL and then they were stored at 4 or 25°C. Also, chicken breast samples inoculated with SEnt-phages at 10^9 PFU/g were maintained at refrigerator temperature. In addition, the inhibitory effect of SEnt-phages against *S. Enteritidis* contamination which may occur on chicken breast meat under refrigerator conditions were also determined. It was found that SEnt-phages applied at a level of 10^9 pfu/g as separately or cocktail to chicken breast and skin samples containing *S. Enteritidis* at 10^3 CFU/g declined the viable number of their host cells in all samples kept at refrigerated or room temperatures reduced to undetectable level during storage period. In chicken breast and chicken skin samples containing 10^6 CFU/g *S. Enteritidis*, SEnt-phages decreased the number of host cells by 4,11-6,42 log CFU/g on the first day of storage. SEnt-phages have been observed to maintain their stability during storage both at refrigerator and at room temperature. The infectious effects of SEnt-phages were higher at 25°C than at 4°C. SEnt-phages have been found to be stable in chicken breast samples and effectively prevent subsequent *Salmonella* contamination under refrigeration conditions. Consequently, it has been determined that SEnt-phages have potency to be used as a biocontrol agent against food-borne pathogenic *S. Enteritidis* in the poultry meat industry.

Keywords: Bacteriophage, *Salmonella* Enteritidis, chicken meat, chicken skin, biopreservation

ÖNSÖZ

Çalışmamın tez konusunun belirlenmesinden sonuçlanmasına kadar her aşamasında desteğiyle bana yardımcı olan, bilimsel gelişimime tecrübe ve önerileriyle katkıda bulunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM'a en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte varlıklarından güç aldığım çocuklarım Cemre, Ezgi, Yaşar ve Çınar'a, manevi desteğini esirgemeyen eşim Serdar AYDIN'a ve bu günlere gelmemde her zaman ve her konuda beni destekleyen sevgili aileme ve iş yeri çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmaya destek sağlayan Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırma Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü'nce desteklenmiştir. Proje No: FEB 2017/04-YÜLTEP, 2018.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR	xi
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1 Tavuk Eti ve Mikrobiyolojik Kalitesi	4
2.2 Bakteriyofaj	6
2.3 Bakteriyofajların Tarihi ve Sınıflandırılması	6
2.4 Bakteriyofajların Genel Özellikleri	9
2.5 Bakteriyofajların Yaşam Döngüleri	11
2.6 Gıda Endüstrisinde Bakteriyofajların Biyokoruyucu Olarak Kullanım Olanakları..	13
2.7 <i>Salmonella</i> Enteritidis ve Bakteriyofajlar Aracılığı ile Kontrolü	15
BÖLÜM III MATERYAL VE METOT	21
3.1 Materyal	21
3.2 Metot	21
3.2.1 Faj örneklerinin hazırlanması	21
3.2.2 Tavuk derisi ve tavuk göğüs et örneklerinin hazırlanması	21
3.2.3 Tavuk derisi ve tavuk göğüs et örneklerinin bakteriyofaj ve test bakterisi ile inokülasyonu	22
3.2.4 <i>Salmonella</i> Enteritidis sayımı	22
3.2.5 Bakteriyofaj sayısının belirlenmesi	23
3.2.6 Bakteriyofajla muamele edilen et ve deri örneklerinde faja dayanıklı <i>Salmonella</i> enteritidis suşların oluşup oluşmadığının belirlenmesi	23
3.2.7 İstatistiksel değerlendirme	23
BÖLÜM IV ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	24

4.1 Düşük Dozda S. Enteritidis ile Kontamine Edilen Tavuk Göğüs Eti ve Tavuk Derisinde SEnt-Fajlarının Enfektif Etkileri.....	24
4.2 Yüksek Dozda S. Enteritidis ile Kontamine Edilen Tavuk Göğüs Eti ve Tavuk Derisinde SEnt-Fajların Enfektif Etkileri.....	28
4.3 S. Enteritidis ile Kontaminasyondan Önce Tavuk Etine Uygulanan SEnt-Fajlarının Litik Aktivitesi.....	35
4.4 Bakteriyofajla Muamele Edilen Et Örneklerinde Faja Dayanıklı S. Enteritidis Suşların Oluşup Oluşmadığının Belirlenmesi.....	37
BÖLÜM V SONUÇLAR.....	39
KAYNAKLAR.....	42
ÖZ GEÇMİŞ.....	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bakteriyofajların Ackermann sınıflandırılması	9
Çizelge 4.1. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 4°C’de tavuk göğüs etine 10^3 kob/g düzeyinde inoküle edilen <i>S. Enteritidis</i> MET-S1-411 üzerine inhibitör etkisi	25
Çizelge 4.2. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 4°C’de tavuk derisine 10^3 kob/g düzeyinde inoküle edilen <i>S. Enteritidis</i> MET-S1-411 üzerine inhibitör etkisi	25
Çizelge 4.3. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 25°C’de tavuk göğüs etine 10^3 kob/g düzeyinde inoküle edilen <i>S. Enteritidis</i> MET-S1-411 üzerine inhibitör etkisi	27
Çizelge 4.4. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 25°C’de tavuk derisine 10^3 kob/g düzeyinde inoküle edilen <i>S. Enteritidis</i> MET-S1-411 üzerine inhibitör etkisi	27
Çizelge 4.5. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 4°C’de tavuk göğüs etine 10^6 kob/g düzeyinde inoküle edilen <i>S. Enteritidis</i> MET-S1-411 üzerine inhibitör etkisi	29
Çizelge 4.6. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 25°C’de tavuk göğüs etine 10^6 kob/g düzeyinde inoküle edilen <i>S. Enteritidis</i> MET-S1-41 üzerine inhibitör etkisi	30
Çizelge 4.7. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 4°C’de tavuk derisine 10^6 kob/g düzeyinde inoküle edilen <i>S. Enteritidis</i> MET-S1-411 üzerine inhibitör etkisi	32
Çizelge 4.8. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 25°C’de tavuk derisine 10^6 kob/g düzeyinde inoküle edilen <i>S. Enteritidis</i> MET-S1-411 üzerine inhibitör etkisi	34
Çizelge 4.9. Yüksek dozda SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 4°C’de depolama sürecinde tavuk göğüs etine sonradan kontamine olan düşük dozda (10^3 kob/g) <i>S. Enteritidis</i> ’in gelişimi üzerine etkisi.....	37
Çizelge 4.10. Yüksek dozda SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 4°C’de depolama sürecinde tavuk göğüs etine sonradan kontamine olan yüksek dozda (10^6 kob/g) <i>S. Enteritidis</i> ’in gelişimi üzerine etkisi.....	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bakteriyofajların tarihçesi	7
Şekil 2.2. Bakteriyofajların Bradley sınıflandırması	8
Şekil 2.3. Kompleks bir bakteriyofajın yapısı	10
Şekil 2.4. Bakteriyofajların yaşam döngüsü	12
Şekil 2.5. Faj preparatları.....	15
Şekil 4.1. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 4°C 'de 10^3 kob/g düzeyinde S. Enteritidis MET-S1-411 ile inoküle edilen tavuk göğüs etinde stabilitesi.....	25
Şekil 4.2. SEnt -fajlarının (10^9 pob/g) 4°C 'de 10^3 kob/g düzeyinde S. Enteritidis MET-S1-411 inoküle edilen tavuk derisinde stabilitesi.....	26
Şekil 4.3. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 25°C 'de 10^3 kob/g düzeyinde S. Enteritidis MET-S1-411 ile inoküle edilen tavuk göğüs etinde stabilitesi	27
Şekil 4.4. SEnt -fajlarının (10^9 pob/g) 25°C 'de 10^3 kob/g düzeyinde S. Enteritidis MET-S1-411 inoküle edilen tavuk derisinde stabilitesi.....	28
Şekil 4.5. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 4°C 'de 10^6 kob/g düzeyinde S. Enteritidis MET-S1-411 inoküle edilen tavuk göğüs etinde stabilitesi.....	30
Şekil 4.6. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 25°C 'de tavuk göğüs etine 10^6 kob/g düzeyinde inoküle edilen S. Enteritidis MET-S1-411 üzerine inhibitör etkisi	31
Şekil 4.7. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 4°C 'de 10^6 kob/g düzeyinde S. Enteritidis MET-S1-411 inoküle edilen tavuk derisinde stabilitesi	32
Şekil 4.8. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 25°C 'de tavuk derisine 10^6 kob/g düzeyinde inoküle edilen S. Enteritidis MET-S1-411 üzerine inhibitör etkisi	34
Şekil 4.9. Tavuk göğsü etine yüksek dozda (10^9 pob/g) uygulanan SEnt-fajlarının 4°C 'de depolama sürecinde stabiliteleri	36

SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler

μ	Mikron
kob/mL veya g	Mililitrede veya gramda koloni oluşturan birimi
pob/mL veya g	Mililitrede veya gramda plak oluşturan birim
nm	Nanometre
μm	Mikrometre

Kısaltmalar

Açıklama

BHI	Brian Heart Infusion
MOI	Çoklu Enfeksiyon Değeri
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
STX	Shiga Toksini
<i>S. enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
SEnt-faj	<i>Salmonella</i> Enteritidis Fajı
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>

BÖLÜM I

GİRİŞ

İnsanların sağlıklı olarak beslenmelerinde hayvansal kaynaklı proteinlerin önemli bir yer tutması nedeniyle bir ülkede yaşayan insanların günlük tükettiği hayvansal kaynaklı protein miktarı o ülkenin gelişmişlik düzeyi ile doğrudan ilişkilendirilmektedir (Temiz ve Okumuş, 2005). Hayvansal bir ürün olan kanatlı eti, üretimi nispeten daha kolay, biyolojik değeri yüksek protein, B grubu vitaminler ile özellikle demir ve bakır yönünden zengin bir gıda maddesidir (Ergezer, 2005).

Piliç veya tavuk eti ve ürünlerinin, protein içeriklerinin ve protein kalitesinin kırmızı ete oranla daha yüksek olması, insan beslenmesi için gerekli olan elzem amino asitlerin tümüne sahip olması, daha az yağ ve kolesterol içermesi, sindiriminin kolay ve fiyatının düşük olması diğer et ürünlerine göre daha çok tercih edilmesini sağlamaktadır (Arslan, 2013).

Dünya kanatlı eti üretiminin yaklaşık %90'ını oluşturan tavuk eti, protein içeriğinin yüksek, yağ içeriğinin düşük, çiğnenmesi ve hazmının kolay ve ayrıca kırmızı et ile kıyaslandığında daha ucuz olması nedeniyle dünyada popüler gıdalardan birisidir. Ancak, tavuk eti, yüksek besin değeri, yüksek su aktivitesi (0,98-0,99) ve uygun pH (tavuk göğüs etinin pH değeri 5,7-5,9) değerinden dolayı gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaların gelişmesi için uygun bir ortam olduğundan, mikrobiyal bozulmalara karşı en duyarlı gıdalar arasında yer almaktadır. Bu nedenle tavuk etinin mikrobiyolojik kalitesi ve güvenliği hem üretici hem satıcı hem de tüketici için oldukça önem arz etmektedir. Tavuk derisi mikroorganizmalar için fiziksel bariyer olarak rol oynamasına karşın birçok gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmayı içerdiğinden önemli bir bulaşı kaynağı durumundadır (ICMSF, 1998).

Tavuk eti ve ürünleri gıda zincirinin her aşamasında örneğin üretim, taşıma, muhafaza ve tüketime hazırlama sırasında çeşitli bakterilerle kontamine olmaktadır. Sağlıklı hayvanlardan elde edilen etlerin merkezi kısımları steril olmasına karşın, kesim hijyenine bağlı olarak dış kısımları patojen bakterilerle kontamine olabilmektedir. Tavukların bağırsak içeriği, derileri ve tüyleri yoğun bir şekilde mikroorganizma barındırdığından,

kesim, tüy ıslatma ve yolma, parçalama, ambalajlama ve muhafaza işlemi sırasında gerekli önlemler alınmadığında tavuk karkasına kontaminasyon olabilmektedir. Bunlara ilaveten personel, hava, su ve alet-ekipmandan kaynaklanan kontaminasyonlar da söz konusudur (Davies ve Board, 1998; Mulder, 1999; Tekinşen vd., 2000; Mead 2004a, 2004b).

Yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı mikrobiyal gelişimi önlemek veya kontrol altına almak için iyi veteriner uygulamaları, iyi üretim uygulamaları, iyi hijyen uygulamaları, HACCP ve uygun muhafaza yöntemlerinin uygulanması gerekmektedir (Fiorentini vd., 2001). Tavuk ve tavuk ürünlerinde en sık rastlanılan patojen bakteriler *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica*'dır (Mead, 2004; Uyttendaele vd., 1999; Conner vd., 2001; Hargis vd., 2001).

Enterobacteriaceae familyasında yer alan *Salmonella* Gram-negatif, çubuk şeklinde, endospor ve oksidaz negatif, katalaz pozitif, fakültatif anaerobik ve hareketli (*S. Gallinarum* ve *S. Pullorum* hariç) bir bakteridir. *Salmonella* serovarları, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde halk sağlığı açısından risk oluşturan en önemli gıda kaynaklı patojen bakterilerden birisidir. *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium insanlarda salmonella salgınlarına neden olan en önemli serovarlardır (Cormican vd., 2002). *Salmonella*, iftlik, evcil ve yabani hayvanların bağırsak sisteminin doğal bileşeni olduğundan başlıca rezervuarı hayvanların bağırsak sistemidir. Özellikle kümes hayvanları, gıda zincirinde *Salmonella* yayıcı hayvanlar içerisinde en önemli yere sahiptir. Türkiye'de piliç karkaslarının %31-90 oranında, başta *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* olmak üzere değişik *Salmonella enterica* serovarları ile kontamine olduğu ifade edilmektedir (Erol, 2007).

Salmonella, insanlar ve hayvanlar tarafından kontamine gıdalar vasıtasıyla alındığında gıda kaynaklı hastalıklardan salmonellozis'e neden olmaktadır. Salmonellozis bir tür akut bağırsak enfeksiyonu olup Avrupa  lkelerinde gıda kaynaklı hastalıklar içerisinde campylobacteriosis'ten sonra ikinci sırada yer almaktadır. Salmonellozise neden olan en önemli serovarlara *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium*'dur. *S. Enteritidis* patojenitesinin yüksek olması, doğada yaygın olarak bulunması, buzdolabı sıcaklığında gelişebilmesi, gıda ve gıdanın hazırlanması sırasında kullanılan alet-ekipman yüzeylerine tutunabilmesi

gibi özelliklerinden dolayı gıda endüstrisi için önemli sorunların kaynağı konumundadırlar (Wright vd., 2009; Coffey vd., 2010).

Son yıllarda tüketicilerin doğal koruyucularla korunmuş gıdaları daha çok tercih etmesinden dolayı gıda endüstrisinde gıdaların güvenliğini iyileştirmek ve korumak amacıyla biyokoruyucuların kullanımına ilişkin ilgi artmıştır. Gıdaların mikrobiyolojik kalitesini iyileştirmek ve güvenliğini arttırmak amacıyla laktik asit bakterileri ile bakteriyofajların veya bunların ürettikleri antimikrobiyal bileşiklerin koruyucu bileşen olarak kullanılmasına biyokoruma denilmektedir. Son yıllarda gıda endüstrisinde bakteriyofajların biyokoruyucu ajan olarak kullanımıyla ilgili çalışmaların arttığı görülmektedir. Bunun temel nedenin ise fajların insan ve hayvan sağlığını olumsuz yönde etkilemeden ve ayrıca gıdaların biyokimyasal, fiziksel ve duyuşsal özelliklerinde herhangi bir değişime neden olmadan gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakterileri imha etmelerinden kaynaklanmaktadır (Greer, 2005; Garcia vd., 2008; Coffey vd., 2010).

Daha önce tarafımızca kanalizasyon, gıda işletmeleri ile mezbaha atık suları, dere, balık işletmeleri, yalak ve akarsulardan *S. Enteritidis*'i enfekte eden 52 adet faj izole edilip saflaştırılmıştır. İzole edilen ve saflaştırılan fajlardan etki ettiği konak hücre aralığı en geniş ve litik aktivitesi kuvvetli olan 4 tane SEnt-fajı seçilmiş ve karakterize edilmişlerdir. SEnt-fajlarının genomunda *sefC*, *pefA*, *spvC*, *sopE* ve *gipA* virülant gen bölgelerinin olmadığı; genom büyüklüğünün 35.9-37.8 kb olduğu, Myoviridae ve Siphoviridae familyasında yer aldıkları, çoklu enfeksiyon değerlerinin (MOI) 0,1-0,0001, mutant sıklığı değerlerinin 10^{-7} , latent periyodları, patlama süreleri ve patlama sayılarının sırasıyla 10-20 dk, 25-35 dk ve 76-356 adet/hücre olduğu bulunmuştur. Fajların geniş pH aralığına ve yüksek sıcaklığa dayanıklı oldukları da belirlenmiştir. SEnt-fajların konak bakterilerine karşı 20, 30 ve 37°C'de enfektif oldukları; inkübasyon işleminin ilk 5 dakikası içerisinde konakçı hücrelerine %94,4-99,8 oranında adsorbe oldukları tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın amacı *S. Enteritidis*'e karşı enfektif olan ve karakterize edilen 4 farklı SEnt-bakteriyofajların özgül konak hücreleri üzerine tek tek ve kokteyl olarak enfektif etkilerini tavuk göğüs eti ve tavuk derisinde belirleyerek bakteriyofajların tavuk endüstrisinde biyokoruyucu olarak kullanım olanağını ortaya koymaktır.

BÖLÜM II

KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Tavuk Eti ve Mikrobiyolojik Kalitesi

Yeterli ve dengeli beslenmede hayvansal kaynaklı proteinler ve esansiyel bileşenler çok önem arz etmektedir. Hayvansal kaynaklı proteinin elde edilmesindeki güçlüğü giderebilmek için bu proteinleri kısa sürede üretebilen hayvanların yetiştirilmesi gerekmektedir. Bu beklentiye en iyi cevap verebilecek üretim biçimi kanatlı etleri üretimidir (Ergezer, 2005).

Aves sınıfında bulunan kanatlı eti terimi, tavuk, hindi, kaz, ördek, bıldırcın, devekuşu ve benzeri evcil kanatlı hayvanların karkaslarından elde edilen insan tüketimi için uygun tüm parçaları ifade etmektedir (Ergezer, 2005). Kanatlı eti denince daha çok etlik piliç eti anlaşılmasına karşın, bunun yanı sıra hindi, kaz, ördek, bıldırcın, sülün ve diğer bazı kanatlı hayvan etleri de bu terim içerisinde yer almaktadır. Kanatlı etleri yüksek kaliteli protein içerdiği gibi bütün esansiyel amino asitleri de içermesi ve kolay sindirilebilir olması açısından insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Bunlara ilaveten kanatlı etleri B vitaminleri ve demir açısından da iyi bir kaynak olduğu gibi yağ içeriğinin düşük ve nispeten çoklu doymamış yağ asidi konsantrasyonunun yüksek olması insan beslenmesindeki önemini artırmaktadır (Botsoglou vd., 2003; Stadelman vd., 1988).

