



Gıda Teknolojilerinde İnovatif Bir Yaklaşım Olarak “Bakteriyofajlar”

Yağmur Küçükdoğan^{1*}, Rumeysa Bayrak², Eda Esmer³, Pervin Başaran⁴

^{1*} Yeditepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye, (ORCID: 0000-0001-9871-0534), yagmur.kucukdogan@yeditepe.edu.tr

² İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya ve Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-8754-1250), bayrak19@itu.edu.tr

³ İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya ve Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye, (ORCID: 0000-0003-1848-5766), esmer@itu.edu.tr

⁴ İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya ve Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-9969-6196), basaranakocakp@itu.edu.tr

(İlk Geliş Tarihi 4 Aralık 2020 ve Kabul Tarihi 24 Temmuz 2021)

(DOI: 10.31590/ejosat.832904)

ATIF/REFERENCE: Küçükdoğan, Y., Bayrak, R., Esmer, E. & Başaran, P. (2021). Gıda Teknolojilerinde İnovatif Bir Yaklaşım Olarak “Bakteriyofajlar”. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (27), 6-16.

Öz

Gıda üretim zincirinde kontamine olmuş gıdalardaki patojenik mikroorganizmaların antibiyotiklere direnç göstermeye başlaması, Avrupa’da ve ABD’de hayvan beslemede antibiyotik kullanımına yasal sınırlamaların getirilmesi ve bunun yanı sıra tüketicilerin de kimyasal kontaminasyon içermeyen ürün talepleri doğrultusunda gıdaların patojenlerden arındırılmasında alternatif kontrol yöntemlerine gereksinim duyulmaktadır. Son yıllarda canlı mikrobiyal hücreleri enfekte eden virüsler olarak tanımlanan fajlar, tarım ve gıda sektöründe farklı amaçlarla ticarileştirilmeye başlanmıştır. Gıdalarda patojenlerin yok edilmesinde genel olarak “çiftlikten sofraya” kadar tüm gıda zinciri aşamalarında uygulanabilmektedir. Bakteriyofajlar, özellikle gıda endüstrisinde ekipman ve temas yüzeylerinin dezenfeksiyonu (biyosanitasyon), kolay bozulabilir gıdalarda doğal koruyucu olarak kullanılarak, ürünün raf ömrünün uzatılması (biyokoruma) ve çiğ süt, et ve taze gıdalarda dekontaminasyon (biyokontrol) amacıyla kullanılabilir. Antibiyotik alternatif olarak hayvan ve bitki yetiştiriciliğinde terapötik amaçlı kullanılmasının yanı sıra, gıda endüstrisindeki temel problemlerden biri olan biyofilm oluşumunu önleme ve elimine etmede, patojen bakterilerin hızlı tespitinde kullanılması konusunda yoğun araştırmalar devam etmektedir. Bakteriyofaj uygulamaları, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp.* ve *Salmonella spp.* gibi gıda kaynaklı patojenler üzerine yoğunlaşmıştır. Fajın gıda güvenliğiyle ilgili iki benzersiz özelliği arasında, hayvan ile bitki hücrelerine ve doğal mikrobiyotaya zarar vermemeleri sıralanabilmektedir. Fajların konakçılarına özgü özellikleri, sadece sınırlı sayıda bakteri suşunu enfekte edebilmeleri açısından bir dezavantaj olarak değerlendirilmektedir. Buna ek olarak çevresel faktörlerden (ultraviyole (UV) ışınları, sıcaklık ve nem dalgalanmaları, bitki koruması için kullanılan kimyasalların kalıntıları gibi) etkilenebilir olması faj uygulamasında çeşitli zorluklar yaratmaktadır. Bu derlemede, son yıllarda inovatif bir yaklaşım olarak değerlendirilen bakteriyofajların ticarileştirilme süreci, tarım ve gıda alanlarındaki uygulamalarının avantaj ve dezavantajları detaylı olarak incelenerek, hasat öncesi ve hasat sonrası gıda işlemede kullanılabilirliği değerlendirilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Virüs, Bakteriyofaj, Faj Terapisi, Gıda Teknolojisi, Biyofilm, Biyoajan.

"Bacteriophages" as an Innovative Approach in Food Technologies

Abstract

In line with the resistance of pathogenic microorganisms in contaminated foods to antibiotics in the food production chain, the imposition of legal restrictions on the use of antibiotics in animal nutrition in Europe and the USA, and the demand of consumers for products that do not contain chemical contamination, alternative control methods are required for the decontamination of foods from pathogens. Phages, defined as viruses that infect living microbial cells in recent years, have started to be commercialized for different purposes in the agriculture and food industry. It can generally be applied at all stages of the food chain from "farm to table" in the destruction of pathogens in foods. Bacteriophages, especially in the food industry, can be used for disinfection of equipment and contact surfaces (biosanitization), using as natural preservatives in perishable foods, extending the shelf life of the product (bioprotection), and decontamination (biocontrol) in raw milk, meat, and fresh foods. In addition to its therapeutic use in animal and plant breeding as an alternative to antibiotics, intensive research continues on its use in the prevention and elimination of biofilm formation, one of the main problems in the food industry, and rapid detection of pathogenic bacteria. Bacteriophage applications have focused on foodborne pathogens such as *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp.* and *Salmonella spp.* Two unique characteristics of phage regarding food safety are that they do not damage animal and plant cells and do not harm the natural microbiota. The characteristics of phages specific to their hosts are seen as a disadvantage in that they can only infect a limited number of bacterial strains. Besides, being easily affected by environmental factors (such as ultraviolet (UV) rays, temperature, and humidity fluctuations, and chemical agent residues used for plant protection) that creates various difficulties in phage application. In this review, it is aimed at a different perspective by examining the advantages and disadvantages of the applications of bacteriophages in agriculture and food fields, which have been considered as an innovative approach in recent years.

Keywords: Virus, Bacteriophage, Phage Therapy, Food Technology, Biofilm, Bioagent.

1. Giriş

İngiliz bakteriyolog Ernest Hankin 1896'da ilk kez bakteri filtrelerinden geçen tanımlanmamış bir maddenin antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir (Nigam ve ark., 2014). Frederick Twort 1915'te, doğal antibakteriyel ajanlar olarak faj kullanımını önermiştir. Felix d'Herelle ise (1919) fajları şiddetli dizanteri tedavisi için kullanmış ve bakteriyel inhibisyonunda plak oluşumunu virüslere bağlayan ve "bakteriyofaj" terimini ilk kez kullanan araştırmacı olmuştur (Garcia ve ark., 2008; Lin ve ark., 2017). Takip eden yıllarda, d'Herelle faj biyolojisi üzerine kapsamlı çalışmalar gerçekleştirmek üzere 1923'te Tiflis'te (Gürcistan) Uluslararası Bakteriyofaj Enstitüsü'nün kurulmasına öncülük etmiştir (Sulakvelidze ve ark., 2001). Fajlar, 1920-1940 yılları arasında dizanteri, kolera ve cilt hastalıkları gibi hastalıkların tedavisinde terapötik ajanlar olarak tanımlanmıştır (Hermoso ve ark., 2007; Monk ve ark., 2010). 1928'de penisilin keşfiyle antibiyotik kullanımının başlaması ve II. Dünya Savaşı'ndan sonra batı toplumlarında enfeksiyonların tedavisinde antibiyotiklere öncelik verilmesi, kapsamlı araştırmaların devam ettiği eski Sovyetler Birliği ve Polonya dışındaki tüm ülkelerde fajların terapötik olarak kullanımını büyük ölçüde sınırlandırmıştır (Slopek ve ark., 1987; Sulakvelidze ve ark., 2001).

Son yıllarda, mikrobiyal enfeksiyonları tedavi etmek için antibiyotiklerin bilinçsizce uzun süreli ve düzensiz kullanımı, mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç oluşturmaya sebep olmuştur (Shafiani ve Malik, 2003). Antibiyotiklerin yerine geçebilecek potansiyele sahip olan bakteriyofajlar zorunlu parazit olup doğal bakteriyel katillerdir, canlı bakteriyel hücreleri konakçı olarak kullanarak yeni fajlar üretirler ve son aşamada bakteri hücrelerini parçalayarak etrafa yayılırlar (Barberis ve ark., 2018; Lewis ve ark., 2020). Hedef hücrelerini özgün ve seçici olarak tanımak ve etkili bir şekilde öldürmek için milyonlarca yıllık evrim tarafından optimize edilen fajlar, oldukça çeşitli olup, farklı türlerdeki canlılara yayılmış olarak yeryüzünde en yaygın bulunan mikroorganizmalardır. Bakteriyofajlar enfekte ettikleri bakteri grubu ve suşu kullanılarak isimlendirilmektedir; örneğin, *E. coli*'yi enfekte eden bir faj "coliphage" olarak adlandırılmaktadır (Hendrix, 2002; Brüssow ve Kutter, 2005; van Regenmortel ve Mahy, 2010; Hussain ve ark., 2017). Biri litik diğeri lizojenik olmak üzere iki yaşam döngüsüne sahip olan fajlar kendi kendilerini kopyaladıkları için çevresel yayılmaları da oldukça kolaydır (Zaman ve ark., 1991; Rao ve Lalitha, 2015).

