



## **TAZE DİLİMLENMİŞ MEYVELERDE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM'UN FAJLARLA BİYOKONTROLÜ**

**Şeyma Betül Encu, Aslı Yıldırım, Selin Akbaş, İbrahim Çakır, Esra Acar Soykut\***  
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bolu, Türkiye

Geliş/Received: 29.12.2023; Kabul /Accepted: 06.03.2024; Online baskı /Published online: 08.04.2024

Encu, Ş. B., Yıldırım, A., Akbaş, S., Çakır, İ., Acar Soykut, E. (2024). Taze dilimlenmiş meyvelerde *Salmonella* Typhimurium'un fajlarla biyokontrolü. GIDA (2024) 49 (2) 370-384 doi: 10.15237/gida.GD24010

Encu, Ş. B., Yıldırım, A., Akbaş, S., Çakır, İ., Acar Soykut, E. (2024). Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in fresh sliced fruits using phages. GIDA (2024) 49 (2) 370-384 doi: 10.15237/gida.GD24010

### **ÖZ**

Gıda kaynaklı hastalıklar dünya çapında halk sağlığı açısından büyük bir sorun olarak varlığını sürdürmektedir. Mikrobiyel kaynaklı gıda zehirlenmelerinin başında ise patojenik *Salmonella* serotipleri gelmektedir. Bu çalışmada dilimlenmiş meyvelerde de rastlanan *Salmonella* Typhimurium'un fajlar ile inhibisyonu hedeflenmiştir. Bunun için atık su, çiğ süt ve tavuk eti örneklerinden izole edilen *Salmonella* Typhimurium fajlarının *EcoRV* ve *XbaI* enzimleri ile RFLP analizi yapılmış 9 fajdan 4'ünün genomik olarak birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir. Tek aşamalı gelişme eğrileri çıkarılan bu fajların latent dönemleri kısa (5-15 dk), patlama büyüklükleri ise 25-111 PFU/hücre aralığında bulunmuştur. Fajların farklı cins bakterilere karşı litik etkisi incelenmiş fakat *Salmonella* dışındaki Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı litik etkisi saptanmamıştır. Fajlardan hazırlanan kokteyl ile kavunda *S. Typhimurium* sayısında MOI 1000 ve 10000 değerlerinde 2 log KOB/g azalış; ananas örneklerinde ise MOI 10 ve 100 değerlerinde 1 log KOB/g azalış tespit edilmiştir. Hazırlanan faj kokteylinin gıda endüstrisinde *Salmonella* kontrolü için kullanılabilecek stratejiler arasında olabileceği ortaya konmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Bakteriyofaj, Biyokontrol, Faj terapi, *Salmonella* Typhimurium

## **BIOCONTROL OF *SALMONELLA* TYPHIMURIUM IN FRESH SLICED FRUITS USING PHAGES**

### **ABSTRACT**

Foodborne diseases continue to be a major public health problem worldwide. Pathogenic *Salmonella* serotypes are the leading cause of microbial food poisoning. This study aimed to inhibit *Salmonella* Typhimurium with phages as biological agents in fruits. RFLP analysis of *Salmonella* Typhimurium phages isolated from wastewater, raw milk and chicken meat samples was performed with *EcoRV* and *XbaI* enzymes. The latent periods of these phages, whose single-stage growth curves were obtained, were found to be short (5-15 minutes), and their burst size was found to be in the range of 25-111 PFU/cell. The lytic effect of phages against different types of bacteria was examined, but no lytic

\* Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding Author

✉: esra.acarsoykut@ibu.edu.tr

☎ : +90 374 254 10 00 -5834

Şeyma Betül Encu; ORCID no: 0000-0001-9155-1868

Aslı Yıldırım; ORCID no: 0000-0002-1366-6923

Selin Akbaş; ORCID no: 0000-0002-5110-274X

İbrahim Çakır; ORCID no: 0000-0001-7775-1871

Esra Acar Soykut; ORCID no: 0000-0002-6639-4212

effect was detected against Gram-positive and Gram-negative bacteria other than *Salmonella*. With the cocktail prepared from phages, the number of *S. Typhimurium* in melon decreased by 2 log CFU/g at MOI 1000 and 10000; In pineapple samples, a 1 log CFU/g decrease was detected at MOI 10 and 100. It has been revealed that the prepared phage cocktail may be among the strategies that can be used for *Salmonella* control in the food industry.

**Keywords:** Bacteriophage, Biocontrol, Phage therapy, *Salmonella Typhimurium*

## GİRİŞ

Taze kesilmiş, çiğ meyve ve sebzelerin tüketimi ile ilişkili belgelenmiş enfeksiyonların sayısı son yıllarda artmaktadır. *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *Shigella*, *Aeromonas hydrophila* ve *Yersinia enterocolitica* dahil olmak üzere çeşitli patojen bakteri ve parazit türleri, gıda kaynaklı hastalık salgınlarından sorumlu tutulmaktadır. Özellikle kontamine domates, karpuz, taze lahana, havuç, salatalık, rezene ve marul ürünlerinin tüketimi insanlarda salmonelloz ve listeriosis salgınları ile bağdaştırılmıştır (Shashidhar vd., 2007). *Salmonella*, Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre gıda kaynaklı enfeksiyon ve salgınlara neden olan patojenler sıralamasında ilk sırada yer almaktadır. Bu bakteri küresel çapta ishalleri hastalıkların 4 temel nedeninden biridir. *Salmonella*'nın yaklaşık 2659 serotipi tanımlanmış olmakla birlikte, insan enfeksiyonlarının çoğuna neden olan iki serotip *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis*'dir (Halkman, 2019; WHO, 2023). Çoğu enfeksiyon vakasının, gıdaların hazırlanması sırasında oluşan kontaminasyon yoluyla veya kümes hayvanları, sığır eti, süt, meyve ve sebzeler dahil olmak üzere çiğ veya az pişmiş gıdaların tüketiminden meydana geldiği bilinmektedir (Shang vd., 2021; Khan ve Rahman, 2022).

Günümüzde gıda kaynaklı patojenlerin kontaminasyonunu önlemek ve kontrol altına almak için gıda endüstrisinde sıklıkla kimyasal koruyucular ve fiziksel yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemler insan sağlığına ve çevreye zarar verebilmekte, gıda kalitesinin bozulmasına neden olabilmektedir (Sun vd., 2022). Son 30 yılda, özellikle de son on yılda, dünya çapında çoklu ilaca dirençli bakteriler hızla artış göstermiş, yeni antibakteriyel ajanların geliştirilmesi ve üretilmesinde bir düşüş gözlemlenmiştir (Principi vd., 2019). Ayrıca, kimyasal koruyucuların kullanımının ortadan kaldırılmasına yönelik artan tüketici talebi de,

doğal antimikrobiyel ihtiyacını da arttırmıştır (Makalata vd., 2021).

Bakterileri enfekte eden virüsler olarak bilinen bakteriyofajlar umut verici antimikrobiyel ajanlar olarak görülmektedir. Biyosferde tahmini faj sayısının  $10^{31}$  olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, dünyada en çok bulunan organizmalar olarak kabul edilmektedirler (Chevallereau vd., 2022). Fajlar, antibiyotiklerle karşılaştırıldığında bol miktarda izolasyon kaynağına, yüksek özgüllüğe, güvenliğe ve iyi bir bakteriyostatik etkiye sahiptir, bu nedenle ilaca dirençli bakterileri kontrol etmek için antibiyotiklere mükemmel bir alternatif olarak görülmektedir (Li vd., 2021). Gıda ürünlerinde biyokontrol için kullanılan çoğu litik faj, genellikle çevreden izole edilmekte ve genetiği değiştirilmemektedir. Fajların konak özgüllüğü nedeniyle, gıdada bulunan diğer yararlı mikroflora bozulmadan kalmaktadır. Fajlar çevre dostu olarak kabul edilmekte ve tüketicilerin pek çok talebine hitap etmektedir. Ayrıca, fajların gıdanın organoleptik özellikleri üzerinde çok az etkisi olabilmekte ya da hiç etkisi bulunmamaktadır (Wessels vd., 2021).

