

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**BAKTERİ TAYİNİ İÇİN NANOPARTİKÜL TABANLI SENSÖR
GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Erhan TEMÜR

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Uğur TAMER

ANKARA
Haziran 2010

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**BAKTERİ TAYİNİ İÇİN NANOPARTİKÜL TABANLI SENSÖR
GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Erhan TEMÜR

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Uğur TAMER

Bu tez TÜBİTAK tarafından 107T682 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Haziran 2010

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10/06/2010



İmza
Prof. Dr. Nilgün Günden GÖGER
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



İmza
Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI
Hacettepe Üniversitesi



İmza
Doç. Dr. Uğur TAMER
Gazi Üniversitesi
Tez Danışmanı

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Şekiller	vi
Tablolar	viii
Semboller, Kısaltmalar	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Bakteriler	4
2.1.1. <i>Escherichia coli</i> 'nin Genel Özellikleri	6
2.1.2. <i>E. coli</i> 'nin Hücre Yapısı	6
2.1.2.1. Hücre Duvarı	6
2.1.2.2. Hücre Duvarının Fonksiyonları	7
2.1.2.3. Membran Zarı (Stoplazma Zarı)	8
2.1.2.4. Stoplazma	8
2.1.3. Morfolojik Özellikleri	9
2.1.3.1. Makroskobik Morfoloji	9
2.1.3.1.1. Bakterilerin Koloni Morfolojisi	9
2.1.3.2. Mikroskobik Morfoloji	10
2.1.4. Antijenik Yapısı	11
2.1.5. Biyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	11
2.1.6. Kimyasal Yapısı	12
2.1.7. Patojenik Özellikleri	13
2.1.8. K-12 Serotipi	13

2.2. <i>Escherichia coli</i> Gelişimi ve Canlılığı	14
2.3. Mikroorganizma Tayininde Kullanılan Yöntemler	16
2.3.1. Klasik Yöntemler	16
2.3.1.1. Kuru Madde Tayinine Dayalı Yöntem	16
2.3.1.2. Mikroskopik Sayım Yöntemi	16
2.3.1.3. En Muhtemel Sayım Yöntemi	17
2.3.1.4. Katı Besiyeri Yöntemi	19
2.3.1.5. Membran Filtrasyon Yöntemi	20
2.3.1.6. Koliform Grup ve <i>E. Coli</i> 'nin Tanımlanması	21
2.3.2. Hızlı Yöntemler	22
2.3.2.1. MUG Yöntemi	22
2.3.2.2. Doğrudan Epifloresant Filtreleme Tekniği (DEFT)	23
2.3.2.3. Enzim Bağlı İmmünosorbent Assay (ELISA)	24
2.3.2.4. Akış Sitometrisi	24
2.3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	24
2.3.2.6. İmmünomanyetik Ayrıma Dayalı Yöntemler	25
2.3.2.7. Raman Spektroskopisi	26
2.3.2.7.1. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)	31
2.3.2.7.1.1. Biyolojik Uygulamaları	33
2.3.2.7.1.2. SERS Substratı Olarak Kullanılan Metal Nanopartiküller	34
2.3.2.7.1.3. Altın Nanopartiküller	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. GEREÇ	45
3.1.1. Kimyasal ve Biyokimyasal Malzemeler	45

3.1.2. Kùltürler	46
3.1.3. SERS Ölçüm Düzenegù	46
3.1.4. UV-Visible Spektrofotometre Düzenegù	47
3.1.5. Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) Ölçüm Düzenegù	47
3.1.6. Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM) Ölçüm Düzenegù	47
3.2. YÖNTEM	47
3.2.1. Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması	48
3.2.2. Su Örneklerinin Toplanması	49
3.2.3. Besiyerlerinin Hazırlanması	49
3.2.4. Besiyerlerinin Kullanılışı	51
3.2.4.1. Durham Tüpü ile Kullanılan Besiyerleri	51
3.2.4.2. Yayma Yöntemi ile Kullanılan Besiyerleri	52
3.2.5. Partiküllerin Sentezi	53
3.2.5.1. Altın Nanoçubuklar	53
3.2.5.2. Altın Küre Nanopartiküller	55
3.2.6. Sabit Yüzey Üzerinde Gerçekleştirilen İmmünoanaliz Yöntemi	56
3.2.6.1. Yüzeylerde Moleküllerin Tek Tabaka Halinde Oluşturulması (SAM)	56
3.2.6.2. Raman Etiketlerinin Hazırlanışı	56
3.2.6.3. Karbonil Gruplarının Aktif Hale Getirilmesi	57
3.2.6.4. Avidinin Bağlanması	57
3.2.6.5. Avidin Üzerinden Biotinli Antikorun Bağlanması	57
3.2.6.6. Spesifik Olmayan Bağlanmaların Engellenmesi	58
3.2.6.7. Bakteri Dilüsyonlarının Hazırlanması	58
3.2.6.8. Hazırlanan Probile Bakterilerin Yakalanması	59

3.2.6.9. Sandviç İmmunoanaliz İçin Yapının Tamamlanması	59
3.2.6.10. Geliştirilen Yöntemin Seçiciliği	60
3.2.7. Su Numunesinde <i>E. coli</i> Tayini	60
4. BULGULAR	62
4.1. Altın Nanopartikülerin Karakterizasyonu	62
4.2. Slaytlar Üzerinde Yapılan Modifikasyonların AFM Sonuçları	65
4.3. Bakteri-Antikor Etkileşiminde Zamana Bağlı Olarak Maksimum Bağlanmanın Saptanması	69
4.4. Sandviç Yapısının Tamamlanmasından Sonra SERS ile Bakteri Tayini	70
5. TARTIŞMA	79
6. SONUÇ	81
7. ÖZET	84
8. SUMMARY	85
9. KAYNAKLAR	86
TEŞEKKÜR	103
ÖZGEÇMİŞ	104

ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil.1. Protista alemine dahil olan mikroorganizmaların sınıflandırılması	4
Şekil.2. En yaygın bakteri şekilleri	5
Şekil.3. Gram negatif mikroorganizmaların hücre yapısı görünümü	7
Şekil.4. <i>E. coli</i> ve <i>E. coli</i> hücre bileşenlerinin şematik gösterimi	8
Şekil.5. Bakterilerin koloni morfolojileri	10
Şekil.6. Bakterilerin üremesi ve büyümesi	15
Şekil.7. Stokes ve anti-Stokes türü Raman saçılması olaylarının molekül enerji diyagramı ile açıklanması	27
Şekil.8. Stokes ve anti-Stokes hatları	28
Şekil.9. CO ₂ molekülüne ait polarlanabilirlik	29
Şekil.10. Nanopartiküllerin doğası ve sahip olabilecekleri özellikler	35
Şekil.11. Metal nanopartikül üzerinde elektronların salınımı: "plazmon"	41
Şekil.12. Delta Nu Raman mikroskop	46
Şekil.13. Durham Tüpü	51
Şekil.14. Yayma yöntemi ile ekim	52
Şekil.15. Altın nanoçubukların kimyasal sentezi	54
Şekil.16. Altın küre nanopartiküllerin sentezi	55
Şekil.17. Sandviç immünoanaliz için gerçekleştirilen basamaklar	60
Şekil.18. Nanopartiküllerin TEM görüntüleri	63
Şekil.19. Altın küre ve çubuk nanopartiküller için UV-Visible absorpsiyon spektrumları	64

Şekil.20.	AFM topografya görüntüleri	66
Şekil.21.	AFM <i>E. coli</i> + nanopartikül görüntüleri	68
Şekil.22.	Maksimum % bakteri bağlanma oranının saptanma süresi	69
Şekil.23.	DTNB'nin 10^1 - 10^5 kob/mL bakteri derişimleri arasında altın nanoçubukların varlığında gösterdiği simetrik NO ₂ gerilme pikleri	71
Şekil.24.	DTNB'nin 10^1 - 10^5 kob/mL bakteri derişimleri arasında altın küre nanopartiküllerin varlığında gösterdiği simetrik NO ₂ gerilme pikleri	72
Şekil.25.	Altın küre ve çubuk nanopartiküller kullanılarak elde edilmiş kalibrasyon grafikleri	74
Şekil.26.	10^1 - 10^9 kob/mL <i>E. coli</i> için altın nanoçubukların varlığında DTNB'nin 1336 cm ⁻¹ 'deki pik şiddeti değerleri	75
Şekil.27.	<i>E. aerogenes</i> , <i>E. dissolvens</i> ve <i>E. coli</i> için DTNB'nin 1336 cm ⁻¹ 'deki pik şiddeti değerleri	76
Şekil.28.	Gerçek numunelerde altın nanopartiküller ile elde edilen analiz sonuçları	77

TABLÖLAR

	Sayfa No
Tablo 1. Bazı koliform grup bakterilerin biyokimyasal karakterleri	22
Tablo 2. Sandviç İmmünoanaliz için farklı yüzeylerin AFM pürüzlülük değeri	69
Tablo 3. Derişimi bilinen bakteri dilüsyonlarının geliştirilen analiz yöntemi ile elde edilen sonuçları	77

KISALTMALAR

<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
DNA	Deoksiribonükleik asit
SERS	Surface enhanced Raman scattering
�	Angstrom
G	Guanine
C	Cytosine
EMS	En Muhtemel Sayı
TSE	Türk Standartları Enstitüsü
ISO	Uluslar arası Standartlar �rg�t�
LST	Lauril Sülfat Triptoz Broth
BGBB	Brillant Green Bile Broth
EC	<i>E. coli</i>
TW	Trypton Water
AOAC	Amerikan Resmi Analitik Kimyacılar Birliği
EMB	Eosin Metilen Blue Agar
APHA	Amerikan Halk Sağlığı Kuruluęu
LB	Laktoz Broth
NB	Nutrient Agar
VBR	Violet Bile Red
TSA	Triptik Soy Agar

HGMF	Hidrofobik Grid Membran Filtre
I	İndol testi
M	Metil red testi
V	Voges-Proskauer testi
E	Eijkman testi
C	Sitrat testi
H	Hidrojen sülfür testi
O	Ornitin dekarboksilaz testi
Mo	Hareketlilik testi
MUG	4-methyleumbelliferyl- β -D-glucuronide
MUGase, β-GUR	β -D-glucuronidase
DEFT	Doğrudan Epifloresent Filtreleme Tekniği
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
PCR-RT	Polymerase Chain Reaction-Reverse Transcripteraz
NASBA	Nucleic Acid Sequence Based Amplification
İMA	İmunomanyetik Ayırım
IR	Infrared
NRS	Normal Raman Spektroskopisi
RRS	Rezonans Raman Spektroskopisi
S/N	Signal/Noise
SERRS	Surface Enhanced Resonance Raman Scattering
RIO	Radyoimmünoanaliz
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer

NIR	Near Infrared
CTAB	Heksadesiltrimetil-amonyum bromür
EDC	N- (3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodimid hidroklorür
NHS	N-Hidroksisülfosüksinimid sodyum tuzu
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskop
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskop
DTNB	5,5-Dithiobis(2-Nitrobenzoic acid)
SAM	Self Assembled Monolayer
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
PB	Phosphate Buffer
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBST	Phosphate Buffer Saline-Tween 20
SMAC agar	Sorbitol Mac-Conkey Agar
SAM	Self Assembled Monolayer

1. GİRİŞ

İnsan hayatının sağlıklı bir şekilde devamı için önemli gereksinimler içerisinde ön sıralarda gelen besin ve su kaynaklarının sağlıklı olarak tüketilmesi gerekir. Patojenik kirlenmeye maruz kalmış, sıhhi olmayan kaynakların tüketilmesi sağlık açısından birçok probleme neden olur. Bu tür bir kirlenmenin takibinin yapılması ve sağlıklı kaynakların tüketilmesini sağlamak amacıyla çalışmalarda model bakteri olarak koliform grubu bakteriler kullanılmaktadır. Koliform grubu bakteriler gıdalarda ve sularda fekal kontaminasyonun göstergesi olarak bulunurlar. Koliform grubunda bulunan bakterilerden florası insan ve sıcakkanlı hayvanların sindirim sistemleri olanlar, fekal koliform grubu bakteriler olarak tanımlanır ve bu tür bakteriler fekal kontaminasyonun bir göstergesi olarak kabul edilir. Bu grupta bulunan *Escherichia coli* (*E. coli*), mevcut fekal kontaminasyonun varlığını güvenilir olarak belirtip indikatör olarak kullanılır¹. Gıda mikrobiyolojisinde su ve çeşitli gıdalarda *E. coli*'nin fekal kontaminasyonun indikatörü olarak kullanılmasının nedeni dışkıda doğal olarak bulunması, genel olarak patojen olmayan karaktere sahip olması ve suda canlı kalması olarak belirtilebilir². Koliform grubuna dahil diğer üyeler toprak ve bitki kökenli olabilmektedirler. Herhangi bir su veya gıda örneğinde *E. coli*'ye rastlanması, örneğe doğrudan ya da dolaylı yoldan dışkı bulaştığını gösterip *Salmonella* ve *Shigella* gibi yine bağırsak kökenli olan primer patojenlerin de örnek içinde bulunabileceği ihtimalini gösterir. *E. coli*'nin çoğu suşu patojen olarak kabul edilmese de, bazı suşları gıda ve su kaynaklı hastalıklara neden olabilmektedir³.