Bakteriyofajlar, insan bağırsağında (Shkoporov ve ark., 2018), derisinde (van Zyl ve ark., 2018), hayvanlarda (Morozova ve ark., 2018), kanalizasyon arıtma sistemlerinde (Fernandez-Cassi ve ark., 2018) ve fermente gıdalarda (Halter ve Zahn, 2018) doğal olarak bulunmaktadır. Fajların bağırsak mikrobiyotası üzerinde olumsuz bir etkisi tespit edilmemiştir (Aldayel, 2019). Geniş aktivite spektrumlarına sahip olan birçok kimyasal antibiyotik, süper enfeksiyonları indüklemeye eğilimlidir, ancak fajlar konakçı özgüllükleri nedeniyle sağlığı koruyan normal flora bakterilerini sadece minimal olarak etkilemektedir (Carlton, 1999; Skurnik ve ark., 2007; Gupta ve ark., 2011). Fajların ve litik proteinlerin çoklu antibiyotiğe dirençli bakteriyel enfeksiyonlarının tedavisi üzerine yapılan araştırmalar, faj terapisinin antibiyotik ile tedaviye alternatif monoterapi şeklinde kullanımının yanı sıra bulaşıcı hastalıkların tedavi etkinliğini artırmak için antibiyotikler ile de kombine edilebileceğini göstermektedir (Kutateladze ve Adamia 2010, Lin ve ark., 2017).

Fajların tedavi amaçlı AR-GE maliyeti, antibiyotiklerle karşılaştırıldığında nispeten daha ucuzdur (El-Shibiny ve El-Sahhar, 2017) ve enfeksiyonların tedavisinde, antibiyotik tedavisinde gerekenden daha az sıklıkta ve daha düşük bir tedavi dozuna ihtiyaç duyulmaktadır (Sulakvelidze ve ark., 2001).

1.1 Fajların Hayvan Yetiştiriciliğinde Kullanım Alanları

Çiftlik hayvanları, *Listeria*, *Campylobacter*, *Escherichia* ve *Salmonella* gibi birçok önemli bakteriyel patojenin rezervuarıdır ve bu sebeple insanlar tarafından tüketildiklerinde enfeksiyona neden olabilmektedir (Endersen ve ark., 2014). Avrupa Birliği, hayvan yetiştirilmesinde antibiyotiklerin profilaktik kullanımını yasakladığından, dünyanın geri kalanı antibiyotik kullanımına alternatifler bulmak ve ciddi önlemler almak için yoğun bir baskı altındadır ((USFDA), 2006; Cogliani ve ark., 2011). Antibiyotik kullanımına alternatif olarak hayvancılık üretimindeki faj terapisi; birincil üretim sırasında probiyotik formunda faj uygulanması yoluyla patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların önlenmesinde, kesim öncesi hayvanların derisinin dezenfekte edilmesinde ve hayvan büyümesi sırasında, gıda işleme sırasında hayvan dışkı ile çapraz kontaminasyon olasılığının azaltılmasında ve hayvanlarda halihazırda mevcut olan bir hastalığın tedavisinde etkili olabilmektedir (Sillankorva ve ark., 2012; Kazi ve Annapure, 2016).

Fajlar, kümes hayvanlarında spreyleme, ağız yoluyla, içme suyuna veya yeme dahil edilerek *Salmonella* ve *Campylobacter*'i, geviş getiren hayvanlarda ise oral ve/veya rektal olarak *E. coli*'yi kontrol etmek amacıyla uygulanmıştır (Sillankorva ve ark., 2012). Püskürtme yöntemi *E. coli* O157:H7'yi önemli ölçüde azaltmazken, oral yolla besleme yönteminin bu patojeni önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir (Bach ve ark., 2009; Arthur ve ark., 2017). Fajların rumen ve gastrointestinal sistemdeki gıda partiküllerine seçici olmayan şekilde bağlanması (Goodridge ve Bisha, 2011) ve gastrointestinal sisteme yetersiz sayıda oral fajın ulaşması (Hagens ve Loessner, 2007) oral uygulamalardaki başarısızlıkların sebepleri arasında görülmektedir. Buna çözüm olarak fajların enkapsülasyon olarak kullanımını hayvanlardaki gastrointestinal sistem koşullarında bakteri hücrelerine daha etkin lokalize olmasını sağlamaktadır (Ma ve ark., 2008; Wang ve Sabour, 2010). Yapılan bir çalışmada, *Salmonella typhimurium*'u kontrol etmek için domuz yemine mikrokapsülenmiş faj karışımının etkinliği araştırılmış ve mikrokapsülasyon uygulanmış fajlarla beslenen domuzların, besleme ve kontrol gruplarına kıyasla doğrudan daha az *S. typhimurium* bulaştığı gözlemlenmiştir (Wall ve ark., 2010). Bakteriyel fajlar, deniz suyunda da uzun süreli olarak hayatta kalabilmektedir (Pereira ve ark., 2011). Su ürünleri yetiştiriciliğinde mikrobiyal hastalıkların önlenmesine alternatif olarak faj terapisi önerilmiştir (Oliveira ve ark., 2012). Birçok çalışma, litik fajların balık ve kabuklu deniz hayvanlarında farklı bakteri türlerini kontrol etmede yararlı olduğunu göstermiştir (Rao ve Lalitha, 2015).

1.2 Fajların Bitkisel Tarımda Hasat Öncesi Kullanım Alanları

Birçok önemli bakteriyel bitki patojeni üzerinde faj biyokontrolü üzerine çok sayıda umut vaat eden çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır (Buttimer ve ark., 2018). Tarla ve bahçe bitkisi yetiştiriciliğinde birçok önemli bitki patojeni kaynaklı hastalıkların kontrolünde fajların biyokontrol ajan olarak kullanılabilmesi tespit edilmiştir (Tablo 1) (García ve ark., 2008; Buttimer ve ark., 2018). Ticari tüm elma ve armut türleri, *Xylella*

fastidiosa patojenine orta ile yüksek derecede duyarlıdır ve dirençli germplazma mevcut değildir. Kanada ve ABD'de, streptomisin ve kasugamisin, ateş yanıklığı patojeninin kontrolünü sağlamak için açık çiçeklenme sırasında uygulanmaktadır (McManus ve ark., 2002; McManus ve ark., 2014). Streptomisin direncinin mevcut olduğu ve/veya organik meyve yetiştirilen bölgelerde, antibiyotik kullanımının yasaklanması sebebiyle alternatif kontrol stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır. *Myoviridae* ve *Podoviridae*'ye ait patojenik olmayan konakçı *Pantoea agglomerans* ile birleştirilen fajlar, açık çiçeklenme sırasında patojeni kontrol etme yetenekleri açısından sera ve tarla koşullarında test edilmiş ve ateş yanıklığında önemli ölçüde azalma gözlemlenmiştir (Lehman ve ark., 2007; Scircev ve ark., 2010; Boulé ve ark., 2011).