Son yıllarda, Intralytix, Microcos Food Safety, FINK TEC GmbH, Passport Food Safety Solutions ve Phagelux gibi şirketler *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ve *Salmonella* dahil olmak üzere önde gelen gıda kaynaklı patojenlerin bazılarını kontrol etmek için faj bazlı ürünleri ticari kullanıma sunmuştur. Bu fajlar, Genel Olarak Güvenli Olarak Kabul Edilen (GRAS) statüsüne sahip ve Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır (Endersen ve Coffey, 2020). Bu ürünlerden biri olan SalmoFresh™'in cam ve paslanmaz çelik yüzeylerde, taze meyvelerde, bütün ve taze kesilmiş salatalıklarda, tavuk ve hindi göğsü pirzolarlarında patojenik *Salmonella*'yı etkili bir şekilde azaltabildiğini bildirmiştir (Woolston vd., 2013; Sharma vd., 2015; Zhang vd., 2019).

Günümüzde tüketim alışkanlıkları değişmekte ve tüketiciler bilinçlenmektedir. Daha az veya hiç kimyasal içermeyen ürünlere talebin artması aynı zamanda patojenlerle mücadelenin devamlılığı açısından yeni alternatif teknolojilerin araştırılması mecburiyet kazanmaktadır. Bu kapsamda fajlar hem tüketici tercihlerini karşılayacak hem de patojenlerle mücadele edebilecek biyolojik materyaller olarak bu çalışmanın konusu olmuştur. Bugün firmaların ürettiği ve ticari olarak satışa sunulmuş olan ürünlere ilave olarak alternatif ürün geliştirilmesi çalışmanın hedefi olmuştur. Bu çalışmada taze dilimlenmiş paketli meyvelerde *Salmonella* riskinin azaltılmasına yönelik faj etkinliğinin araştırılmıştır. Bu amaçla marketlerde sıklıkla dilimlenerek satışa sunulan ananas ve kavun hedef gıdalar olarak belirlenmiştir. Böylelikle artış gösteren tüketime hazır gıdalar üzerinde yenilikçi yöntemlerin araştırılması ve patojenlerle mücadelede yeni yerli ürünlerin geliştirilmesi için öncül bir çalışma yapılmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Kullanılan Bakteri Kültürleri ve Gelişme Koşulları

Bu çalışmada kullanılan *Salmonella* Typhimurium suşu ve konakçı skalasının belirlenmesi için kullanılan diğer *E. coli* O157:H7 KUEN 1461, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Bacillus megatarium*, *Micrococcus luteus* (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mikrobiyolojisi Kültür Koleksiyonu), *Rhodococcus equi* ATCC 6939, *Enterococcus faecalis* ATCC 51559, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas putida* DSM 6125, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Listeria innocua* ATCC 33090 suşları, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyolojisi Kültür Koleksiyonundan (BAİBÜ GMKK) temin edilmiştir. Ayrıca MALDI-TOF ile cins düzeyinde tanımlanmış yerel izolatlar olan *Salmonella* RT2-1, *Salmonella* RT2-4, *Salmonella* RT2-5, *Salmonella* RT2-6, *Salmonella* RT2-10, *Salmonella* RT3-6 suşları ile *Salmonella* Typhimurium ATCC 12023, *Salmonella* Enteritidis ATCC 12694 suşları Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kültür Koleksiyonundan temin

edilmiştir. Suşlar -18°C'de %30 (a/h) gliserol (1:1) karışımı içinde saklanmıştır. Suşlar, Tryptic Soy Broth (TSB) içinde, 37°C'de 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir.

### *Salmonella* Typhimurium'a Etkili Fajların İzole Edilmesi, Zenginleştirilmesi ve Titrelelerinin Belirlenmesi

Faj izolasyonu için 10 adet çiğ süt, 3 adet su ve 5 adet tavuk eti olmak üzere toplam 18 adet izolasyon materyali kullanılmıştır. Çiğ süt örnekleri Bolu ilinin 10 farklı köyünden temin edilmiştir. Su örneklerini ise, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi kanalizasyonu, şehir atık suyu ve kanal suyu oluşturmaktadır. Yerel marketlerden satın alınmış farklı markalara ait tavuk göğüs etleri de izolasyon kaynakları arasında yer almıştır. Çiğ süt örnekleri için 100 mL süte %10'luk laktik asitten 6 mL eklenerek kazeinin çökmesi için bir süre beklenmiş ve daha sonra kaba filtre kağıdından süzlmüştür. Atık su örnekleri ise 8000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir (Maal vd., 2015). Tavuk örnekleri için ise 5 g numune, 5 mL %0.9 NaCl ile karıştırılmış, ardından 15000 g'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir (Cao vd., 2022). Elde edilen süpernatantlar, %10 kloroform ilave edilerek bakteri üremesi engellenmiştir (Acar Soykut, 2007).

Süpernetantlarda faj olup olmadığını kontrol etmek için çift tabaka agar yöntemi kullanılmıştır. Bunun için, TS (Tryptic Soy) yumuşak agar (%0.5 agar) içerisine 100 µl aktif *Salmonella* Typhimurium (OD<sub>600</sub>:0.5) ve 10 mM CaCl<sub>2</sub> eklenmiş, karıştırılmış ve TSA üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Daha sonra, bu Petri kutuları üzerinde belirli bölgelere, elde edilen süpernatantlardan 10'ar µL damlatılmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda plak oluşumunun (liziz) görüldüğü bölgelerde faj varlığı saptanan örnekler 2X TSB ile üç defa zenginleştirilmiştir (Byun vd., 2022). Bu çift kuvvet besiyeri ile zenginleştirmeler sonrası muhtemel faj lizatları yeniden çift tabaka agar yöntemi ile damlatılarak plak oluşumu gözlemlenmiştir.

İzolasyonu gerçekleştirilen fajlar titrelelerinin yükseltilmesi için küçük hacimlerde

zenginleştirilmeye devam edilmiştir. 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 µL *Salmonella* Typhimurium ve 100 µL faj örneği 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne eklendikten sonra faj adsorpsiyonun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 1 mL TSB besiyeri eklenmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra, 13000 g'de 15 dakika santrifüj sonucu elde edilen süpernatant steril bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve üzerine %10 kloroform ilave edilip hafifçe vorteksenerek + 4°C'de muhafaza edilmiştir (Acar Soykut, 2007; Lee vd., 2017).

Titreleri yükseltelen fajların, titrelerinin belirlenmesi için çift plaka agar yöntemi kullanılmıştır. Logaritmik fazda olan *Salmonella* Typhimurium, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mL yumuşak agar ile karıştırılarak ve önceden hazırlanmış ince tabaka TSA bulunan Petri kutularına yayılmıştır. Petri kutusunda işaretlenmiş noktalara, fizyolojik tuzlu su (FTS) çözeltisi ile 10<sup>-6</sup> ya kadar seyreltilmiş faj dilüsyonlarından 10<sup>2</sup> ar µL damlatılmış ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda işaretli noktalarındaki faj plakları sayılmıştır (Acar Soykut, 2007; Lee vd., 2017; Shang vd., 2021).

### **Salmonella Typhimurium Fajlarından DNA İzolasyonu**

DNA izolasyonu için, yüksek titreye sahip faj süspansiyonları 33000 g'de 90 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen peletlerden, DNA'larının izolasyonu için Viral DNA/RNA izolasyon kiti (Thermo Scientific GeneJET Viral DNA and RNA Purification Kit) kullanılmıştır. DNA izolasyonu, Viral DNA/RNA izolasyon kitinin protokolüne göre yapılmıştır. İzole edilen genomik DNA'ların kalitesi, nanodrop ile 260 ve 280 nm'de ABS ölçümleri yapılarak belirlenmiştir. Jel için %0.8'lik agaroz (Merck) ve 1X Tris-acetate-EDTA (TAE; Thermo Scientific 50X TAE Buffer) tampon kullanılmıştır. Agaroz tamamen çözünene kadar çözelti mikrodalga fırında kaynatılmış, soğumaya bırakılmıştır. Jele son konsantrasyonu 1 µL/mL olacak şekilde etidyum bromür eklenmiş ve jel yatağında katılaşmaya bırakılmıştır. Katılaştıran jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir ve

kuyucuklara 5 µL faj DNA-yükleme boyası (6X DNA Loading Dye; Thermo Scientific) karışımı yüklenmiş ve 60 V/cm'lik bir dielektrik kuvvette yaklaşık 45 dakika yürütülmüştür (Acar Soykut, 2007).