Koliform grubuna ait *E. coli*'nin bir indikatör olarak kullanılması nedeniyle *E. coli* veya diğer patojenlerin tayini için birçok yöntem geliştirilmiştir. Örneğin; polimeraz zincir reaksiyonu, ELISA^{4,5}, DNA mikro dizilim teknikleri^{6,7,8}, imünosensör tabanlı teknikler⁶; manyetik

nanopartiküller⁹, kuantum noktalar¹⁰ ve gümüş nanopartiküllere¹¹ dayalı birçok nanopartikül tabanlı biosensör geliştirilmiştir. Geliştirilen bu sensörlerin istenilen hız ve tayin sınırına ulaşamaması nedeniyle yeni yöntemler denenmiştir. Bu noktada dikkatler; hızlı DNA sekansını, patojen tayinini, gıda analizlerini ve hatta tek molekül tayinini mümkün kılan bir yöntem olan Yüzeyde Kuvvetlendirilmiş Raman Saçılmasına (SERS) yoğunlaşmıştır¹². SERS; altın, gümüş gibi metal yapıların yüzeyleri üzerinden birkaç Angstrom mesafe kadar uzağında bulunan moleküllerin elastik olmayan foton saçılmasına dayanır. Belirli dalga boyunda gönderilen ışın ile metal yüzeyin etkileşmesi sonucu metal yüzey üzerinde kuvvetlenmiş bir elektromanyetik alan oluşur. Oluşan bu alan sonucu saçılmalara ait sinyaller 10^6 kez kuvvetlendirilmiş bir şekilde elde edilir ve daha hassas ölçümlerin yapılması sağlanır¹¹.

Bakteriler üzerine SERS yöntemi ile yapılan çalışmalarda genel olarak altın ve gümüş nanopartiküllerin bakterinin parmak izi çıkartılarak tanımlanması, parmak izi üzerinden tür tayini ve çeşitliliği üzerine gerçekleştirilmiştir^{13,14}. Bunun dışında manyetik çekirdek üzerine altın kaplı nanopartiküller de biyosensör olarak biyo-ayırma temeli üzerine kurulu çalışmalarda SERS yöntemi ile kullanılmaktadır¹⁵.

Bütün bu yöntemlerin geliştirilmesinin temel amacı, gıda ve su kaynaklarının zararlı mikroorganizmalar tarafından kirletilmesi durumunda sağlık açısından olası tehlikelere karşı hızlı bir tayin yöntemini mümkün kılmaktır. Çünkü; *E. coli*'nin tayininde kullanılan geleneksel yöntemler yavaş ve zahmetli olduğundan geri kalmakta ve ihtiyacı karşılayamamaktadır.

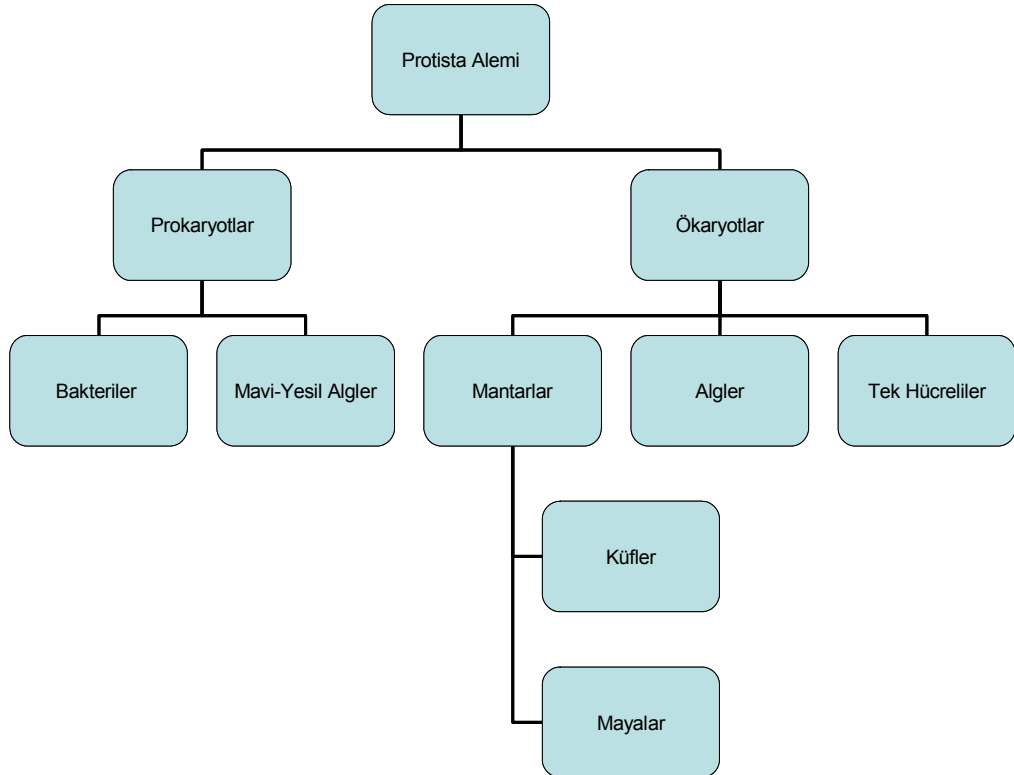
Mikroorganizmaların optik, elektrokimyasal, biyokimyasal ve fiziksel özelliklerinden yararlanılarak tayin edilmelerinde kullanılan yöntemlere genel bilgiler kısmında değinilecektir.

Bu alışmada, *E. coli*'nin hızlı, hassas ve seçici şekilde tayini için altın nanopartiküller kullanarak SERS tabanlı yeni bir analiz yöntemi geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemin mevcut geleneksel ve literatürde yer alan yöntemlerle karşılaştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bakteriler

Mikroorganizmalar tek hücreli canlılar olarak kabul edilip genel olarak protista alemi içerisinde yer almaktadırlar. Bazı mikroorganizmalar farklı hücresel özelliklere sahip oldukları için birbirlerinden yapısal olarak ayrılmışlar ve protista aleminde ökaryot ve prokaryot canlılar olarak alt gruplara ayrılıp incelenmeye başlanılmışlardır. Bakteriler, hücresel organizasyonlarına bakıldığında çekirdek zarı içermedikleri için prokaryotların bir türü olarak gösterilmiştir¹⁶. Mikroorganizmaların sınıflandırılması şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Protista alemine dahil olan mikroorganizmaların sınıflandırılması

Protista alemi içerisinde bakteriler tek hücreli canlıların büyük bir kısmını oluştururlar ve ışık mikroskopunda gözlenebilirler. Bakterilerin tanımlanmasında kullanılan en önemli kriterler bakterilerin şekil ve büyüklükleridir. Büyüklükleri 1-10 µm arasında değişir ve değişik şekiller gösterebilirler. En yaygın olan bakteri şekilleri kok ve basildir. Bunların dışında ince, uzun iplik şeklinde hife oluşturan bakterilerle, spiral veya sarmal şekilli bakteriler de mevcuttur¹⁷.



Şekil 2. En yaygın bakteri şekilleri¹⁸

Bakterilerin şekil ve büyüklüklerine göre ışık mikroskobu altında incelenmesi, boyama yöntemleri ve bunun gibi farklı birçok yöntem kullanılarak bakteri alemi içerisinde birçok bilimsel sınıflandırma yapılmıştır. Bu sınıflandırma içerisinde, deneysel çalışmalarda kullanılan koliform bakteriler grubunda yer alan fekal orijinli *Escherichia coli* (*E. coli*); Eubacteria aleminin, Proteobacteria şubesine, Enterobacteriaceae (koliform grup) familyasına aittir. Genel olarak koliform bakteriler Enterobacteriaceae familyası içinde yer alan ve laktozdan 35°C'de 48 saat içinde gaz oluşturma yeteneğine sahip bakterilerdir. Bu bakteriler gram negatif, sporsuz, çubuk şeklinde olup aerobik veya fakültatif anaerobiktirler¹⁷. *E. coli*'nin temel habitatı insan ve sıcakkanlı hayvanların bağırsak sistemidir. *E. coli*'nin gıdada ya da su kaynaklarında bulunması, fekal orijinli olması nedeniyle, genel olarak gıdaya ve su kaynağına direkt

ya da indirekt yolla bir dışkı bulaşısının olduğuna işaret eder. Buna bağlı olarak da *E. coli* varlığı, gıdalarda ve su kaynaklarında enterik patojen bakterilerin bulunabileceğinin klasik bir göstergesi olarak kabul edilmektedir¹⁷.

2.1.1. *Escherichia coli*'nin Genel Özellikleri

Su ve gıdalarda dışkı kaynaklı olası bir kontaminasyondan kaynaklanan patojen tehdidi için indikatör olarak önemli görev üstlenen *E. coli* ilk olarak Theodor Escherich tarafından hasta olan bir çocuğun dışkı örneğinden izole edilerek önce *Bacterium coli commune* olarak, daha sonra ise *Escherichia coli* olarak adlandırılıp literatüre geçmiştir¹⁹.

2.1.2. *E. coli*'nin Hücre Yapısı

Genel olarak, çoğu canlı hücre oldukça küçüktür ve katı ya da esnek hücre membranına sahiptir. Hücrenin iç kısmı proteinlerin, karbonhidratların ve diğer kompleks organizma bileşiklerinin bulunduğu sitoplazma olarak adlandırılan koloidal bir karışımı içerir.

2.1.2.1. Hücre Duvarı

Hücre duvarı, renksiz, yumuşak ve esnek bir yapıya sahip olup hücrenin şekil ve dayanıklılığını sağlar. Hücre duvarı, büyüme ile sürekli genişler ve hücre gelişimine bağlı olarak değişir, enzimleri ve diğer yüksek etkinlikteki maddeleri içerisinde barındırır. Hücre duvarı, hücre kuru maddesinin yaklaşık %19'una sahiptir.