Fajların ultraviyole (UV) ışınlarla, sıcaklık ve nem dalgalanmalarına, kimyasal ajan kalıntıları gibi olumsuz çevresel faktörlere doğrudan maruz kalması sebebiyle açık ortamda yetiştirilen bitkilerde bakterilerin faj yoluyla biyokontrolü zordur ve faj uygulamasının optimize edilmesi gerekir (Fernández ve ark., 2018). UV'nin olumsuz etkilerini en aza indirmek ve yaprak yüzeyleri üzerinde yüksek faj popülasyonlarının kaldığı süreyi uzatmak için fajlar bitkilere gün sonunda uygulanabilmektedir (Jones ve ark., 2012). Yapılan bir çalışmada, mikroenkapsülasyon uygulaması fajların UV duyarlılığını azaltarak pH 3-7 aralığında ve aşırı sıcaklıklarda hayatta kalmasını artırmıştır (Lewis ve Hill, 2020). Bitkisel tarımda bitki patojenlerine karşı bazı faj uygulamaları Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. Tarımda Bakteriyofaj Uygulamaları

Patojen Mikroorganizma	Etki	Referans
<i>X. campestris</i> pv. <i>Vesicatoria</i>	Domates bitkilerinde bakteriyel lekelerin azalması.	Balogh ve ark., (2003)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>allii</i>	<i>Xanthomonas</i> 'in etken maddesi soğan yaprak yanıklığının şiddetini azaltması.	Lang ve ark., (2007)
<i>X axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	Asya turuncgil kanserinde yaklaşık %59'luk bir azalma sağlaması.	Balogh ve ark., (2008)
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	İstiridye mantarlarında kahverengi leke hastalığının tamamen inhibisyonunun sağlanması.	Kim ve ark., (2011)
<i>Ralstonia solanacearum</i>	φRSL1 faj uygulaması sonucunda patojenin domates kökünde varlığının engellenmesi.	Fujiwara ve ark., (2011); Bae ve ark., (2012)
<i>E. amylovora</i>	Saksı elma ağaçlarında <i>Pantoea agglomerans</i> ile birlikte % 56 hastalık azalması.	Boule ve ark., (2011)
<i>Dickeya solani</i>	Tohum yumrularına muamele edilen ekim fajından 82 gün sonra verimde önemli bir artışın sağlanması.	Adriaenssens ve ark., (2012)
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Faj terapisi sonrası fitopatojen ile hastalık insidansında azalma.	Lim ve ark., (2013)
<i>Pseudomonas syringae</i>	Üç fajlı kokteyl ile soya fasulyesinde bakteriyel yanıklığın, yaprakların kurumasının ve enfekte olmuş bitkilerin nihai ölümünün engellenmesi.	Susianto ve ark., (2014)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Actinidiae</i>	Enfekte kivi meyvelerinden izole edilmiş fajların tam karakterizasyonu yoluyla fajların biyokontrol ajanları olarak kullanılması.	Frampton ve ark., (2014)
<i>Dickeya</i> spp.	Etkinliğini kanıtlamak için izole edilmiş fajın genom dizilemesi.	Czajkowski ve ark., (2014)
<i>Xylella fastidiosa</i>	Dört fajlı bir kokteyl ile patojen popülasyonunun önemli ölçüde azaltılması.	Das ve ark., (2015)
<i>Erwinia amylovora</i>	Elma fidelerinin tedavisi, <i>E. amylovora</i> 'ya özgü bakteriyofajların penetrasyonu ve translokasyonu nedeniyle hastalığın şiddetini azaltılması.	Nagy ve ark., (2015)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Porri</i>	Hastalık semptomunun gelişiminin zayıflaması.	Rombouts ve ark., (2016)
<i>Xylella fastidiosa</i>	Üzümde terapötik ve profilaktik tedaviler için kullanan faj kokteyllerinin sera deneylerinde patojen ve semptom gelişimini önemli ölçüde kontrol edebilmesi.	Svircev ve ark., (2018)
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>Oryzae</i>	Fajlarla tohum tedavisinden sonra patojen popülasyonunun ortadan kaldırılması.	Ranjani ve ark., (2018)
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	<i>Podoviridae</i> virüs ailesinden olan CB1, CB2 ve CB3 fajlarının yumuşak kök hastalığının tedavisinde kullanılması.	Buttimer ve ark., (2018)

1.3 Fajların İşlenmiş Gıdalarda Kullanımı

Fermente süt ürünü üretilen işletmelerde fermentasyonda görev alan laktik streptokokları enfekte eden fajların kontaminasyonu ve süt endüstrisinde yarattığı sorunlar, 80 yıldan uzun bir süre önce Whitehead ve Cox (1935) tarafından rapor edilmiştir (Garneau ve Moineau, 2011). Peynir fabrikalarında faj kontaminasyonu önemli bir sorundur; çünkü peynir altı suyunun ayrılması genellikle aerosol kaynaklı fajların ortaya çıkmasına ve dolayısıyla fabrika ortamının kirlenmesine yol açmaktadır (Połaska ve Sokołowska, 2019). Bu nedenle, fermente süt ürünü işletmelerinde faj seviyelerini düşürmek ve süt fabrikalarında faj dağılımını durdurmak amacıyla; starter kültür rotasyonu, starterlerin doğrudan inokülasyonu, peynir altı suyunun dikkatli kullanımını ve uzaklaştırılması, faj-engelleyici ortam oluşturulması, UV radyasyonu, termal uygulama ve filtrasyon vb. optimize edilmiş sanitasyon ve faj dirençli starter kültürlerinin kullanımı uygulanan yaklaşımlardan bazılarıdır (Coffey ve Ross, 2002; Moineau ve ark., 2002; Atamer ve ark., 2013; Pujato ve ark., 2019).

Günümüzde özgün hedef mikroorganizmalara karşı fajların biyokoruma, doğal veya kontrollü mikrobiyota ya da antimikrobiyal olarak kullanılması ürünlerin raf ömrünü uzatmada önemli bir araştırma alanı oluşturmaktadır (Singh, 2018). Fajlar, patojenik ve bozulma etmeni bakterilerin (özellikle psikrotrofik bakteriler) soğutulmuş gıdalar üzerindeki büyümesini 1° C'ye kadar düşük sıcaklıklarda bile konakçıları parçalayarak kontrol altına alabildiğinden, ideal gıda biyokoruma ajanı olarak görülmektedir (Greer, 1982; Greer, 1988). Son yıllarda yapılan bir çalışmada, yüksek özgülükleri nedeniyle fajlar, süt ürünlerinde sıklıkla bulunan *Staphylococcus* bakterilerini yok etmek için de kullanılmıştır (Połaska ve Sokołowska, 2019). Diğer bir çalışmada ise, mikroenkapsüle edilmiş fajların domateslerde *E. coli* mikrobiyal yükünü beş gün boyunca önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Ramirez ve ark., 2018).

Fermentasyon, süt ve süt ürünleri işleme, kanatlı ve kırmızı et üretim tesislerinde biyofilm oluşumu, gıda güvenliği ve sanitasyon açısından önemli bir problemdir (Langsrud ve ark., 2003). Gıda işleme tesislerindeki tank ve boru hatlarında biyofilm oluşumu, metal korozyona neden olan fiziksel ve kimyasal reaksiyonlara sebep olmaktadır. Ekipmanlardaki biyofilm kalınlığının önemli bir noktaya gelmesi ise boru hatlarında ve özellikle plakalı eşanjörlerde ısı iletimini azaltabilmektedir (Simões, 2010). Sütte bulunan patojen sporları, süt işleme tesislerindeki ekipmanlarda pastörizasyondan sonra hayatta kalabilmekte ve biyofilm oluşturabilmektedir. Süt işletmelerinde, pastörizasyon sonrasında meydana gelen kontaminasyonun başlıca kaynağı dolmuş makineleridir (Dogan ve Boor, 2003). Biyofilm oluşumunu azaltmada ve elimine etmede birincil basamak, temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerinin sık olarak uygulanmasıdır, ancak bu işlem kalıntı oluşturma ve yüzey aşımını gibi etkiler göz önünde bulundurularak yapılmalıdır (Mosteller ve Bishop, 1993; Wirtanen ve ark., 2000). Yüksek konsantrasyonlarda kullanılan dezenfektanlar ortamdaki hassas mikroorganizmaları belli ölçüde elimine edebilmektedir ve zamanla antimikrobiyallere dirençli mikroorganizmalar gelişebilmektedir (Davies, 2003). Bu sebeple faj uygulaması, bakterilerin elimine edilmesinde kullanılan, spesifik, herhangi bir toksisiteye sahip olmayan oldukça kullanışlı bir yöntemdir

(Sillankorva ve ark., 2004). Tablo 2'de farklı fajların çeşitli gıdalardaki patojen veya bozulma etmeni mikroorganizmalar üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar bulunmaktadır.