### **Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi/RFLP Enzim Kesimi**

Faj genomları RFLP analizi için, *EcoRV* ve *XbaI* (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) ile kesime alınmıştır (Mhone vd., 2022). Kesim koşulları, imalatçı talimatlarına göre düzenlenmiştir. % 0.8-1'lik agaroz jele yüklenen DNA fragmentleri jel görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.

### **Konakçı Skalasının Belirlenmesi**

Fajların etkili olduğu cins veya türlerin belirlenmesi, çift tabaka agar yöntemine göre yapılmıştır. Bu amaçla 100 µL bakteri kültürü yumuşak agar ile karıştırılarak Petri kutusuna yayılmıştır. Bir süre sonra işaretli bölgelere titreleri yaklaşık 10<sup>8</sup> PFU/mL olan her bir fajdan damlatılmıştır (Guang-Han vd., 2016).

### **Tek Aşamalı Gelişme Eğrisi ve Adsorpsiyon Oranı**

Tek aşamalı gelişme eğrisinin belirlenmesi için logaritmik fazda bulunan konakçı bakteri kültüründen 900 µL alınarak üzerine titresi 1x10<sup>8</sup> PFU/mL olan fajdan 100 µL eklenmiştir. Faj-bakteri karışımı 37°C'de 10-15 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda adsorbe olmayan fajları uzaklaştırmak için 12500 g'de 10 dk santrifüj işlemi yapılmış ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Peletler, TSB besiyerinde çözüldükten sonra faj ve bakteri karışımı 37°C'de inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun 0. dakikasından itibaren ilk yarım saatte her 5 dakikada bir, 70. dakikaya kadar ise her 20-30 dakikada bir örnek alınarak çift tabaka agar yöntemi ile faj sayısı belirlenmiştir. Faj titrelerinin sabit kaldığı süre latent dönem olarak tespit edilmiştir. Artarak sabit kalan faj sayısının latent dönemdeki faj sayısına oranlanmasıyla faj patlama büyüklüğü olarak belirlenmiştir (Acar Soykut, 2007; Peng ve Yuan, 2018).

Fajların adsorpsiyon hızlarının belirlenmesi için Kropinski vd. (2009)'nin kullandığı yöntem kullanılmıştır. Log fazındaki kültürler, 10<sup>6</sup>

KOB/mL olacak şekilde seyreltilmiştir. Konakçı kültür ve faj MOI 0.1 olacak şekilde karıştırılmış ve 10 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında 1 dakikalık aralıklarla 50 µL karışımdan alınarak buz aküsü içerisinde bekleyen 950 µL CASO içerisine eklenmiştir. Seri dilüsyonlar yapılarak süpernatandaki konakçıya absorbe olmamış fajların titreleri belirlenmiştir. Aşağıdaki eşitlik kullanılarak fajların adsorpsiyon hız sabiti (k) değerleri belirlenmiştir.

$$k = [(2.3 / (B \times t)) \times \log (P_0 / P)]$$

$$\text{Adsorpsiyon oranı: } [(P_0 - P) / P_0] \times 100$$

Eşitlikte verilen k, adsorpsiyon hız sabiti; B, bakteri konsantrasyonu; P<sub>0</sub>, başlangıç faj titresini; P, son faj titresini; t, faj titresi P<sub>0</sub>'dan P'ye düşünceye kadar geçen zamanı temsil etmektedir.

### Gıda Denemesi

Kavun ve ananas örnekleri Bolu ilinde bulunan yerel bir süpermarketten satın alınmıştır. Örneklerin kabuk kısımları %75'lik alkolle sterilize edildikten sonra, yine steril bir bıçak yardımıyla kabukları uzaklaştırılmıştır. Kabukları uzaklaştırılan örneklerin yenilebilir kısımlarından 10 g ağırlığında parçalar kesilmiş ve steril Petri kutularına yerleştirilmiştir. Daha sonra ST1, ST2, ST3, ST5 kodlu fajlardan oluşan faj süspansiyonu farklı MOI değerlerinde (10, 100, 1000 ve 10000) *Salmonella* Typhimurium (10<sup>8</sup> KOB/mL) ile karıştırılarak faj-bakteri karışımı hazırlanmıştır. Kontrol gruplarına faj karışımı yerine TSB besiyeri koyulmuştur. Bakteri faj karışımları hazırlandıktan sonra kavun ve ananas parçaları üzerine 1'er mL bu karışımdan eklenmiş ve bir Drigalski spatülü yardımıyla yayılmıştır. Daha sonra örnekler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her numune, 90 mL FTS içeren stomacher torbalarına aktarılmış ve 2 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Seri dilüsyonlar yapılarak XLD (Xylose Lysine Deoxycholate) agarda yayma kültür yöntemiyle ekim yapılmış, 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bakteri sayıları belirlenmiş ve fajların etkinliği ortaya konulmuştur (Byun vd., 2022).

### SONUÇ VE TARTIŞMA

Günümüzde marketlerde taze ve dilimlenmiş tüketime hazır meyvelerin satışına daha fazla rastlanmaktadır. Bu ürünler gerek kendi kabuklarının taşıdığı mikrobiyel yük gerekse kesimde kullanılan bıçaklar nedeniyle kontamine olmaktadır. Dolayısıyla bu ürünlerde karşılaşılabilecek patojenik bir *Salmonella* serotipinin engellenmesi için antimikrobiyel ajan olarak fajların kullanımı tercih edilmiş ve bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

### Faj İzolasyonu

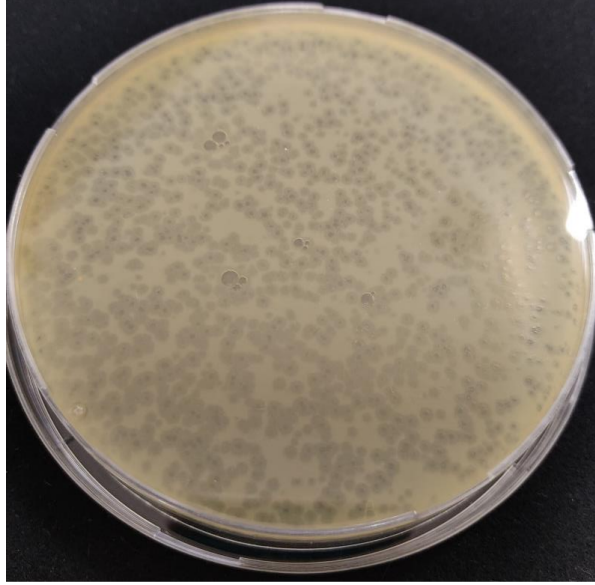
*Salmonella* hala dünya çapında salgınlara neden olan ve insan sağlığını tehdit eden mikroorganizmaların başında gelmektedir. Gıda güvenliğine yönelik yenilikçi yaklaşımlar fajların biyokontrol ajanları olarak kullanılabilirliğini araştırmaktadır.