Yapısı itibari ile çok katlı bir görünümde olan zar maddesinin yaklaşık % 80'nini polisakkaritler teşkil eder. Ultramikroskopik incelemede, demetler halinde bir yapı gösteren hücre duvarında; bu polisakkaritler

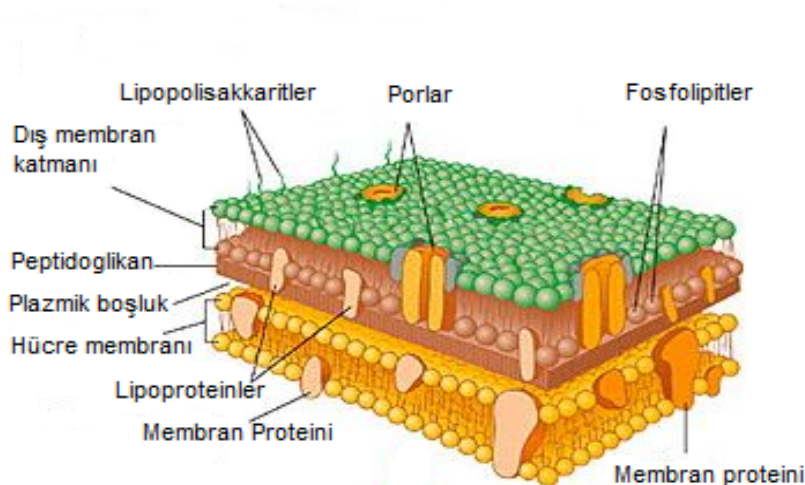
uzunlamasına molekül zincirlerine sahip olan yapı elemanlarını oluşturur. Hücre yapısı kimyasal bileşen olarak selüloz, kitin, selüloz-glukan, selüloz-kitin, kitin-kitozan, kitin-glukan, glukan-mannan gibi polisakkaritleri barındırır ve bu yapılar organizmanın familyasını ayırt etmede yardımcı olurlar.

2.1.2.2. Hücre Duvarının Fonksiyonları

- Hücre içi ve hücre dışındaki ortam arasında bulunan ozmotik basınçtan dolayı bakterinin parçalanmasını önlemek,
- Bakteriye karakteristik şeklini kazandırmaktır.

Gram negatif bakterilerde hücre duvarı kalınlığı yaklaşık olarak 10 nm'dir ve hücre duvarı alanin, glisin, glutamik asit ve lizin gibi değişik aminoasitlerden oluşur.

Gram-negatif bakteriler, gram-pozitif bakterilerden daha kompleks bir hücre duvarına sahiptir ve değişik aminoasitler ile belirli miktarda lipit, polisakkarit ve protein bileşeni içerirler. Şekil 3, hücre duvarı yapısını göstermektedir²⁰.



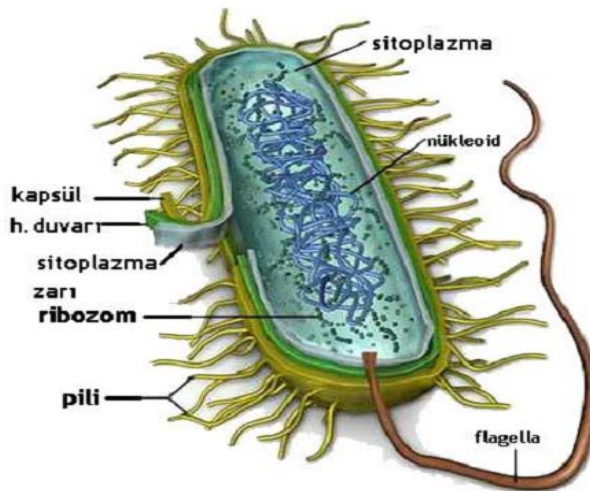
Şekil 3. Gram negatif organizmaların hücre yapısı görünümü²¹

2.1.2.3. Membran zarı (Stoplazma zarı)

Mikroorganizma hücrelerinde hücre duvarı altında ikinci bir zar yer alır ve bu zar stoplazmayı kuşattığı için stoplazma zarı olarak tanımlanır. Stoplazma zarı da hücre duvarı gibi çok katlıdır. Toplam 12 nm kalınlığındaki bu zarın 6 nm'lik orta tabakası fosfolipitlerden, 3'er nm'lik iç ve dış tabakaları ise proteinlerden oluşmaktadır. Orta tabakayı oluşturan fosfolipitlere ait hidrofobik uçlar içe, hidrofilik uçlar ise dışa doğru yönelmiştir. Stoplazma zarı bu yapısı ile hücrenin madde alışverişinde büyük önem taşır¹⁹.

2.1.2.4. Stoplazma

Hücre organellerini çevreleyen renksiz, protein benzeri maddelerden oluşan bir jel yapısındadır. Stoplazma, çok sayıda zar tarafından bölünmüş olup değişik membran yapısına sahip hücre organellerini, ribozomları ve diğer hücre içeriklerini barındırır. Stoplazma içinde yer alan organellerden en önemlileri mitokondri, golgi cisimciği, ribozomlar ve endoplazmik retikulumdur. Şekil 4'de *E. coli* ve hücre bileşenlerinin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 4. *E. coli* ve *E. coli* hücre bileşenlerinin şematik gösterimi²²

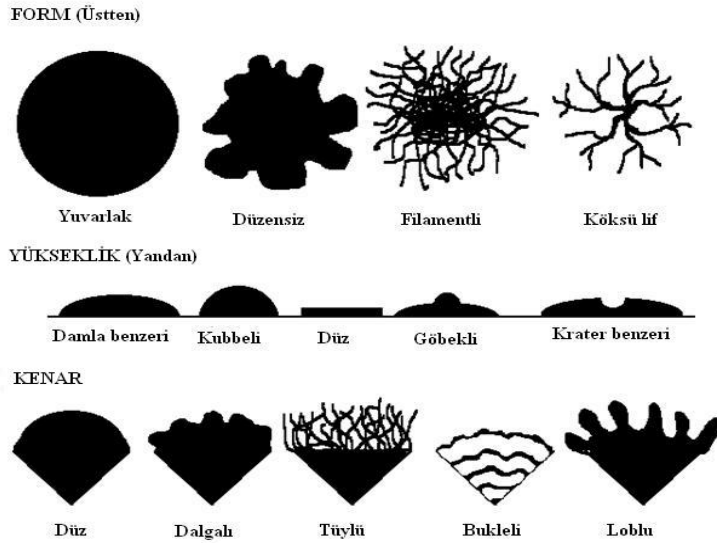
2.1.3 Morfolojik Özellikleri

Bakteri morfolojisi; makroskopik ve mikroskopik morfoloji olarak ikiye ayrılabilir. Makroskopik morfoloji daha çok bakterilerin koloni morfolojisi olarak bilinmektedir. Ancak makroskopik morfoloji kavramı içinde, bakterilerin katı ve sıvı besiyerlerindeki üreme şekilleri, oluşturdıkları yapılar ve meydana getirdikleri değişimler de incelenebilmektedir.

2.1.3.1. Makroskopik Morfoloji

2.1.3.1.1. Bakterilerin Koloni Morfolojisi

Koloni; bir bakteri hücresinin katı bir besiyerinde düştüğü herhangi bir noktada çok sayıda bölünmeler geçirerek oluşturduğu ve çıplak gözle görülebilen hücre topluluğu şeklinde bir yapı olarak tarif edilebilir. Bu durumda bir kolonide yalnızca belli bir bakteri türüne ait hücreler bulunur. Koloni sayımlarında da bu tanımdan hareketle, bir koloninin bir hücreye eşdeğer olduğu varsayılmaktadır. Her bakteri belli bir besiyerinde, koşullar değiştirilmediği sürece kendine özgü karakterde koloniler oluşturur. Aynı bakteri değişik bir besiyerine ekildiğinde ise farklı bir koloni morfolojisi gösterebilir²³.



Şekil 5. Bakterilerin koloni morfolojileri²⁴

2.1.3.2. Mikroskopik Morfoloji

Bakteriler genel olarak şeffaftır ve bu nedenle mikroskop altında direkt olarak incelenmeleri güçtür.

Bakterileri tanımlama yollarından birisi onları boyayarak incelemektir. Bakteriler boyanarak, bakterilerin mikroskopik morfolojileri (şekilleri, büyüklükleri, diziliş şekilleri, belli hücre organellerinin varlığı ve yapısı) ve çeşitli boyalara karşı davranışları hakkında bilgi edinilebilmektedir. Çeşitli boya ve bu boyalara olan davranışlarına göre bakteriler Gram pozitif, Gram negatif bakteriler olarak ayrılabilirler.

Hem makroskopik hem de mikroskopik morfoloji özelliklerine bakıldığında, *E. coli* yaklaşık olarak 2-6 µm boyunda ve 1,0-1,5 µm eninde düz, uçları yuvarlak çomak şeklinde bir bakteridir. Bazı kültürlerde koka benzeyip kısa, bazı kültürlerde de normalden uzun Y harfi şeklinde dallanan filamentli şekillerde bulunabilir. Peritrik kirpikleri sayesinde hareket yetisi kazanmışlardır. Fakat bu hareketleri oldukça yavaştır.

Hareketli suşlarının yanı sıra hareketsiz suşları da saptanmıştır. Bazı suşları ise kapsüllüdür. Bakteriyolojik boyalarla iyi boyanan koliform grubu *E. coli* gram negatiftir^{25,26}.

2.1.4. Antijenik Yapısı

E.coli'nin somatik (O), kirpik (H) ve kapsül (K) antijenleri vardır.

Somatik (O) antijenleri bakteri duvarı ile ilgilidir. Alkol ve ısıya dayanıklıdır, formole ise duyarlıdır. 150'den fazla varyasyon gösterebilir ve bazen bir bakteride birden fazla (O) antijeni bulunabilir. Oluşan antikorlar (Immune Globuline M) IgM yapısındadırlar.

Kirpik (H) antijeni flagele yerleşmiştir. Alkol ve ısıya duyarlı, formole dirençlidir. 50'den fazla türü vardır. Buna karşı organizmada oluşan antikorlar (Immune Globuline G) IgG yapısındadır. Flagellin adı verilen proteinden oluşur. Bakteriler (H) antijenini kaybedip, uygun ortamlarda tekrar oluşturabilirler.

Kapsül (K) antijeni kapsüllü bakterilerde bulunur. Klebsiella, *E. coli* ve diğer bazı enterik bakteriler bu antijeni içerirler. 100 kadar tipi vardır. Polisakkarit yapısında, ısıya dayanıklı ve bakteri yüzeyinde yer alan bir antijendir. 100-120 °C'de 1-2 saatte kaybolurlar. (K) antijeni bakterinin virulansını sağlar¹⁶.

2.1.5. Biyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

E. coli gram negatif, fakültatif anaerobik ve spor oluşturmeyen bir bakteridir. *E. coli*, tipik olarak çubuk şeklinde olup

yaklaşık 2 µm uzunluğunda, 0,5 µm çapında, 0,6-0,7 µm³ hücre hacmine sahip bir canlıdır²⁷.

Geniş alana yayılmış çeşitli substratların üzerinde yaşayabilirler. Bu substratlar da anaerobik koşullar altında asit fermentasyonu sonucu laktat, süksinat, etanol, asetat ve karbondioksit üretir. *E. coli* için optimum gelişme 37 °C'de gerçekleşir. Fakat, bazı türleri en iyi gelişimi 49 °C'de gösterirler. Büyüme, trimetilamin N-oksit, oksijen, nitrat, dimetil sülfoksit gibi substratların indirgenmesi ve pürvik asit, formik asit, hidrojen ve aminoasitlerin yükseltgenmesini içeren redoks çiftlerinin aerobik veya anaerobik solunumda kullanılması ile gerçekleşir²⁸.

Flagella'ya sahip olan türleri bulundukları ortam itibari ile yüzebilir ve kendiliğinden hareket edebilirler²⁹. Hareketlerini sağlayan flagella tüylü bir düzenlemeye sahiptir.

E. coli ve *E. coli*'ye benzer bakteriler, bakteriyel konjügasyon, transdüksiyon veya transformasyon ile DNA transferi yaparak genetik materyallerini kendilerinden sonraki popülasyona aktarabilirler. Bu proses ile shiga toksinlerini bakteriyofajların taşıması sonucu, gen kodlarını *Shigella*'dan *E. coli* O157:H7 ye aktarmışlardır³⁰.

2.1.6. Kimyasal Yapısı

Bütün canlı hücrelerde olduğu gibi *E. coli* hücresinin yapısında organik maddeler, inorganik maddeler ve su bulunur. Su, genel olarak bakterilerin %70-90'lık kısmını oluşturur. Bakteri sporlarında bu oran %40-50'ye düşer.