Yüksek besin içeriğinden dolayı tavuk eti mikroorganizmaların gelişmesi için de çok uygun bir ortam oluşturmaktadır. Tavuk etinin üretimi, işlenmesi, taşınması ve dağıtımı sırasında gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmalar ile kontaminasyonu istenmemesine karşın kaçınılmazdır. Bu nedenle, patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaların bu ürünlerdeki varlığı üreticiler, tüketiciler ve halk sağlığını ilgilendiren yetkililer açısından büyük önem arz etmektedir. Tavuk karkaslarındaki mikroorganizma düzeyinde; kesim ve işleme esnasındaki hijyen ve sanitasyon uygulamalarının, depolama süresinin ve sıcaklığının da etkili olduğu bilinmektedir (Alvarez-Astorga vd., 2002).

Epidemiyolojik alışmalar, tavuk etlerinin hâla gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlarının önemli nedenlerinden biri olduğunu göstermektedir. Sağlıklı hayvanlardan elde edilen etlerin iç kısımları steril olmasına karşın; kesim, yüzme, parçalama ve muhafaza sırasında etler kontaminasyona maruz kalabilmektedirler. Tavuk eti de kesimhanelerde hem işlenme hem de muhafaza aşamalarında; alet-ekipman, yıkama suyu, hava, ambalaj materyali, taşıma, depolama ve personel kaynaklı kontaminasyonlara uğrayabilmektedir. Meydana gelen kontaminasyonlar mikrobiyel yükün artmasına, yetersiz soğutma, dondurma ve depolama koşulları ise mikroorganizmaların hızla çoğalarak hem ürünün raf ömrünün kısılmasına ve bozulmasına neden olabilmekte, hem de halk sağlığını tehdit edebilmektedir (Cason 1999; Mead, 2004; şahin 2015; Tang vd., 2009).

Tavuk ve tavuk ürünlerinde en sık izole edilen patojen bakteriler *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica*'dır (Mead, 2004; Conner vd., 2001; Hargis vd., 2001; Uyttendaele vd., 1999).

Salmonella dünyada gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıklardan sorumlu başlıca patojen bakteri olup insan ve hayvanlarda gıda kaynaklı hastalıklardan salmonellozise neden olmaktadır. Salmonellozisin belirtileri arasında mide bulantısı, kusma, karın krampları, ishal, ateş ve baş ağrısı bulunmaktadır. İnsanlarda Salmonellozis belirtileri, bulaşık gıda tüketildikten 6 ile 48 saat sonra görölmeye başlamakta olup organizma gastrointestinal bölgeyi geçip epitel dokuda enflamasyona neden olduğu zaman ortaya çıkmaktadır. *Salmonella* cinsi içinde 2700'den fazla serotip bulunmaktadır. Bunlar içerisinde *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* insanlarda salmonella salgınlarına neden olan en önemli serovarlardır (Cormican vd., 2002). Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde salmonellozisten yılda yaklaşık 600 kişinin hayatını kaybettiği ve 1,4 milyon kişinin hastalandığı belirtilmektedir. Salgının temel kaynağının kanatlı et ürünleri ile yapraklı yeşil bitkiler ve domates olduğu belirtilmektedir (Mead vd., 1999; Wright vd., 2009; Coffey vd., 2010).

Salmonella enterica enfeksiyonu önemli bir halk sağlığı sorunu olup ABD'nde her yıl yaklaşık 1 milyon gıda kaynaklı hastalığa neden olduğu, bunun 19.000'den fazla hastane yatış ve en az 378 ölümlle sonuçlandığı tahmin edilmektedir. Dünya çapında her yıl

tahmini 93.8 milyon hastalık ve 155.000 ölüm gerçekleşmektedir. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, dünyada önemli bir gıda kaynaklı bakteriyel patojendir ve *S. Typhimurium*'dan sonra *Salmonella*'nın ikinci önde gelen serovarıdır. ABD'nde 25 yıldan daha fazla süredir kontrol ve önleme tedbirlerinin sürdürülmesine karşın çok sayıda insanda hastalığa neden olmaya devam etmektedir. ABD'de *Salmonella* Enteritidis sıklığı % 5'ten % 20'ye çıkmıştır. *S. Enteritidis*'in, salmonellozise neden olan üç serovardan biri olduğu ve bir yılda gerçekleşen *Salmonella* salgınlarının %26-34'ünden sorumlu olduğu bildirilmektedir (Braden, 2006; CDC, 2013; Majowicz vd., 2010; Wright vd., 2016).

2.2 Bakteriyofaj

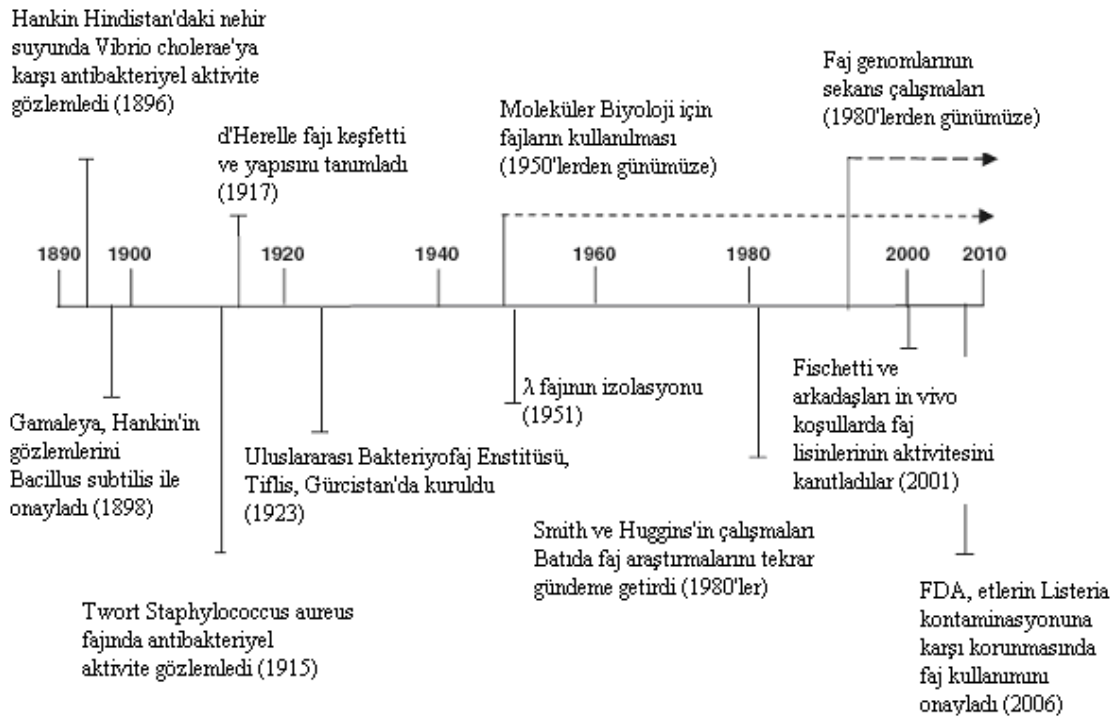
Bakteri yiyen anlamına gelen bakteriyofajlar veya kısaca fajlar dünya üzerinde en fazla bulunan mikroorganizmalardır (10^{31} parçacık) (Brüssow ve Kutter, 2005). Fajlar, bakteri virüsleridir ve dünyada bakterilerin bulunduğu hemen hemen her ortamda bulunurlar (Weinbauer, 2004; Brüssow ve Hendrix, 2002). Deniz suyu, kanalizasyon, kirli sular, termal sular, toprak, bitki, hayvan ve insan bağırsağı ile dışkısı, gıdalar ve gıda işletmeleri fajların bulunduğu önemli kaynaklarıdır (McGrath vd., 2007). Deniz suyu ve kanalizasyonda 10^6 - 10^7 pob/cm³, toprakta 10^7 pob/g, insan dışkısında 10^5 - 10^7 pob/cm³ düzeyinde bulunmaktadır (Sharp, 2001). Bakteriyofajlar, bakterileri spesifik olarak enfekte eden ve bakterilerde çoğalan virüsler olduklarından insanlar, hayvanlar ve bitkiler için zararsızdırlar. Bakteriyofajlar, Archaea olarak bilinen tek hücreli prokaryotik organizmaları da enfekte ederler (Ackermann, 2007; Weinbauer, 2004).

2.3 Bakteriyofajların Tarihi ve Sınıflandırılması

Fajlar ile ilgili ilk bilimsel tespitler, 1896 yılında M. Ernest Hankin tarafından Hindistan'daki Ganj ve Jumma nehir sularında *Vibrio cholerae*'yı inhibe eden bakteriyofaj kaynaklı antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi ile başlamıştır (Kutter, 1997). Fajlar, 1917 yılında Kanadalı mikrobiyolog Felix d'Herelle tarafından dizanteri etmeni bakteriyi öldürebilen canlı mikroorganizma olarak keşfedilmesinden itibaren hem terapötik hem de profilaktik ajan olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak 1928 yılında geniş antibakteriyel spektrumlu antibiyotiklerin keşfi ile bakteriyofajla ilgili yapılan çalışmalar yavaşlamıştır. Felix d'Herelle "bakteriyofajların zorunlu hücre içi paraziti" olduklarını iddia etmiştir (Harper ve Kutter, 2008). Günümüzde antibiyotiğe dirençli

patojen bakterilerin gelişmesiyle birlikte faj uygulamaları yeniden ilgi odağı haline gelmiştir.

Emory Ellis ve arkadaşları “Tek Aşamalı Gelişme Kurvesi” adını verdikleri yöntem ile doğru ve istatistiksel olarak geçerli ölçümler yaparak bakteriyofajın bakteriye penetrasyonunu ve bakteriyofaj partiküllerinin bakteri hücresi içinde çoğalma ve gelişme sürecini elektron mikroskobu ile şemalaştırmışlardır (Pennazio, 2006). Şekil 2.1’de fajların tarihçesi verilmiştir.

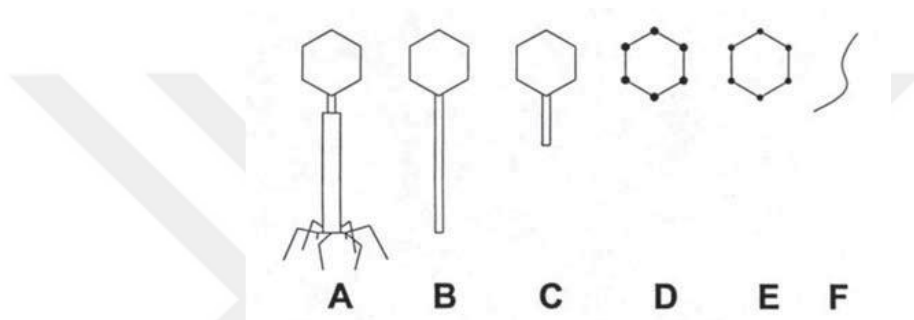


Şekil 2.1. Bakteriyofajların tarihçesi (O’Flaherty vd., 2009)

Bakteriyofajların sınıflandırılmasında morfolojik özellikler ile genomik materyalin yapısı dikkate alınmaktadır. Bakteriyofaj genomu tek tip nükleik asit olup ya tek zincirli ya da çift zincirli DNA veya RNA’dan oluşmaktadır. Morfolojik özelliklerinde ise kuyruklu veya kuyruksuz, başlı veya başsız, zarlı veya zarsız gibi özellikleri dikkate alınmaktadır (Sharp, 2001).

Fajlar, ilk kez 'Hérelle tarafından birçok ırktan oluşan tek bir faj grubu olarak sınıflandırılmıştır (d'Hérelle, 1918). 1948 yılında Holmes morfoloji ve nükleik asit tipine bağlı olarak virüs sınıflandırma sistemini geliştirmiştir. Buna göre fajlar, bir alt-sınıf, tek

bir aile ve Virölans sınıfının tek bir cinsi olarak sınıflandırılmıştır (Lwoff vd., 1962). 1967 yılında Bradley, sahip oldukları nükleik asit tipine ve morfolojik yapılarına (baş ve kuyruk özelliklerine) göre fajları 6 tip (A-F) olarak gruplandırmıştır. Bu sınıflandırmada kasılabilen kılıflı, kuyruklu, çift iplikli linear DNA fajlar A tipi faj; uzun kuyruklu, kılıflı, çift iplikli linear DNA fajlar B tipi fajlar; kısa kuyruklu, kılıfsız, çift iplikli linear DNA fajlar C tipi fajlar; kuyruksuz, büyük kapsomerli, tek iplikçi DNA fajlar D tipi fajlar; kuyruksuz, küçük kapsomerli, tek iplikçi RNA fajlar E tipi fajlar; başsız, ipliksi ya da filamentöz, tek iplikçi RNA fajlar ise F tipi fajlar olarak isimlendirilmiştir (Şekil 2.1) (Bradley, 1967).



Şekil 2.2. Bakteriyofajların Bradley sınıflandırması (Bradley, 1967)

Ackermann (2003) tarafından yapılan sınıflandırmada fajların morfolojik özellikleri ile birlikte nükleik asit yapıları dikkate alınmış ve buna göre fajlar, dört gruba ayrılmış ve 1 takım, 13 aile ve 31 cins olarak tanımlanmıştır (Çizelge 2.1). Çizelge 2.1’de ”Ackermann Sınıflaması” olarak adlandırılan sınıflandırma modeli verilmiştir (Ackermann, 2003; Ackermann, 2007). Ackermann sınıflandırılmasında fajlar morfolojik yapıları esas alınarak 4 grupta toplanmıştır: Kuyruklu, polihedral, filamentöz ve pleomorfik fajlar (Regenmortel vd., 2000).

Bakteriyofajların %96’sını oluşturan kuyruklu fajlar, nükleik asit olarak çift sarmallı DNA’ya, bu DNA’yı saran kapside ve düz görünümlü uzun veya kısa bir kuyruğa sahiptirler. Kuyruklu fajların DNA içeriği ve bileşimi, boyutları, ince yapısı ve fizyolojisi dikkate alındığında çok fazla çeşitleri mevcuttur. Kuyruk ucunda altıgen şeklinde olan taban levhasında genellikle 6 adet diken ve/veya 6 adet kuyruk iplikçiği yer alır. Bakteriyofajlarda tutunma veya adsorbsiyon organeli olarak görev yapan kuyruk kısmı, aynı zamanda genetik maddenin bakteriye taşınmasında da bir kanal ya da köprü vazifesi görür (Ergüllü, 1982; Kınık vd., 2000; Ackermann, 2003). Kuyruklu fajlar, *Myoviridae*,

Siphoviridae ve *Podoviridae* olarak üç aileye ayrılır. Kuyruklu fajların % 25'ini oluşturan *Myoviridae*'ler kasılabilir kuyruğa, %61'ni oluşturan *Siphoviridae*'lar, uzun kuyruğa ve %14'ünü oluşturan *Podoviridae* kısa kuyruğa sahiptirler (Ackermann, 2003).

Polihedral fajlar nükleik asit olarak DNA veya RNA içermektedirler. Bu grupta *Microviridae* (ssDNA), *Corticoviridae* (dsDNA), *Tectiviridae* (dsDNA), *Leviviridae* (ssRNA) ve *Cystoviridae* (dsRNA) yer almaktadır. DNA içeren pleomorfik fajlar içerisinde ise *Plasmaviridae* (dsDNA), *Fuselloviridae* (dsDNA) aileleri bulunmaktadır (Ackermann, 2003).

Çizelge 2.1. Bakteriyofajların Ackermann sınıflandırılması (Ackermann, 2003; Ackermann, 2007)

Morfoloji	Nükleik Asit	Takım ve Familya	Cins	Örnek	Özellikleri
Kuyruklu	DNA, ds, L	<i>Caudovirales</i> <i>Myoviridae</i> <i>Siphoviridae</i> <i>Podoviridae</i>	15 6 6 3	T4 λ T7	Kontraktıl kuyruk Uzun kuyruk Kısa kuyruk
Polihedral	DNA, ss, C ds, C, T ds, L RNA, ss, L ds, L, S	<i>Microviridae</i> <i>Corticoviridae</i> <i>Tectiviridae</i> <i>Leviviridae</i> <i>Cystoviridae</i>	4 1 1 2 1	ϕ X174 PM2 PRD1 MS2 ϕ 6	Lipit içeren kompleks kapsid Lipoprotein kaplı kapsid
Filamentöz	DNA, ss, C ds, L ds, L	<i>Inoviridae</i> <i>Lipothrixviridae</i> <i>Rudiviridae</i>	2 1 1	fd TTV1 SIRV	Lipit zarf Uzun veya kısa filament TMV benzeri
Pleomorfik	DNA, ds, C, T ds, C, T	<i>Plasmaviridae</i> <i>Fuselloviridae</i>	1 1	L2 SSV1	Zarf, lipid, kapsid yok Limon formu, kapsid yok

C, dairesel; L, linear; S, segmentli; T, süper helikal; 1, tek zincirli; 2, çift zincirli.

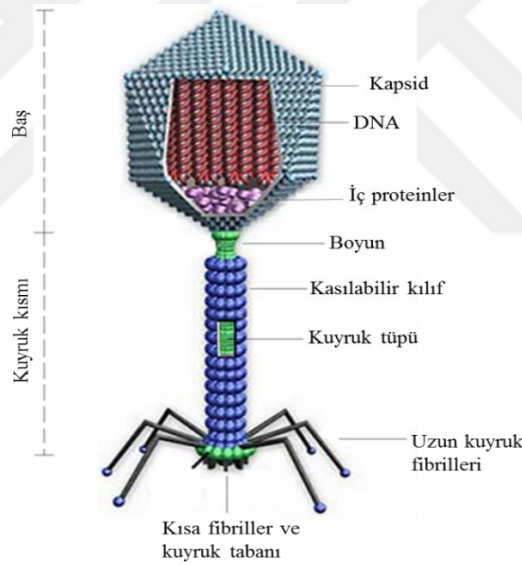
2.4 Bakteriyofajların Genel Özellikleri

Her biri sadece bir tür veya birkaç tür bakteri veya archaea'yı enfekte edebilen binlerce faj çeşidi vardır. Tüm virüsler gibi, fajlar da bir protein kapsidiyle çevrelenmiş bir genetik materyal (nükleik asit) çekirdeğinden oluşan basit organizmalardır. Nükleik asit, çift iplikli veya tek iplikli DNA veya RNA olabilir. Fajın üç temel yapısal formu vardır: kuyruklu bir icosahedral (20- Taraflı) baş, kuyruksuz bir icosahedral baş ve filamentli form. Bir faj partikülü temel olarak nükleik asit (%40'ı) ve kapsit (%60'ı) adı verilen protein kılıfından oluşur. Fajda nükleik asit olarak ya DNA ya da RNA vardır ve bu

nükleik asitler çift veya tek sarmallı olabilmektedirler. Yapılan çalışmalar ile fajlarda çoğunlukla nükleik asit olarak DNA bulunduğu tespit edilmiştir (Ackermann, 2007).