Bu çalışmada 18 farklı çiğ süt (10), atık su (3) ve tavuk eti (5) örneklerinden *S. Typhimurium*'a etkili fajların izolasyonu belirtilen çift tabaka agar yöntemi ile tespit edilmiştir. İzole edilen faj kodları ve izolasyon materyalleri Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Kullanılan *Salmonella* fajları  
Table 1. *Salmonella phages used*

Faj Kodu / Phage Code	İzolasyon Kaynağı / Isolation Source
ST1	Çiğ Süt <i>Raw milk</i>
ST2	Çiğ Süt <i>Raw milk</i>
ST3	Atık Su <i>Waste water</i>
ST4	Tavuk Eti <i>Chicken meat</i>
ST5	Çiğ Süt <i>Raw milk</i>
ST6	Çiğ Süt <i>Raw milk</i>
ST7	Çiğ Süt <i>Raw milk</i>
ST8	Çiğ Süt <i>Raw milk</i>
ST9	Çiğ Süt <i>Raw milk</i>

Çizelge 1'de yer alan fajlar izolasyondan sonra zenginleştirme işlemine tabi tutulmuş ve titrelerinin yükselmesi sağlanmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Faj plakları  
Figure 1. Phage plaques

Konakçı bakteri olarak *S. Typhimurium* suşu kullanılarak toplanan 18 adet örnekten 9 adet fajın izolasyonu sağlanmıştır. Yapılan çalışmalara bakıldığında, Abdelsattar vd. (2021), benzer olarak *Salmonella*'ya etkili faj ZCSE6'nın izolasyonunu çığ sütten sağlamıştır. Çığ süt dışında *Salmonella*'ya etkili fajların izolasyonu ağırlıklı olarak kümesler ve bunlarla ilişkili materyallerden sağlanmıştır (Wongsuntornpoj vd., 2014). Ayrıca araştırmacılar tavuk ve domuz dışkısı (Huang vd., 2018a), tavuk atık kanalizasyonu (Bao vd., 2011), toprak (Shang vd., 2021), tatlı su (Guo vd., 2021), atık su kanalizasyonu ve arıtma tesisi (Huang vd., 2018b) gibi farklı ortamlardan ve materyallerden *Salmonella*'ya etkili fajların izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

#### Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi ile Fajların Sınıflandırılması

Taze dilimlenmiş meyvelerde fajların etkinliğini kontrol etmek üzere izole edilen fajlardan farklı RFLP şablonuna sahip olanlardan bir faj kokteyli oluşturulmuştur. Bu amaçla öncelikle faj genomları, *EcoRV* ve *XbaI* enzimleri ile kesime tabii tutulmuştur. Enzim kesimi sonucu reaksiyon karışımı jele yüklenmiş ve DNA fragmentleri görüntülenmiştir. Faj DNA'larının ilgili enzim ile

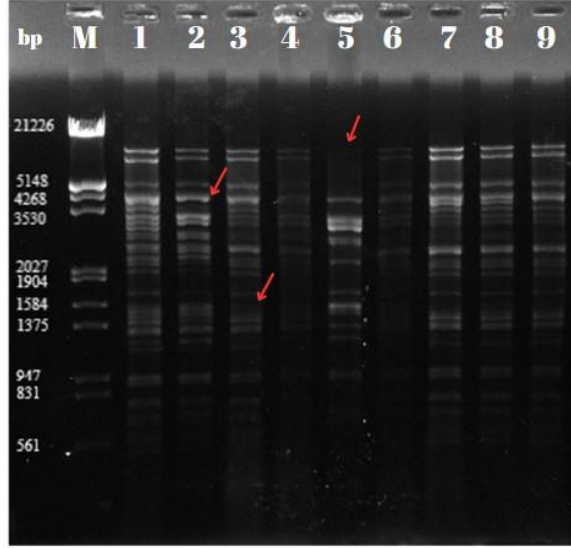
kesim sonucu elde edilen jel görüntüleri Şekil 2 ve Şekil 3'te verilmiştir.

*EcoRV* ile yapılan kesim sonuçlarına bakıldığında 1., 2. 3. ve 5. kuyucuklarda farklı fragmentlerin oluştuğu tespit edilmiştir (Farklılık gösteren fragmentler şekil üzerinde kırmızı ok ile gösterilmiştir). Elde edilen kesim profiline göre 2. kuyucukta bulunan yaklaşık 4268 bp'lik fragment büyüklüğünün diğer kuyucuktakilerden az olduğu, 3. kuyucuktaki yaklaşık 1375-1584 bp'lik fragmentlerin 1. ve 2. kuyucuktakilerden farklı olduğu, 5. kuyucukta ise diğer genomlarda oluşan ilk bantların oluşmadığı görülmüştür (Şekil 2). Oluşan fragmentlerin toplamına göre ise genom büyüklükleri yaklaşık olarak ST1 66005 bp, ST2 60911 bp, ST 3 63910 bp ve ST5 23980 bp büyüklüğüne sahip bulunmuştur.

*XbaI* enzimi ile yapılan kesime bakıldığında 1, 2 ve 3. kuyucukların ilk DNA bantlarında yoğunluk tespit edilmiştir. Yaklaşık 3000 bp'lik fragmentin 1. kuyucukta olmadığı ve diğer kuyucuklardaki fragment büyüklüğünden farklı olduğu görülmüştür. Yine 1, 2 ve 3. kuyucuklardaki kesim profiline bakıldığında kesim enziminin 3. kuyucukta bulunan örnekte daha fazla fragment (yaklaşık 1584 bp'lik ve daha küçük fragmentler) oluşturduğu anlaşılmıştır. *XbaI* enzimi ile yapılan

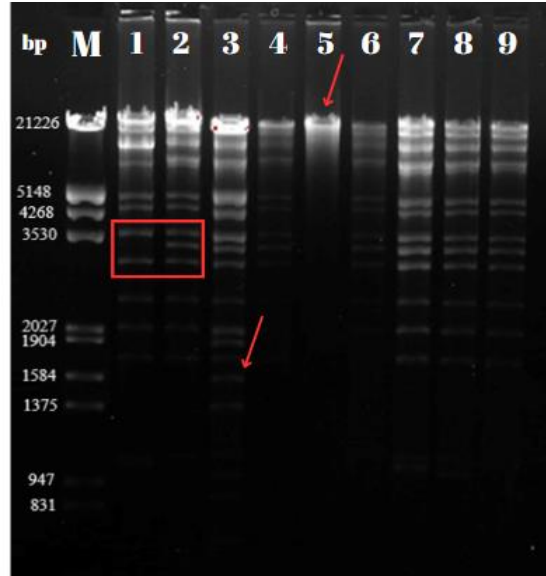
kesim sonucunda oluşan fragment büyüklüklerine göre ise ST1 69566 bp, ST2 74970 bp ve ST3 75474 bp büyüklüğüne sahip bulunmuştur. Her iki kesim sonucunda elde edilen genom büyüklükleri birbirine yakın bulunmuştur. Sonuç

olarak farklılık gösteren faj genomları kesim profillerine göre gruplandırılmış ve gruplar DNA'ların bulunduğu kuyucuk sırasına göre Çizelge 2'de verilmiştir.



Şekil 2. *EcoRV* ile kesim sonucu (DNA'ların kuyucuklardaki yüklenme sırası: M: Marker, 1: ST1, 2: ST2, 3: ST 3, 4: ST4, 5: ST5, 6: ST6, 7: ST7, 8: ST8, 9: ST9)

Figure 2. DNAs subjected to restriction digestion with enzymes *EcoRV* (The loading order of DNA in the wells: M: Marker, 1: ST1, 2: ST2, 3: ST 3, 4: ST4, 5: ST5, 6: ST6, 7: ST7, 8: ST8, 9: ST9)



Şekil 3. *XbaI* enzimi ile kesilen DNA'lar (DNA'ların kuyucuklardaki yüklenme sırası: M: Marker, 1: ST1, 2: ST2, 3: ST 3, 4: ST4, 5: ST5, 6: ST6, 7: ST7, 8: ST8, 9: ST9)

Figure 3. DNAs subjected to restriction digestion with enzymes *XbaI* (The loading order of DNA in the wells: M: Marker, 1: ST1, 2: ST2, 3: ST 3, 4: ST4, 5: ST5, 6: ST6, 7: ST7, 8: ST8, 9: ST9)