Organik maddeler kuru ağırlığın %50-90'ını oluşturur. Organik maddelerin başlıcaları, proteinler, karbonhidratlar, lipitler ve nükleik asitlerdir.

Genel olarak bakterilerde en çok karbon, hidrojen, oksijen, azot, kükürt, fosfor gibi elementlerin yanı sıra daha az oranda da sodyum, potasyum, magnezyum, klor, demir, bakır, çinko bulunmaktadır.

E. coli'nin yapısında bulunan karbonhidratlar, polisakkarit şeklinde ve/veya glikoprotein yapısında olabilir. Cins ya da tipe özgü özellikleri nedeniyle bu karbonhidratlar serolojik tanıda kullanılabilirler. Lipidler, bazı bakterilerde yüksek oranda bulunur ve proteinlerle birleşmiş yapılar da oluşturabilirler. İnorganik maddeler, bakteri kuru ağırlığının %2-30'u arasında değişir. Daha çok tuz şeklinde bulunurlar³¹.

2.1.7. Patojenik Özellikleri

E.coli memelilerin ve kuşların normal bağırsak florasında bulunup, burada diğer flora bakterileri ve organizmalar ile denge içinde kaldığı sürece hastalık yapmaz. Ancak belli koşullar altında *E.coli* insanlar ve hayvanlar için patojen olup, kanlı ve kansız diyare şeklinde ortaya çıkan bağırsak hastalıklarına neden olur³².

Bağırsak kanalı dışına çıkıp diğer dokulara yerleşmeleri ve çeşitli klinik tablolara yol açmaları sık görülen durumlardır. Özellikle idrar yolları, safra kesesi ve safra yolları, akciğer, periton ve meninkslere ulaşan *E.coli* bakterileri önemli hastalıklara yol açarlar³³.

2.1.8. K12 Serotipi

E. coli'nin birçok suşuna ait sekans dizilimi belirlenip detaylı olarak uzun yıllar çalışılmıştır. *E. coli* K-12 serotipi "tüm genom dizilimi için aday olarak önerilen" ilk organizmadır³⁴. Bu serotip 4.639.221 baz çiftli tek bir dairesel kromozoma sahiptir ve 4288 protein-kodlama geni taşımaktadır. Bu genlerin % 38'i protein oluşumu üzerinde baskın nitelik

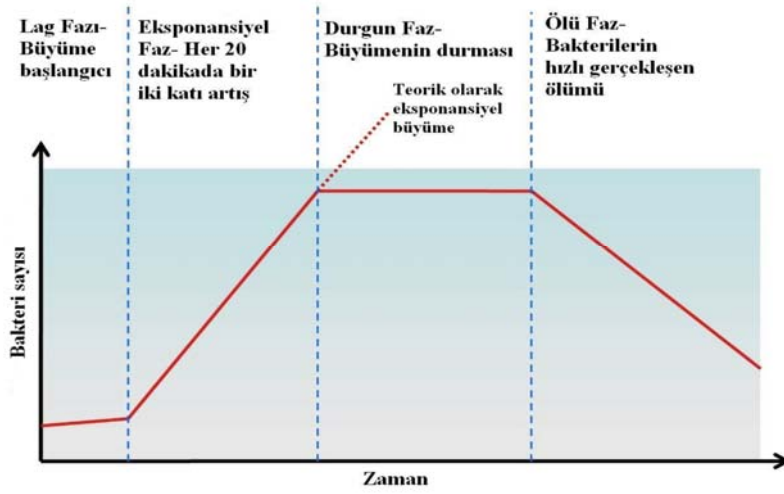
taşımamaktadır. *E. coli* K-12 genomu diğer *E. coli* genomları gibi %50,8 G+C içeriği taşımaktadır. Çalışmalarda *E. coli*'nin model bakteri olarak seçilmesindeki en önemli nedenlerden biri de hakkında bu kadar fazla çalışma yapılmış olmasıdır.

2.2. *Escherichia coli* Gelişimi ve Canlılığı

Bakteri üremesi mikroorganizma bileşenlerinin belirli bir düzende sentezi ve bakteri çoğalması anlamına gelir. Bakteri üremesi hücre konsantrasyonu veya hücre yoğunluğu olarak ölçülebilir. Hücre konsantrasyonu canlı hücre sayısı ile ilgilidir. Hücre yoğunluğu ise kuru ağırlık tayini üzerinden veya azot tayini üzerinden hesaplanabilir. Bakteriler ikiye bölünerek çoğalırlar. Bakterilerde jenerasyon hücre adedinin iki misline çıkması olarak tarif edilir.

Bakterilerin çoğalmalarında ana hatları ile 4 dönem saptanmıştır:

- A) Lag fazı
- B) Ekponansiyel faz
- C) Durgun faz
- D) Ölüm fazı



Şekil.6. Bakterilerin üremesi ve büyümesi³⁵

A - (Lag fazı): Bir bakteri topluluğu, yüksek besin bulunduran bir ortama ilk girdiğinde hücrelerin yeni ortamlarına adapte olmaları gerekir. Büyümenin ilk evresi bekleme aşamasıdır. Bu yavaş büyüme döneminde hücreler yüksek besili ortama adapte olup hızlı büyümeye hazırlanırlar. Hızlı büyüme için gerekli olan proteinler üretilmektedir ve biyosentez hızı yüksektir.

B - (Eksponansiyel faz): Logaritmik artış evresinde toplam bakteri sayısı hızla katlanmaya başlar ve besinlerden biri tükenip sınırlayıcı olana kadar devam eder.

C - (Durgun faz / sabit büyüme evresi): Besinler tükenmeye başlamıştır ve mikroorganizmalarca üretilen toksik maddelerin miktarı artmaktadır. Hücreler metabolik etkinliklerini azaltır ve hücrel proteinlerini harcar.

D - (Ölüm fazı): Besin yetersizliği ve aşırı yüklenme sebebiyle hücreler ölmeye başlar¹⁶.

2.3. Mikroorganizma Tayininde Kullanılan Yöntemler

Bir gıda maddesinde ya da herhangi bir materyalde *E. coli* aranma ve sayılması için kullanılan tüm standart yöntemler koliform grup aranmasına yöneliktir. Bu yöntemler en muhtemel sayı (EMS) yöntemi, katı besiyeri kullanılan yöntemler, membran filtrasyon yöntemi ve hızlı sayım yöntemleri olarak gruplandırılmaktadır.

2.3.1. Klasik Yöntemler

2.3.1.1. Kuru madde tayinine dayalı yöntem

Kuru madde miktarı biyokütlenin tahmini için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla, belirli bir hacme sahip belirli bir mikroorganizma kültüründeki (saf kültür) hücreler damıtık su ile yıkandıktan sonra kuru madde tayinleri yapılmaktadır³⁶. Bu prosedür substrat olarak çözünmeyen katılar kullanıldığında, gerçek biyokütleyi vermeyeceği gibi düşük mikroorganizma miktarlarında da tayini zorlaştırmaktadır.

2.3.1.2. Mikroskopik sayım yöntemi

Bu yöntem dahilinde hücreler, özel üretilen lamaların (Thoma lamı, Howard lamı vb.), kullanım için belli bir hazırlık gerektiren normal lamaların (Breed yöntemi) veya membran filtrelerin üzerine yayılarak ya doğrudan ya da boyama işlemi sonrasında mikroskopta sayılmaktadır²⁰. Sayım sonucu mikroskopik sayı/ml veya mikroskopik sayı/gram olarak verilmektedir³⁷. Çoğu geleneksel yöntemde göre oldukça hızlı olsada, bu yöntemde canlı ve ölü hücreler ayırt edilemediğinden ve hücreler ile örnek içerisindeki partiküller karıştırılabilmektedir

2.3.1.3. En Muhtemel Sayı Yöntemi

Genellikle koliform grup/fekal koliform grup bakteriler / *E. coli* sayımında EMS yöntemi tercih edilmekte ve yöntem üç aşamada uygulanmaktadır. Bu aşamalar sırasıyla:

- Koliform grup bakterilerin muhtemel sayısını belirlemek,
- Koliformların kesin sayısını onaylamak ve aynı anda farklı bir besiyerinde fekal koliformların sayısını belirlemek,
- *E. coli* sayısını belirlemektir.

Türk Standartları Enstitüsü (TSE) ve Uluslararası Standartlar Örgütü (ISO) 'nın koliform grup bakterilerin numune içerisinde aranması yönelik çalışmalar, standart analiz yöntemlerine göre hazırlanan örneğin dilisyonları içerisinde ardışık beş dilüsyondan üçer adet Lauril Sülfat Triptoz Broth (LST) besiyerine birer mL ekim yapılması ve 37°C'de 24 (gerekirse 48) saat inkübasyondan sonra pozitif sonuç veren tüpler muhtemel koliform olarak değerlendirilmesine dayanmaktadır. Bu yöntemle göre, muhtemel koliformların sayısını doğrulamak için de Brilliant Green Bile Broth (BGBB) besiyerine ekim yapılmakta ve 37 °C'de 24 (gerekirse 48) saat inkübasyondan sonra pozitif sonuç veren tüpler koliform grup olarak doğrulanmaktadır³⁸.

TS 6063/ISO 7251'e göre *E. coli* aranması, ardışık beş dilüsyondan üçer adet LST besiyerine 1'er mL ekim yapılarak 37°C'de 24 (gerekirse 48) saat inkübasyona bırakılarak başlatılır. Bu noktada pozitif sonuç veren tüplerden su banyosunda 44,5°C'de tutulan *E. coli* (EC) Broth besiyerlerine ekim yapılmakta ve gaz oluşumu için yine 44,5°C'de 24 (gerekirse 48) saat inkübe edilmektedir. Bu süre sonunda gaz oluşumu gözlenen tüplerin fekal koliform içerdiği varsayılmaktadır. Testin bir sonraki aşamasında EC Broth besiyerinde pozitif sonuç alınan örneklerden

44,5°C'deki Trypton Water (TW) besiyerine ekim yapılarak yine aynı derecede 48 saat inkübasyona bırakılır ve bu süre sonunda indol testi gerçekleştirilir. Eğer indol testi pozitif sonuçlanırsa pozitif sonuçlar içeren tüplerde *E. coli*, pozitif sonuç vermeyen diğer tüplerde ise *E. coli* dışındaki diğer fekal koliformların olduğu sonucu çıkarılır.

Amerikan Resmi Analitik Kimyacılar Birliği (AOAC)'nin koliform grup/*E. coli* aranması için önerdiği yöntem ise EMS yöntemidir. Bu yöntemle göre hazırlanan örnek dilüsyonlarından ardışık üç dilüsyondan 3'er adet LST besiyerine 1'er mL ekim yapılmakta, 35°C'de 48 saat süren inkübasyondan sonra pozitif sonuç veren tüpler muhtemel koliform grup olarak değerlendirilmektedir. Bu değerlendirme aşamasında pozitif sonuç veren tüplerden BGGB ve EC Broth besiyerlerine ekim yapıp 35°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra, BGGB tüplerinden alınan pozitif sonuçlar koliform grup olarak doğrulanmakta, 44,5°C'de 48 saate kadar inkübe edilen EC Broth tüplerinden alınan pozitif sonuçlar ise fekal koliform olarak kabul edilmekte ve sayılmaktadır. Bu aşamanın ardından ayrıca Eosin Metilen Blue Agar (EMB) besiyeri üzerine pozitif sonuçlu tüplerden alınan örnekler ile sürme yapılarak gram boyama ve IMVEC testlerinin uygulanması ile de *E. coli*'nin varlığı doğrulanmaktadır³⁹.