Çok farklı şekil ve boyutta olan fajların büyüklükleri de 24-200 nm arasında değişim gösterir. En büyük faj, T4 fajı olup yaklaşık 200 nm uzunluğa ve 80-100 nm genişliğe sahiptir. Bir fajın ağırlığı 5×10^{-13} gramdır (Ackermann ve Kropinsk, 2007; Ackermann, 2007; Regenmortel vd., 2000).

Baş, boyun, kuyruk, taban ve taban uzantıları gibi kısımlardan meydana gelen fajların baş kısmı yumak şeklindedir ve bu kısımda nükleik asit molekülü bulunur. Nükleik asit molekülü kapsit adı verilen protein kılıfı ile sarılmıştır. Birbirine benzer kapsomer adı verilen alt birimlerden oluşan kapsit prizma şeklindedir (Ergüllü, 1982; Kılıç, 2010). Şekil 2.3’de kuyruklu bir bakteriyofajın 2 ve 3 boyutlu yapısı verilmiştir.



Şekil 2.3. Kompleks bir bakteriyofajın yapısı

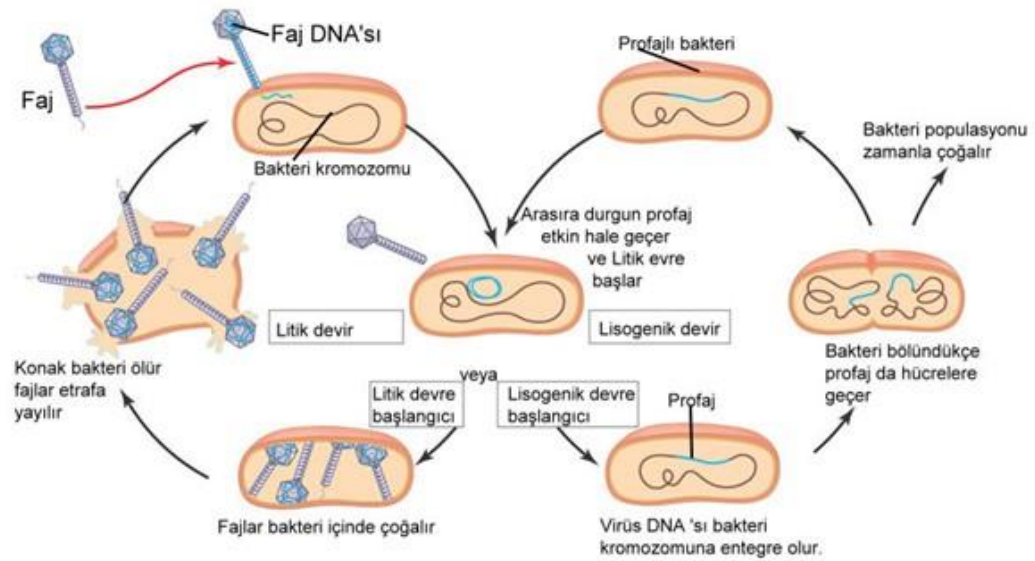
Enerji üretebilecek hiçbir genetik bilgiye sahip olmayan fajlar yaşamak ve çoğalmak için konak bakteriye ihtiyaç duyan zorunlu bakteriyel parazitlerdir. Fajların rastgele bir şekilde bakteriyi seçmediği, genellikle yüksek düzeyde konakçı-spesifik olmaları nedeniyle sadece spesifik türleri veya hatta suşları enfekte edebildikleri yapılan çalışmalar ile desteklenmiştir (Hyman ve Abedon, 2010; Rakhuba vd., 2010; Kim ve Ryu, 2011; 2013; Kim vd., 2013). Fajların konakçı spesifikliğı ise kuyruk kısmında yer alan ve konakçı bakterilerin hücre çeperinde bulunan protein, lipopolisakkarit, taykoik asitler,

pili ve flagella gibi spesifik reseptörlere bağlanan proteinlerinden kaynaklanmaktadır (Rakhula vd., 2010). Bu spesifik bağlanmaya bağlı olarak fajlar konakçı dışındaki mikrobiyotaya hiçbir zarar vermeden sadece konakçı bakterileri lize etmektedirler (Meaden ve Koskella, 2013; Sulakvelidze vd., 2011). Örneğin, yapılan bir araştırmada Salmonella'ya özgü ST27, ST29 ve ST35 bakteriyofajların, tüm Salmonella serovarlarının hücre yüzeyinde bulunan TolC reseptörlerine spesifik olarak bağlanırken aynı bakteriyofajların diğer Enterobacteriaceae türlerine karşı herhangi bir aktivite göstermediği tespit edilmiştir (Ricci ve Piddock, 2010). Ayrıca daha az spesifik olmakla birlikte bazı fajların, birçok benzer bakteri türünü enfekte edebildiği saptanmış olup bu olgu, “yerel adaptasyon” olarak adlandırılmıştır (Flores vd., 2011; Hyman ve Abedon, 2010; Koskella vd., 2011; Vos vd., 2009).

2.5 Bakteriyofajların Yaşam Döngüleri

Fajlar, bir bakteriyi enfekte etmeden önce enfekte edeceği bakterinin hücre duvarında bulunan reseptörlere bağlanmalıdır (Chatterjee ve Rothenberg, 2012). Bu bağlanma spesifitesi, fajın konak aralığını veya fajın enfekte edebileceği konakçı tipini belirler. Fajlar, konakçı bakteri içine girdiğinde tipik olarak litik (virülant) veya lizojenik (ılıman) yaşam döngüsü gösterir. Litik yaşam döngüsünde, fajlar daha fazla faj üretmek için bakteri hücre içine faj transdüksiyonu ile girer, bakterinin çoğalma mekanizmasını kullanır ve hızlı konak ölümüne (bakteriyel hücre lizisine) yol açar (Wright vd., 2013). Lizojenik yaşam döngüsünde ise faj bakteriyi parçalamaz, konakçı hücrenin kromozomu ile birleşerek bakterinin canlılığını ve çoğalmasını olumsuz bir şekilde etkilemeden hücre içinde tutulu kalır. Bir fajın yaşam döngüsünün ne olacağı, operatör bölgesine bağlanan CRO ve CI proteinleri arasındaki öncelikle ilişkilendirilmektedir. Eğer bağlanma CI proteini ile gerçekleşirse lizojenik yaşam döngüsü, CRO proteini ile gerçekleşirse litik yaşam döngüsü oluşmaktadır. Yani proteinlerden hangisi operatöre önce bağlanırsa, kendi sentezine başlamakta ve diğer proteinin sentezine engel olmaktadır (Hendrix, 2002; Guttman vd., 2005). Ayrıca çok nadir rastlanmakla birlikte filamentli olarak adlandırılan üçüncü bir yaşam döngüsü de bulunmaktadır. Bu döngüde de diğer iki döngüde olduğu gibi bakteri kromozomunun içine faj transdüksiyonu ile bakterinin çoğaltma mekanizması kullanılır fakat filamentli sistemler hücre ölümü, sürekli faj üretimi ve fajların çevreye salınımı ile sonuçlanmamaktadır (Yee et al., 2013).

Litik ve lizojenik yaşam döngüsünde, fajın konak bakteriye tutunma ve DNA'sını enjekte etme (penetrasyon) aşamaları benzerdir (Şekil 2.3). Litik yaşam döngüsü, adsorpsiyon, penetrasyon, biyosentez, olgunlaşma ve lizis evrelerinden oluşmaktadır (Şekil 2.3). Lizojenik yaşam döngüsünden 'Latent Dönem' olarak adlandırılan sürecin başlaması ile ayrılan litik yaşam döngüsünde faj, bakteri hücre duvarına tutunarak nükleik asidini bakteri içerisine enjekte eder. Adsorbsiyonun (tutunmanın) ilk aşamasında bakteri yüzeyi ile faj arasındaki etkileşim geri dönüşümlüdür. Fakat zamanla bu bağlanma kuvvetlenerek geri dönüşümsüz bir hal alır. Penetrasyon aşamasında kromozomunu konak hücreye enjekte eden faj, biyosentez aşamasında bakterinin metabolizmasını kullanarak kendi yapısal bileşenleri ile enzimlerini sentezler ve faja ait kromozomun çoğalmasını sağlar. Olgunlaşma aşamasında, ayrı ayrı sentezlenen bu yapı taşları bir araya gelerek olgun faj partiküllerini oluştururlar. Hücre içerisinde yeterince gelişen ve olgunlaşan fajlar belirli bir sayıya eriştikten sonra bakteriyi parçalayarak serbest kalır ve yeni konak bakterilerini enfekte edip yeni yaşam döngüsünü oluştururlar (Şekil 2.3) (Hendrix, 2002; Hanlon, 2007; Sulakvelidze ve Kutter, 2005).



Şekil 2.4. Bakteriyofajların yaşam döngüsü

Lizojenik yaşam döngüsünde, fajlar, enfeksiyondan sonra bakteri kromozomuna entegre olur ve profaj şeklini alarak konak hücrede bazen fenotipik değişimlere ve üstelik profaj virülant gen taşıyorsa bakteri patojenitesinin artmasına bile sebep olur (O'Brien vd., 1984; Guttman vd., 2005). Lizojenik yaşamda bakteri içinde faj çoğalması, bakterinin canlılığını, üremesini ve çoğalmasını etkilemediği için bu tür fajlar temperate ya da ılımlı

faj olarak adlandırılır. DNA'sı ile bütünleşmiş faja sahip bakteri lizojen bakteri, bu olay lizojeni ve bağlanan faj da profaj olarak tanımlanır. Diğer bakteriler gibi çoğalan ve hayati fonksiyonlarını devam ettiren lizojenik bakterilerden iki yavru lizojenik bakteri oluşur ve bakteriyel ölüm sadece çevresel uyarıcılar tarafından başlatıldığında ortaya çıkar (Şekil 2.3). Bu çevresel uyarıcılar aşağıda verilmiştir (Acar Soykut ve Tunail 2009a; Hogg, 2005; Kılıç, 2008);

- a) Profaj içeren bakteri DNA'sında hasara sebep olan işlemler: Radyasyon, UV ışığı, reaktif oksijen radikalleri, antibiyotik özellikle mitomisin C antibiyotiğinin düşük dozdaki uygulaması
- b) Profaj içeren bakterinin gelişme koşullarında meydana gelen değişimler: İnkübasyon sıcaklığının değişmesi, gelişme ortamında besin madde miktarının azalması

Bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede ve gıda güvenliğinde patojenik biyokontrol yöntemlerinde litik fajların kullanımı uygun olmakla birlikte lizojenik fajların kullanımı uygun görülmemiştir (Prescott vd., 2005).

2.6 Gıda Endüstrisinde Bakteriyofajların Biyokoruyucu Olarak Kullanım Olanakları

Günümüzde teknolojinin ilerlemesine ve gıda güvenirliliği ile ilgili yasaların uygulamada olmasına karşın gıda kaynaklı hastalıklar ve zehirlenmeler önemli bir problem teşkil etmektedir. Bu nedenle son 20 yılda hasat/kesim, sağım, işleme, depolama, paketleme, aşamalarında gıdalara bulaşabilen bakteriyel patojenlere karşı gıda ürünlerinin üretimden tüketime kadar güvenilirliğinin sağlanması için bakteriyofajların doğal antimikrobiyal ajan olarak kullanım potansiyellerinin araştırılmasına hız verilmiştir. Yapılan araştırmalarla fajların doğada yaygın olarak bulunmaları, nispeten kolay kullanımları, güvenli olmaları, yüksek spesifik antimikrobiyal aktivite göstermeleri, kendi kendine replikasyon ve kendi kendini sınırlayan doğaları nedeniyle sentetik antimikrobiyallere karşı alternatif olarak kullanılabilecekleri gösterilmiştir (Atterbury vd., 2005; Martinez vd., 2008; Tabla vd., 2012; Bueno vd., 2012; Oliver vd., 2000). Ayrıca bakteriyofajların insan sağlığını etkilemeden, gıdaların kimyasal, fiziksel ve duyuşal özelliklerinde herhangi bir değişime uğratmadan gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakterilerin

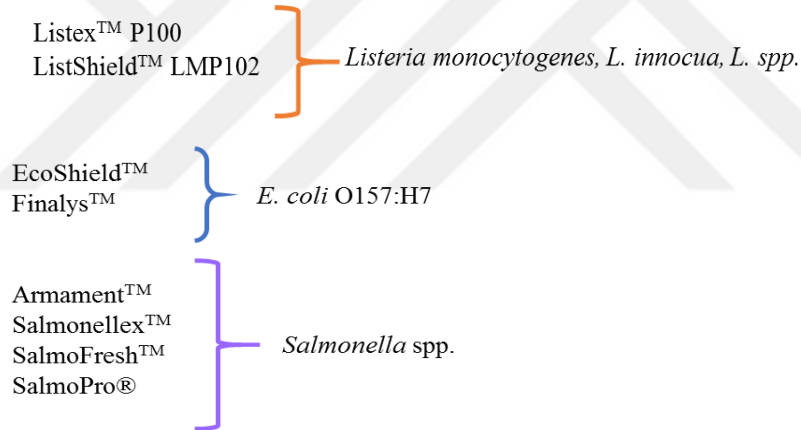
gelişimlerinin kontrol altına alınmasında etkin oldukları tespit edilmiştir (Greer, 2005; Garcia vd., 2008; Coffey vd., 2010).

Bakteriyofajlar, çiftlik hayvanlarında görülen hastalıkların önlenmesi (faj terapisi), çiğ ürünlerin dekontaminasyonu, alet-ekipman ve yüzeylerin dezenfeksiyonu (biyosanitasyon), hızlı bozulan gıdaların raf ömrünün uzatılması (biyokoruyucu) gibi gıda zincirinin her basamağında uygulama alanı da bulmuştur. Ayrıca bakteriyofajlar, gıda kontaminasyonunun bir göstergesi olan patojen ve/veya bozulma etmeni bakterilerin gıdalarda varlıklarının tespitinde ve bakterilerin kimliklendirilmesinde de kullanılma potansiyeline sahiptirler (Garcia vd., 2008; EFSA, 2009).

Tıbbi olarak fajların biyokoruyucu olarak kullanımı sonucunda herhangi bir yan etkiye neden olmadığı spesifik araştırmalarla ortaya konulmuş ve hatta yüksek konsantrasyonda oral yolla tüketilmeleri durumunda bile insanlara ve hayvanlara toksik etkili olmadıkları belirlenmiştir (Hanlon, 2007; Sulakvelidze ve Kutter, 2005). Fajlar gıda güvenirliliğini sağlamada mükemmel araç gibi görünseler de tüm fajların patojenik bakterilerin biyokontrolünde kullanımının uygun olduğu anlamı çıkarılmamalıdır. Çünkü lizojenik fajlar konakçıları öldürmeden bakteriyel kromozoma tutulu kalır ve böylece enfekte ettikleri bakteride fenotipik değişime ve hatta bazen konak hücrenin patojenitesinde artmaya neden olabilmektedirler (Hagens ve Loessner, 2010). Lizojenik dönüşümle patojenitesi artan bakterilere örnek olarak *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Clostridium botulinum* verilebilir. Kolera toksini CTXΦ fajında bulunan *ctxA* ve *ctxB* genleri; shiga-benzeri toksin (STX) lamda fajında bulunan *stx1* ve *stx2* genleri; botulunim toksini Clostridial fajlar tarafından kodlanmaktadır (Waldor ve Mekalanos, 1996; O'Brien vd., 1984). Buna ilaveten genelleşmiş transdüksiyon yapabilen fajların başına, faj DNA'sı yerine bakteri DNA'sının bir parçasının girmesi ve paketlenmesidir. Bu şekilde oluşan fajlar yine hedef bakteriyi tanır, ona tutunur ve viral olmayan DNA'yı alıcı bakteri kromozomuna rekombine edebilir ve bakteriye yeni genler aktarabilir. Bakteriye entegre edilen gene bağlı olarak bu rekombinasyon işlemi, aktarılan gen virülansa neden olan bir ürün kodlayıp patojen olmayan bakteriyi patojenik bir bakteriye dönüştürebilmektedir (Ikeda ve Tomizawa, 1965). Bu bilgiler doğrultusunda gıda endüstrisinde insan tüketimine yönelik gıdaya uygulanacak bir bakteriyofajın seçilebilmesi aşağıda belirtilen özellikleri taşıması gerekmektedir (Hagens ve Loessner, 2010).

- i) Litik ve GRAS statüsünde olmalıdır.
- ii) Enfekte ettiği konak hücre aralığı geniş olmalı, ancak patojen olmayan yararlı bakteriler üzerinde enfektif olmamalıdır.
- iii) Fajın tam genom dizisi bilinmeli ve faj transdüksiyonla gen aktarma mekanizmasına sahip olmamalıdır.
- iv) Alerjiye ve patojeniteye neden olan proteinleri kodlayan genlere sahip olmamalıdır.
- v) Oral yolla direkt alımla ilgili yapılan çalışmalarda herhangi bir yan etki göstermemiş olmalıdır.
- vi) Faj-konakçı etkileşiminin olduğu sıcaklık aralığı belirlenmelidir.
- vii) Gıda işleme koşullarına dayanıklı ve ticari boyutta üretimi kolay olmalıdır.

Kullanımı onaylanan faj preparatları aşağıda verilmiştir (FDA, 2006; FDA, 2011; Gillies, 2017; USDA FSIS, 2018).



Şekil 2.5. Faj preparatları

2.7 *Salmonella* Enteritidis ve Bakteriyofajlar Aracılığı ile Kontrolü

Gıda sektöründe her geçen gün bilimsel ve teknolojik yönden ilerlemeler kaydedilse de kontamine gıdanın ve suyun neden olduğu ciddi halk sağlığı problemleri hala en önemli gündem konusudur. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verileri incelendiğinde her yıl sanayileşmiş ülkelerin nüfusunun % 5-10'unun gıda kaynaklı hastalıklardan etkilendiği görülmektedir (CDC, 2013).

Günümüzde gıda kaynaklı bakteriyel patojenler arasında önemli bir yere sahip olan *Salmonella*'nın konakçısı ve asıl taşıyıcısı hayvanlardır ve bu bakteri insandan tavuğa, yılandan kaplumbağaya kadar çok sayıda farklı konakçıyı etkileyebilir. *Salmonella*'nın doğal yerleşim yeri insanların, vahşi kuşların, evcil hayvanların, kemiricilerin ve birçok hayvan türünün gastrointestinal sistemi olmakla birlikte hijyenik koşulların yeterli olmadığı bölgelerde çoğalmaksızın, uygun koşullar altında suda haftalarca, toprakta yıllarca canlı kalabilir ve bulaşı yolu ile hayvansal kökenli gıdalardan insanlara, insandan insana ve insandan hayvana geçebilirler (Bell ve Kyriakides, 2002; Cormican vd., 2002).