Çizelge 2. Restriksiyon enzim kesimi sonucuna göre farklı faj grupları  
Table 2. Different phage groups according to the results of restriction enzyme digestion

<i>EcoRV</i> enzim kesimine göre gruplar / <i>Groups according to EcoRV restriction digestion</i>	Grupların yaklaşık genom büyüklükleri / <i>Approximate genome sizes of the groups</i>	<i>XbaI</i> enzim kesimine göre gruplar / <i>Groups according to XbaI restriction digestion</i>	Grupların yaklaşık genom büyüklükleri / <i>Approximate genome sizes of the groups</i>
Grup 1: 1	66005 bp	Grup 1: 1	69566 bp
Grup 2: 2	60911 bp	Grup 2: 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9	67004-86927 bp
Grup 3: 3, 4, 6, 7, 8, 9	50766-73265 bp	Grup 3: 5	-
Grup 4: 5	23980 bp		

*EcoRV* ve *XbaI* enzim kesimlerine göre ise kesim sonuçları farklılık gösteren ST1, ST2, ST3, ST5 fajlar, faj kokteyli oluşturmak üzere seçilmiştir. Huang vd., (2018b) *Salmonella*'ya etkili fajların RFLP analizi için *EcoRI*, *EcoRV* ve *HindIII* enzimlerini kullanmışlardır. Faj LPST10'un DNA'sı *EcoRI* ve çalışmamızdaki gibi *EcoRV* ile kesilebilirken, *HindIII* tarafından kesilememiştir. LPST10' un genom boyutunun, fragment büyüklüklerine göre 47.66 kb olarak hesaplanmıştır. Çalışmamıza benzer olarak Kim vd. (2012) *Salmonella* fajı olan SS3e'nin genomik dizi analizi sonucunda genom büyüklüğünü 40793 bp; Li vd. (2020) ise BPSELC-1 *Salmonella* fajının genom büyüklüğünü 86996 bp olarak bulmuştur. López-Cuevas vd. (2011) çalışmalarında ise

*HindIII* ve *EcoRV* enzimleri ile yaptıkları kesimde *HindIII* enziminin sınırlı fragment oluşturduğunu ancak *EcoRV*'in, dört faj üzerinde birkaç DNA fragmenti oluşturduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada ise ilgili enzim ile kesim sonucunda 14 ile 27 arasında fragment oluşumu ile karşılaşılmıştır. Bu durum aynı konakçıya etkili bu fajların birbirinden farklı olduğunu göstermiştir.

#### Konakçı Skalasının Belirlenmesi

Fajların enzim kesimi sonuçlarına göre farklı olanları seçilmiş ve bu fajların farklı konakçılara karşı litik aktivitelerinin varlığı araştırılmıştır. Kullanılan konakçılar ve damlatma sonuçları Çizelge 3'te verilmiştir.

Çizelge 3. Fajların konakçı aralığı  
Table 3. Host range of phages

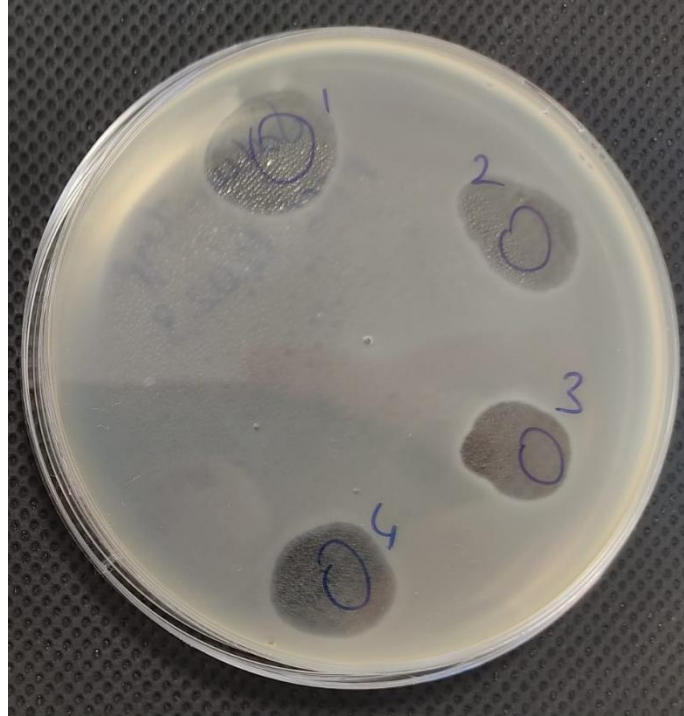
Konakçı Bakteriler / Host Bacteria	ST1	ST2	ST3	ST5
<i>Salmonella</i> Typhimurium, BAİBÜ GMKK	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 12023	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 12694	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> RT2-1	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> RT2-4	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> RT2-5	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> RT2-6	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> RT2-10	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> RT3-6	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 KUEN 1461	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	-	-	-	-
<i>Bacillus megatarium</i> , BAİBÜ GMKK	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-
<i>Rhodococcus equi</i> ATCC 6939	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51559	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i> DSM 6125	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 12924	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	-	-	-	-

+: Fajların bakteriye litik etkisi gözlemlenmiştir. -: Fajların bakteriye karşı litik etkisi gözlemlenmemiştir.  
+: The lytic effect of phages on bacteria has been observed. -: No lytic effect of phages against bacteria was observed.



Çizelge 3'te de belirtildiği üzere fajlar *Salmonella* spp. dışındaki diğer bakterilere karşı litik etki göstermemiştir. Ancak fajların çalışmada kullanılan *Salmonella* Enteritidis'e ve yerel izolat olan *Salmonella* türlerine de etkili olduğu görülmüştür (Şekil 4). Benzer olarak Carey-Smith vd. (2006) izole ettikleri FGCSSa1 fajının 3 farklı *Salmonella* Typhimurium suşuna ve aynı zamanda iki farklı *S. Enteritidis* suşuna etkili olduğunu

ancak *S. Infantis*, *S. Menston*, *S. Saintpaul* suşlarına etkili olmadığını tespit etmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak Bielke vd. (2007) izole ettikleri *Salmonella* fajlarının *E. coli* ve *Klebsiella oxytoca* bakterilerini de enfekte ettiğini tespit etmiş ve faj konak aralığının her zaman cinsle sınırlı olmadığını bildirmişlerdir.



Şekil 4. Fajların *Salmonella* Typhimurium ATCC 12023'e karşı litik etkisi (1: ST1, 2: ST2, 3: ST3, 4:ST5)  
Figure 4. Lytic effect of phages against *Salmonella* Typhimurium ATCC 12023 (1: ST1, 2: ST2, 3: ST3, 4:ST5)

#### Tek Aşamalı Gelişme Eğrisi ve Adsorpsiyon Oranı

Fajların patlama büyüklükleri, latent dönemlerinin belirlenmesi, adsorpsiyon oranlarının belirlenmesi faj enfeksiyonunun önemli parametreleridir. Fajların tek aşamalı gelişme eğrileri çıkarılarak bu parametrelere ait sahip oldukları değerler tespit edilebilmektedir. Fajlara ait gelişme eğrileri Şekil 5'te verilmiştir.