Amerikan Halk Sağlığı Kuruluşu (American Public Health Association; APHA) tarafından önerilen Amerikan standartları yöntemine göre koliform *E. coli* aranmasında % 0,5 Laktoz Broth (LB) kullanılmaktadır. Buna göre her biri 20 ml LB besiyeri içeren 15 adet tüpe, 5X10 ml, 5X1 ml ve 5X0,1 ml olacak şekilde ekim yapılmakta ve tüpler 35°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmaktadır. Inkübasyon sonunda gaz oluşturan tüpler muhtemel koliform olarak kabul edilmektedir. Daha sonra gaz oluşturan bu tüplerden EMB agara sürme yapılmakta ve 35°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmaktadır. Eğer bu besiyerinde tipik *E. coli* kolonileri oluşmuş ise tamamlama testi yapılmakta, oluşmamış ise teste

burada son verilmektedir. Tamamlama testinde EMB agardan birkaç değişik koloni alınarak LB fermentasyon besiyerine ve yatık Nutrient Agar (NA) besiyerine ekim yapılarak her iki besiyeri de 35°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmaktadır. İnkübasyon sonunda LB besiyerinde gaz oluşmuş ve NA'dan alınan kolonilerde gram negatif sporsuz çubuk bakteriler tespit edilmiş ise su örneğinde koliform grup mikroorganizma olduğu kabul edilmektedir. Aynı kuruluş fekal koliform testi için EC Broth besiyerinde 44±0,2°C'de 48 saat inkübasyon sonunda gaz oluşumu görülen tüplerin fekal koliform olarak değerlendirilmesini önermektedir⁴⁰.

2.3.1.4. Katı Besiyeri Yöntemi

Pek çok kuruluş tarafından koliform grup ve *E. coli* aranmasında standart yöntem olarak EMS yöntemi gösterilirken, özellikle izolasyon amaçlı sayım çalışmalarında katı besiyeri kullanılmaktadır. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan besiyeri Violet Bile Red (VRB) Agardır. Bu besiyerinde sayım yapılırken yayma, dökme ve çift tabaka dökme plak yöntemleri uygulanmaktadır⁴⁰.

VRB Agar besiyerine alternatif olarak Petrifilm VRB yöntemi de kullanılabilir. Bu yöntemde göre VRB Laktoz Agar besiyeri kullanılması önerilmektedir. Besiyeri bileşiminde katılaştırıcı ajan olarak agar yerine soğuk suda çözülebilen bir madde kullanılmaktadır. Bileşenler kurutularak üzeri plastik film ile kaplanmış halde kullanıma hazır olarak satılmaktadır. Yönteme göre seyreltiden veya direkt örnekten 1 ml alınarak besiyeri üzerine ilave edilir. Plastik film üzerine basınç uygulanarak örneğin 20 cm² alana yayılması sağlanır. 32±1°C'de 24±2 saat inkübasyondan sonra, etrafında bir veya daha fazla gaz kabarcığı görünen koloniler koliform olarak sayılır. Burada ister koliform ister başka bir tür olsun, kolonilerin kırmızı renkli olacağı unutulmamalıdır⁴¹.

E. coli sayımında katı besiyeri olarak Triptik Soy Agar (TSA) besiyeri de kullanılmaktadır. Dökme plak yöntemi ile hazırlanan petri kutuları 35°C'de 2 saat inkübasyondan sonra besiyerinin üzeri ikinci tabaka olarak VRB Agar ile kaplanmakta ve inkübasyona 44,5 °C'de 24 saat devam edilmektedir. Bu yöntemle, hasar görmüş *E. coli* hücrelerinin sayımında daha iyi sonuçlar alınmaktadır⁴⁰.

2.3.1.5. Membran Filtrasyon Yöntemi

Hidrofobik Grid Membran Filtre (HGMF) tekniği, özellikle su ve diğer sıvı gıdaların analizinde kullanılmaktadır. Bu teknikte örnek önce bir membran filtreden geçirilerek mikroorganizmalar filtre üzerinde tutulmaktadır. Daha sonra bu filtreler uygun bir besiyeri üzerine, arada hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilmekte ve oluşan koloni sayısından materyaldeki mikroorganizma sayısı hesaplanmaktadır. Filtreler üzerinde bulunan birbirini dik kesen hidrofobik hatlar, oluşan kolonilerin dağılmasını önlemekte ve böylece sayım yapılmasını kolaylaştırmaktadır. HGMF tekniği ile *E. coli* sayımı AOAC tarafından standart analiz yöntemi olarak kabul edilmiştir⁴².

Membran filtrasyon tekniğinin bazı üstünlükleri bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri; örnekte az sayıda mikroorganizmanın bulunması durumunda bile belirleme imkânı vermesi ve inkübasyondan sonra filtrelerin kurutularak saklanabilmesidir⁴³.

HGMF ile fekal koliform sayılmasında filtre, TSA besiyerine yerleştirilmekte ve kuru gıdalar için 25°C'de 4-5 saat, diğer gıdalar için 35°C'de 4-5 saat olmak üzere, hasar görmüş ve stres altındaki mikroorganizmaların tekrar aktivite kazanmalarını sağlamak amacı ile bir ön inkübasyon uygulanmaktadır. Filtreler buradan m-FC Agar (modified-Fecal Coliform) besiyerine alınmakta ve 44,5°C'de 24 saat inkübasyona

bırakılmaktadır. İnkübasyon sonunda bir veya daha çok mavi renkli koloni gelişimi görülen alanlar belirlenmekte ve değerlendirme koliform sayımında olduğu gibi yapılmaktadır⁴⁰.

2.3.1.6 Koliform Grup ve *E. coli*'nin Tanımlanması

Uluslararası standart kontrol örgütleri tarafından *E. coli* 'nin doğrulama testleri olarak IMVEC testleri gösterilmektedir (I: İndol testi, M: Metil red testi, V: Voges-Proskauer testi, E: Eijkman testi veya 44,5±0,2°C'de gelişme testi, C: Sitrat testi). IMVEC testlerine ilaveten HOMoC testleri de yapılmaktadır (H: Hidrojen sülfür oluşum testi, O: Ornitin dekarboksilaz testi, Mo: Hareketlilik testi, C: Sitrat testi). Ayrıca; glikozdan gaz oluşumu, laktoz, mannit, sorbitol fermentasyon testleri, lisin dekarboksilasyonu, H₂S oluşumu testleri koliform grup bakterilerin identifikasyonu için önerilen diğer bazı testlerdir³⁹. Bu testlerde koliform grup bakteriler ve *E. coli* 'nin test sonuçları çizelge 1 'de verilmiştir.

Tablo 1. Bazı koliform grup bakterilerin biyokimyasal karakterleri⁴⁰

	In	Mr	Vp	Ci	HS	Or	Mo	Gg	La	mn	So	Li
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-	±	+	+	+	+	±	+
Tip I	-	+	-	-	-	±	+	+	+	+	±	±
Tip II												
<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-	+	+	±	+	+	-	+	+	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	±	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	±	+

2.3.2. Hızlı Yöntemler

2.3.2.1. MUG Yöntemi

AOAC tarafından *E. coli* için hızlı tayin yöntemi olarak belirtilen bu yöntemde, örnekten dilüsyonlar hazırlandıktan sonra ardışık üç dilüsyondan üçer adet LST Broth besiyerine inokülasyon yapıp, tüpler kapalı su banyosunda $44,0 \pm 0,2$ °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmakta ve pozitif sonuç veren tüpler muhtemel *E. coli* olarak değerlendirilmektedir. Daha sonra bu kültürlerden EMB Agar besiyerine sürme yapılarak *E. coli*'nin varlığı doğrulanmaktadır. Bu yöntemle göre analiz süresi toplam 48 saattir³⁹.

Bu tekniğin prensibi; doğrudan besiyerinin ilave edilen ya da selektif katkı olarak ilave edilen 4-methyleumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) adlı bileşiğin *E. coli* 'de yapısal bir enzim olarak bulunan β -D-glucuronidase (MUGase, β -GUR) enzimi tarafından 4-methyleumbelliferone adlı florojenik bir ürüne dönüşmesi ve bu ürünün de 366 nm uzun dalga boylu ultraviyole ışık altında floresan ışıma vermesi esasına dayanmaktadır. MUG, her türlü katı ve sıvı besiyeri bileşimine

rahatlıkla ilave edilebildiği için, EMS yöntemi, katı besiyerleri ve membran filtrasyon yöntemi ile gerçekleştirilen *E. coli* analizlerinde kullanılmaktadır⁴⁰.

β -D-glucuronidase pozitif olan bakteriler içinde indol pozitif olan tek bakteri *E. coli* 'dir. Bu nedenle *E. coli* dışında bazı β -D-glucuronidase pozitif *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella* suşlarının neden olduğu sahte pozitif reaksiyonlar indol testi ile belirlenebilmektedir. Ayrıca bazı *E. coli* suşları yoğun üremeye bağlı olarak aşırı miktarda asit oluşturmakta ve bu da floresan ışımayı maskeleymektedir. Bu gibi durumlarda besiyerine 1 ml, 1 N NaOH ilavesi ile floresan reaksiyon kesinleştirilebilmektedir⁴⁰.

2.3.2.2. Doğrudan Epifloresant Filtreleme Tekniği (DEFT)

DEFT teknoloji ile uyumlu pratik bir teknik olarak görülmektedir. Analizi gerçekleştirilecek örnekler filtrelendir ve floresan özelliğe sahip uygun bir indikatör ile işaretlenir. Bu yöntemde kullanılan “akridin oranj” yöntem için orijinal bir indikatör olarak kullanılmasına rağmen son zamanlarda gerçekleştirilen uygulamalarda 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ön plana taşınmıştır. Epifloresans mikroskopi, floresans özellik taşıyan/taşıması sağlanan mikroorganizmalar için kullanılmaktadır. Tekniğin duyarlılığı filtrelenen hacime ve mikroskop altında görüntülenen alan sayısına bağlıdır. Mikrokoloni oluşumu, tekniğin doğruluğunu ve hücrenin tayinini kuvvetlendirir. Bu teknikte filtreleme sırasında mikroorganizmaların membran üzerinde yayılması önem kazandığı için kullanılması olası çözeltiler bir önfiltrilemede kullanılarak uygun çözelti seçimi yapılabilir^{44,45}.

2.3.2.3. Enzim Bağlı İmmunosorbent Assay (ELISA)

ELISA hücresel bileşime dayalı bir tekniktir. Bu teknikte antijen-antibody reaksiyonu belirli mikroorganizmaların veya hücresel bileşimin tayini için kullanılır. ELISA geçmişten bu yana klinik uygulamalarda oldukça tercih edilen bir teknik olmuştur⁴⁵. Analiz süresi bakteriler için 24-52 saat arasında değişirken mikrobiyal toksinler için bu süre 4-24 saat arasında değişmektedir. Çoğu immünolojik testlerde 10^4 hücre / mL kadar bakteri sayısı tayinin gerçekleştirilmesi için gereklidir. Bu yüzden bu durumlarda ön zenginleştirme yapılabilir⁴⁶.

2.3.2.4. Akış Sitometrisi

Flow sitometri, hücre veya partiküllerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesidir. Akış sitometrisi ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli florofor da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir⁴⁷.

2.3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR, nükleik asit tabanlı, genotipik teknoloji içeren bir tekniktir. Sistem basit bir örnekle fotokopi makinası gibi çalışır, nükleik asit fragmentleri kopyalanır. Nükleik asit fragmentleri hücre içi kullanımı için polimerizasyon teknikleri kullanılarak kuvvetlendirilir. Örneğin ayna-imaj kopyalama tekniği bu işi yapabilir. Daha sonra orijinal hedefin bir sonraki kopyaları bu ve buna benzer farklı teknikler kullanılarak yapılır. Çeşitli

PCR metotları kullanılabilir: reverse transcriptase PCR (PCR-RT), nucleic acid sequence based amplification (NASBA), veya transcription mediated amplification (TMA) ⁴⁵.