Salmonella serovarları genellikle 2-5 mikron uzunluğunda, 0.5-1.5 mikron genişliğinde ve peritrikus flagellaya sahip hareketli, fakültatif anaerobik Gram-negatif çubuk şekilli bakterilerdir. *Salmonellae*, Enterobacteriaceae familyasına ait olup hem insanlar hem de hayvanlar için tıbbi açıdan önemli bir patojendir. *Salmonella*, iki türden ve altı alt türden oluşan, 2600'den fazla serovar içeren karmaşık bir bakteri grubu oluşturur. *Salmonella* cinsi içinde yer alan iki tür *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori*'dir. Bunlar içinde en önemli tür *Salmonella enterica*'dır. *S. enterica*, biyokimyasal ve genomik özelliklerine bağlı olarak *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* ve *indica* alt türlerine ayrılabilir. İnsan ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturan suşların % 99'u *S. enterica* subsp. *enterica* alt grubunda yer almaktadır (Brenner vd., 2000). *Salmonellaların* çoğunluğu, oksidaz negatif, katalaz pozitif ve hidrojen sülfid üreticidir. *Salmonella*'nın tanımlanmasında kullanılan diğer biyokimyasal özellikler arasında tek karbon kaynağı olarak sitratı kullanması, lisini dekarboksile ve üreyi hidrolize etmesi yer almaktadır. *Salmonella* enfeksiyonların başlıca kaynağı evcil hayvanlar, özellikle sürüngenler, yeterince ısıtılma işlem uygulanmamış veya çiğ et ürünleri, deniz ürünleri ve yumurta, meyve veya sebzelerdir. İnsanlarda gıda kaynaklı hastalıklara sebep olan en yaygın serovar *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis veya kısaca *Salmonella* Enteritidis'dir (Bell ve Kyriakides, 2002; Cormican vd., 2002; Andino ve Hanning, 2015).

ABD'de *Salmonella*, en fazla sayıda ölüme neden olan ve en yüksek maliyet yüküne sahip gıda kaynaklı patojendir. 2010 yılı için salmonellozis ile ilişkili yıllık maliyetlerin 1,4 milyon vaka için 2,71 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir. Son on yıldaki en yüksek *Salmonella* salgın sayısı, ana rezervuar olarak kümes hayvanları ve kara hayvanları ile ilgilidir. İnsan salmonellozisin % 70'inden fazlası kontamine tavuk, hindi veya yumurta

tüketimine atfedilmiştir (Batz vd., 2012; CDC, 2013; USDA, 2013). *Salmonella enterica* serovarlarının neden olduğu gıda kaynaklı hastalık tifoid olmayan salmonellozis veya kısaca salmonellozis (gastroenterit, akut bağırsak enfeksiyonu) olarak ifade edilmektedir. Tifoid olmayan salmonellozis vakaları gastroenterit veya bakteriyemi ile karakterize edilir. Gıda kaynaklı salgınlara neden olan *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Newport* ve *S. Heidelberg*'i dahil birçok serovarin rezervuarı çiftlik hayvanları olduğundan salmonellozis fekal-oral yolla yayılmaktadır. Salmonellozise neden olan en önemli serovarlardan birisi *S. Enteritidis*'tir. Salmonellozisin belirtileri mide bulantısı, kusma ve ishaldir ve ayrıca tipik olarak 7 gün süren kendiliğinden sınırlayıcı özelliğe sahiptir. Enfektif dozu 10^6 - 10^9 hücre sayısı arasında olmakla birlikte enfektif doz, gıdanın çeşidine, bakterinin serotipine, tüketicinin yaşına ve fizyolojik şartlarına bağlı olarak değişiklik gösterebilir (Mead vd., 1999; Wright vd., 2009; Coffey vd., 2010). WHO'nun verilerine göre de son 30 yılda gıda kaynaklı insan hastalıklarında *Salmonella* serotipleri arasında *S. Enteritidis*'in çarpıcı bir şekilde öne çıktığı görülmüştür (Schlundt, 2002).

Yapılan literatür taraması sonucunda *Salmonella* serovarlarının fajlar vasıtasıyla biyokontrolü amacıyla *in vivo* ve *in vitro* çalışmaların yapıldığı gözlenmiştir.

Goode vd. (2003) yaptıkları bir çalışmada, virülant bakteriyofajları tavuk derisine çoklu enfeksiyon değeri (MOI) 1 olacak şekilde uygulandığında *S. Enteritidis* sayısında yaklaşık 1 log'luk; MOI değeri 100-1000 olacak düzeyde uygulandığında ise 48 saatlik depolama süresi içinde 2 log'luk azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar tavuk derisine uygulanan bakteri düzeyi 2 log ve faj konsantrasyonu 10^5 olduğunda *Salmonella* sayısının tespit edilemeyecek seviyenin altına düştüğü ve 4°C'de depolama süresince de bakterinin tespit edilmediğini ifade etmişlerdir.

S. Enteritidis ile 10^3 kob/g düzeyinde kontamine edilmiş hindi karkasları $5,5 \times 10^8$ veya 10^{10} pob düzeyinde PHL 4 faj ile muamele edildiğinde, *Salmonella* sayısının tespit edilebilir düzeyin altına düşürdüğü bildirilmiştir (Higgins vd., 2005). Fiorentin vd., (2005) tavuk derisine inoküle edilen *Salmonella* fajlarının *Salmonella* sayısını önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir. Tavuklara 10^{11} pob düzeyinde faj uygulandığında inoküle edilen *Salmonella* Enteritidis sayısını fekalde etkili bir şekilde (3,5 log) azalttığı belirtilmiştir. Başka bir çalışmada *S. Enteritidis* ile enfekte edilen tavuklara 21 gün boyunca 10^9 pob düzeyinde bakteriyofaj verildiğinde bakterinin tavuk bağırsağında

kolonize olamadığı ve bağırsakta bakteri gelişiminin olmadığı belirtilmiştir (Lim vd., 2012). Araştırmacılar faj terapisi ile tavuk etine geçen patojenik bakteri sayısının kontrol altına alınabileceğini ortaya koymuşlardır.

Hungaro vd. (2013) yaptıkları bir çalışmada *S. Enteritidis* ile 10^5 kob/cm² düzeyinde enfekte edilen tavuk derisi 10^9 pob/mL düzeyinde faj içeren solusyonda 30 dakika bekletildiğinde bakteri sayısında 1 log'luk azalma olduğunu bildirmişlerdir. Sodyum dikloroisosiyanurat (200 ppm, 10 dk), perasetik asit (100 ppm, 10 dk) ve laktik asit (%2, 90 sn) uygulanan örneklerde ise yaklaşık 0,81 log kob/cm²'lik azalma olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar fajla muamele edilen tavuk derisinde faja dirençli *S. Enteritidis*'lerin oluşup oluşmadığını analiz etmek amacıyla, bu örneklerde *Salmonella* gelişimi gözlenmiş Petri plaklardan rastgele 30 koloni alınmış ve çalışmada kullanılan 5 farklı faj karşı test edilmiştir. Analiz sonucunda, tüm *S. Enteritidis* izolatlarının beş fajın hepsine duyarlı oldukları ve direnç kazanmadıkları bildirilmiştir.

Gonçalves vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, kanalizasyon suyundan izole edilen litik bakteriyofajlardan oluşan faj kokteyli 10^7 kob/mL düzeyinde oral olarak *S. Enteritidis* verilen 45 günlük broyler tavuklara 1 saat sonra oral olarak verilmiştir. Faj uygulamasından hemen sonra ve 30 dakika, 1, 3, 6 ve 12 saat sonra, tavuklar kesilmiştir. Kalın bağırsak ve ürünler *Salmonella*'nın varlığı için analiz edilmiştir. Faj terapisinden 3 saat sonra sırasıyla *Salmonella* sayısının kalın bağırsakta 10^3 kob/g ve tavuk etinde 10^1 kob/g olduğu, terapiden 6 saat sonra kalın bağırsakta 10^3 kob/g iken, tavuk etinde *Salmonella* sayısının tespit edilebilir limitin altında olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar bakteriyofaj tedavisinin, tavuklarda kesim öncesi *Salmonella* düzeyini düşürmek suretiyle karkas kontaminasyonunu azaltabileceği sonucuna varmışlardır.

Galarce vd. (2014), bakteriyofajların çiğ ve füme edilmiş somon balığı etinde *S. Enteritidis* üzerine etkinliğini belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, örnekleri *S. Enteritidis* ile kontamine ettikten sonra 5 farklı fajdan oluşan faj kokteyli ile muamele etmişler ve on gün boyunca 18°C ve 4°C'de inkübe etmişlerdir. 18°C ve 4°C'de muhafaza edilen çiğ somon eti örneklerin başlangıç kontaminasyon düzeyinin sırasıyla 2,9 ve 4,9 log kob/g; füme somon eti örneklerinde ise 3,2 ve 4,2 log kob/g olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonucunda 18°C'de muhafaza edilen çiğ somon örneklerde 0,75-3,19 log kob/g; 4°C'de bekletilen örneklerde 2,82-3,12 log kob/g düzeyinde *Salmonella* sayısında azalma

meydana geldiği belirlenmiştir. Bakteriyofajların füme somonda etkinliklerinin düşük olduğu, 18°C'de depolanan örneklerde 1,02-1,96 log kob/g, 4°C'deki örneklerde ise 0,50-1,16 log kob/g düzeyinde bir düşüş olduğu belirtilmiştir. Fajların her iki depolama sıcaklığında somon balığı etinde stabilitelerini korudukları da ifade edilmiştir.

Augustine ve Bhat (2015) tarafından yapılan bir çalışmada *S. Enteritidis* ile enfekte edilen (10^3 kob/mL) tavuk eti örnekleri yüksek (10^6 pob/mL) ve düşük dozda (10^4 pob/mL) bakteriye spesifik ϕ SP-1 and ϕ SP-3 fajlarla muamele edildikten sonra 4, 28 ve 37°C'de 3 gün depolanmışlardır. Araştırma sonucunda 4°C'de 3 gün muhafaza edilen örneklerde bakteriyofajlar yüksek dozda tek tek uygulandığında bakteri sayısında 2,46 ve 2,1 log kob/mL, düşük dozda uygulandığında ise 0,98 ve 0,52 log kob/mL düzeyinde azalmaya neden olduğunu bulmuşlardır. Oda sıcaklığında (25°C) muhafaza edilen örneklerde bakteriyofajlar yüksek dozda uygulandığında 3,99 ve 3,46 log kob/mL, düşük dozda uygulanan örneklerde 2,51 ve 2,3 log kob/mL, 37°C'de muhafaza edilen örneklerde ise yüksek dozda uygulanan örneklerde 1,98 ve 2,38 log kob/mL, düşük dozda bakteriyofaj uygulanan örneklerde 1,52 ve 1,98 log kob/mL düzeyinde bakteri sayısında bir düşüş olduğu belirtilmiştir. Fajlar kokteyl şeklinde uygulandığında enfektif etkinin arttığı ve 37°C'de 3 gün muhafaza edilen örneklerde bakteri sayısının 3,52 log kob/mL, 4°C ve oda sıcaklığında muhafaza edilen örneklerde ise tespit edilemeyecek seviyenin altına düştüğü belirtilmiştir.

Bao vd., (2015) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *S. Enteritis* ATCC13076 ve CVCC2184 serovarları ile 1×10^4 kob/ml düzeyinde tek tek ve kombine olarak kontamine edilen tavuk göğüs eti örnekleri PA13076 and PC2184 fajlarıyla 1×10^8 pob/mL düzeyinde tek tek ve kokteyl olarak uygulanmış ve 4°C ile 25°C'de 5 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Araştırma sonucunda bakteriyofajların stabilitelerini ette korudukları ve inhibitör etkilerinin 4°C'ye göre 25°C'de daha iyi olduğu, 3 saatlik depolama sonucunda bakteri sayısında yaklaşık 2-3 log'luk azalmaya neden olduklarını bulmuşlardır.

Farklı gıdalarda (hindi eti, çikolatalı süt, sosis, deniz mahsülleri, yumurta sarısı ve Cheddar peyniri gibi) gerçekleştirilen çalışmalarda bakteriyofajların *Salmonella* sayısını belirlenemeyecek seviyenin altına düşürdüğü ortaya konmuştur (Guenther vd., 2012; Modi vd., 2001). Faj içermeyen kontrol örneklerinde ise *Salmonella* sayısının arttığı tespit

edilmiştir. Ye vd. (2009) tarafından yapılan ve domateslerin üretimi sırasında *Salmonella* Javiana üremesini durdurmak için *Enterobacter asburiae* JX1 ve 5 farklı litik bakteriyofaj kombinasyonun kullanıldığı çalışmada ise biyokontrol için kullanılan bu faj karışımının gelişim sırasında etkili olmasına karşın hasat sonrasındaki uygulamalarda tek başına *Salmonella* kontrolünde etkili olmadığı sonucuna varılmıştır.

Bigwood vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, düşük (<100 hücre/cm²) ve yüksek (10^4 hücre/cm²) düzeyde *S. Typhimurium* PT160 bulaştırılmış, daha sonra düşük (10) ve yüksek (10^4) MOI düzeyinde *S. Typhimurium* P7 fajı enfekte edilmiş olan çiğ ve pişmiş sığır eti örnekleri 5°C ve 24°C’de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnek tipine ve inkübasyon derecesine bağlı olarak *Salmonella* sayısında meydana gelen düşüşün değişkenlik gösterdiği, yüksek faj ve *S. Typhimurium* uygulanan et örnekleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, *Salmonella* sayısında 5°C’de 2-3 log kob/cm², 24°C’de ise $>5,9$ log kob/cm² seviğinde bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir.

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Çalışmada gıda maddesi olarak kullanılan tavuklar Niğde'deki marketten, bakteriyofajlar ise Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden temin edilmiştir. Bu çalışmada, TÜBİTAK tarafından desteklenen 213O035 numaralı proje kapsamında tanımlanan *Salmonella* Enteritidis'i enfekte eden SEnt-P1, P2, P3 ve P4 kodlu fajlar kullanılmıştır. *Salmonella* Enteritidis %20 gliserol içeren brain hearth infusion (BHI) besiyerinde -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2 Metot

3.2.1 Faj örneklerinin hazırlanması

Faj örnekleri ve konak bakteri 1:100 oranında nutritent broth besiyeri içerisine ilave edildikten sonra gece boyunca çalkalamalı inkübatörde (100 devir/dk) 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra kültür santrifüj edilmiş (6000×g'de 15 dk) ve filtrat sırasıyla 0,45 ve 0,22 µm gözenek çaplı steril membran filtrelerden geçirilmiştir. Faj örnekleri hemen kullanılacak ise 4°C'de, uzun süre kullanılmayacak ise %30 gliserol içeren SM tamponu (50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 99 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 0,01% jelatin) içinde -80°C'de muhafaza edilmiştir (Kocharunchitt vd., 2009). Faj sayısı çift tabaka plak agar yöntemiyle belirlenmiş ve sonuçlar mililitredeki plak oluşturma birimi (pob/mL) şeklinde belirtilmiştir (Adams, 1959).

3.2.2 Tavuk derisi ve tavuk göğüs et örneklerinin hazırlanması

Çalışmada kullanılan tavuk etleri Niğde'deki marketten temin edilmiş ve aseptik koşullarda Gıda Mühendisliği Mikrobiyoloji laboratuvarına getirilmiştir. Aseptik koşullar altında tavuk derisi ve tavuk göğüs kısımları elde edilmiştir. Tavuk derisi yaklaşık 4 cm² büyüklüğünde, tavuk göğüsü de yaklaşık 5 gram ağırlığında ve yüzey alanı 4 cm² olacak şekilde kesilip steril polietilen stomacher poşetlere konulmuştur.

3.2.3 Tavuk derisi ve tavuk göğüs et örneklerinin bakteriyofaj ve test bakterisi ile inokülasyonu

Steril koşullarda hazırlanan tavuk derisi ve tavuk göğüs et örneklerin yüzeylerine yaklaşık 10^3 ve 10^6 kob/g düzeyinde olacak şekilde nalidiksik aside dayanıklı *S. Enteritidis* MET-S1-411 kültüründen konulmuş ve Salmonellanın et ve deri yüzeyine adsorbe olabilmeleri için 15-20 dk bekletilmiştir. Her bir tavuk eti örneği bakteriye spesifik SEnt-F1, F2, F3, F4 ile tek tek ve kokteyl olarak 10^8 - 10^9 pob/g düzeyinde inoküle edildikten sonra buzdolabı sıcaklığında (4°C) 8 gün ve oda sıcaklığında (25°C) 4 gün depolanmışlardır. Depolamanın belirli günlerinde (4°C 'de muhafaza edilen örneklerden depolamanın 0. ve 3. saati ile 1., 3., 5. ve 8. günlerinde, 25°C 'de bekletilen örneklerden 0. ve 3. saati ile , 1., 2. ve 4. günlerinde) örnekler alınıp 20 mL fosfat tamponu ilave edilerek stomacher'da 2 dakika süreyle parçalanmıştır. Dilüsyonlar hazırlandıktan sonra bakteri ile faj sayımı yapılmıştır.

Bakteriyofajların buzdolabı koşullarındaki stabilitesi ile bu koşullarda meydana gelebilecek kontaminasyonlara karşı etkinliğini ortaya koymak amacıyla ayrı bir deneme planı oluşturulmuştur. Bu deneme planında steril stomacher poşetlerine konulan tavuk göğüsü örneklerine (5 g) 10^9 pob/g düzeyinde bakteriyofaj örnekleri tek tek ve kokteyl olarak ilave edilmiştir. Bakteriyofaj içeren et örnekleri buzdolabında muhafaza edilmiştir. Depolamanın 0., 1., 3., 5. ve 8. günlerinde rastgele alınan tavuk göğüsü örneklerine yaklaşık 10^3 ve 10^6 kob/g düzeyinde *S. Enteritidis* ile inoküle edilip 3 saat bekletilmiştir. Bu işlemin sonunda et örneklerine 20 mL fosfat tamponu eklenip stomacher ile 1 dk homojenize edilmiş ve dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan bu dilüsyonlardaki Salmonella ile faj sayısı belirlenmiştir.

Denemelerde pozitif kontrol örneği olarak sadece bakteri veya fajla inoküle edilen tavuk derisi ve eti, negatif kontrol olarak bakteri ve fajla inoküle edilmemiş et örnekleri kullanılmıştır.

3.2.4 *Salmonella Enteritidis* sayımı

Tavuk göğüsü ve tavuk derisi örneklerinde *S. Enteritidis* sayımı 35 - 37°C 'de 24-48 saat nalidiksik asit ilave (50 ppm) edilmiş BHI agar kullanılarak yapılmıştır.

3.2.5 Bakteriyofaj sayısının belirlenmesi

Örneklerde faj sayısının belirlenmesinde çift tabaka plak agar metodu kullanılmıştır. Depolamanın belirli periyodlarında alınan örneklerden dilüsyonlar hazırlanmış ve dilüsyonlardan alınan 100 µl'lik hacim, konak hücre içeren (300 µL) 45-50°C'deki nutrient yumuşak agara ilave edilip karıştırıldıktan sonra katılmış nutrient agar içeren Petrilerin üzerine dökülmüştür. Örnekler 37°C'de 24-48 saat inkübasyon işlemine tabi tutulduktan sonra plak sayımı yapılmıştır (Adams, 1959).