Verilen gelişme eğrilerine göre fajların patlama büyüklükleri ve latent dönemleri hesaplanmıştır. Buna göre ST2 fajının latent dönemi 15 dakika diğer fajların ise latent dönemleri 5 dakika olarak bulunmuştur. Patlama büyüklükleri ise ST1'in 25,

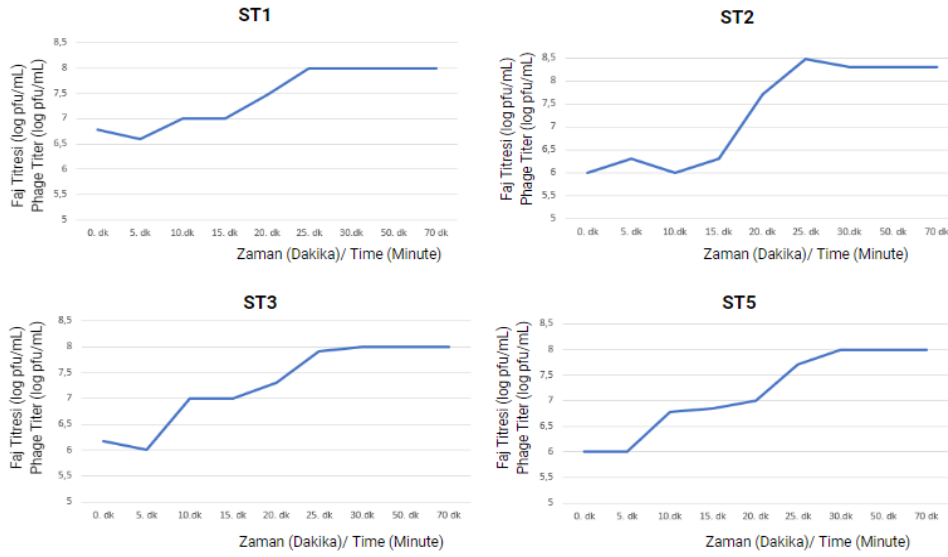
ST2'nin 66; ST3'ün 100 ve ST5'in ise 111 PFU/hücre olarak bulunmuştur.

Fajlara ait zamana karşı faj titresini gösteren adsorpsiyon grafikleri Şekil 6'da, bu fajlara ait adsorpsiyon hız sabitleri ve adsorpsiyon oranları Çizelge 4'te verilmiştir.

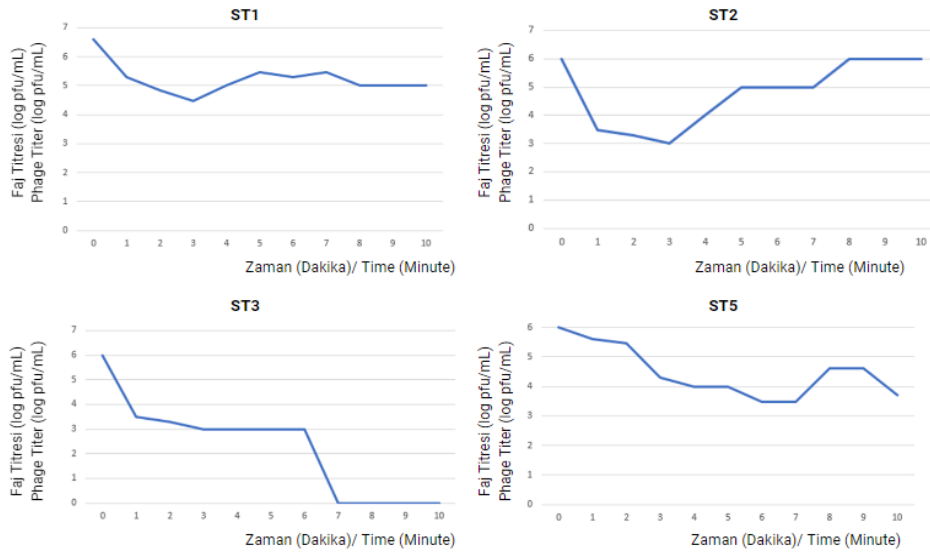
Huang vd. (2018b) izole ettikleri LPST10 fajının latent dönemini 10 dk, patlama büyüklüğünü ise 101 PFU/mL olarak belirlemiştir. Bu değerler çalışmamızda bulunan değerler ile benzerlik göstermektedir. Yine benzer olarak Lu vd. (2020) atk sudan izole ettikleri vB\_SenS\_SE1 kodlu *Salmonella* fajının patlama büyüklüğünü hücre

başına 19 PFU olarak bulmuştur. Petsong vd. (2019) ise *S. Enteritidis*'e etkili faj karışımının patlama büyüklüğünü 97.7 PFU; *S. Typhimurium*'a etkili faj karışımının patlama büyüklüğünü ise hücre başına 173.7 PFU olarak bulmuştur. Fajların latent dönemlerini ise 15 ile 45 dakika aralığında bulmuştur. Yan vd. (2020)'de benzer olarak LPSEYT'in adsorpsiyon oranını 10 dakikada %95 olarak bulmuştur. Patlama büyüklüğünü ise hücre başına  $133 \pm 23$  PFU olarak

hesaplamıştır. Sritha ve Bhat (2018) ise  $\Phi$ Stp1'in adsorpsiyon oranını %97 olarak bulmuştur. Yine bu fajın latent süresi 30 dakika ve patlama büyüklüğünü 37 PFU/hücre olarak bulunmuştur. Latent dönemi kısa ve patlama büyüklüğü fazla olan fajlar gıdalarda biyokontrol amaçlı kullanım için istenen özelliklerdir. Çalışmamızda seçilen fajlar kısa latent döneme sahip, genel olarak yüksek patlama büyüklüğü gösteren ve yaklaşık %99 adsorpsiyon oranına sahip fajlardır.



Şekil 5. Fajların gelişme eğrisi  
Figure 5. Growth curve of phages



Şekil 6. Fajların adsorpsiyon grafikleri  
Figure 6. Adsorption graphs of phages

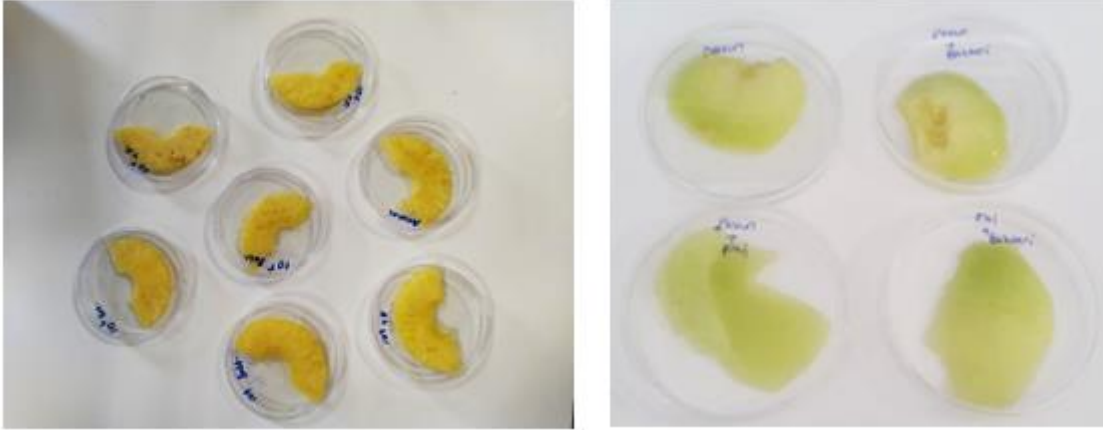
Çizelge 4. Fajlara ait adsorpsiyon hız sabitleri ve oranları  
Table 4. Adsorption rate constants and ratios of phages

Faj / Phage	Adsorpsiyon Hız Sabiti (mL/dk) / Adsorption Rate Constant (mL/min)	Fajların Adsorpsiyon Oranları (%) / Adsorption Rates of Phages (%)
ST3	$6.9 \times 10^{-8}$	99.9
ST2	$6.9 \times 10^{-8}$	99.9
ST1	$4.88 \times 10^{-8}$	99.25
ST5	$19.06 \times 10^{-8}$	99.7

### S. Typhimurium Fajlarının Gıda Ortamında Etkinliğinin Belirlenmesi

*S. Typhimurium*'un taze dilimlenmiş meyvelerde gelişiminin engellenmesi için seçilen ST1, ST2, ST3 ve ST5 fajlarından bir karışım hazırlanmıştır. Bu karışım ile dilimlenmiş kavun ve ananas örneklerinde MOİ 10, 100, 1000 ve 10000 değerlerinde denemeler yapılmıştır (Şekil 7). Deneme sonuçlarına göre kavunda *S.*

*Typhimurium* sayısında MOİ 1000 ve 10000 değerlerinde 2 log KOB/g azalış belirlenmiştir. Ananas örneklerinde ise MOİ 10 ve 100 değerlerinde 1 log KOB/g azalış tespit edilmiştir. Analiz sırasında konakçı bakterinin başlangıç konsantrasyonunun düşük tutulması ile yapılacak denemelerde daha iyi sonuçların elde edileceği düşünülmektedir.