The BAX_ Microbial Identification System (Qualicon) ve Probetia System (BioControl Systems) bu tekniği sistemlerinde kullanan kuruluşlardır. Dupont BAX system örnekleri genetik seviyede değerlendirilerek PCR ile bakteriye ait DNA baz dizilimini tayin etmektedir. PCR, DNA sentez başlangıcında spesifik primeri sağlamak için DNA synthase gereksinimi üzerinden yürütülür. Primerin sağlanması ile teknisyen sentez başlangıcında bakteriyel kromozomun yerini kontrol eder. Tespit işleminden sonra bakteriye ait DNA dizilimi elde edilir⁴⁵.

2.3.2.6. İmmunomanyetik Ayırmaya Dayalı Yöntemler

İmmunomanyetik ayırım (İMA) yönteminin temeli, manyetik alan varlığında yüzeyi antikorlu kürelerin ortamda diğer türlerden miknatıslanma ile ayrılması ve ayrılan türlerin tayin edilmesine dayanır⁴⁸. İMA, hedef maddenin karışık bir ortam içerisinde seçici olarak ayrılmasını ve konsantre edilmesini sağlamaktadır. Bu amaçla paramanyetik veya süpermanyetik partiküller, manyetize olabilme özelliklerini yalnızca dışardan uygulanan manyetik bir alan varlığında göstermektedirler⁴⁹. Bu alan uzaklaştırıldığında, miknatısa doğru biraraya gelme özelliklerini yitiren partiküller birbirlerine yapışmadan homojen bir karışım oluşturmaktadırlar⁴⁸.

Manyetik partiküller farklı fiziksel özelliklerde olmakla birlikte, immunolojik sistemler için aglütinasyon ve özgül olmayan bağlanmayı da en aza indirebilme imkanını sunduğundan dolayı küresel partiküller olarak (çoğunlukla 2,8 µm ve 4,5 µm çapında) kullanılmaktadır⁴⁸. Manyetik partiküllerin homojen büyüklük ve şekilde olmaları, fiziksel ve kimyasal

açından, kararlı bir sistemin oluşmasını sağlamaktadır.

İMA'da kullanılan kürelerin sentezi çoğunlukla demir bir merkez içeren polistiren küreler ile gerçekleştirilmektedir. Bu kürelerin içerisinde bulunan demir merkez, küreye paramanyetik özelliğini kazandırmaktadır⁵⁰.

İmmünolojik sistemlerde manyetik kürelerin yüzeyleri üzerine kovalent bağlanma ile oluşturulan ve hedefe özgü monoklonal veya poliklonal antikorlar ile modifiye edilen küreler kullanılmaktadırlar⁴⁸. Bunun için son zamanlarda streptavidin-biotin konjügasyonu manyetik küreler yüzeyinde kullanılmaktadır. Suda çözünen, küçük bir vitamin olan biotin, yumurta beyazı proteini avidine karşı yüksek affinitesi bulunmaktadır⁵¹. Avidin ve biotin arasındaki bağlanmanın hızlı ve güçlü olması, bu sistemin paramanyetik kürelerin antikorlarla kaplanmasında da kullanılmasını sağlamıştır. Bakteriyel kaynaklı bir protein olan streptavidin, nötral bir izoelektrik noktası olması ve karbonhidrat içermemesi nedeniyle uygulamalarda avidine tercih edilmektedir⁵¹. Streptavidin biotin sisteminin en önemli avantajı, bağlanma sisteminin hızlı ve basit olmasıdır.

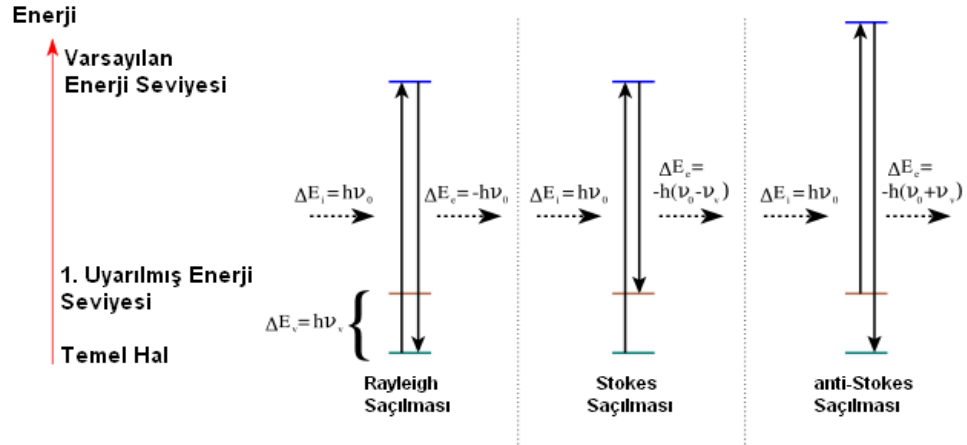
İMA yönteminde, antikor kaplı küreler hazırlanan örnek ile karıştırılmakta ve uygun bir inkübasyon süresinin ardından manyetik partiküllere bağlanmış olan antijen, manyetik bir ayırıcı ile bu karışımdan ayrılmaktadır. İzole edilen bu manyetik partikül-antijen kompleksi ölçüm sistemine aktarılmadan önce uygun bir tampon çözelti ile yıkanmaktadır.

2.3.2.7. Raman Spektroskopisi

Teknik, moleküllerin şiddetli bir monokromatik ışın demeti ile etkileşmesi sırasında oluşan saçılmanın dedektör tarafından takibi prensibi üzerine kuruludur. Işık saçılması sırasında saçılan ışığın büyük bir

kısının enerjisi madde ile etkileşen ışığın enerjisine eşit olur ve bu tür elastik saçılma olayına Rayleigh saçılması denir. Elastik saçılma olayının yanı sıra saçılan ışığın çok az bir kısmı ise molekül ile etkileşmeye giren ışığın enerjisinden daha farklı enerjiler ile saçılır. Bu tür elastik olmayan saçılma olayı ise Raman saçılması adını alır. Raman saçılması sırasında saçılan ışığın enerjisinde, molekül ile etkileşen ışığına göre oluşan fazlalık veya azlık, ışıkla etkileşen molekülün titreşim enerji düzeyleri arasındaki enerji farkları kadardır. Bu nedenle Raman saçılmasının spektroskopik incelenmesi ile moleküllerin titreşim enerji düzeyleri hakkında bilgi edinilebilir. Bu tür bir spektroskopik yöntem Raman spektroskopisi adını alır⁵².

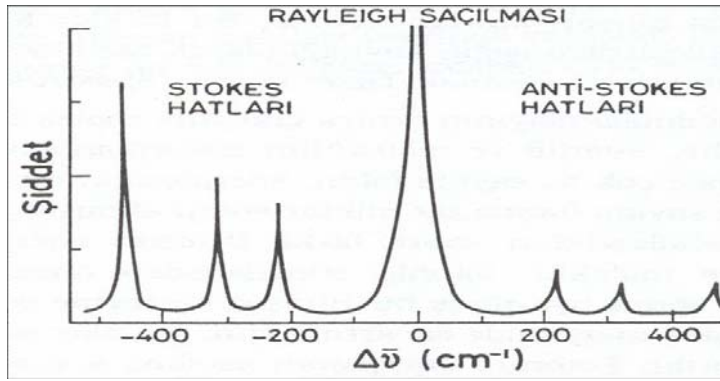
Şekil. 7'de Raman saçılması olayının ortaya çıkışının molekülün titreşim enerji düzeyleri ile ilişkisi görülmektedir.



Şekil.7. Stokes ve anti-Stokes türü Raman saçılması olaylarının molekül enerji diyagramı ile açıklanması⁵³.

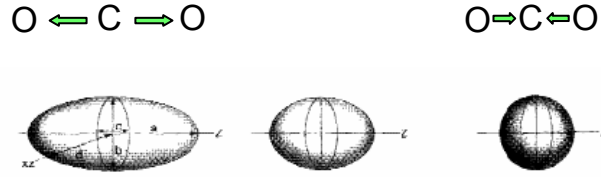
Enerjisi $h\nu_0$ olan bir foton, molekül ile etkileştiğinde saçılmadan önce çok az sayıda foton, enerjilerinin bir kısmını moleküllere aktarır veya moleküllerde çok az sayıda fotona bir miktar enerji aktarılır. Bu enerji aktarımı olayı sonucu moleküller fotonla etkileştikten sonra farklı titreşim enerji düzeylerinde bulunurlar. Enerji aktarımı nedeni ile molekül,

fotonla etkileşmeden önce temel titreşim enerji düzeyinde iken, etkileşmeden sonra uyarılmış bir titreşim düzeyine geçiyorsa fotonun enerjisinde azalma ve molekülün titreşim enerjisinde ise artma olur. Bu olay sonunda saçılan ışınlar Stokes hatları olarak adlandırılır. Fotonun enerjisinin saçılma sonrası arttığı durumlarda ise, molekül fotonla etkileşmeden önce uyarılmış bir titreşim düzeyinde iken, etkileşme sonrası temel titreşim düzeyine döner ve böylece molekülden fotona, molekülün uyarılmış enerji düzeyi ile temel titreşim düzeyi arasındaki fark kadar bir enerji aktarılmış olur. Bu durumda gözlenen Raman kaymalarına anti-Stokes hatları adı verilir⁵².



Şekil.8. Stokes ve anti-Stokes hatları⁵².

Boltzman dağılım yasasına göre, fotonla etkileşmeden önce uyarılmış enerji titreşim düzeylerinde bulunan moleküllerin sayısı, temel titreşim enerji düzeylerinde bulunan moleküllerin sayısında çok daha az olduğundan, anti-Stokes türü Raman saçılmasının meydana gelme olasılığı Stokes türününkine göre çok daha azdır⁵².



Şekil.9. CO₂ molekülüne ait polarlanabilirlik

Bir molekülün Raman türü saçılma etkileşmesine girebilmesi için molekülün titreşimi sırasında etkileştiği fotonun frekansına eşit frekanslı olarak polarlanabilmesi yani geçici bir dipol momentinin olması gerekmektedir. Şekil.9'da doğrusal CO₂ molekülünün simetrik ve asimetrik gerilme ve eğilme titreşimleri sırasında molekülün dipol momentinde ve polarlanabilmesinde oluşan değişimler görülmektedir⁵².

Raman spektrumları bir molekül için İnfrared spektrumları ile birlikte değerlendirildiğinde o moleküle ait hemen hemen bütün titreşimlerin görülmesini mümkün kılıp molekülün kimyasal yapısının veya nitel analizinin daha güvenilir gerçekleşmesini sağlar. Fakat biyolojik çalışmalarda IR yöntemi su varlığında kuvvetli absorplama özelliği gösterdiği için sorun teşkil etmektedir. Biyolojik çalışmalar için IR spektroskopinin geri planda kalması, Raman spektroskopiyi oldukça ön plana taşımıştır. IR'nin aksine Raman spektroskopinin en büyük avantajlarından birisi olan sulu ortamda bulunan numune analizinin gerçekleştirilmesi daha kolay olmaktadır. Böyle bir teknik ile biyolojik olarak çeşitlilik gösteren canlıların parmak izi bölgeleri çalışılarak tanımlama gerçekleştirilebilmektedir. Bu tarz bir durumda çalışma sonrası elde edilen spektrumun hücresel bileşen tabanlı olduğu söylenebilir⁴⁵.

Oluşturulan model yüzeyler taksonomik gruplara karşı seçicidir. Örnekler, bilinen mikroorganizma veri tabanındaki spektrum örnekleri ile karşılaştırılır. Klinik çalışmalarda elde edilen bulgulara göre

bakteri kültüründe 5 saat içerisinde gelişmeye başlayan türlerin mikrobiyal tanımlamaları bu yöntem ile sağlanmıştır⁴⁵.

Diğer yandan; normal Raman spektroskopi (NRS) sulu ortamda çalışmaya olanak sağlamasına rağmen, düşük şiddet ve hassasiyetle çalışıyor olmasından dolayı, zamanla yerini Rezonans Raman Spektroskopiye (RRS) bırakmıştır. RRS, floresans girişiminin daha az olduğu spektrumların eldesinde, konjuge aromatik yapılara karşı verdiği cevap ve elde edilen sinyallerin daha net olması bakımından NR ye göre oldukça üstün bulunmuştur¹³.