3.2.6 Bakteriyofajla muamele edilen et ve deri örneklerinde faja dayanıklı *Salmonella enteritidis* suşların oluşup oluşmadığının belirlenmesi

Bakteriyofaj uygulanan et ve deri örneklerinde *S. Enteritidis* gelişmesi durumunda petrilere rastgele yaklaşık 50 tane (25 adet et ve 25 adet deri örneklerinden) koloni alınıp BHI besiyerinde geliştirildikten sonra çalışmada kullanılan bakteriyofajlara karşı test edilmiştir.

3.2.7 İstatistiksel değerlendirme

Üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilen araştırmada elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS (version 11.0; SPSS, Chicago, IL, USA) paket programı ile ANOVA varyans analizi kullanılarak yapılmıştır.

BÖLÜM IV

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Düşük Dozda *S. Enteritidis* ile Kontamine Edilen Tavuk Göğüs Eti ve Tavuk Derisinde SEnt-Fajlarının Enfektif Etkileri

Tavuk göğüs eti ve tavuk derisinde SEnt-fajların konak bakterilerine karşı litik aktivitelerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, 10^3 ve 10^6 kob/g düzeyinde *S. Enteritidis* MET-S1-411 ile kontamine edilen tavuk göğüsü ve derisi örnekleri 10^9 pob/g dozda SEnt-fajları muamele edildikten sonra hem buzdolabı (4°C) hem de oda sıcaklığında (25°C) muhafaza edilmiştir.

Çalışma sonucunda yüksek dozda (10^9 pob/g) SEnt-fajları 10^3 kob/g düzeyinde *S. Enteritidis* MET-S1-411 ile inoküle edilmiş tavuk göğüs eti ve tavuk derisi örneklerine uygulandığında buzdolabında gerçekleştirilen muhafaza koşullarında depolamanın birinci gününden itibaren 8 günlük depolama süresince *Salmonella* sayısını tespit edilebilir seviyenin altına (10 kob/g veya $1 \log \text{ kob/g}$) düşürdüğü bulunmuştur (Çizelge 4.1 ve 4.2). Bakteriyofaj uygulanmayan kontrol örneklerinde *S. Enteritidis* sayısının düşük düzeyde de olsa arttığı belirlenmiştir. Tavuk göğüs kontrol örneğinde depolamanın 5 ve 8'inci gününde, tavuk derisi kontrol örneğinde ise depolamanın 8'inci gününde meydana gelen artışın istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.1 ve 4.2). Bakteriyofaj içeren örneklerin faj sayılarında depolama süresince de önemli bir değişimin olmadığı ($p>0,05$) ve stabilitelerini korudukları tespit edilmiştir. Tüm örneklerde faj sayısının depolamanın 3'üncü saatinde biraz arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.1 ve 4.2).

Çizelge 4.1. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 4°C’de tavuk göğüs etine 10^3 kob/g düzeyinde inoküle edilen *S. Enteritidis* MET-S1-411 üzerine inhibitör etkisi

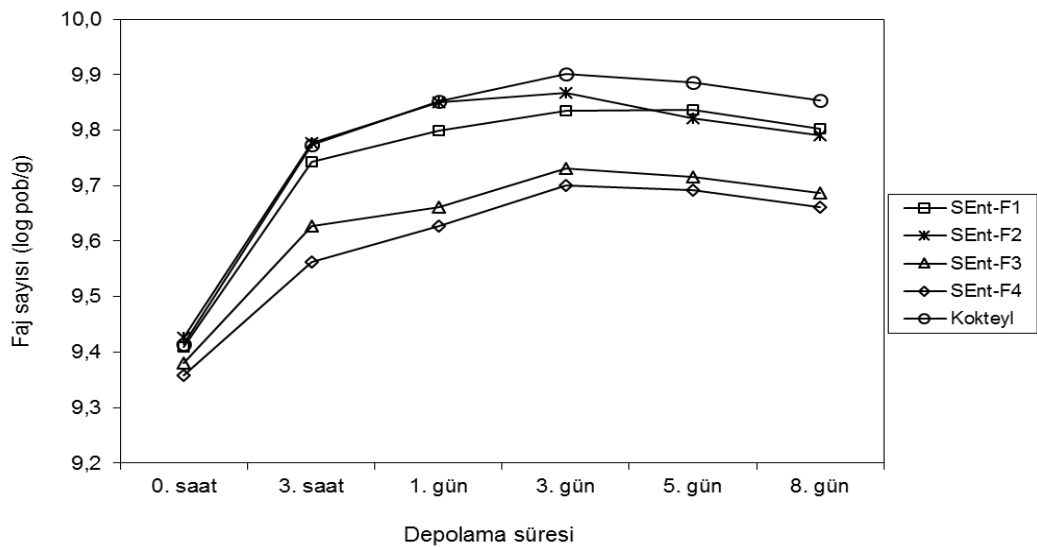
Örnekler	Depolama Süresi					
	0. saat	3. saat	1. gün	3. gün	5. gün	8. gün
SEnt-F1	3,45±0,10	1>	1>	1>	1>	1>
SEnt-F2	3,47±0,12	1>	1>	1>	1>	1>
SEnt-F3	3,48±0,15	1>	1>	1>	1>	1>
SEnt-F4	3,42±0,08	1>	1>	1>	1>	1>
Kokteyl	3,47±0,13	1>	1>	1>	1>	1>
SE*	3,46±0,11	3,49±0,14	3,78±0,10	4,09±0,16	4,34±0,15	4,59±0,19

SE*, sadece *S. Enteritidis* MET-S1-411 içeren örnek, kontrol örneği

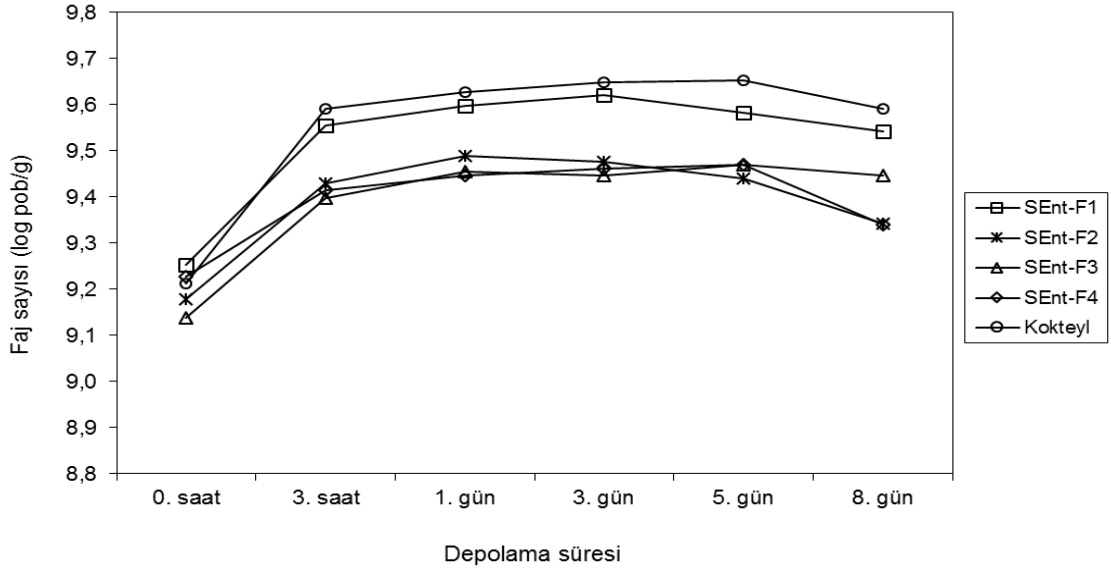
Çizelge 4.2. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 4°C’de tavuk derisine 10^3 kob/g düzeyinde inoküle edilen *S. Enteritidis* MET-S1-411 üzerine inhibitör etkisi

Örnekler	Depolama Süresi					
	0. saat	3. saat	1. gün	3. gün	5. gün	8. gün
SEnt-F1	3,36±0,12	1>	1>	1>	1>	1>
SEnt-F2	3,32±0,11	1>	1>	1>	1>	1>
SEnt-F3	3,32±0,15	1>	1>	1>	1>	1>
SEnt-F4	3,35±0,09	1>	1>	1>	1>	1>
Kokteyl	3,37±0,13	1>	1>	1>	1>	1>
SE*	3,45±0,18	3,56±0,16	3,73±0,12	4,96±0,18	4,19±0,23	4,38±0,21

SE*, sadece *S. Enteritidis* MET-S1-411 içeren örnek, kontrol örneği



Şekil 4.1. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 4°C’de 10^3 kob/g düzeyinde *S. Enteritidis* MET-S1-411 ile inoküle edilen tavuk göğüs etinde stabilitesi



Şekil 4.2. SEnt -fajlarının (10^9 pob/g) 4°C 'de 10^3 kob/g düzeyinde *S. Enteritidis* MET-S1-411 inoküle edilen tavuk derisinde stabilitesi

Aynı düzeyde *Salmonella* (10^3 kob/g) ve SEnt-fajı içeren (10^9 pob/g), ancak oda sıcaklığında muhafaza edilen örnekler incelendiğinde buzdolabı koşullarında muhafaza edilen örneklerde olduğu gibi kontrol hariç tüm faj uygulanan örneklerde *Salmonella* sayısının gerek tavuk göğüs eti gerekse tavuk derisi örneklerinde depolama süresince tespit edilebilir düzeyin altında olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$) (Çizelge 4.3 ve 4.4). Faj uygulanmayan tavuk göğüs eti ve tavuk derisi kontrol örneklerinde ise depolama süresince *Salmonella* sayısının arttığı ($p < 0,05$), tavuk göğsü örneğinde görülen bakteri sayısındaki artışın tavuk derisi örneğine göre biraz yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.3 ve 4.4). SEnt fajı ile muamele edilen tavuk eti ve tavuk derisi örneklerin faj içerikleri incelendiğinde, uygulamadan 3 saat sonra faj sayılarının biraz arttığı ve depolama süresince SEnt-fajlarının stabilitelelerini korudukları belirlenmiştir. Dört günlük depolama sonunda istatistiksel olarak önemli olmasa da faj sayısında az olma bir azalmanın olduğu görülmüştür ($p > 0,05$) (Şekil 4.3 ve 4.4).

Higgins vd. (2005)'de yaptıkları bir araştırmada, 10^3 kob/g düzeyinde *S. Enteritidis* ile kontamine edilmiş hindi karkaslarına $5,5 \times 10^8$ ve 10^{10} pob düzeyinde PHL 4 fajı uygulandığında, *Salmonella* sayısının tespit edilmeyecek düzeye düştüğünü bulmuşlardır.

Çizelge 4.3. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 25°C’de tavuk göğüs etine 10^3 kob/g düzeyinde inoküle edilen *S. Enteritidis* MET-S1-411 üzerine inhibitör etkisi

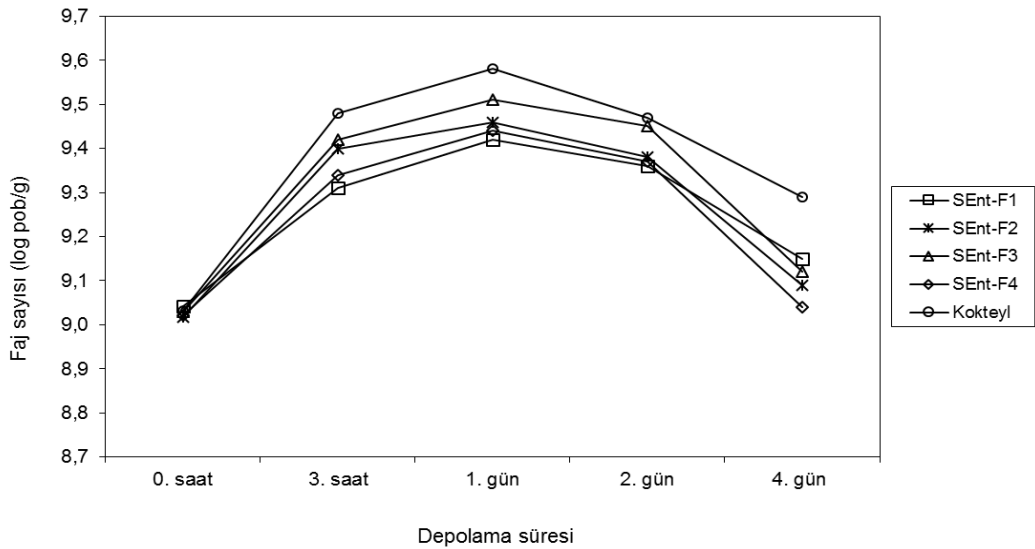
Örnekler	Depolama Süresi				
	0. saat	3. saat	1. gün	2. gün	4. gün
SEnt-F1	3,18±0,11	1>	1>	1>	1>
SEnt-F2	3,13±0,14	1>	1>	1>	1>
SEnt-F3	3,23±0,19	1>	1>	1>	1>
SEnt-F4	3,16±0,17	1>	1>	1>	1>
Kokteyl	3,20±0,22	1>	1>	1>	1>
SE*	3,15±0,18	3,75±0,14	6,54±0,20	8,12±0,20	8,54±0,25

SE*, sadece *S. Enteritidis* MET-S1-411 içeren örnek, kontrol örneği

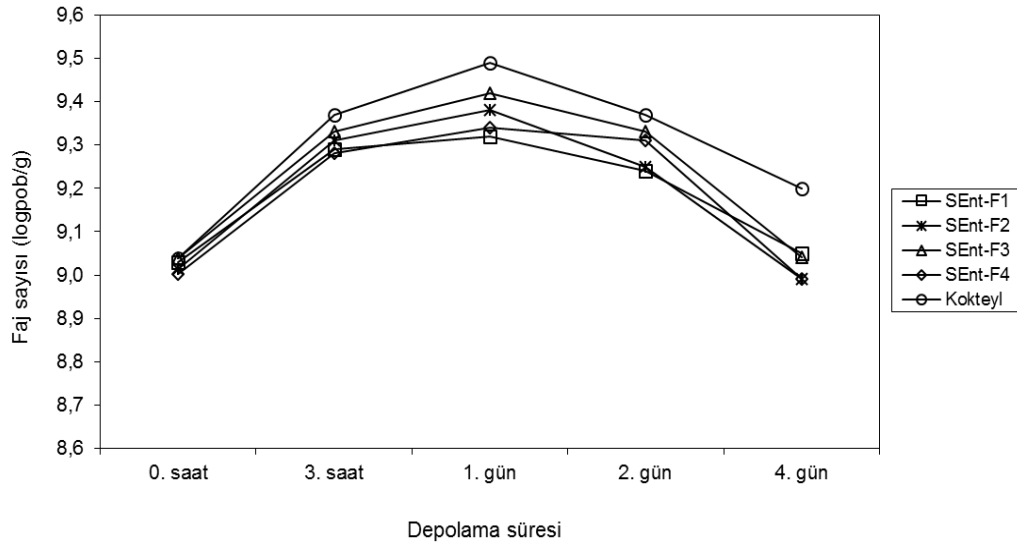
Çizelge 4.4. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 25°C’de tavuk derisine 10^3 kob/g düzeyinde inoküle edilen *S. Enteritidis* MET-S1-411 üzerine inhibitör etkisi

Örnekler	Depolama Süresi				
	0. saat	3. saat	1. gün	2. gün	4. gün
SEnt-F1	3,51±0,11	1>	1>	1>	1>
SEnt-F2	3,57±0,16	1>	1>	1>	1>
SEnt-F3	3,55±0,17	1>	1>	1>	1>
SEnt-F4	3,51±0,19	1>	1>	1>	1>
Kokteyl	3,55±0,13	1>	1>	1>	1>
SE*	3,52±0,12	3,95±0,13	5,55±0,25	6,54±0,28	7,30±0,25

SE*, sadece *S. Enteritidis* MET-S1-411 içeren örnek, kontrol örneği



Şekil 4.3. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 25°C’de 10^3 kob/g düzeyinde *S. Enteritidis* MET-S1-411 ile inoküle edilen tavuk göğüs etinde stabilitesi



Şekil 4.4. SEnt -fajlarının (10^9 pob/g) 25°C 'de 10^3 kob/g düzeyinde S. Enteritidis MET-S1-411 inoküle edilen tavuk derisinde stabilitesi

4.2 Yüksek Dozda S. Enteritidis ile Kontamine Edilen Tavuk Göğüs Eti ve Tavuk Derisinde SEnt-Fajların Enfektif Etkileri

Bu amaçla yüksek (10^6 kob/g) düzeyde S. Enteritidis MET-S1-411 ile inoküle edilen tavuk göğüs eti ve tavuk derisi örnekleri 10^9 pob/g düzeyinde SEnt-fajları ile tek tek ve kokteyl olarak muamele edildikten sonra 4 ve 25°C 'de muhafaza edilerek fajların enfektif etkileri incelenmiştir. Buzdolabı koşullarında muhafaza edilen örnekler incelendiğinde, SEnt-fajları kokteyl olarak uygulandığında depolamanın 3'üncü saatinden itibaren 8 günlük depolama süresince Salmonella sayısını tespit edilebilir seviyenin altına düşürdüğü gözlenmiştir (Çizelge 4.5). SEnt-F4 fajı uygulanan tavuk göğüs eti örneğinde, depolamanın 3 ve 24'üncü saatlerinde Salmonella sayısının tespit edilebilir seviyenin altında olduğu, ancak depolama süresinin uzamasıyla birlikte Salmonella sayısının arttığı, 8 günlük depolama sonucunda söz konusu bakteri sayısının $2,27 \pm 0,09$ log kob/g'a ulaştığı tespit edilmiştir. SEnt-F1, F2 ve F3 ile muamele edilen tavuk göğüs örnekleri incelendiğinde depolamanın 3'üncü saatinde Salmonella sayısında sırasıyla 4,64, 4,97 ve 4,40 log; depolamanın 1'inci gününde 4,53, 4,99 ve 5,29 log'luk azalmaya ($p < 0,05$) neden olduğu belirlenmiştir. Söz konusu örneklerde depolama işleminin uzatılmasıyla birlikte Salmonella sayısının düşük düzeyde de olsa arttığı belirlenmiştir ($p > 0,05$). Depolama işlemi sonunda SEnt-F1, F2 ve F3 fajlarını içeren tavuk göğüs örneklerinde bakteri sayısının sırasıyla 2,27, 2,83 ve 2,11 log kob/g olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.5). Kontrol örneğinde ise depolama süresi boyunca Salmonella sayısının düşük düzeyde de

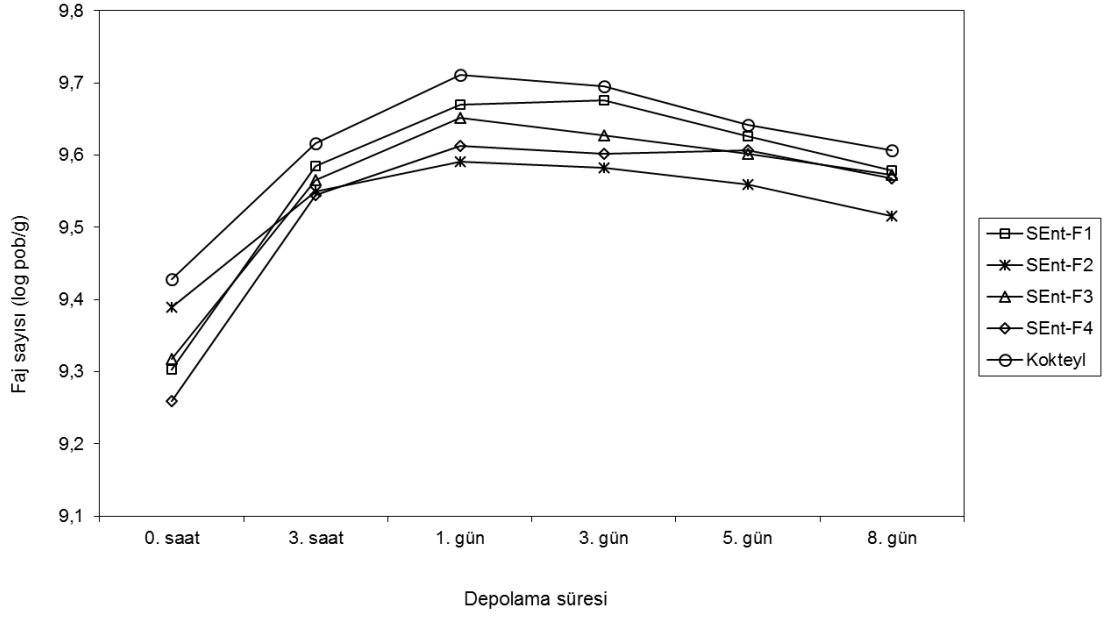
olsa arttığı ($p>0,05$) ve depolama sonunda meydana gelen artışın önemli olduğu bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge 4.5). Aynı tavuk göğüs eti örnekleri SEnt-faj içeriği açısından irdelendiğinde, faj sayılarının tüm örneklerde depolamanın 3'üncü ve 1'inci gününde önemsiz düzeyde arttığı ($p>0,05$), depolama sürecinde de örneklerin faj sayılarında önemli bir değişimin olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.5).