Şekil 7. Analiz için hazırlanan ananas ve kavun örnekleri  
Figure 7. Pineapple and melon samples prepared for analysis

Guo vd. (2021), çeşitli gıda örnekleri ile yaptıkları çalışmalarında faj LPSTLL ile sütte *Salmonella* sayısında 2.8 log KOB/mL'lik bir azalış elde etmişlerdir. Islam vd. (2019) ise hem buzdolabı hem de oda sıcaklığında *Salmonella*'ya karşı LPSTLL, LPST94 ve LPST153 fajları ile hazırladıkları kokteylin etkinliğini araştırmışlardır. Çalışmada her iki sıcaklıkta *Salmonella* sayısında 3 log/KOB azalış sağlanmıştır. Huang vd. (2018b) LPST10 fajı ile farklı gıdalarda yaptıkları denemelerde *Salmonella* sayısında sütte 4 log

KOB/mL, sosiste sırasıyla 4 ve 28 °C'de 1.8 log KOB/örnek ve 1.1 log KOB/örnek ve marulda MOI 100 değerinde 1.9 ile 2.7 log KOB/cm<sup>2</sup> azalış elde etmişlerdir. Thung vd. (2017), meyve sularında yaptıkları çalışmada 4°C'de 48 saatlik inkübasyonun ardından *S. Enteritidis* sayısında yaklaşık 2 log KOB/ml'lik bir azalış elde etmiştir. Yapılan çalışmalarda kullanılan serotipler, MOİ değerleri, sıcaklık vb. analiz parametreleri değişiklik göstermektedir. Netice olarak elde edilen inhibisyon değerleri çalışmamızda elde

edilen değerler ile benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlar fajların biyokontrol amaçlı kullanılabilirliğini göstermektedir.

Bu çalışmada gıda kaynaklı zehirlenmelerin başında gelen *Salmonella* serotiplerinden biri olan *Salmonella* Typhimurium'un fajlarla inhibisyonu hedeflenmiştir. Bu amaçla çiğ süt, atık su ve tavuk eti örneklerinden izole edilen fajların izolasyonu sağlanmıştır. İzole edilen 9 fajın DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA'ların *EcoRV* ve *XbaI* enzimleri ile kesimi sağlanmış ve elde edilen kesim profillerine göre farklı olan fajların seçimi sağlanmıştır. Fajlardan 4 tanesi farklı olarak bulunmuştur. Bunlar ST1, ST2, ST3, ST5 kodlu fajlardır. Bu fajların gelişme eğrileri çıkarılmış, patlama büyüklükleri ve latent dönemleri tespit edilmiştir. Latent dönemleri kısa (5-15 dk.) bulunan fajların patlama büyüklükleri çeşitlilik göstermiştir. Patlama büyüklükleri 25 ile 111 PFU/hücre arasında değişmektedir. Fajların farklı cins bakterilere karşı litik etkisi incelenmiş fakat analizde *Salmonella* spp. dışında kullanılan diğer bakterilere karşı litik etkisi saptanmamıştır. Fajlardan hazırlanan kokteyl ile ananas ve kavun gibi tüketime hazır dilimlenen meyvelerde *S. Typhimurium*'a karşı litik etki incelenmiştir. Denemelerde MOİ 10, 100, 1000 ve 10000 değerlerinde faj ve bakteri karışımı kullanılmıştır. Analiz sonucunda kavunda *S. Typhimurium* sayısında MOİ 1000 ve 10000 değerlerinde 2 log KOB/g azalış belirlenmiştir. Ananas örneklerinde ise MOİ 10 ve 100 değerlerinde 1 log KOB/g azalış tespit edilmiştir. Kokteyle girecek faj sayısındaki artış, bu fajların farklı antimikrobiyel ajanlar ile kullanılması ve başlangıç bakteri yükündeki değişimler elde edilecek sonuçları olumlu yönde değiştirecektir. Elde edilen sonuçlar fajların gıda endüstrisinde biyokontrol amaçlı kullanılabileceğini göstermektedir.

### TEŞEKKÜR

Bu çalışma, TÜBİTAK-1002 programı, 120O250 numaralı proje ile gerçekleştirilmiştir.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarların, başka kişiler ve/veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

### YAZAR KATKILARI

Şeyma Betül ENCU, Aslı YILDIRIM ve Selin AKBAŞ deneysel çalışmaları gerçekleştirmiştir. Esra ACAR SOYKUT ve İbrahim ÇAKIR verilerin değerlendirilmesi, makalenin yazımı ve kontrolü aşamalarına katkı sağlamışlardır. Yazarlar makalenin son halini okuyarak onaylamışlardır.

### KAYNAKLAR

Abdelsattar, A. S., Safwat, A., Nofal, R., Elsayed, A., Makky, S., El-Shibiny, A. (2021). Isolation and characterization of bacteriophage ZCSE6 against *Salmonella* spp.: Phage application in milk. *Biologics*, 1(2), 164-176. <https://doi.org/10.3390/biologics1020010>.

Acar Soykut, E. (2007). *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* virulent fajlarının replikasyon parametreleri, kapsid protein profilleri ve restriksiyon endonükleaz analizleri esas alınarak tanımlanmaları ve sınıflandırılmaları, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, Ankara, Türkiye, 188 s.

Bao, H., Zhang, H., Wang, R. (2011). Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. *Poultry Science*, 90(10), 2370-2377. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01496>.

Bielke, L., Higgins, S., Donoghue, A., Donoghue, D., Hargis, B. M. (2007). *Salmonella* host range of bacteriophages that infect multiple genera. *Poultry Science*, 86(12), 2536-2540. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00250>.

Byun, K. H., Han, S. H., Choi, M. W., Park, S. H., Ha, S. D. (2022). Isolation, characterization, and application of bacteriophages to reduce and inhibit *Listeria monocytogenes* in celery and enoki mushroom. *Food Control*, 135, 108826. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108826>.

Cao, S., Yang, W., Zhu, X., Liu, C., Lu, J., Si, Z., Pei, L., Zhang, L., Hu, W., Li, Y., Wang, Z., Pang, Z., Xue, X., Li, Y. (2022). Isolation and identification of the broad-spectrum high-efficiency phage vB\_SalP\_LDW16 and its therapeutic application in chickens. *BMC*