Rezonans Raman saçılım olayı, bir analitin elektronik absorpsiyon pikine oldukça yaklaşan dalga boyları ile uyarılması sonucu Raman şiddetlerinin büyük ölçüde güçlendiği bir durumdur. Bu koşul altında çoğu Raman piklerinin şiddetleri 10^2 ile 10^6 kat kadar kuvvetlenir. Bunun sonucunda rezonans Raman spektrumları 10^{-8} M'a kadar düşürülebilen analit derişimlerinde kullanılabilir. Bu duyarlılık düzeyi, çoğunlukla 0,1 M'dan daha yukarı derişimlerle sınırlı normal Raman çalışmaları ile çelişkilidir. Rezonans kuvvetlendirmesi, kromofor ile ilgili Raman bantları ile kısıtlanmış olduğundan rezonans Raman spektrumları genellikle sadece birkaç çizgiden oluşur. Bunun da ötesi, rezonans Raman spektrumları oldukça seçimli olarak elde edilebilirler. Çünkü uyarma, spesifik absorpsiyon bantlarına hedeflenebilir⁵⁴.

Bir diğer Raman yöntemi olan yüzeyde kuvvetlendirilmiş Raman saçılması (SERS) ise geliştirilip NR ve RRS'nin önüne taşınmıştır. Özellikle mikroorganizma çalışmalarında, tanımlamaya yönelik sonuçların NR ve RRS ile elde edilebilmesine karşılık, bu sonuçlarla birlikte üç problem de hala süregelmektedir. Bu problemler;

- hassasiyet,

- miktar ve spektral data üzerinde seçicilik ile sıkışıklık problemleri,
- bunların dışında bir diğer önemli husus ise cihazın fiyatı^{48,49}.

SERS bu problemleri çözmekte oldukça başarılı bir teknik olup bakteri tanımlanmasında ve diğer çalışmalarda uygun genel bir yöntem haline gelmiştir. Ayrıca SERS-aktif substratların floresansı sönümlemesi ölçümlerde S/N oranını da arttırmaktadır. Bu şekilde elde edilen kuvvetlendirme ile spektrumlarda oluşan sıkışıklık giderilmiş olup daha hassas ölçümlerin SERS substratları ile gerçekleştirilmesi mümkün kılınmıştır^{13,55}.

2.3.2.7.1. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)

Moleküllerdeki titreşimler üzerine çalışan temel teknikler, infrared absorpsiyonu ya da Raman saçılmasının prensibi üzerine kuruludur. Bu teknikler, kimyasal yapılar ve fiziksel formlar üzerinden; karakteristik spektral modellerden (fingerprinting) maddenin tanımı ve kantitatif veya yarı kantitatif bir biçimde örneğin içindeki madde miktarının tayini için bilgi sağlamada kullanılır. Örneklerin, bütün fiziksel hallerde incelenmesi mümkündür. Örneğin, katı, sıvı, buhar, sıcak veya soğuk haller, viskoz yapılar, mikroskopik partiküller veya yüzey katmanları olarak bütün örnekler bu teknik ile incelenebilir⁵⁶.

Raman spektroskopisi; sulu çözeltilerde, cam küvetler içerisinde, hiçbir hazırlık yapılmaksızın örnek analizlerinde hızlı uygulama imkanları ile kendi imkanlarını geliştirip diğer teknikler arasında yerini almıştır⁵⁶.

Temel olarak SERS, Raman sinyallerinin kuvvetlendirilmiş biçimidir. Söz konusu kuvvetlendirme ise SERS substratları ile sağlanmaktadır. SERS substratları için kullanılan yüzeyler, altın, gümüş gibi iletken metallerin nanoboyuttaki parçacıklarından oluşmaktadır. Geniş ölçekli bir kuvvetlendirme yüzeylerde oluşturulan nano ölçekli (10-100 nm) pürüzlü yapılar ile sağlanmaktadır. Bu yüzeyler elektrot üzerinde indirgenme-yükseltgenme döngüsünün birkaç kere tekrarlanması ile, cam yüzeyler üzerine partikülleri film olarak kaplamak ya da ada şeklinde biriktirmekle, agregre olmuş koloidler, litografik teknikler v.b. kullanılarak hazırlanmaktadır⁵⁵.

SERS'deki bu sinyal artışı metaller ile ışığın elektromanyetik etkileşiminden gelmektedir. Metaller bu etkileşim sırasında plazmon rezonans olarak bilinen, lazerin düştüğü alanda, ikincil bir elektromanyetik alan oluştururlar ve ışık kaynağı ile metaller tarafından oluşturulan bu alan rezonansa girerek metal yüzeyinde- örneğin bulunduğu ortamda- bir "elektromanyetik kuvvetlendirme" gerçekleştirmiş olur. Bu kuvvetlendirmeden yararlanabilmek için moleküller metal yüzeyine adsorbe olmalı ya da metal yüzeyine çok yakın (10-15 nm) bulunmalıdır⁵⁵. Elektromanyetik kuvvetlendirme dışında, oluşan kuvvetlendirmeyi açıklamak için bir diğer teori ise "kimyasal kuvvetlendirme" olarak bilinmektedir. Bu kuvvetlendirme sıklıkla eşleşmemiş elektron çiftleri içeren moleküller üzerinden açıklanmıştır. Analitin yüzeye adsorbe olarak yüzeyle etkileşmesi sonucu oluşmaktadır. Bu durumda kimyasal kuvvetlendirme yüzeye kemisorblanan tür ile metal yüzey arasında kurulan yük transferi ile oluşmaktadır. Bu kuvvetlendirmenin bazı özel durumlarda ve muhtemelen elektromanyetik kuvvetlendirmenin gerçekleştiği koşullarda elektromanyetik kuvvetlendirme ile gerçekleştiği sanılmaktadır⁵⁷. Özetle SERS'in adını aldığı harfleri inceleyerek yönteme bakarsak; kelime kelime SERS:

- Surface (S): SERS bir yüzey spektroskopisi tekniğidir; moleküller yüzey üzerinde ya da yüzeye yakın olmalıdırlar. Bu SERS uygulamalarında temel noktadır.
- Enhanced (E): Sinyal kuvvetlendirmesi metal substratlarda plazmon rezonans ile sağlanır.
- Raman (R): Moleküllerin (SERS prob veya analit) Raman sinyallerini ölçen bir tekniktir. Raman spektroskopisi elastik olmayan ışık saçılmasına dayanır.
- Son olarak SERS kodlamasındaki son “S”, “Scattering” ya da “Spectroscopy” kelimelerine dayanır.

2.3.2.7.1.1. Biyolojik Uygulamaları

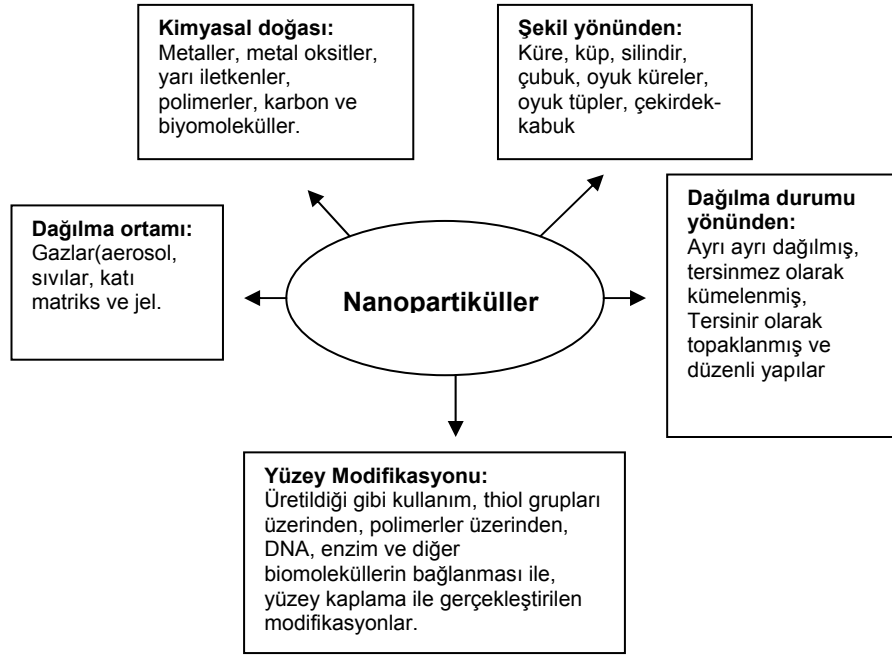
Raman spektroskopisi biyolojik moleküller ile çalışma sırasında bir takım avantaj ve dezavantajları beraberinde getirir. Avantajları arasından ön plana çıkan, in situ çalışmalarda sulu sistemlerde kullanılabilirlik kabiliyetidir. Dezavantajlarından biri ise oldukça kuvvetli lazer tarafından uyarılan örnek dokularının zarar görmesidir. Fakat; Raman spektroskopisi tekniğine uygun çalışabilecek biyolojik örnekler için oldukça geniş ölçekte sistemler geliştirilmiş durumdadır⁵⁸. Polar gruplar; karboniller, aminler ve amidlerin Raman spektrumları oldukça zayıftır. Bu Raman spektroskopide dezavantaj olarak görünen bir durumdur. Buna rağmen -S-S-, -SH, -CN, -C=C- ve aromatik halkalar spesifik karakterizasyonlar için ayırıcı kuvvetli bandlar gösterirler. Karbonat ve fosfat gibi diğer gruplar da ayırım sağlayabilecek Raman bandları verirler. Raman ile fiziksel formlardaki değişiklikleri tespit etmek mümkündür. Örneğin, polimorfizma, peptitlerin ikincil yapıları ve genel olarak molekülün yapısal iskeletinde meydana gelen değişimlerin tespiti mümkündür. Geliştirilen mikroskop ve mikroproblar ile 180°'lik saçılmanın kullanılması, in situ sistemlerde inceleme yapma kabiliyeti ve otomasyon için hızlı görüntüleme imkanı sağlamaktadır. Mikroproblar açısından bakıldığında,

probların bir parçası olarak metal kolloidler kullanıldığında SERS ve SERRS gibi teknikler ile duyarlılıkta büyük derecede bir artış sağlanabilir. Literatürde geçen çoğu çalışma kimyasal bağlanma, genomikler, proteomikler, protein etkileşimleri, katı faz sentez çalışmaları ile DNA, protein analizi ve hücre çalışmalarına dayanmaktadır. Ayrıca gıda ve biyomedikal alanlarında yayınlanmış birçok çalışma da mevcuttur. SERS'in yaygın bir teknik olarak kullanıldığı alanlara birkaç örnek vermek gerekirse: Amino asit kristallerindeki geçişleri⁵⁹, tek hücreli bakteriler⁶⁰, bakteri sporları⁶¹, mikroorganizmaların karakterizasyonu⁶², fungi⁶³, hububat karışımları⁶⁴, lipozom kompleksleri⁶⁵, küf⁶⁶, iyi huylu ve kötü huylu tiroid dokularında meydana gelen oluşumlar⁶⁷ üzerine çalışmalar oldukça yaygındır. Raman saçılması üzerine SERS; tıp alanında ve in situ çalışmalarda türlerin tayini, kromofor gruba sahip birçok biyolojik molekül ile çalışılma uyumluluğu açısından yararlı bir teknik olmuştur.