SEnt-fajlarını 10^9 pob/g, S. Enteritidis MET-S1-411'yi 10^6 kob/g düzeyinde içeren ve 25°C 'de muhafaza edilen tavuk göğüs et örnekleri irdelendiğinde, depolamanın 3'üncü saati ile 1'inci gününde SEnt-F1, F3, F4 ve kokteyl uygulanan et örneklerinde Salmonella sayısının tespit edilebilir seviyenin altında olduğu ($p<0,05$), ancak depolama süresinin uzamasıyla birlikte bakteri sayısının arttığı belirlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.6). SEnt-F2 fajı ile muamele edilen tavuk eti örneğinde sadece depolamanın 3'üncü saatinde Salmonella sayısının tespit edilebilir düzeyin altında olduğu, bakteri sayısının depolamanın 1'inci gününden itibaren artmaya başladığı gözlenmiştir (Çizelge 4.6). Fajla muamele edilmeyen kontrol örneğinde S. Enteritidis sayısının depolama işlemi süresince arttığı gözlenmiştir (Çizelge 4.6). Kontrol örneğinde Salmonella sayısının 4 günlük depolama işlemi süresince 6,50 log'dan 9,48 log'a çıktığı görülmüştür. Faj uygulanan et örnekleri içermiş oldukları faj sayısı açısından değerlendirildiğinde, tüm örneklerde depolamanın 3'üncü saati ile 1'inci gününde faj sayısının biraz arttığı ($p<0,05$), depolama sürecinde de tüm tavuk eti örneklerinde faj sayısında istatistiksel olarak önemli bir değişimin olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$) (Şekil 4.6).

Çizelge 4.5. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 4°C 'de tavuk göğüs etine 10^6 kob/g düzeyinde inoküle edilen S. Enteritidis MET-S1-411 üzerine inhibitör etkisi

Örnekler	Depolama Süresi (gün)					
	0. saat	3. saat	1. gün	3. gün	5. gün	8. gün
SEnt-F1	6,44±0,19	1,80±0,09	1,47±0,16	1,90±0,10	2,10±0,09	2,27±0,09
SEnt-F2	6,51±0,27	2,11±0,14	1,98±0,21	2,35±0,09	2,60±0,14	2,83±0,14
SEnt-F3	6,44±0,23	1,45±0,12	1,15±0,15	1,64±0,14	1,89±0,12	2,11±0,12
SEnt-F4	6,41±0,17	1>	1>	1,11±0,12	1,42±0,08	1,68±0,08
Kokteyl	6,57±0,25	1>	1>	1>	1>	1>
SE*	6,49±0,31	6,48±0,27	6,96±0,27	7,17±0,28	7,30±0,24	7,54±0,21

SE*, sadece S. Enteritidis MET-S1-411 içeren örnek, kontrol örneği

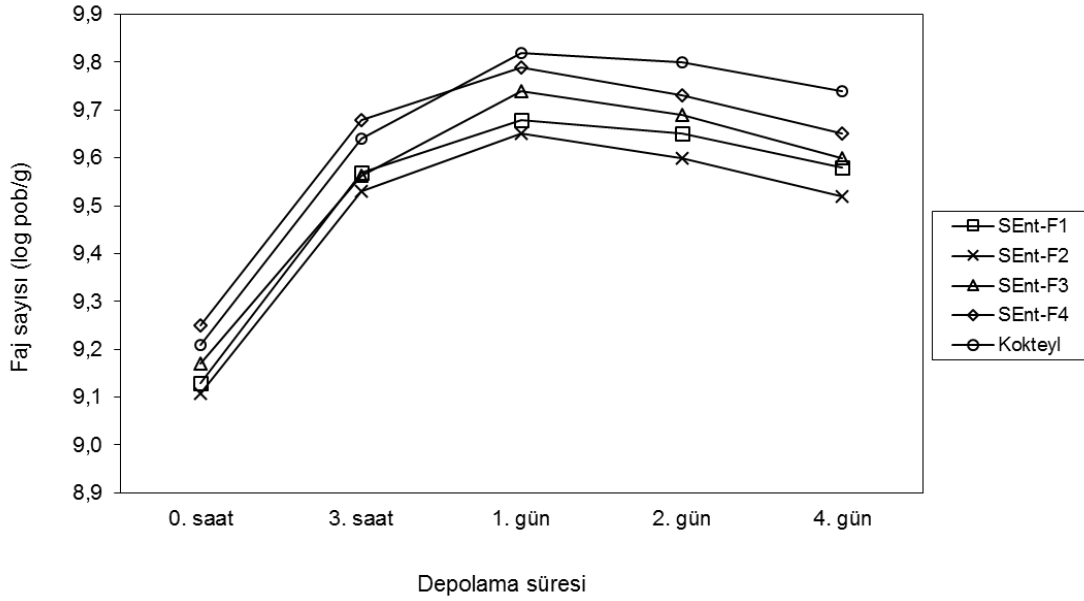


Şekil 4.5. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 4°C’de 10^6 kob/g düzeyinde *S. Enteritidis* MET-S1-411 inoküle edilen tavuk göğüs etinde stabilitesi

Çizelge 4.6. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 25°C’de tavuk göğüs etine 10^6 kob/g düzeyinde inoküle edilen *S. Enteritidis* MET-S1-41 üzerine inhibitör etkisi

Örnekler	Depolama Süresi (gün)				
	0	3. saat	1. gün	2. gün	4. gün
SEnt-F1	6,29±0,15	1>	1>	1,32±0,07	2,12±0,14
SEnt-F2	6,42±0,12	1>	1,08±0,06	1,44±0,10	2,21±0,15
SEnt-F3	6,31±0,19	1>	1>	1,26±0,06	1,98±0,11
SEnt-F4	6,39±0,22	1>	1>	1,17±0,08	1,74±0,09
Kokteyl	6,44±0,13	1>	1>	1,05±0,05	1,62±0,12
SE*	6,50±0,25	6,63±0,24	8,57±0,28	9,28±0,31	9,48±0,35

SE*, sadece *S. Enteritidis* MET-S1-411 içeren örnek, kontrol örneği



Şekil 4.6. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 25°C 'de tavuk göğüs etine 10^6 kob/g düzeyinde inoküle edilen *S. Enteritidis* MET-S1-411 üzerine inhibitör etkisi

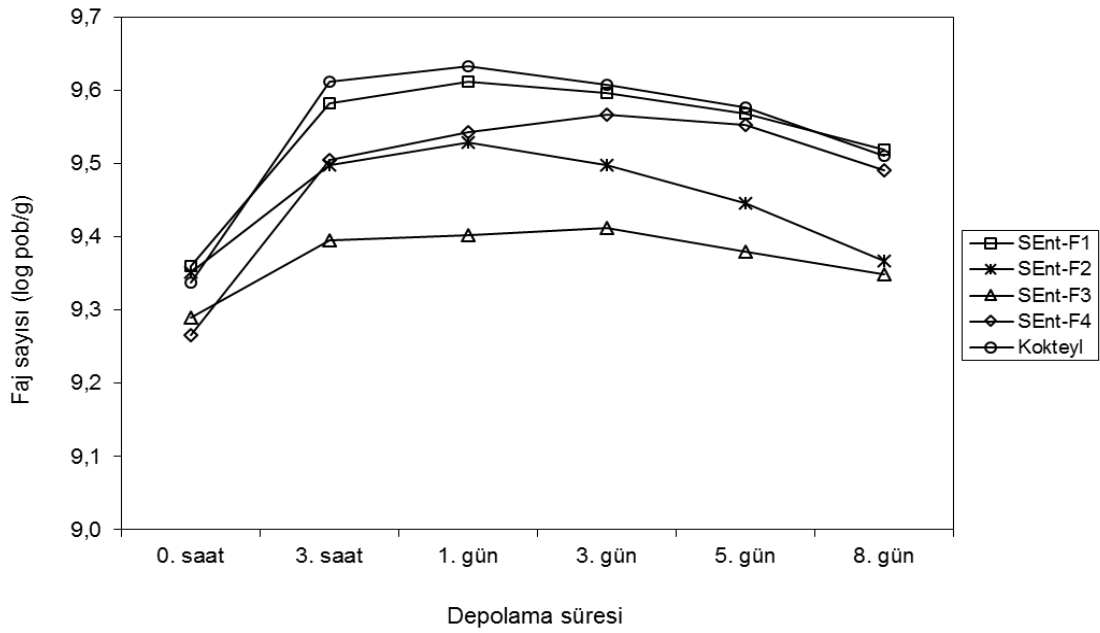
SEnt-fajı 10^9 pob/g, *S. Enteritidis* sayısı 10^6 kob/g olan ve 4°C 'de muhafaza edilen tavuk derisi örnekleri incelendiğinde, tavuk göğüs eti örneğinde olduğu gibi SEnt-fajları kokteyl olarak uygulandığında tavuk derisi örneklerinde *Salmonella* sayısını depolamanın 3'üncü saatinde ve depolama işlemi süresince tespit edilebilir seviyenin altına düşürdüğü bulunmuştur ($p < 0,05$) (Çizelge 4.7). SEnt-F4 fajı ile muamele edilen tavuk derisi örneğinde depolamanın 3'üncü saatinden 3'üncü gününe kadar *Salmonella* sayısının tespit edilebilir seviyenin altına olduğu ve bundan sonraki depolama sürelerinde bakteri sayısında istatistiksel olarak önemli olmasa da bir artış olduğu gözlenmiştir ($p > 0,05$). SEnt-F1, F2 ve F3 fajlarının depolamanın 3'üncü saatinde 4,11, 4,24 ve 5,00 log'luk; 1'inci gününde ise 4,92, 4,46 ve 5,28 log'luk azalmaya neden olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Depolama işleminin 3'üncü gününden sonra söz konusu örneklerde *Salmonella* sayısının biraz arttığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$). Depolama işleminin sonunda *Salmonella* sayısında en fazla artışın sırasıyla SEnt-F2, F1, F3 ve F4 örneğinde olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.7). Faj içermeyen kontrol örneğinde ise 4°C 'de gerçekleştirilen depolama işlemi süresince *Salmonella* sayısının arttığı ($p > 0,05$) ve depolama işleminin 8'inci gününde gözlenen artışın önemli olduğu görülmüştür ($p < 0,05$) (Çizelge 4.7). Kontrol örneğinde ise *Salmonella* sayısının depolama süresince arttığı, 6,38 log kob/g'den 7,31 log kob/g'ye ulaştığı gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Çizelge 4.7). Söz konusu örneklerde SEnt-faj sayısının depolamanın 3'üncü saati ile 1'inci gününde arttığı

($p<0,05$), daha sonra örneklerin faj sayısında önemli bir değişimin olmadığı görülmüştür ($p>0,05$) (Şekil 4.7).

Çizelge 4.7. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 4°C 'de tavuk derisine 10^6 kob/g düzeyinde inoküle edilen *S. Enteritidis* MET-S1-411 üzerine inhibitör etkisi

Örnekler	Depolama Süresi					
	0. saat	3. saat	1. gün	3. gün	5. gün	8. gün
SEnt-F1	6,43±0,10	2,32±0,12	1,51±0,18	1,90±0,12	2,10±0,11	2,26±0,14
SEnt-F2	6,37±0,21	2,13±0,11	1,91±0,17	2,19±0,10	2,49±0,20	2,76±0,19
SEnt-F3	6,39±0,14	1,39±0,15	1,11±0,13	1,55±0,10	1,80±0,13	2,05±0,13
SEnt-F4	6,42±0,13	1>	1>	1>	1,15±0,07	1,45±0,11
Kokteyl	6,40±0,16	1>	1>	1>	1>	1>
SE*	6,38±0,18	6,41±0,19	6,65±0,18	6,88±0,23	7,11±0,20	7,31±0,22

SE*, sadece *S. Enteritidis* MET-S1-411 içeren örnek, kontrol örneği



Şekil 4.7. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 4°C 'de 10^6 kob/g düzeyinde *S. Enteritidis* MET-S1-411 inoküle edilen tavuk derisinde stabilitesi

SEnt-fajları 10^9 pob/g düzeyinde *S. Enteritidis* MET-S1-411 ile 10^6 kob/g seviyesinde kontamine edilen tavuk derisine uygulandığında 25°C 'de depolamanın 3'üncü saatinde ve 1'inci gününde SEnt-F3, F4 ve kokteyl fajlarının konak hücre sayısını tespit edilemeyecek seviyeye düşürdüğü ($p<0,05$) saptanmıştır. SEnt-F1 ve F2 fajlarının ise depolamanın 3'üncü saatinde 4,47 ve 4,40 log'luk ($p<0,05$), 1'inci gününde ise 4,65 ve

4,53 log'luk azalmaya ($p<0,05$) neden olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Depolama süresinin uzamasıyla birlikte *S. Enteritidis* sayısının tüm örneklerde arttığı, ancak artış oranının en düşük kokteyl örneğinde olduğu ve bunu sırasıyla SEnt-F4, F3, F2 ve F1 örneklerinin takip ettiği bulunmuştur. Kontrol tavuk derisi örneğinde ise *S. Enteritidis* sayısının depolamanın 3'üncü saatine kadar düşük düzeyde arttığı, depolama süresinin uzamasıyla birlikte *Salmonella* sayısının önemli düzeyde arttığı saptanmıştır ($p<0,05$) (Çizelge 4.8). Faj uygulanan tavuk derisi örneklerinde faj sayısının depolamanın 3'üncü saatinde ve 1'inci gününde biraz arttığı, depolama sürecinde de örneklerin faj sayılarında çok düşük düzeyde bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.8).

Yapılan bir çalışmada, tavuk derisine litik bakteriyofajlar ile *S. Enteritidis* aynı oranda ($MOI=1$) uygulandığında *S. Enteritidis* sayısında yaklaşık 1 log'luk; ilave edilen faj oranı bakteri oranından 100-1000 kat ($MOI=100-1000$) olduğunda ise *Salmonella* sayısının çok hızlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur (Goode vd., 2003). Bizim sonucumuza benzer şekilde, araştırmacılar tavuk derisine kontamine edilen bakteri düzeyi düşük (2 log), katılan faj konsantrasyonu yüksek (10^5 pob) olduğunda *Salmonella* sayısının depolamanın başından sonuna kadar tespit edilebilir düzeyin altında olduğu ifade edilmiştir (Goode vd., 2003).

Hungaro vd. (2013) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, tavuk derisine ilave edilen *S. Enteritidis* 10^5 kob/cm², faj miktarı 10^9 pob/mL düzeyinde olduğunda 30 dakika sonra bakteri sayısında 1 log'luk azalma olduğunu belirtmişlerdir.

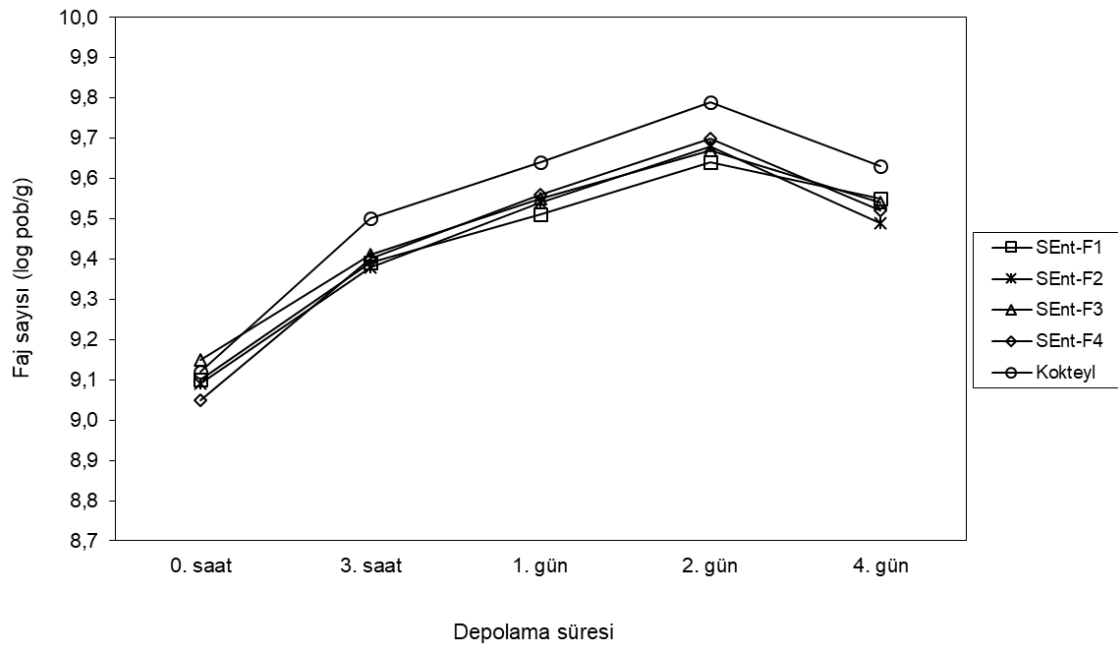
Başka bir çalışmada *S. Enteritidis* ile 10^3 kob/mL enfekte edilen tavuk eti örnekleri ϕ SP-1 ve ϕ SP-3 fajları ile tek tek ve kokteyl olarak 10^6 pob/mL ve 10^4 pob/mL düzeyinde uygulanmış ve 4, 25 ve 37°C'de 3 gün muhafaza edilmiştir (Augustine ve Bhat 2015). Çalışma sonucunda araştırmacılar, 4°C'de 3 gün depolama sonunda yüksek dozda tek başlarına faj uygulanan örneklerde *Salmonella* sayısında sırasıyla 2,46 ve 2,1 log kob/mL, düşük dozda uygulanan örneklerde 0,98 ve 0,52 log kob/mL düzeyinde azalmaya neden olduğunu bulmuşlardır. 25°C'de muhafaza edilen yüksek dozda faj içeren örneklerde 3,99 ve 3,46 log, düşük dozda içeren örneklerde ise 2,51 ve 2,30 log'luk azalma olduğu rapor edilmiştir. 37°C'de muhafaza edilen, yüksek dozda faj uygulanan örneklerde 1,98 ve 2,38 log, düşük dozda bakteriyofaj içeren örneklerde ise *Salmonella* sayısında 1,52 ve 1,98 log'luk azalma olduğu belirtilmiştir. Fajlar kokteyl şeklinde uygulandığında enfektif

etkinin arttığı, 37°C’de muhafaza edilen örneklerde bakteri sayısının 3,52 log kob/mL, 4°C ve oda sıcaklığında muhafaza edilen örneklerde ise tespit edilemeyecek seviyenin altına düştüğünü ifade etmişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada da SEnt-fajlarının inhibitör etkilerinin kokteyl olarak kullanıldıklarında virülant etkilerinin arttığı bulunmuştur.