Fajların, ticari gıda zincirinin farklı aşamalarında bakteriyel patojenlerin ve/veya bozulma etmeni mikroorganizmaların kontaminasyonunu önlemek için kullanılabilir alternatif olarak kullanılması yoğun bir araştırma alanını oluşturmaktadır (de Melo ve ark., 2018). Fajlar diğer gıda koruyucularında olduğu gibi gıdaların duyuşal özelliklerini değiştirmemekte (Połaska ve Sokołowska, 2019) ve genellikle gıda işleme koşullarına (gıdanın fizikokimyasal koşulları dahil) karşı direnç göstermektedir (Sillankorva ve ark., 2012). Gıda zincirinde fajlardan farklı şekillerde yararlanılabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla, çiğ etlerin, taze ürünlerin veya çiğ sütlerin (biyokontrol) dekontaminasyonu, ekipman ve temas yüzeylerinin dezenfeksiyonu (biyosanitasyon), hazır ürünlerin raf ömrünün uzatılması (biyokoruma) gibi uygulamalar başlıca hedefler arasında yer almaktadır (Sillankorva ve ark., 2012). Fajlar ambalaj materyaline ise; doğrudan eklenerek (Gouvêa ve ark., 2016; Amarillas ve ark., 2018) veya daldırma (Sukumaran ve ark., 2016; Vonasek ve ark. 2018) ve püskürtme metodu gibi çeşitli şekillerde dahil edilebilmektedir.

Gıdalarda faj uygulamalarında, gıdanın bazı iç ve dış faktörleri fajın etkinliğini doğrudan etkileyebilmektedir. Fajların, bakteri sayısını *in vitro* uygulamalardaki azaltma etkinliği; uygulanan fajların konsantrasyonu, uygulama yöntemi ve zamanlaması, konakçı hücrenin büyüme koşulları ve çevresel koşullar (sıcaklık, iyonik ortam, pH, besin konsantrasyonu) gibi birçok faktöre bağlıdır (Huff ve ark., 2003; Ryan ve ark., 2011; Robinson, 2014). Genel olarak, faj konsantrasyonu ne kadar yüksek olursa, hedef bakteri sayısında da o derece azalma olmaktadır (Lewis ve Hill, 2020). Faj dirençli suşların ortaya çıkışını sınırlandırmak ve etkinliği artırmak için tek fajın aksine faj kokteyli tavsiye edilmektedir (de Melo ve ark., 2018). Faj uygulamasında sıcaklığın etkisini incelemek için yapılan bir çalışmada, T4 faj veriminin yüksek oranda sıcaklığa bağlı olduğu ve 45 °C, 55 °C ve 70 °C sıcaklıkların T4 fajının inaktivasyonuna neden olduğu gözlemlenmiştir. 37 °C'nin ise T4 fajının *E. coli* BL21'e karşı bakteriyolitik aktivitesi için ideal bir sıcaklık olduğu tespit edilmiştir (Taj ve ark., 2014). Gıdanın matrisi fajların aktivitesini etkileyebilmektedir (Lewis ve Hill, 2020). Yapılan bir çalışmada, tek faj kullanılarak sıvı yumurta ve meyve suyunda *S. typhimurium* yükünü azaltmak için 105/gr kullanılması gerekli iken, pişmiş sığır eti ve tavukta benzer miktarda bir azalma sağlamak için 107/gr gerekli olmuştur (Thung ve ark., 2017). Fajlar asidik ortama karşı duyarlıdır (Ramirez ve ark., 2018). Yapılan çalışmalar, fajların genellikle pH 5 ve 8 arasında stabil olduğunu, düşük sıcaklıklarda bu aralığın 4 ila 10 arasında olduğunu göstermiştir (Adams, 1959). Yapılan bir çalışmada, asidik koşulların üstesinden gelmek için süt proteinleri ile faj enkapsülasyonu yapılması bir strateji olarak test edilmiş ve fajlar pH 2'de 2 saat boyunca korunmuştur (Samtlebe ve ark., 2016). Başka bir çalışmada ise, asit gidericiler pH'yı artırarak bağırsaktaki fajların hayatta kalmasını sağlamak için öncesi veya sonrasında fajlarla birlikte verilmiştir (Carvalho ve ark., 2010; Hammerl ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda, bir fajın başka bir gıda sınıfı olan antimikrobiyaller (nisin) (Leverentz ve ark., 2003) ve trans-sinnamaldehit yağı (Viazis ve ark., 2011) ile kombine edildiğinde sinerjistik bir etkinin oluştuğunu göstermiştir.

Tablo 2. Fajların Gıdalarda Biyokoruma Amacıyla Kullanım Örnekleri

Hedef mikroorganizma	Faj Türü	Gıdanın Türü	Proses koşulları	Etkinliği	Kaynaklar
Patojen Mikroorganizmalar					
<i>E. coli</i>	DT1-DT6 kokteyl faj	Süt	4°C 24°C, 24 saat 37°C	<10 ¹ CFU/mL ~4 log CFU/mL ~4 log CFU/mL	Tomat ve ark., (2018)
Enterohemorragik <i>E. coli</i> (EHEC)	<i>E. coli</i> faj OSY-SP	Kesilmiş yeşil biber Ispanak yaprakları	5 dk durulama 2 dk durulama	~2.7 log CFU/g azalma ~3.4 log CFU/g azalma	Snyder ve ark., (2016)
<i>L. monocytogenes</i>	P100	Brezilya taze sosisi	4°C, 10 gün	2.5 log azalma	Rossi ve ark., (2011)
<i>Shigella</i>	İki Shigella spesifik fajları (vB_SfIS-ISF001 ve vB_SsoS-ISF002)	Kontamine olmuş et	2 saat 120 saat	~1.4 log CFU/g azalma ~1.1 log CFU/g Azalma	Shahin ve ark., (2019)
<i>Salmonella</i>	(LPSTLL, LPST94 ve LPST153) faj kokteylleri	Süt, tavuk göğsü	25 °C ya da 4 °C	~3logCFU/g azalma	İslam ve ark., (2019)
<i>Salmonella enterica</i>	Faj kokteyl (fSE7, fSE8, fSE12, fSE1, fSE4)	Pişmiş hindi jambonu ve tavuk sosisi	18 °C	~2.12 log CFU/g azalma	Galarce ve ark., (2016)
Bozulma Etmeni Mikroorganizmalar					
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Homolog bakteriyofaj A3	Domuz yağı dokusu	28°C ya da 68°C	2 log azalma	Greer ve Dilts, (2002)
<i>Serratia</i>	AZT6	Balık	Maksimum 6 gün, 6°C	~1 log 'a kadar azalma	Hernández, (2017)

2. Tarım ve Gıda Alanında Kullanılmak Üzere Ticarileştirilen Faj Kültürleri

Fajların doğal antimikrobiyal ajanlar olarak uygulanma olanağı, dünya çapında çok sayıda şirket tarafından faj bazlı ürünlerin üretilmesini sağlamıştır (Choińska-Pulit ve ark., 2015). Tarım-gıda sektöründe kullanılmak üzere fajların, İyi Üretim Uygulamaları'na (GMP) uygun şekilde üretilen kokteylleri Avrupa'da Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) ve ABD'de Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) tarafından onaylanmaktadır (Pirnay ve ark., 2018; Połaska ve Sokolowska, 2019). Gıda güvenliği bağlamında, tarım mahsülleri üzerindeki bakteriyel spot hastalığını önlemek için OmniLytics Inc. tarafından üretilen faj bazlı Agriphage, ABD'de tarımda kullanılmak üzere onaylanan ilk faj bazlı

üründür (US Environ. Prot. Agency 2005). Ardından, 2006 yılında *L. monocytogenes* suşlarının faj biyokontrolünü hedefleyen ilk ticari faj ürünü ListShield, FDA tarafından GRAS statüsünde kabul edilerek piyasaya sürülmüştür (Endersen ve ark., 2014; Strydom ve Witthuhn, 2015). CJ CheilJedang şirketi tarafından geliştirilen BioTector ise, kümes hayvanlarında tifo ve pullorum hastalığına neden olan *Salmonella* türlerini kontrol altına alarak hayvan yemindeki antibiyotiklerin yerini alan ilk faj bazlı üründür (Monk ve ark., 2010). Tüketiciler, doğal kaynaklardan elde edilen katkı maddelerini, yıllardır kullanılan kimyasal katkı maddelerine tercih etmektedir (Lewis ve Hill, 2020). Fajların işlenmiş gıdalarda uygulanabilmesi için tüketici görüşü büyük bir önem taşımaktadır. Yapılan bir çalışma, tüketicilerin büyük bir kısmının, faj ile muamele edilmiş taze ürünler için ek bir miktar ödeme yapmaya istekli olduğunu

göstermiştir (Naanwaab ve ark., 2014). Ticari olarak piyasada mevcut olan faj ürünleri Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. Ticarileştirilmiş Bakteriyofajlar ve Uygulama Alanları