- Veterinary Research*, 18(1), 386. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03490-3>.
- Chevallereau, A., Pons, B. J., van Houte, S., Westra, E. R. (2022). Interactions between bacterial and phage communities in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 20(1), 49-62.
- Endersen, L., Coffey, A. (2020). The use of bacteriophages for food safety. *Current Opinion in Food Science*, 36, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.006>.
- Islam, M. S., Zhou, Y., Liang, L., Nime, I., Liu, K., Yan, T., Wang, X., Li, J. (2019). Application of a phage cocktail for control of *Salmonella* in foods and reducing biofilms. *Viruses*, 11(9), 841. <https://doi.org/10.3390/v11090841>.
- Guang-Han, O., Leang-Chung, C., Vellasamy, K. M., Mariappan, V., Li-Yen, C., Vadivelu, J. (2016). Experimental phage therapy for *Burkholderia pseudomallei* infection. *PLoS One*, 11(7), e0158213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158213>.
- Guo, Y., Li, J., Islam, M. S., Yan, T., Zhou, Y., Liang, L., Connerton, I. F., Deng, K., Li, J. (2021). Application of a novel phage vB\_SalS-LPSTLL for the biological control of *Salmonella* in foods. *Food Research International*, 147, 110492. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110492>.
- Halkman, A. K. (2019). Gıda Mikrobiyolojisi. Editör: A. Kadir Halkman. Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd, Ankara, 648 s. ISBN: 978-605-245-683-5; [www.mikrobiyoloji.org](http://www.mikrobiyoloji.org)
- Huang, C., Virk, S. M., Shi, J., Zhou, Y., Willias, S. P., Morsy, M. K., Abdelnabby, H. E., Liu, J., Wang, X., Li, J. (2018a). Isolation, characterization, and application of bacteriophage LPSE1 against *Salmonella enterica* in ready to eat (RTE) foods. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1046. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01046>.
- Huang, C., Shi, J., Ma, W., Li, Z., Wang, J., Li, J., Wang, X. (2018b). Isolation, characterization, and application of a novel specific *Salmonella* bacteriophage in different food matrices. *Food Research International*, 111, 631-641. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.071>.
- Khan, M. A. S., Rahman, S. R. (2022). Use of phages to treat antimicrobial-resistant *Salmonella* infections in poultry. *Veterinary Sciences*, 9(8), 438. <https://doi.org/10.3390/vetsci9080438>.
- Kim, S. H., Park, J. H., Lee, B. K., Kwon, H. J., Shin, J. H., Kim, J., Kim, S. (2012). Complete genome sequence of *Salmonella* bacteriophage SS3e. *Journal of Virology*, 86(18). <https://doi.org/10.1128/jvi.01550-12>
- Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E., Johnson, R. P. (2009). Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*, 69-76.
- Lee, S., Kim, M. G., Lee, H. S., Heo, S., Kwon, M., Kim, G. B. (2017). Isolation and characterization of listeria phages for control of growth of *Listeria monocytogenes* in milk. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37(2), 320-328. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.2.320>.
- Li, F., Tian, F., Nazir, A., Sui, S., Li, M., Cheng, D., Nong, S., Ali, A., Kakar, M.U., Li, L., Feng, Q., Tong, Y. (2022). Isolation and genomic characterization of a novel *Autographiviridae* bacteriophage IME184 with lytic activity against *Klebsiella pneumoniae*. *Virus Research*, 319, 198873. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198873>.
- Li, P., Zhang, X., Xie, X., Tu, Z., Gu, J., Zhang, A. (2020). Characterization and whole-genome sequencing of broad-host-range *Salmonella*-specific bacteriophages for bio-control. *Microbial Pathogenesis*, 143, 104119. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104119>
- López-Cuevas, O., Castro-del Campo, N., León-Félix, J., González-Robles, A., Chaidez, C. (2011). Characterization of bacteriophages with a lytic effect on various *Salmonella* serotypes and *Escherichia coli* O157: H7. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(12), 1042-1051. <https://doi.org/10.1139/w11-099>.
- Lu, M., Liu, H., Lu, H., Liu, R., Liu, X. (2020). Characterization and genome analysis of a novel *Salmonella* phage vB\_SenS\_SE1. *Current Microbiology*, 77, 1308-1315, <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01879-7>

- Maal, K. B., Delfan, A. S., Salmanizadeh, S. (2015). Isolation and identification of two novel *Escherichia coli* bacteriophages and their application in wastewater treatment and coliform's phage therapy. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8 (3). <https://doi.org/10.5812/jjm.14945>.
- Makalatia, K., Kakabadze, E., Bakuradze, N., Grdzlishvili, N., Stamp, B., Herman, E., Tapinos, A., Coffey, A., Lee, D., Papadopoulos, N.G., Robertson, D.L., Chanishvili, N., Megremis, S. (2021). Investigation of *Salmonella* phage–bacteria infection profiles: network structure reveals a gradient of target-range from generalist to specialist phage clones in nested subsets. *Viruses*, 13(7), 1261. <https://doi.org/10.3390/v13071261>.
- Mhone, A. L., Makumi, A., Odaba, J., Guantai, L., Gunathilake, K. D., Loignon, S., Ngugi, C. W., Akhwale, J. K., Moineau, S., Svitek, N. (2022). *Salmonella* Enteritidis bacteriophages isolated from Kenyan poultry farms demonstrate time-dependent stability in environments mimicking the chicken gastrointestinal tract. *Viruses*, 14(8), 1788. <https://doi.org/10.3390/v14081788>.
- Peng, Q., Yuan, Y. (2018). Characterization of a newly isolated phage infecting pathogenic *Escherichia coli* and analysis of its mosaic structural genes. *Scientific Reports*, 8(1), 8086.
- Petsong, K., Benjakul, S., Chaturongakul, S., Switt, A. I. M., Vongkamjan, K. (2019). Lysis profiles of *Salmonella* phages on *Salmonella* isolates from various sources and efficiency of a phage cocktail against *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*. *Microorganisms*, 7(4), 100. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7040100>.
- Principi, N., Silvestri, E., Esposito, S. (2019). Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 513. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00513>.
- Shang, Y., Sun, Q., Chen, H., Wu, Q., Chen, M., Yang, S., Du, M., Zha, F., Ye, Q., Zhang, J. (2021). Isolation and characterization of a novel *Salmonella* phage vB\_SalP\_TR2. *Frontiers in Microbiology*, 12, 664810. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664810>.
- Sharma, C. S., Dhakal, J., Nannapaneni, R. (2015). Efficacy of lytic bacteriophage preparation in reducing *Salmonella* in vitro, on turkey breast cutlets, and on ground turkey. *Journal of Food Protection*, 78(7), 1357-1362. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-585>.
- Shashidhar, R., Dhokane, V. S., Hajare, S. N., Sharma, A., Bandekar, J. R. (2007). Effectiveness of radiation processing for elimination of *Salmonella* Typhimurium from minimally processed pineapple (*Ananas comosus* Merr.). *Journal of Food Science*, 72(3), M98-M101. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00300.x>.
- Sritha, K. S., Bhat, S. G. (2018). Genomics of *Salmonella* phage ΦStp1: candidate bacteriophage for biocontrol. *Virus Genes*, 54, 311-318. <https://doi.org/10.1007/s11262-018-1538-3>
- Sun, X., Wang, J., Dong, M., Zhang, H., Li, L., Wang, L. (2022). Food spoilage, bioactive food fresh-keeping films and functional edible coatings: Research status, existing problems and development trend. *Trends in Food Science & Technology*, 119, 122-132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.004>.
- Thung, T. Y., Premarathne, J. M. K. J. K., San Chang, W., Loo, Y. Y., Chin, Y. Z., Kuan, C. H., Tan, C. W., Basri, D.F., Radzi, C. W. J. W. M., Radu, S. (2017). Use of a lytic bacteriophage to control *Salmonella* Enteritidis in retail food. *LWT*, 78, 222-225. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.044>.
- Yan, T., Liang, L., Yin, P., Zhou, Y., Mahdy Sharoba, A., Lu, Q., Dong, X., Liu, K., Connerton, I. F., Li, J. (2020). Application of a novel phage LPSEYT for biological control of *Salmonella* in foods. *Microorganisms*, 8(3), 400. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030400>.
- Wessels, K., Rip, D., Gouws, P. (2021). *Salmonella* in chicken meat: Consumption, outbreaks, characteristics, current control methods and the potential of bacteriophage use. *Foods*, 10(8), 1742. <https://doi.org/10.3390/foods10081742>.

Wongsuntornpoj, S., Switt, A. I. M., Bergholz, P., Wiedmann, M., Chaturongakul, S. (2014). *Salmonella* phages isolated from dairy farms in Thailand show wider host range than a comparable set of phages isolated from US dairy farms. *Veterinary Microbiology*, 172(1-2), 345-352. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.05.023>.

Woolston, J., Parks, A. R., Abuladze, T., Anderson, B., Li, M., Carter, C., Hanna, L.F., Heyse, S., Charbonneau, D., Sulakvelidze, A.

(2013). Bacteriophages lytic for *Salmonella* rapidly reduce *Salmonella* contamination on glass and stainless steel surfaces. *Bacteriophage*, 3(3), e25697. <https://doi.org/10.4161/bact.25697>.

WHO, (2023). Food Safety Incidents. <https://www.who.int/news/item/31-05-2023-infosan-quarterly-summary-2023-1> (Erişim Tarihi: 20.11.2023)