Çizelge 4.8. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 25°C’de tavuk derisine 10^6 kob/g düzeyinde inoküle edilen *S. Enteritidis* MET-S1-411 üzerine inhibitör etkisi

Örnekler	Depolama Süresi (gün)				
	0	3. saat	1. gün	2. gün	4. gün
SEnt-F1	6,32±0,11	1,75±0,11	1,47±0,13	1,99±0,09	2,61±0,10
SEnt-F2	6,22±0,14	1,92±0,18	1,69±0,14	2,16±0,11	2,75±0,12
SEnt-F3	6,25±0,20	1>	1>	1,49±0,12	2,08±0,14
SEnt-F4	6,34±0,19	1>	1>	1,27±0,13	1,97±0,11
Kokteyl	6,27±0,21	1>	1>	1,07±0,08	1,55±0,09
SE*	6,23±0,15	6,83±0,17	7,22±0,20	8,86±0,29	9,04±0,31

SE*, sadece *S. Enteritidis* MET-S1-411 içeren örnek, kontrol örneği



Şekil 4.8. SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 25°C’de tavuk derisine 10^6 kob/g düzeyinde inoküle edilen *S. Enteritidis* MET-S1-411 üzerine inhibitör etkisi

Bao vd. (2015), *S. Enteritidis* ATCC13076 ve CVCC2184 serovarlarıyla 1×10^4 kob/mL seviyesinde kontamine edilen tavuk göğüs eti örnekleri PA13076 ve PC2184 fajları ile

1×10^8 pob/mL düzeyinde muamele edildiğinde 25°C 'de 3 saatlik depolama işlemi sonunda bakteri sayısında yaklaşık 2-3 log'luk azalmaya neden olduğunu ve fajların enfektif etkilerinin 4°C 'ye göre 25°C 'de daha iyi olduğunu ifade etmişlerdir. Bu sonuca benzer şekilde SEnt-fajlarının da konak hücrelerine karşı virülant etkilerinin 4°C 'ye göre 25°C 'de daha yüksek olduğu bulunmuştur.

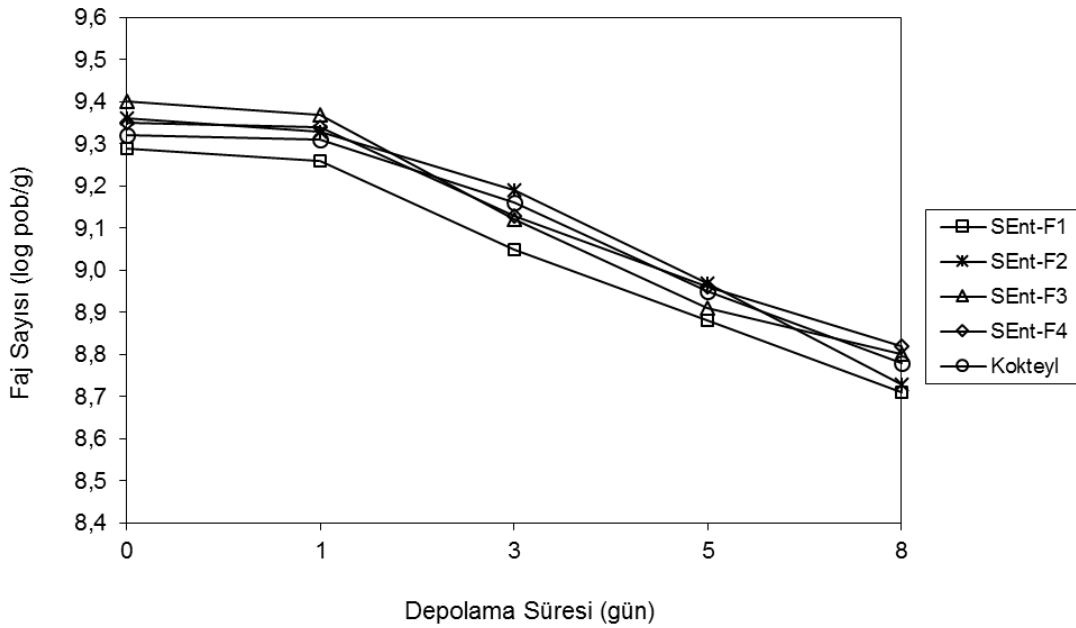
Hindi eti, süt, sosis, balık, yumurta sarısı ve Cheddar peyniri gibi çeşitli gıdalarda gerçekleştirilen çalışmalarda bakteriyofajların *Salmonella* sayısını belirlenemeyecek seviyenin altına düşürdüğü Guenther vd. (2012) ve Modi vd. (2001) tarafından bildirilmiştir.

10^4 hücre/cm² seviyesinde *S. Typhimurium* ile kontamine edilen et örnekleri P7 fajı ile 10^4 pob seviyesinde muamele edildiğinde *Salmonella* sayısında 5°C 'de 2-3 log, 24°C 'de ise $>5,9$ log'luk bir azalma olduğu ifade edilmiştir (Bigwood vd., 2008).

4.3 S. Enteritidis ile Kontaminasyondan Önce Tavuk Etine Uygulanan SEnt-Fajlarının Litik Aktivitesi

SEnt-fajlarının tavuk göğüs etinde buzdolabı koşullarında stabilitesini ve et örneklerine depolama işlemi sırasında olabilecek *S. Enteritidis* kontaminasyona karşı aktivitelerini belirlemek amacıyla, et örnekleri 10^9 pob/g düzeyinde fajlar ile tek tek ve kokteyl halinde muamele edilmiş ve buzdolabında muhafaza edilmişlerdir. Depolamanın 0, 1, 3, 5 ve 8 günlerinde rastgele alınan tavuk göğüs et örnekleri yaklaşık 10^3 ve 10^6 kob/g düzeyinde *S. Enteritidis* MET-S1-411 ile kontamine edilip 3 saat bekletildikten sonra bakteri ve faj sayımı yapılmıştır. Araştırma sonucunda SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) tavuk göğüs örneklerinde buzdolabı sıcaklığında stabilitelerini korudukları ve *Salmonella* hücrelerine karşı oldukça enfektif oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.9). Şekil 4.9 incelendiğinde, istatistiksel olarak önemli olmasa da depolama süresinin uzaması ile birlikte faj sayılarında düşük düzeyde de olsa bir azalmanın olduğu görülmektedir ($p>0,05$). Faj konsantrasyonunun yüksek (10^9 pob/g), bakteri seviyesinin düşük (10^3 kob/g) olduğu et örneklerinde inhibitör etkinin yüksek olduğu, 8 günlük depolama süresince *Salmonella* sayısının tespit edilemeyecek seviyenin altına düştüğü belirlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.9). Faj konsantrasyonu 10^9 pob/g olan et örneklerine 10^6 kob/g düzeyinde *Salmonella* ilave edildiğinde, faj kokteyli uygulanan et örneklerinde tüm depolama süresince, SEnt-

F4 örneğinde depolamanın 3'üncü ve SEnt-F3 örneğinde depolamanın 1'inci gününe kadar Salmonella sayısının tespit edilebilir limitin altında olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Belirtilen depolama sürelerinin üstüne çıkıldığında Salmonella sayısında düşük düzeyde de olsa bir artış olduğu gözlenmiştir ($p > 0,05$) (Çizelge 4.10). SEnt-F1 ve F2 örnekleri depolamanın 0. gününde sırasıyla 4,98 ile 4,57 log'luk, depolamanın 8'inci gününde ise 4,13 ile 3,37 log'luk azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Depolamanın 8'inci gününde Sen-F1, F2, F3, F4 ve kokteyl örneklerinde Salmonella seviyesinin 2,15, 2,53, 1,77, 1,34 ve $1 > \log \text{ kob/g}$ olduğu gözlenmiştir. Elde edilen verilerden de anlaşılabileceği üzere SEnt-fajları kokteyl halinde uygulandığında depolama sırasında olabilecek Salmonella kontaminasyonunu çok etkili bir şekilde önlenebileceği ortaya konmuştur. Dolayısıyla SEnt-fajları kokteyl olarak uygulandıklarında sinerjit bir etkinin olduğu söylenebilir. Fajlar enfektif etki açısından karşılaştırıldığında en yüksek inhibitör etkiyi SEnt-F4 fajının gösterdiği ve bunu SEnt-F3, F1 ve F2'nin takip ettiği görülmektedir (Çizelge 4.10).



Şekil 4.9. Tavuk göğsü etine yüksek dozda (10^9 pob/g) uygulanan SEnt-fajlarının 4°C 'de depolama sürecinde stabiliteleri

Çizelge 4.9. Yüksek dozda SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 4°C’de depolama sürecinde tavuk göğüs etine sonradan kontamine olan düşük dozda (10^3 kob/g) S. Enteritidis’in gelişimi üzerine etkisi

Örnekler	Depolama Süresi (gün)				
	3. saat	1. gün	3. gün	5. gün	8. gün
SEnt-F2	1>	1>	1>	1>	1>
SEnt-F4	1>	1>	1>	1>	1>
SEnt-F3	1>	1>	1>	1>	1>
SEnt-F1	1>	1>	1>	1>	1>
Kokteyl	1>	1>	1>	1>	1>
SE*	3,04±0,09	3,11±0,12	3,23±0,20	3,46±0,22	3,35±0,17

SE*, sadece S. Enteritidis MET-S1-411 içeren örnek, kontrol örneği

Çizelge 4.10. Yüksek dozda SEnt-fajlarının (10^9 pob/g) 4°C’de depolama sürecinde tavuk göğüs etine sonradan kontamine olan yüksek dozda (10^6 kob/g) S. Enteritidis’in gelişimi üzerine etkisi

Örnekler	Depolama Süresi (gün)				
	3. saat	1. gün	3. gün	5. gün	8. gün
SEnt-F1	1,37±0,13	1,42±0,10	1,65±0,18	1,84±0,15	2,15±0,17
SEnt-F2	1,78±0,18	1,86±0,20	2,08±0,11	2,22±0,17	2,53±0,19
SEnt-F3	1>	1>	1,19±0,06	1,41±0,10	1,77±0,15
SEnt-F4	1>	1>	1>	1,18±0,07	1,34±0,11
Kokteyl	1>	1>	1>	1>	1>
SE*	6,35±0,21	6,25±0,18	6,22±0,21	6,17±0,23	6,28±0,26

SE*, sadece S. Enteritidis MET-S1-411 içeren örnek, kontrol örneği

4.4 Bakteriyofajla Muamele Edilen Et Örneklerinde Faja Dayanıklı S. Enteritidis Suşların Oluşup Oluşmadığının Belirlenmesi

Bakteriyofaj uygulanan et ve deri örneklerinde ekim sonucunda Petri kutularında gelişen bakteri kolonilerinden rastgele 50 tane alınmış ve yeniden kendi bakteriyofajlarına karşı test edilmiştir. Analiz sonucunda alınan kolonilerin kendi bakteriyofajlarına karşı duyarlı oldukları ve dolayısıyla bakteriyofajlarına karşı bir direnç kazanmadıkları tespit edilmiştir. Benzer sonuç Hungaro vd. (2013) tarafından da ortaya konmuştur. Hungaro vd. (2013), 5 farklı fajdan oluşan faj kokteyli ve S. Enteritidis ile muamele edilen tavuk derisinde faja dirençli S. Enteritidis’lerin oluşup oluşmadığını analiz etmek amacıyla, bakteri gelişimi gözlenmiş Petri plaklardan rastgele 30 koloni almışlar ve fajlara karşı test

edilmiştir. Sonuçta, tüm S. Enteritidis izolatlarının fajlara duyarlı oldukları rapor edilmiştir.



BÖLÜM V

SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında 4 farklı SEnt-fajlarının kendi konak hücreleri olan *S. Enteritidis* MET-S1-411'e karşı inhibitör etkileri hem tavuk göğüs eti hem de tavuk derisinde 4 ve 25°C'de depolama koşullarında belirlenmiştir. Araştırma sonucunda elde edilen bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- 4°C ve 25°C'de muhafaza edilen 10^3 kob/g *S. Enteritidis* ve 10^9 pob/g faj içeren tavuk göğüs eti ve tavuk derisi örneklerinde SEnt-fajları tek tek ve kokteyl şeklinde uygulandıklarında *Salmonella* sayısını depolamanın 3'üncü saatinden itibaren depolama süresince tespit edilemeyecek seviyenin altına düşürdüğü saptanmıştır ($p<0,01$). SEnt-fajlarının tavuk göğüs et ve tavuk derisi örneklerinde depolama işlemi sırasında sayılarında düşük düzeyde bir azalma olmasına karşın stabilitelerini korudukları ($p>0,05$) belirlenmiştir. SEnt-fajı uygulanmayan kontrol örneklerinde ise *S. Enteritidis* sayısının 4 ve 25°C'de depolama işlemi süresince arttığı, ancak bu artışın 25°C'de muhafaza edilen örnekte daha fazla olduğu gözlenmiştir.
- Faj konsantrasyonu 10^9 pob/g, *S. Enteritidis* seviyesi 10^6 kob/g olan ve 4°C'de muhafaza edilen tavuk eti örnekleri incelendiğinde, SEnt-fajları kokteyl olarak uygulandığında depolamanın 3'üncü saatinden itibaren depolama süresince *Salmonella* sayısını belirlenebilir limitin altına düşürdüğü belirlenmiştir. SEnt-F1, F2, F3 ve F4 fajların depolamanın 1'inci gününde *Salmonella* sayısında sırasıyla 4,53, 4,99, 5,29 ve 6,41 log'luk azalmaya neden olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Depolama süresinin uzamasıyla birlikte söz konusu örneklerde bakteri sayısının arttığı saptanmıştır.
- 4°C'de muhafaza edilen tavuk derisi örneklerinde de fajlar kokteyl olarak uygulandığında *Salmonella* sayısını depolamanın başlangıcından sonuna kadar tespit edilebilir seviyenin altına düşürdüğü belirlenmiştir ($p<0,05$). SEnt-F1, F2, F3 ve F4 fajlarının depolamanın 1'inci gününde sırasıyla 4,11, 4,24, 5,28 ve 6,42 log'luk azalmaya neden olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Depolamanın 3'üncü gününden itibaren örneklerin bakteri sayısında düşük düzeyde de olsa bir artış olduğu gözlenmiştir ($p>0,05$).
- Faj içermeyen tavuk göğüs ve tavuk derisi kontrol örneklerinde 4°C'de muhafaza

işlemi esnasında Salmonella sayısının biraz arttığı görülmüştür ($p>0,05$).

- SEnt-fajları ile muamele edilen tavuk göğüs ve tavuk derisi örneklerinde fajların 4°C’de depolamanın başlangıcında sayılarında bir artış olduğu ve depolama işlemi süresince stabilitelerini korudukları saptanmıştır ($p>0,05$).
- Aynı konsantrasyonda faj (10^9 pob/g) ve S. Enteritidis (10^6 kob/g) içeren 25°C’de muhafaza edilen tavuk göğüs örnekleri irdelendiğinde, SEnt-F1, F3, F4 ve kokteyl uygulanan et örneklerinde depolamanın 3’üncü saati ile 1’inci gününde, SEnt-F2 örneğinde ise sadece 3’üncü saatinde Salmonella sayısının tespit edilebilir seviyenin altında olduğu ($p<0,05$), ancak depolama süresinin uzamasıyla birlikte bakteri sayısının arttığı görülmüştür ($p<0,05$).
- 25°C’de inkübe edilen tavuk derisi örneklerinde depolamanın 1’inci gününde SEnt-F1, F2, F3, F4 ve kokteyl fajlarının S. Enteritidis sayısında 4,63, 4,53, 6,25, 6,34 ve 6,27 log’luk azalmaya neden olduğu ($p<0,05$), depolama süresinin uzamasıyla birlikte Salmonella sayısının tüm örneklerde arttığı belirlenmiştir.
- SEnt-fajı uygulanmayan tavuk göğüs eti ve tavuk derisi kontrol örneklerinde hücre sayısının 4 günlük depolama süresince arttığı ($p<0,05$), ancak tavuk göğüs örneğinde artışın biraz daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Faj içeren örneklerde faj sayısının muhafazasının 3 ve 24’üncü saatlerinde biraz arttığı, depolama işlemi süresince stabilitelerini korudukları belirlenmiştir.
- Buzdolabı koşullarında depolama esnasında olabilecek S. Enteritidis kontaminasyonuna karşı SEnt-fajlarının etkinliklerini belirlemek amacıyla yapılan çalışma sonucunda, SEnt-fajları inoküle edilen tavuk göğüs eti örneklerinde fajların 8 günlük depolama işlemi süresince stabilitelerini korudukları; 3,04-3,35 log kob/g düzeyinde S. Enteritidis bulaştığında bakteri sayısını belirlenemeyecek seviyenin altına düşürdüğü; 6,17-6,35 log kob/g düzeyinde S. Enteritidis ile kontamine olduğunda çok etkili bir şekilde bakteri sayısını azalttığı belirlenmiştir.
- SEnt-fajları ile muamele edilen tavuk eti ve tavuk derisi örneklerinden izole edilen 50 adet S. Enteritidis MET-S1-411 serovarlarının kendi fajlarına karşı direnç kazanmadıkları belirlenmiştir.