Şirket	Faj	Hedef Bakteri	Uygulama alanı	Kaynak
Gıda zincirinde mevcut olan ticari fajlar				
Intralytix, Inc Kolombiya, ABD	SalmoFresh	<i>S. enterica</i>	Kümes hayvanları, su ürünleri, meyve ve sebzeler	http://www.intralytix.com/index.php?page=prod
	ListShield	<i>L.monocytogenes</i>	Et ve kümes hayvanları ürünleri	
	ShigaShield	<i>S.flexneri, S.sonnei</i> ve <i>S.dysenteria</i>	Pişmiş sığır eti ve tavuk, fümme somon, kış kavunu, marul ve yogurt	
	EcoShield PX	<i>E.coli</i> ve Shiga toksin üreten <i>E.coli</i> (STEC) (O157:H7)	Et ürünleri	
	Ecolicide	<i>E. coli</i> O157:H7	Evcil hayvan maması	
	SalmoLyse	<i>S. enterica</i>	Evcil hayvan maması	
	ListPhage	<i>L. monocytogenes</i>	Evcil hayvan maması	
	Ecolicide PX	<i>E. coli</i> O157:H7	Canlı hayvan derisi (hasat öncesi)	
ARM & HAMMER Animal and Food Production, Iowa, ABD	Finalyse O157	<i>E. coli</i> O157:H7 ve diğer Shiga toksin üreten <i>E. coli</i> (STEC)	Sığır eti	https://ahfoodchain.com/
	Finalyse SAL	<i>Salmonella</i>	Kümes hayvanları	
OmniLytics Utah, ABD	AgriPhage	<i>Xanthomonas campestris</i> <i>P. syringae</i>	Domates ve biber	https://www.agriphage.com/
	AgriPhage-Fire Blight	<i>E. amylovora</i>	Elma ve armut	
	AgriPhage CMM	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Domates	
	AgriPhage-Citrus Canker	<i>Xanthomonas citri</i>	Turunçgiller	
	PhageGuard Listex	<i>L. monocytogenes</i>	Et ve tavuk ürünleri, su ürünleri, peynir, meyve ve sebzeler	https://phageguard.com/

Microcos Food Safety B.V. Wageningen, Hollanda	Phage Guard S	<i>Salmonella</i>	Evcil hayvan maması, gıda ile temas eden yüzeyler	
	PhageGuard E	<i>E. coli</i> 0157	Meyve ve sebzeler, evcil hayvan maması, et ve tavuk ürünleri	
CJ CheiJedang Corp. Seoul, Korea	Biotector	<i>Salmonella</i> , <i>C.perfringens</i> , <i>E.coli</i>	Domuz, kümes hayvanları	https://www.cjbio.net/en/products/biotector.do
APS Biocontrol LTD Dundee, İngiltere	Biolyse-PB	Patateslerin en yaygın yumuşak çürük bakterileri	Patates	https://www.apsbiocontrol.com/
Proteon Pharmaceuticals, Łódź, Polonya	BAFASAL	<i>Salmonella</i>	Kümes hayvancılığı	https://www.proteonpharma.com/

3. Gıda Kaynaklı Patojenlerin Tespitinde Faj Bazlı Sensör Uygulamaları

Biyosensörler yaygın patojen tespit yöntemlerinin sınırlamalarını en aza indirmek için yeni tespit yöntemleri olarak geliştirilmektedir. Faj bazlı biyosensörlerde faj, sensör yüzeyine seçici olarak bağlanmakta ve numunedeki patojen tespit edilebilmektedir (Casey ve ark., 2017). Sultan ve ark., (2019) tarafından yapılan bir çalışmada; faj bazlı baroreseptör yoluyla patojenleri (*E. coli* suşları) tespit etmek için yeni bir biyosensör önerilmiştir. Önerilen biyosensör, elmas şeklindeki bir mikroserit yuva anteni kullanarak farklı gıda numunelerindeki patojenik bakterileri tespit edebilmektedir. Faj-bakteri etkileşimi, bu sensörlerde iletim hatlarındaki ve anten yanıtlarındaki dinamik değişiklikler yoluyla tespit edilmektedir. Aynı zamanda antenin domates numunesinde *E. coli*'yi tespit etme doğruluğu da araştırılmıştır. Sonuçlar, tasarlanan algılama elemanları yoluyla bakteri ve faj arasındaki geçici etkileşimin etkili bir şekilde tespit edilebildiğini göstermektedir (Sultan ve ark., 2019). *E. coli* tespiti için yapılan bir diğer çalışmada ise *E. coli* O157:H7'yi hızlı ve hassas bir şekilde tespit etmek için patojene özgü faj phiV10lux tasarlanmıştır. Yapay olarak kontamine marulda, elma suyunda (pH 3.51) ve sığır eti kıymasında faj, sırasıyla yaklaşık 10 KOB/cm², 13 KOB/ml ve 17 KOB/g miktarlarında *E. coli* O157:H7'yi başarıyla tespit etmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, faj phiV10lux, gıdalarda *E. coli* O157:H7'nin hızlı ve hassas bir şekilde tespit edilmesi için güçlü bir araç olarak kullanılabilirliğini göstermektedir (Kim ve ark., 2017). Faj bazlı algılama mekanizmasının, patojenik bakterilerin geleneksel tespit testlerine kıyasla daha hızlı, daha doğru ve düşük maliyetli bir şekilde tespit etmesi beklenmektedir.

4. Faj Uygulamasında Başlıca Kısıtlayıcı Faktörler

Fajların, gıda ve tarım alanlarında uygulamalarında bazı kısıtlayıcı faktörler mevcuttur. Fajların antimikrobiyal olarak kullanılmasında enfeksiyona neden olan bakteri türlerinin tam kimliğinin bilinmesi gereklidir (Rao ve Lalitha, 2015). Fajların konakçılara özgü özellikleri, sadece sınırlı sayıda bakteri suşunu enfekte edebilmeleri açısından bir dezavantaj olarak

görülmektedir (Cieplak ve ark., 2018). Bu nedenle birkaç fajdan oluşan bir karışımın (kokteyl) dar konakçı aralığını genişletmek için bir önerilmektedir (Endersen ve ark., 2014). Bakteriler antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilirken, farklı mekanizmalar yoluyla fajlara da dirençli hale gelebilmektedir. Bu mekanizmalar arasında, bakteriyel hücre üzerindeki faj yüzey reseptörlerinin modifikasyonu, fajın genomunun bakteri genomuna entegrasyonu ve fajın replikasyonu veya montajı için spesifik genlerin kaybı bulunmaktadır (Ghannad ve Mohammadi, 2012). Faj kokteyl uygulamasında, faja dirençli suşların ortaya çıkmasını önlemek amacıyla faj karışımının düzenli olarak suşlara uygulanması gerekmektedir (Fernández ve ark., 2018). Ek olarak izojenik fajlar ölümcül virülans genlerini bir konakçı bakteri kromozomuna kolayca entegre ederek zararsız bir bakteriyi ölümcül hale dönüştürebilmektedir (Fan ve Tong, 2012). Örnek olarak, toksijenik *V. cholerae*, salgın ve pandemik koleraya neden olmaktadır ve lizojenik filamentöz faj ctxΦ tarafından kodlanan ctxAB genlerinin yatay gen transferi yoluyla patojen hale gelmiştir (Heidelberg ve ark., 2000; Waldor ve Mekalanos, 1996; Faruque ve Mekalanos, 2012). Lizojenik fajlar gelecekte terör saldırılarında kullanılabilir ve biyogüvenlik riski ortaya çıkabilmektedir (Fan ve Tong, 2012).

Bir diğer kısıtlayıcı faktör ise; fajların ticarileştirilerek antimikrobiyal olarak kullanılmasında mevcut klinik araştırmaların yeterli görülmemesidir (El-Shibiny ve El-Sahhar, 2017). Faj terapilerinin hali hazırda; yöntemi, dozu, sıklığı ve süresi için belirlenmiş standart bir protokol yoktur. Uzun vadede faj terapisinin yan etkileri de bilinmemektedir. Ayrıca, faj preparatlarının saflığı ve stabilitesi, yeterli kalite kontrol verisi mevcut olmadığından şüpheli görülmektedir (El-Shibiny ve El-Sahhar, 2017). Faj terapisi ile ilgili en önemli yan etkilerden biri de, fajlar tarafından *in vivo* olarak parçalanarak bakterilerden potansiyel endotoksinlerin salınmasıdır (Lorch, 1999). Fajın neden olduğu lizis sırasında salınan endotoksinler, toksik etkilere sebep olabilmektedir ve uzaklaştırılmaları için kararlı formülasyonların geliştirilmesi gereklidir (Merabishvili ve ark., 2009; Marintcheva, 2018). Ek olarak, fajların etkinlikleri ile ilgili mevcut araştırmaların çoğu, fajların uygulanacağı gerçek ticari ortamları yansıtmayan, yapay olarak kontamine edilmiş gıdalarla yapılan deneyler içermektedir (Kazi ve Annapure, 2016). Tüm bunlara ek olarak faj konusunda, tüketici kabulünün

de değerlendirilmesi gerekmektedir (Rao ve Lalitha, 2015). Gıdalarda “virüsler” veya “virulan fajlar” terminolojisinin kullanımına ilişkin tüketicinin olumsuz algılama potansiyeli vardır (Endersen ve ark., 2014).

5. Sonuç

Önümüzdeki yıllarda; faj terapisinin gelişimi için ürüne özgü standart uygulama yöntemlerinin geliştirilmesi, fajlarda litik maddenin lizojenik döngüye kaymasına ilişkin güvenlik sorunlarının giderilmesi, ulusal ve uluslararası yasal düzenleyicilerin kritik uygulama parametrelerinin belirlenmesi, kullanım için yasal onaylama süreci, faj üretimi ve uygulamasına yönelik teknolojilerin geliştirilmesi, mevcut üretimin laboratuvarından çıkarak ticari ölçüğe büyütülmesi, faj kararlılığını sağlamak için ihtiyaç doğrultusunda genetik modifikasyonlar, fajların moleküler etki mekanizmalarının karakterizasyonu, konakçı özgüllüğünü garanti etmek için saflaştırma ve uluslararası faj bankalarının kurulması hedeflenmelidir. Bununla birlikte fajların, gıda ve tarım gibi birçok alanda çeşitli amaçlarla kullanılması ve bu alandaki artan gelişmelerle birlikte daha fazla araştırma ve çalışmaya, faj konusunda üretici ve tüketicinin bilinçlendirilmesine ve kullanımlarının etkin bir şekilde yaygınlaşmasına ihtiyaç vardır.

Kaynakça

- Adams, M.H. (1959). Bacteriophages. New York, USA, Interscience Publishers.
- Adriaenssens, E. M., Van Vaerenbergh, J., Vandenheuvel, D., Dunon, V., Ceysens, P. J., De Proft, M., ... & Lavigne, R. (2012). T4-related bacteriophage LIMEstone isolates for the control of soft rot on potato caused by ‘*Dickeya solani*’. *PLoS one*, 7(3), e33227.
- Aldayel, M. F. (2019). Biocontrol strategies of antibiotic-resistant, highly pathogenic bacteria and fungi with potential bioterrorism risks: Bacteriophage in focus. *Journal of King Saud University-Science*, 31(4), 1227-1234.
- Amarillas, L., Lightbourn-Rojas, L., Angulo-Gaxiola, A. K., Basilio Heredia, J., González-Robles, A., & León-Félix, J. (2018). The antibacterial effect of chitosan-based edible coating incorporated with a lytic bacteriophage against *Escherichia coli* O157: H7 on the surface of tomatoes. *Journal of Food Safety*, 38(6), e12571.
- Arthur, T. M., Kalchayanand, N., Agga, G. E., Wheeler, T. L., & Koohmaraie, M. (2017). Evaluation of bacteriophage application to cattle in lairage at beef processing plants to reduce *Escherichia coli* O157: H7 prevalence on hides and carcasses. *Foodborne pathogens and disease*, 14(1), 17-22.
- Atamer, Z., Samtlebe, M., Neve, H., Heller, K. J., & Hinrichs, J. (2013). Elimination of bacteriophages in whey and whey products. *Frontiers in microbiology*, 4, 191.
- Bach, S. J., Johnson, R. P., Stanford, K., & McAllister, T. A. (2009). Bacteriophages reduce *Escherichia coli* O157: H7 levels in experimentally inoculated sheep. *Canadian journal of animal science*, 89(2), 285-293.
- Balogh, B., Canteros, B. I., Stall, R. E., & Jones, J. B. (2008). Control of citrus canker and citrus bacterial spot with bacteriophages. *Plant Disease*, 92(7), 1048-1052.
- Balogh, B., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Obradovic, A., King, P., & Jackson, L. E. (2003). Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant disease*, 87(8), 949-954.
- Barberis, S., Quiroga, H. G., Barcia, C., Talia, J. M., & Debattista, N. (2018). Natural food preservatives against microorganisms. In *Food Safety and Preservation* (pp. 621-658). Academic Press.
- Boulé, J., Sholberg, P. L., Lehman, S. M., O'gorman, D. T., & Svircev, A. M. (2011). Isolation and characterization of eight bacteriophages infecting *Erwinia amylovora* and their potential as biological control agents in British Columbia, Canada. *Canadian journal of plant pathology*, 33(3), 308-317.
- Brüssow, H. and Kutter, E. (2005). Phage ecology. In E. Kutter & A. Sulakvelidze, *Bacteriophages: biology and applications*. Florida: Boca Raton CRC Press. pp: 129-163.
- Buttimer, C., Hendrix, H., Lucid, A., Neve, H., Noben, J. P., Franz, C., ... & Coffey, A. (2018). Novel N4-Like bacteriophages of *Pectobacterium atrosepticum*. *Pharmaceuticals*, 11(2), 45.
- Carlton RM. (1999) Phage therapy: past history and future prospects. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1999; 47:267-74; PMID: 10604231.
- Carvalho, C. M., Gannon, B. W., Halfhide, D. E., Santos, S. B., Hayes, C. M., Roe, J. M., & Azeredo, J. (2010). The *in vivo* efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. *BMC microbiology*, 10(1), 232.
- Casey, A.; Co_e_y, A.; McAuli_e, O. (2017). Genetics and genomics of bacteriophages: The evolution of bacteriophage genomes and genomic research. *Bacteriophages Biol. Technol. Ther.*, 1–26.
- Choińska-Pulit, A., Mituła, P., Śliwka, P., Łaba, W., & Skaradzińska, A. (2015). Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 212-221.
- Coffey, A., & Ross, R. P. (2002). Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 303-321.
- Cogliani, C., Goossens, H. and Greko, C. (2011). Restricting antimicrobial use in food animals: Lessons from Europe. *Microbe*. 6: 274-279.
- Czajkowski, R., Ozymko, Z., Zwirowski, S., & Lojkowska, E. (2014). Complete genome sequence of a broad-host-range lytic *Dickeya* spp. bacteriophage ϕ D5. *Archives of virology*, 159(11), 3153-3155.
- Das, M., Bhowmick, T. S., Ahern, S. J., Young, R., & Gonzalez, C. F. (2015). Control of Pierce's disease by phage. *PLoS One*, 10(6), e0128902.
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature reviews Drug discovery*, 2(2), 114-122.
- de Melo, A. G., Levesque, S., & Moineau, S. (2018). Phages as friends and enemies in food processing. *Current opinion in biotechnology*, 49, 185-190.
- Dogan, B., & Boor, K. J. (2003). Genetic diversity and spoilage potential among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 130–138.
- El-Shibiny, A., & El-Sahhar, S. (2017). Bacteriophages: the possible solution to treat infections caused by pathogenic bacteria. *Canadian journal of microbiology*, 63(11), 865-879.
- Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, R. P., McAuliffe, O., & Coffey, A. (2014). Phage therapy in the food industry. *Annual review of food science and technology*, 5, 327-349.
- Fan, H., & Tong, Y. (2012). Y., Potential Dual-Use of Bacteriophage Related Technologies in Bioterrorism and