Bu tez projesinde, SEnt-F1, F2, F3 ve F4 fajlarının tavuk göğüs eti ve tavuk derisi örneklerinde buzdolabı ve oda sıcaklığında gerçekleştirilen depolama koşullarında stabilitelerini korudukları ve çok etkili bir şekilde S. Enteritidis’in gelişimini önledikleri

belirlenmiştir. Söz konusu fajlar kokteyl halinde kullanıldığında enfektif etkinin çok fazla arttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak SEnt-fajları gıda kaynaklı patojen bakteri *S. Enteritidis*'e karşı tek tek ve kokteyl halinde kanatlı et endüstrisinde biyokoruyucu ajan olarak kullanma potansiyeline sahip oldukları belirlenmiştir.



KAYNAKLAR

- Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M. Y., Dean, T., Senecal, A. and Sulakvelidze, A., “Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7”, ***Applied and Environmental Microbiology*** 74, 6230-6238, 2008.
- Acar Soykut, E. ve Tunail, N., “Termofilik faj taksonomisi”, ***GIDA*** 34(4), 251-258, 2009a.
- Acar Soykut, E. ve Tunail, N., “Süt endüstrisinde sorun yaratan termofilik fajlar”, ***GIDA*** 34(2), 107-113, 2009b.
- Ackermann, H. W., “Bacteriophage observations and evolution”, ***Research in Microbiology*** 154, 245-251, 2003.
- Ackermann, H. W., “Phages examined in the electron microscope”, ***Archives of Virology*** 152, 227-243, 2007.
- Ackermann, H. W. and Kropinsk, A. M., “Curated list of prokaryote viruses with fully sequenced genomes”, ***Research in Microbiology*** 158, 555-566, 2007.
- Adams, M. H., Bacteriophages, ***Interscience Publishers*** New York, 1959.
- Alvarez-Astorga, M., Capita, R., Alonso-Calleja C., Moreno, B., Garcia-Fernandez, M. C., “Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain”, ***Meat Science*** 62, 45–50, 2002.
- Andino, A., Hanning, I., “*Salmonella enterica*: Survival, Colonization and Virulence Differences among Serovars”, ***Scientific World Journal*** 1, 179-201, 2015.
- Arslan, P., Piliç Eti Sektör Raporu Kitabı: Tavuk etinin sağlıklı beslenme için önemi, ***Beyaz Et Sanayicileri ve Damızlıkçılar Birliği Yayınları***, Ankara, 2013.

- Atterbury, R. J., Dillon, E., Swift, C., Connerton, P. L., Frost, J. A. and Dodd, C. E., “Correlation of *Campylobacter* bacteriophage with reduced presence of hosts in broiler chicken ceca”, *Applied Environmental Microbiology* 71, 4885-4887, 2005.
- Bao, H., Zhang, P., Zhang, H., Zhou, Y., Zhang, L. and Wang, R., “Bio-control of *Salmonella* Enteritidis in foods using bacteriophages”, *Viruses* 7(8), 4836-4853, 2015.
- Batz, M B., Hoffmann S. and Morris J. G., “Ranking the disease burden of 14 pathogens in food sources in the United States using attribution data from outbreak investigations and expert elicitation”, *Journal of Food Protection* 75(7), 1278–1291, 2012.
- Bell, C. and Kyriakides, A., “Salmonella: A practical approach to the organism and its control in foods”, *Oxford: Blackwell Science* 1, 35-45, 2002.
- Bell, C., “Approach to the control of entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)”, *International Journal of Food Microbiology* 78, 197–216, 2002.
- Besser, R. E., Lett, S. M. and Weber, J. T., “An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider”, *Journal of American Medical Associate* 269, 2217–2220, 1993.
- Bhunja, A. K., Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and pathogenesis, *Springer Nature*, New York, 2008.
- Birge, E. A., Bacterial and Bacteriophage Genetics, *Springer-Verlag*, New York, 2000.
- Botsoglou, N. A., Govoris, A., Boysoglou, E. N., Grigoropoulou, S. H. and Papageorgiou, G., “Antioxidant activity of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate supplementation in long-term frozen stored turkey meat”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2930-2936, 2003.
- Braden, C. R., “*Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States”, *Clinical Infectious Diseases* 43: 512–517, 2006.
- Bradley, K., “Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins”, *Journal of Bacteriology* 31, 230–314, 1967.

Bruttin, A. and Brussow, H., “Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: A safety test of phage therapy”, ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy*** 49, 2874-2878, 2005.

Brüssow, H. and E. Kutter., “Bacteriophages: Biology and Applications”, ***Phage Ecology*** 129-164, 2005.

Bueno, E., García, P., Martínez, B. and Rodríguez, A., “Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard type cheese”, ***International Journal of Food Microbiology*** 158(1), 23-27, 2012.

Carlton, R. M., Noordman, W. H., Biswas, B., de Meester, E. D. and Loessner, M. J., “Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatics analyses, oral toxicity study and application”, ***Regulatory Toxicology and Pharmacology*** 43, 301-312, 2005.

Cason, J. A., Buhr, R. J., Dickens, J. A., Musgrove, M. T. and Stern, N. J., "Carcass microbiological quality following intermittent scalding and defeathering", ***Journal of Applied Poultry Research*** 8, 368-373, 1999.

CDC, “Center for Disease Control and Prevention, Foodborne Outbreak Online Database (FOOD)” <http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/Default.aspx>, 2013

Coffey, B., Mills, S., Coffey, A., McAuliffe, O. and Ross, R. P., “Phage and their lysins as biocontrol agents for food safety applications”, ***Annual Review of Food Science and Technology*** 1, 449-468, 2010.

Cormican, M., DeLappe, N., O’Hare, C., Doran, G., Morris, D., Corbett-Feeney, G., Fanning, S. and Daly, M., “*Salmonella enterica* serotype Bredeney: antimicrobial susceptibility and molecular diversity of isolates from Ireland and Northern Ireland”, ***Applied and Environmental Microbiology*** 68, 181–186, 2002.

d’Hérelle, F., “Technique de la recherche du microbe filtrant bactériophage (Bacteriophagum intestinale)”, ***Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*** 81, 1160– 1162, 1918.

EFSA http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale1178620753812_1211902031795.html, 15 Haziran 2018.

Ergezer, H., Değişik yöntemlerle marine edilmiş kanatlı etlerinin kimyasal, mikrobiyolojik, tekstürel ve duyuşal özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, **Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Denizli, s. 2-42, 2005.

Ergüllü, E., “Bakteriyofaj ve süt teknolojisinde yarattığı sorunlar”, **GIDA** 7(5), 239- 245, 1982.

Fiorentin, L., Vieira, N. D. and Barioni J. W., “Use of lytic bacteriophages to reduce *Salmonella* Enteritidis in experimentally contaminated chicken cuts”, **Revista Brasileira de Ciência Avícola** 7, 255-260, 2005

Fruciano, D. E. and Bourne, S., “Phage as an antimicrobial agent: d’Herelle’s heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West”, **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology** 18, 19-26, 2007.

Galarcea, N. E., Brava, J. L., Roberson, J. P. and Boriea, C. F., “Bacteriophage cocktail reduces *Salmonella enterica* serovar Enteritidis counts in raw and smoked salmon tissues”, **Revista Argentina de Microbiología** 46(4):333-337, 2014.

Garcia, P., Madera, C., Martinez, B. and Rodriguez A., “Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages”, **International Dairy Journal** 17, 1232– 1239, 2007.

Garcia, P., Martinez, B., Obeso, J. M. and Rodriguez, A., “Bacteriophages and their application in food safety”, **Letters in Applied Microbiology** 47, 479-485, 2008.

Gautier M, Rouault A, Sommer P, Briand R., “Occurrence of *Propionibacterium freudenreichii* bacteriophages in Swiss cheese”, **Applied and Environmental Microbiology** 61, 2572– 2576, 1995.

Gill, J. J., Sabour, P. M., Leslie, K. E. and Griffiths, M. W., “Bovine whey proteins inhibit the interaction of *Staphylococcus aureus* and bacteriophage K”. **Journal of Applied Microbiology** 101, 377–386, 2006.

Goncalves, G. A. M., Donato, T. C., Baptista, A. A. S., Correa, I. M. O., Garcia, K. C. D. and Filho, R. L. A., “Bacteriophage-induced reduction in *Salmonella* Enteritidis counts

in the crop of broiler chickens undergoing preslaughter feed withdrawal”, ***Poultry Science*** 93, 216–220, 2014.

Goodburn, C. and Wallace, C., “The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: a review”, ***Food Control*** 32, 418-427, 2012.

Goode, D., Allen, V. M. and Barrow, P. A., “Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages”, ***Applied and Environmental Microbiology*** 69, 5032-5036, 2003.

Greer, G. G., “Bacteriophage control of foodborne bacteria”, ***Journal of Food Protection*** 68 (5), 1102–1111, 2005.

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

Guenther, S., Herzig, O., Fieseler, L., Klumpp, J. and Loessner, M. J., “Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2”, ***International Journal of Food Microbiology*** 154, 66-72, 2012.

Guttman B, Raya R. A. and Kutter E., Bacteriophages Biology and Applications: Basic Phage Biology, ***CRC Press***, USA., 2005.

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

Hagens, S. and Loessner M. J., “Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens”, ***Applied Microbiology and Biotechnology*** 76, 513–519, 2007.

Hanlon, G. W., “Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections”, ***International Journal of Antimicrobial Agents*** 30, 118-128, 2007.

Haq, I. U., Chaudhry, W. N., Akhtar, M. N. and leeb, S., Ishtiaq, I. and Qadri, I., “Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review”, ***Virology Journal*** 9, 9-15 2012.

Hartland, E. L. and Leong, J. M., “Enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*:

ecology, pathogenesis and evolution”, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3, 8-15, 2013.

Hendrix, R. W., Bacteriophage λ and Its Relatives, In Modern Microbial Genetics, **A John Willey&Sons Publication**, New York, 2002.

Higgins, J. P., S.E. Higgins, K.L. Guenther, W. Huff, A. M. Donoghue, D. J. and Donoghue, B. M., “Use of a specific bakteriofaj treatment to reduce *Salmonella* in poultry products”, *Poultry Science* 84, 1141-1145, 2005.

Himmelweit, F., “Combined action of penicillin and bacteriophage on staphylococcus”, *Lancet* 249, 104-105, 1945.

Hogg, M. A., The social identity perspective, In: The handbook of Group Research and Practice, **Thousand Oaks**, Sage, USA, 2005.

Ikedo, H. and Tomizawa, J. I., “Transducing fragments in generalized transduction by phage P1. I. Molecular origin of the fragments”, *Journal of Molecular Biology* 14, 85-129, 1965.

Jordan, K. N., Oxford, L. and O’Byrne, C. P., “Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157:H7: correlation between alterations in the cell envelope and increases acid tolerance”, *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3048–3055, 1999.

Kaper, J. B., Nataro, J. P. and Mobley, H. L., “Pathogenic *Escherichia coli*”, *Nature Reviews Microbiology* 2, 123-140, 2004.

Kılıç, S., “Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri”, *Ege Üniversitesi Basımevi*, Bornova, İzmir, 451, 2008.

Kılıç, S., Süt Mikrobiyolojisi, *Sidas Medya Ltd. Şti.*, Çankaya, İzmir, 2010.

Kınık, Ö., Uysal, H., Kavas, G., Pratik Faj Kontrolü, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi*, İzmir, 2000.

Kim, K. P., Klumpp, J. and Loessner, M. J., “*Enterobacter sakazakii* bakteriofajları can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula”, *International Journal of Food Microbiology* 115, 195-203, 2007.

Kocharunchitt, C., Ross, T. and McNeil, D. L., “Use of bacteriophages as biocontrol

agents to control Salmonella associated with seed sprouts”, *International Journal of Food Microbiology* 128, 453– 459, 2009.

Kutter, E., “Phage Therapy, Phage Biology”, *Ever Green* 1, 1-15, 1997.

Lwoff, A., Horne, R.W., Tournier, P., “A system of viruses”, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 27, 51–62, 1962.

Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., et al., “The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis”, *Clinical Infectious Diseases*, 50, 882-889, 2010.

Marco, M. B., Reinheimer, J. A., Quiberoni, A., “Phage adsorption to *Lactobacillus plantarum*: influence of physiological and environmental factors”, *International Journal of Food Microbiology* 138, 270–275, 2010.

Martínez, B., Obeso, M. J., Ana Rodríguez, A. and García, P., “Nisin-bacteriophages cross-resistance in *Staphylococcus aureus*”, *International Journal of Food Microbiology* 122, 253-258, 2008.

Mc Grath, S., Fitzgerald, G. F. and van Sinderen, D., “Bacteriophages in dairy products: Pros and cons.”, *Biotechnology Journal* 2, 450-455, 2007.

Mead, P., Slutsker, L. and Deitz, V., “Food related illness and death in the United States”, *Emergence Infection Disease* 5, 607–625, 1999.

Mead, G. C., “Microbiological quality of poultry meat: a review”. *Brazilian Journal of Poultry Science* 6, 135-142, 2004.

Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A. and Griffiths, M. W., “Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk”, *Journal of Food Protection* 64, 927–933, 2001.

O’Flaherty S, Coffey A, Meaney W. J., Fitzgerald G. F. and Ross R. P., “Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk”, *Letters in Applied Microbiology* 41, 274–279, 2005.

O’Flaherty, S., Ross, R. P. and Coffey, A., “Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria”, *FEMS Microbiology Review* 33, 801–819, 2009.

O’Flaherty, S., Coffey, A., Meaney, W. J., Fitzgerald, G. F. and Ross, R. P., “Inhibition

of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk”, **Letters in Applied Microbiology** 41, 274–279, 2005.

O’Flynn, G., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. and Coffey, A., “Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7”, **Applied and Environmental Microbiology** 70, 3417-3424, 2004.

O’Brien, A. D., Newland, J. W., Miller, S. F., Holmes, R. K., Smith, H. W. and Formal, S. B., “Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea”, **Science** 226 (4675), 694-696, 1984.

Oliver, S. P., Jayarao, B. M. and Almeida, R. A., “Foodborne pathogen in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications” **Foodborne Pathogen and Disease** 2(2), 115-129, 2005.

Özer, Ö., Farklı antioksidan ilavesinin dondurularak muhafaza edilen mekanik ayrılmış 90 piliç eti köftelerinin bazı kalite özellikleri üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, **Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Konya, s. 20-25, 2008.

Pennazio, S., “The origin of phage virology”, **Rivista Di Biologia** 99, 103-129, 2006.

Prescot, L. M., John, P. and Harley, D. A., Microbiology, **McGraw Hill International Edition Publishing**, New York, USA, 2005.

Schmelcher, M. and Loessner, M. J., “Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens”, **Bacteriophage** 4, 28-137, 2014.

Small, A., Reid, C. A. and Buncic, S., “Conditions in lairages at abattoirs for ruminants in southwest England and in vitro survival of *Escherichia coli* O157, *Salmonella* Kedougou and *Campylobacter jejuni* on lairage-related substrates”, **Journal of Food Protection** 66, 1570–1575, 2003.

Stadelman, W. J., Olson, V. M., Shemwell, G. A. and Pasch, S., Egg and Poultry-Meat Processing, **Ellis Horwood Ltd.**, UK, 1988.

Steele, B. T., Murphy, N., Arbus, G. S. and Rance, C. P., “An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of fresh apple juice”, **Journal of Pediatrics** 101, 963–965, 1982.

- Stone, R., “Stalin’s Forgotten Cure”, **Science** 298,728-731, 2002.
- Suárez, V. B., Quiberoni, A., Binetti, A. G. and Reinheimer, J. A., “Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinian dairy industries”, **Journal of Food Protection** 65(10), 1597-1604, 2002.
- Sulakvelidze, A. and Kutter, E., “Bacteriophage therapy in humans”, **Bacteriophages: Biology and Application** 1, 381-436, 2005
- Summers, W. C., “How bacteriophage came to be used by the phage group”, **Journal of the History of Biology** 26, 255-267, 1993.
- Şahin, S., Çelik, T. H., “Comparison of air and water chilling effects on the microbiological quality of broiler carcasses”, **Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 12(2), 67-73, 2015.
- Tabla, R., Martinez, B. and Rebollo, J. E., “Bacteriophage performance against *Staphylococcus aureus* in milk is improved by high hydrostatic pressure treatments”, **International Journal of Food Microbiology** 156(3), 209-213, 2012.
- Tang, J. Y. H., Mohamad Ghazali, F., Saleha, A. A., Nishibuchi, M., Son, R., “Comparison of thermophilic *Campylobacter* spp. Occurrence in Two Types of Retail Chicken Samples, Malaysia”, **International Food Research Journal** 16, 277-288, 2009.
- Temiz, H., Okumuş, E., “Peynir altı suyunun değerlendirilmesinde kullanılan yöntemler”, **Türkiye 4. Gıda Mühendisliği Kongresi Bildirileri**, Ankara, s. 151-171, 29 Eylül-1 Ekim 2005.
- Tolba, M. H., Meshref A. M. S. and Zeinhom, M. M. A., “Biocontrol of *Escherichia coli* O126:H7 in skim milk using bacteriophages”, **American Journal of Animal and Veterinary Sciences** 9(4), 221-229, 2014.
- Tunail, N., Mikrobiyoloji, **Pelin Ofset**, Ankara, 2009.
- USDA, Foodborne illness cost calculator: Salmonella. 2013, http://www.ers.usda.gov/topics/food-safety/foodborne-illness/salm_intro.asp, 20 Haziran 2018.

Van Regenmortel, M. H. V., “Introduction to the species concept”. In: M. H. V. Van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M., Lemon, Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. and Wickner, R. B., Virus taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, **Academic Press**, New York & San Diego, USA, 2000.

Waldor, M. K. and Mekalanos, J. J., “Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin”, **Science** 272, 1904-1910, 1996.

Willshaw, G., Cheasty, T. ve Smith, H. R., “*Escherichia coli*. In: The Microbiological Safety and Quality of Food. **Aspen Inc.**, Maryland, USA, 2000.

Wright, A. P., Richardson, L., Mahon, B. E., Rothenberg R., Cole, D. J., “The rise and decline in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis outbreaks attributed to egg-containing foods in the United States, 1973–2009”, **Epidemiology and Infection** 144, 810–819, 2016.

Wright, A. C., Danyluk, M. D. and Otwell, W. S., “Pathogens in raw foods: what the salad bar can learn from the raw bar”, **Current Opinion Biotechnology** 20, 172–77, 2009.

Ye, J., Kostrzynska, M., Dunfield, K., Warriner, K., “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”, **Journal of Food Protection** 72, 2284–2292, 2009.

Zhao, T., Doyle, M. P. and Besser, R. E., “Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives”, **Applied and Environmental Microbiology** 59, 2526–2530, 1993.

ÖZ GEÇMİŞ

Özgül DEMİRASLAN AYDIN 15.07.1983 tarihinde Niğde ilinde dünyaya geldi. İlk ve ortaöğrenimini Niğde’da tamamladı. 2001 yılında Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümünde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2006 yılında tamamladı. 2009 yılından beri Tarım ve Orman Bakanlığı’nda Gıda Mühendisi olarak çalışmaktadır. Evli ve dört çocuk sahibidir. 2015 yılında Niğde Üniversitesi (Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi) Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.