- Biodefense. *Journal of bioterrorism and biodefense*, 3(121), 4.
- Faruque, S. M., & Mekalanos, J. J. (2012). Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Virulence*, 3(7), 556-565.
- Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Martínez-Puchol, S., Rusinol, M., Rodríguez-Manzano, J., Figuerola, N., ... & Girones, R. (2018). Metagenomics for the study of viruses in urban sewage as a tool for public health surveillance. *Science of the Total Environment*, 618, 870-880.
- Frampton, R. A., Taylor, C., Moreno, A. V. H., Visnovsky, S. B., Petty, N. K., Pitman, A. R., & Fineran, P. C. (2014). Identification of bacteriophages for biocontrol of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(7), 2216-2228.
- Fujiwara, A., Fujisawa, M., Hamasaki, R., Kawasaki, T., Fujie, M., & Yamada, T. (2011). Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. *Applied and environmental microbiology*, 77(12), 4155-4162.
- Galarce, N., Escobar, B., Rojas, V., Navarro, C., Turra, G., Robeson, J., & Borie, C. (2016). Application of a virulent bacteriophage cocktail leads to reduction of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* counts in processed meat products. *Biocontrol Science and Technology*, 26(4), 462-475.
- Garcia, P., Martinez, B., Obeso, J. M., & Rodriguez, A. (2008). Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in applied microbiology*, 47(6), 479-485.
- Garneau, J. and Moineau, S. (2011) Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microb Cell Fact* 10, S20.
- Ghannad, M. S., & Mohammadi, A. (2012). Bacteriophage: time to re-evaluate the potential of phage therapy as a promising agent to control multidrug-resistant bacteria. *Iranian journal of basic medical sciences*, 15(2), 693.
- Goodridge, L. D., & Bisha, B. (2011). Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage*, 1(3), 130-137.
- Gouvêa, D. M., Mendonça, R. C. S., Lopez, M. E. S., & Batalha, L. S. (2016). Absorbent food pads containing bacteriophages for potential antimicrobial use in refrigerated food products. *LWT-Food Science and Technology*, 67, 159-166.
- Greer, G. G., & Dilts, B. D. (2002). Control of *Brochothrix thermosphacta* spoilage of pork adipose tissue using bacteriophages. *Journal of food protection*, 65(5), 861-863.
- Greer, G.G. (1982) Psychrotrophic bacteriophages for beef spoilage *pseudomonads*. *J Food Prot* 45:1318–1325
- Greer, G.G. (1988) Effects of phage concentration, bacterial density, and temperature on phage control of beef spoilage. *J Food Sci* 53:1226– 122
- Gupta R, Prasad Y.(2011). Efficacy of polyvalent bacteriophage p-27/HP to control multidrug resistant *Staphylococcus aureus* associated with human infections. *Curr Microbiol* , 62:255-60; PMID: 20607539; DOI: 10.1007/s00284-010-9699-x
- Hagens, S., & Loessner, M. J. (2007). Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(3), 513-519.
- Halter, M. C., & Zahn, J. A. (2018). Characterization of a novel lytic bacteriophage from an industrial *Escherichia coli* fermentation process and elimination of virulence using a heterologous CRISPR–Cas9 system. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 45(3), 153-163.
- Hammerl, J. A., Jäckel, C., Alter, T., Janzcyk, P., Stingl, K., Knüver, M. T., & Hertwig, S. (2014). Reduction of *Campylobacter jejuni* in broiler chicken by successive application of group II and group III phages. *PLoS One*, 9(12).
- Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Clayton, R. A., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., ... & Gill, S. R. (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*, 406(6795), 477-483.
- Hendrix, R. W. (2002). Bacteriophages: evolution of the majority. *Theoretical population biology*, 61(4), 471-480.
- Hermoso, J. A., García, J. L., & García, P. (2007). Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Current opinion in microbiology*, 10(5), 461-472.
- Hernández, I. (2017). Bacteriophages against *Serratia* as fish spoilage control technology. *Frontiers in microbiology*, 8, 449.
- Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., Balog, J. M., & Donoghue, A. M. (2003). Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection. *Poultry science*, 82(7), 1108-1112.
- Hussain, M. A., Liu, H., Wang, Q., Zhong, F., Guo, Q., & Balamurugan, S. (2017). Use of encapsulated bacteriophages to enhance farm to fork food safety. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(13), 2801-2810.
- Islam, M., Zhou, Y., Liang, L., Nime, I., Liu, K., Yan, T., ... & Li, J. (2019). Application of a Phage Cocktail for Control of *Salmonella* in Foods and Reducing Biofilms. *Viruses*, 11(9), 841.
- Jones, J. B., Vallad, G. E., Iriarte, F. B., Obradović, A., Wernsing, M. H., Jackson, L. E., ... & Momol, M. T. (2012). Considerations for using bacteriophages for plant disease control. *Bacteriophage*, 2(4), e23857.
- Kazi, M., & Annapure, U. S. (2016). Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. *Journal of food science and technology*, 53(3), 1355-1362.
- Kim, J., Kim, M., Kim, S., & Ryu, S. (2017). Sensitive detection of viable *Escherichia coli* O157: H7 from foods using a luciferase-reporter phage phiV10lux. *International journal of food microbiology*, 254, 11-17.
- Kim, M. H., Park, S. W., & Kim, Y. K. (2011). Bacteriophages of *Pseudomonas tolaasii* for the biological control of brown blotch disease. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54(1), 99-104.
- Kutateladze, M., & Adamia, R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in biotechnology*, 28(12), 591-595.
- Lang, J. M., Gent, D. H., & Schwartz, H. F. (2007). Management of *Xanthomonas leaf blight* of onion with bacteriophages and a plant activator. *Plant disease*, 91(7), 871-878.
- Langsrud, S., Sidhu, M. S., Heir, E., & Holck, A. L. (2003). Bacterial disinfectant resistance—a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4), 283-290.
- Lehman, S.M. (2007). Development of a Bacteriophage-Based Biopesticide for Fire Blight. Ph.D. Thesis, Brock University, St. Catharines, ON, Canada, 2007.
- Leverentz B, Conway WS, Camp MJ, et al. (2003) Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Appl Environ Microbiol* 69: 4519–4526.

- Lewis, R., & Hill, C. (2020). Overcoming barriers to phage application in food and feed. *Current opinion in biotechnology*, 61, 38-44.
- Lim, J. A., Jee, S., Lee, D. H., Roh, E., Jung, K., Oh, C., & Heu, S. (2013). Biocontrol of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* using bacteriophage PP1. *J Microbiol Biotechnol*, 23(8), 1147-1153.
- Lin, D. M., Koskella, B., & Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*, 8(3), 162.
- Lorch, A. (1999). Bacteriophages: An alternative to antibiotics. *Biotechnology and development monitor*, 39, 14-17.
- Ma, Y., Pacan, J. C., Wang, Q., Xu, Y., Huang, X., Korenevsky, A. and Sabour, P. M. (2008). Microencapsulation of bacteriophage felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4799-4805.
- Marintcheva, B. (2018). Phage therapy, Harnessing the Power of Viruses- Virus-Based Therapeutic Approaches 9.1 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810514-6.00009-X>
- McManus, P. S. (2014). Does a drop in the bucket make a splash? Assessing the impact of antibiotic use on plants. *Current opinion in microbiology*, 19, 76-82.
- McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W., & Jones, A. L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual review of phytopathology*, 40(1), 443-465.
- Merabishvili, M., Pirnay, J. P., Verbeken, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M., Lashkhi, N., ... & Lavigne, R. (2009). Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS one*, 4(3), e4944.
- Moineau, S., Tremblay, D., & Labrie, S. (2002). Phages of lactic acid bacteria: from genomics to industrial applications.
- Monk, A. B., Rees, C. D., Barrow, P., Hagens, S., & Harper, D. R. (2010). Bacteriophage applications: where are we now?. *Letters in applied microbiology*, 51(4), 363-369.
- Morozova, V., Kozlova, Y., Shedko, E., Babkin, I., Kurilshikov, A., Bokovaya, O., ... & Ushakova, T. (2018). Isolation and characterization of a group of new *Proteus* bacteriophages. *Archives of virology*, 163(8), 2189-2197.
- Mosteller, T. M., & Bishop, J. R. (1993). Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. *Journal of food protection*, 56(1), 34-41.
- Naanwaab, C., Yeboah, O. A., Ofori Kyei, F., Sulakvelidze, A., & Goktepe, I. (2014). Evaluation of consumers' perception and willingness to pay for bacteriophage treated fresh produce. *Bacteriophage*, 4(4), e979662.
- Nagy, J. K., Schwarczinger, I., Künstler, A., Pogány, M., & Király, L. (2015). Penetration and translocation of *Erwinia amylovora*-specific bacteriophages in apple—a possibility of enhanced control of fire blight. *European journal of plant pathology*, 142(4), 815-827.
- Nigam, A., Gupta, D., & Sharma, A. (2014). Treatment of infectious disease: beyond antibiotics. *Microbiological research*, 169(9-10), 643-651.
- Oliveira, J., Castilho, F., Cunha, A., & Pereira, M. J. (2012). Bacteriophage therapy as a bacterial control strategy in aquaculture. *Aquaculture International*, 20(5), 879-910.
- Pereira, C., Silva, Y. J., Santos, A. L., Cunha, ., Gomes, N., & Almeida, A. (2011). Bacteriophages with potential for inactivation of fish pathogenic bacteria: survival, host specificity and effect on bacterial community structure. *Marine drugs*, 9(11), 2236-2255.
- Pirnay, J. P., Merabishvili, M., Van Raemdonck, H., De Vos, D., & Verbeken, G. (2018). Bacteriophage production in compliance with regulatory requirements. In *Bacteriophage therapy* (pp. 233-252). Humana Press, New York, NY.
- Pońska, M., & Sokołowska, B. (2019). Bacteriophages—a new hope or a huge problem in the food industry. *AIMS microbiology*, 5(4), 324.
- Pujato, S. A., Quiberoni, A., & Mercanti, D. J. (2019). Bacteriophages on dairy foods. *Journal of applied microbiology*, 126(1), 14-30.
- Ramirez, K., Cazarez-Montoya, C., LopezMoreno, H. S., Castrodell Campo, N. (2018). Bacteriophage cocktail for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7: Stability and potential allergenicity study. *PLoS ONE*, 13(5): 1-19, doi: 10.1371/journal.pone.0195023.
- Ranjani, P., Gowthami, Y., Gnanamanickam, S. S., & Palani, P. (2018). Bacteriophages: A new weapon for the control of bacterial blight disease in rice caused by *Xanthomonas oryzae*. *Microbiol Biotechnol Lett*, 46(4), 346-59.
- Rao, B. M., & Lalitha, K. V. (2015). Bacteriophages for aquaculture: are they beneficial or inimical. *Aquaculture*, 437, 146-154.
- Robinson, R. K. (2014). *Encyclopedia of food microbiology*. Academic press.
- Rombouts, S., Volckaert, A., Venneman, S., Declercq, B., Vandenheuvel, D., Allonsius, C. N., ... & Klumpp, J. (2016). Characterization of novel bacteriophages for biocontrol of bacterial blight in leek caused by *Pseudomonas syringae* pv. *porri*. *Frontiers in microbiology*, 7, 279.
- Rossi, L. P., Almeida, R. C., Lopes, L. S., Figueiredo, A. C., Ramos, M. P., & Almeida, P. F. (2011). Occurrence of *Listeria* spp. in Brazilian fresh sausage and control of *Listeria monocytogenes* using bacteriophage P100. *Food Control*, 22(6), 954-958.
- Ryan, E.M., Gorman, S.P., Donnelly, R.F., and Gilmore, B.F. (2011). Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy. *J. Pharm. Pharmacol.* 63: 1253– 1264. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01324.x. PMID:21899540.
- Samtlebe, M., Ergin, F., Wagner, N., Neve, H., Küçükçetin, A., Franz, C. M., ... & Atamer, Z. (2016). Carrier systems for bacteriophages to supplement food systems: Encapsulation and controlled release to modulate the human gut microbiota. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 334-340.
- Shafiani, S., & Malik, A. (2003). Tolerance of pesticides and antibiotic resistance in bacteria isolated from wastewater-irrigated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(9), 897-901.
- Shahin, K., Bouzari, M., Wang, R., & Yazdi, M. (2019). Prevalence and molecular characterization of multidrug-resistant *Shigella* species of food origins and their inactivation by specific lytic bacteriophages. *International journal of food microbiology*, 305, 108252.
- Shkoporov, A. N., Khokhlova, E. V., Fitzgerald, C. B., Stockdale, S. R., Draper, L. A., Ross, R. P., & Hill, C. (2018). ΦCrAss001 represents the most abundant bacteriophage family in the human gut and infects *Bacteroides intestinalis*. *Nature communications*, 9(1), 1-8.
- Sillankorva, S. M., Oliveira, H., & Azeredo, J. (2012). Bacteriophages and their role in food safety. *International journal of microbiology*, 2012.

- Sillankorva, S., Oliveira, R., Vieira, M. J., Sutherland, I., & Azeredo, J. (2004). Bacteriophage Φ S1 infection of *Pseudomonas fluorescens* planktonic cells versus biofilms. *Biofouling*, 20(3), 133-138.
- Singh, V. P. (2018). Recent approaches in food bio-preservation- a review. *Open veterinary journal*, 8(1), 104-111.
- Skurnik, M., Pajunen, M., Kiljunen, S. (2007). Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnol Lett*, 29:995-1003; PMID: 17364214; DOI: 10.1007/s10529-007-9346-1.
- Slopek, S., Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M., Kucharewicz-Krukowska, A. (1987). Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981–1986. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 35:569–83
- Snyder, A. B., Perry, J. J., & Yousef, A. E. (2016). Developing and optimizing bacteriophage treatment to control enterohemorrhagic *Escherichia coli* on fresh produce. *International journal of food microbiology*, 236, 90-97.
- Strydom, A., & Withuhn, C. R. (2015). *Listeria monocytogenes*: a target for bacteriophage biocontrol. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(6), 694-704.
- Sukumaran, A. T., Nannapaneni, R., Kiess, A., & Sharma, C. S. (2016). Reduction of *Salmonella* on chicken breast fillets stored under aerobic or modified atmosphere packaging by the application of lytic bacteriophage preparation SalmoFresh™. *Poultry Science*, 95(3), 668-675.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris Jr, J. G. (2001). Bacteriophage therapy, *Antimicrob. Agents*.
- Sultan, K. S., Ali, T. A., Fahmy, N. A., & El-Shibiny, A. (2019). Using millimeter-waves for rapid detection of pathogenic bacteria in food based on bacteriophage. *Engineering Reports*, 1(1), e12026.
- Susianto, G., Farid, M. M., Dhany, N. R., & Addy, H. S. (2014). Host range for bacteriophages that infect bacterial blight pathogen on soybean. *Procedia Environmental Sciences*, 20, 760-766.
- Svircev, A., Roach, D., & Castle, A. (2018). Framing the Future with Bacteriophages in Agriculture. *Viruses*, 10(5), 218. doi:10.3390/v10050218
- Taj, M. K., Ling, J. X., Bing, L. L., Qi, Z., Taj, I., Hassani, T. M., ... & Yunlin, W. (2014). Effect of dilution, temperature and pH on the lysis activity of T4 phage against *E. coli* bl21. *J. Anim. Plant Sci*, 24(4), 1252-1255.
- Thung, T. Y., Premarathne, J. M. K. J. K., San Chang, W., Loo, Y. Y., Chin, Y. Z., Kuan, C. H., ... & Radu, S. (2017). Use of a lytic bacteriophage to control *Salmonella* Enteritidis in retail food. *LWT*, 78, 222-225.
- Tomat, D., Casabonne, C., Aquili, V., Balagué, C., & Quiberoni, A. (2018). Evaluation of a novel cocktail of six lytic bacteriophages against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in broth, milk and meat. *Food microbiology*, 76, 434-442.
- US Environ. Prot. Agency. (2005). *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* specific bacteriophages; exemption from the requirement of a tolerance. *Fed. Regist.*, 70, 16700-4.
- USFDA. (2006). Food additives permitted for direct addition to food for human consumption; bacteriophage preparation. FDA, Washington, DC. <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/cf0559.pdf>. (accessed on 13 January 2015)
- van Regenmortel, M. H., & Mahy, B. W. (Eds.). (2010). *Desk encyclopedia of general virology*. Academic Press.
- van Zyl, L. J., Abrahams, Y., Stander, E. A., Kirby-McCollough, B., Jourdain, R., Clavaud, C., ... & Trindade, M. (2018). Novel phages of healthy skin metaviromes from South Africa. *Scientific reports*, 8(1), 1-13.
- Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., et al. (2011). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on leafy green vegetables by treatment with a bacteriophage mixture and trans-cinnamaldehyde. *Food Microbiol* 28: 149–157.
- Vonasek, E. L., Choi, A. H., Sanchez Jr, J., & Nitin, N. (2018). Incorporating phage therapy into WPI dip coatings for applications on fresh whole and cut fruit and vegetable surfaces. *Journal of food science*, 83(7), 1871-1879.
- Waldor, M. K., & Mekalanos, J. J. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*, 272(5270), 1910-1914.
- Wall, S. K., Zhang, J., Rostagno, M. H., & Ebner, P. D. (2010). Phage therapy to reduce preprocessing *Salmonella* infections in market-weight swine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(1), 48-53.
- Wang, Q. and Sabour, P. M. (2010). Encapsulation and controlled release of bacteriophages for food animal production, p. 237-255. In: P. M. Sabour and M. W. Griffiths (eds.), *Bacteriophages in the Control of Food- and Waterborne Pathogens*. Washington, DC:ASM Press.
- Wirtanen, G., Saarela, M. A. R. I. A., & Mattila-Sandholm, T. I. I. N. A. (2000). Biofilms–Impact on hygiene in food industries. *Biofilms II:Process analysis and applications*, 327-372.
- Zaman, G., Smetsers, A., Kaan, A., Schoenmakers, J., & Konings, R. (1991). Regulation of expression of the genome of bacteriophage M13. Gene V protein regulated translation of the mRNAs encoded by genes I, III, V and X. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1089(2), 183-192.