2.3.2.7.1.2. SERS Substratı Olarak Kullanılan Metal Nanopartiküller

Terim olarak nanopartikül 1-100 nm arasındaki bir boyuta sahip olan partikülü tanımlamak için kullanır. Bir materyalin dolayısıyla bu materyali oluşturan her bir molekülün ve atomun özellikleri, partikül için tanımlanan boyut aralığında, nanopartiküllerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin değişmesi ile belirlenir. Nanopartiküller farklı kimyasal yapıya sahip materyallerden üretilebilirler. Bu materyallerden genel olarak kullanılanları metaller, metal oksitler, silikatlar, organik ve karbon materyaller ile biyomoleküllerdir. Morfolojik olarak ise nanopartiküller genel olarak küre, silindir, tüp şeklinde olabilirler. Nanopartiküller genellikle, spesifik uygulamalara uygun yüzey modifikasyonlarının kolaylıkla gerçekleştirilebilmesi için uygun şekilde dizayn edilirler. Nanopartiküller kimyasal yapılarındaki bu büyük çeşitlilik, şekil ve morfolojileri, bulundukları ortama uygunlukları ve ortamda dağılma şekilleri

(şekil.9) nedeniyle bilim dünyasında önemli uygulama alanlarında aktif olarak kullanılmaktadır⁶⁸.



Şekil.10. Nanopartiküllerin doğası ve sahip olabileceği özellikler.

Farklı materyaller kullanılarak sentezlenen, özellikleri birbirinden farklı olan çeşitli nanopartiküller; kimyasal bileşiklerin sentezini, analizini ve karakterizasyonunu nano boyutta gerçekleştirdiği için nanokimyanın vazgeçilmez ilgi odağı olmuştur.

20. yüzyılın ilk yarısında nanopartiküllere olan ilgi optik özelliklerine bakılınca pek de sınırlı değildi. Bu zaman diliminde su ortamındaki altın nanopartikülleri; çalışmalarda kullanılan altın kolloidlerin kararlılığını ve çekirdek oluşumunu açıklayan bir model sistem özelliği göstermiştir. 1930'larda sülfonamid grubu ilaçların sentezinde ve kullanımında görülen gelişmelerden önce kolloid gümüş partiküllere ait uygulamalar ciddi anlamda bir tartışma ortamı oluşturmuştur. Metal kolloidlerin 1960'larda histolojik boyama ajanı olarak kullanılmış ve hücre

biyolojisinde elektron mikroskopunun kullanılması ile geniş bir kullanım alanı bularak rutin hale gelmiştir⁶⁹.

1950'lerin sonunda anodizasyon ile alüminyum yüzeylerinde integral renklendirme adı verilen çalışma ile ilk patent alındı. Fakat 1970'lerin sonlarında Goad ve Moskovits anodik alüminyum oksit tabakasının porları içerisine gömülü metal partiküllerin plazmon rezonansının sönümlenmesiyle yükselen bir renk değeri gözlemlediklerini bildirmişlerdir⁶⁹.

Yüzeyde Kuvvetlendirilmiş Raman Saçılma (SERS) etkisinin keşfi, fizik ve optik alanlarında metal nanopartiküllerle ilgili yeni bir tartışmanın da başlangıcı olmuştur. Özellikle elektromanyetik kuvvetlendirme ve plazmon rezonans süreçleri arasındaki bağlantının keşfi, küre nanopartiküllerden farklı şekillere sahip partiküllerle çalışma dürtüsünü hem deneysel hem de teorik olarak arttırmıştır. 1970'lerin ortalarında başlayıp 1980'lerin ortalarına kadar birçok kişinin öncelikli olarak SERS etkisi ile ilgilenmeleri, SERS etkisinden çok metal nanopartiküllerin temel optik özelliklerinin önemli ölçüde kavranmasını sağlamıştır⁶⁹.

Metal nanopartiküllerde bazı yeni sentetik ve teorik ilerlemeler, yarı iletken partikül sistemlerinde boyut belirlemeye yönelik çalışmalara ilham kaynağı olmuştur. Ayrıca, fotokatalizler ve elektronik cihazlar ile gerçekleştirilen uygulamaların son on yıl içerisindeki artışı da metal nanopartiküllerin kullanımı için bir itici güç olmuştur⁶⁹.

Biyolojik alanda ise metal nanopartiküllerdeki bu ilerleyişi; 1960'lı yıllarda keşfedilen, yüksek duyarlılığa sahip olan ve bu nedenle biyolojik ölçümlerde bir devrim gözüyle bakılan radyoimunoanalizin (RIO) popüleritesini yitirdiği 1990'lı yıllarda doruk noktasına ulaşmıştır. Fakat;

biyoölçümler için ilk nanopartikül uygulamaları, 1970'lerde 5-50 nm çaplı kolloidal altın kullanımı ve elektron mikroskop için immunositokimyasal prob kullanımı ile başlamıştır⁷⁰. 1990'lı yıllara doğru RIA'nın zayıflamasındaki temel neden ise potansiyel radyoaktif tehlike varlığı taşıyor olması ve radyoaktif atıkların özel olarak yok edilmesi gibi dezavantajlardan kaynaklanmaktadır. Bunun yanında floresan işaretleyiciler ve metal atomları gibi radyoaktif olmayan işaretleyicilerin keşfi, bu metodu etkisiz kılmış ve biyolojik ölçümlerde keşfedilen bu işaretleyiciler ile metaller kullanılmaya başlanmıştır. Bu süreçten itibaren araştırmacılar nanopartiküllere yönelmeye başlamışlardır⁷¹⁻⁷³.

Nanopartiküller 100 nm'den küçük ve boyutlarına özgül özellikler (elektron tutucu etki, geçici mıknatıslık özelliği, yüzey plazmon rezonansı gibi) taşımaları nedeniyle biyolojik sistemlere kolayca entegre olabilirler. Günümüzde nanopartiküller biyoölçümlerde farklı amaçlarla kullanılmaktadır⁷⁴.

Miktar tayininde organik florofor veya radyoaktif işaretlemeyi elimine etmek için nanopartiküller tercih edilebilir. Bu amaçla en çok kuantum noktalar (quantum dots) ve metal nanopartiküller kullanılır. Kuantum noktalar 10-100 Å çaplı, elektron tutucu etkiye sahip küresel yapılardır, bu nedenle optik ve elektronik özelliklere sahiplerdir. Parlak floresan, floresan sinyalin ayarlanabilir olması, dar bandlı emisyon spektrumu, geniş dalgaboyu aralığında UV uyarma ve fotostabilitesinin daha fazla olması geleneksel boya moleküllerine göre en büyük avantajlarıdır.

Kuantum noktalar;

a) Biyomoleküler yüzey kaplamaların geliştirilmesinde kullanılabilir^{75,76}.

b) Floresan prob olarak kullanılabilir: Her-2'nin (meme kanseri belirleyicisi) hücre yüzeyi üzerinde belirlenmesi için IgG ve streptavidin bağlı kuantum noktaların kullanımı⁷⁷ ayrıca invazif ve invazif olmayan kanser hücrelerinin birbirlerinden ayrılmasında kuantum noktalar ile hücre hareketlerinin belirlenmesi⁷⁸ gibi çalışmalarda da yine kuantum noktaları kullanılmaktadır.

c) Elektronik özelliklerinden faydalanılarak DNA hibridizasyon tayinine yönelik çalışmalarda kullanılabilir⁷⁹.

d) Kuantum noktalar ayrıca rezonans enerji transferi (RET) için organik floroforlardan daha iyi bir enerji vericidir⁸⁰.

Metal nanopartiküller kolorimetrik, elektrokimyasal ve kütle spektrometresi metodlarında işaretleyici olarak kullanılır

a) Kolloidal altın çözeltileri elektrokimyasal yöntemlerde ölçüm için tercih edilmektedirler. Kolloidal altınla işaretli, elektrodun üzerine bağlı oligonükleotid ile hibritli DNA'nın elektrokimyasal olarak differansiyel akım voltmetresi ile tayini mümkündür⁸¹. Ayrıca altın nanopartiküller ile işaretlenmiş oligonükleotidlerin gümüşle çöktürülüp 'stripping' potansiyometre ile de tayini mümkündür⁸². Bu elektriksel ölçümlerde duyarlılık metal işaretleyicinin büyüklüğüne bağlıdır.

b) Raman saçılımı ve ışık saçılımı da kolloidal altın ve gümüşe dayalı tayinlerde optik yöntem olarak kullanılabilir. Farklı dalga boyunda ışık saçılımına neden olan farklı büyüklüklerdeki altın nanopartiküller mikrodizilimde (microarray) iki renk tayinine izin vermektedir⁸³. Alkol dehidrogenaz varlığında NADH bağımlı Cu^{+2} 'nin indirgenerek altın nanopartiküller üzerinde birikimi ve nanopartikül hacminin genişlemesi ile artan sinyal veya sinyal amplifikasyonu etanol ölçümünde kullanılabilir⁸⁴. Glukoz tayininde ise glukoz oksidaz varlığında hidrojen peroksida bağlı altın nanopartikül hacminin genişlemesi ile artan sinyal kullanılabilir⁸⁵. Kantitatif glukoz tayini için başka bir yöntem SERS'tir.

Bu yöntemde oligonükleotid, altın nanopartikül üzerine Raman aktif boyası (syanın 5) ile hibridize edilir. Hibridizasyondan sonra mikrodizilim (microarray) gümüşle ve bir indirgeyici ile reaksiyona girer ve SERS sinyali oligonükleotidlerin bulunduğu partiküller üzerinden alınır⁸⁶. Yeni yeni kullanılmaya başlanan diğer işaretleyicilerden biri ince silika tabakası ile kaplı Rutenyum kompleksleridir. Bunlar lösemi hücrelerinin tanınmasında foto-kararlı florofofor etiket olarak kullanılabilirler⁸⁷.

Nanopartiküller solüsyondaki biyolojik ölçümlerde substrat olarak kullanılabilir. Mikrodizilim (microarray) bazlı ölçümler ile karşılaştırıldığında bu süspansiyon bazlı ölçümler daha hızlı, daha esnek, daha yüksek tekrarlanabilirliğe sahiptir ve daha az örnek ve reaktif kullanır. Analit tayini organik işaretleyiciler kullanılarak gerçekleştirilir. Solüsyon bazlı ölçümde, kuantum nokta karışımı mikron boyutundaki polimer partiküllerinin içine yerleştirilir, partiküllerin yüzeyi spesifik oligonükleotid probalar ile kaplanır ve organik boya molekülü hedef DNA'yı direkt işaretlemek için kullanılır. Bu yöntemde, organik boyanın sinyali baz alınır. Her bir boncuğun floresan spektrumu orjinal örnekteki hedef dizinin varlığını veya yokluğunu gösterir. Analitin ne olduğu yerleştirilen kuantum noktalara ait floresan parmak izi ile saptanır⁸⁸. Biyobarkodlar en önemli substratlardan biridir⁸⁹. Biyobarkodlar farklı DNA dizilerine sahip altın nanopartiküller içerirler. Ölçüm agregasyon ile yürütülür, enzimatik hedef veya sinyal amplifikasyonu gerekmez. Antikorla kaplı manyetik boncuk antijenle kompleks oluşturur, buna tek zincirli DNA (barkod) içeren altın nanopartikül bağlanır. Komplementer zincir mikrodizilimde hibridizasyonla tayin edilir. Her bir nanopartikül çok sayıda oligonükleotid taşıdığı için, her bir proteinin bağlanmasıyla çok sayıda amplifikasyon gerçekleşir. Çok düşük düzeylerdeki PSA bu yöntemle saptanabilir⁹⁰. Nanobarkodlar önemli bir diğer substrattır. 20-500 nm çapında, silindirik yapıda, altın ve gümüş çubuklar içeren metal nanopartiküllerdir⁹¹. Kuantum noktaların tersine analiti tayin etmek için floresan ölçümler gereklidir. DNA bazlı

nanobarkodlar, uçları boya ile işaretli birbirine komplementer üç tek zincirli DNA'nın oluşturduğu Y-DNA yapılarıdır. Y-DNA'lar biraraya gelerek dallı bir yapı (dendrimer) oluşturabilirler. Boya moleküllerinin farklı kombinasyonlarında ortaya çıkan farklı floresan yoğunlukları bilgisayar tarayıcı veya floresans ışık mikroskobu ile saptanır⁹².

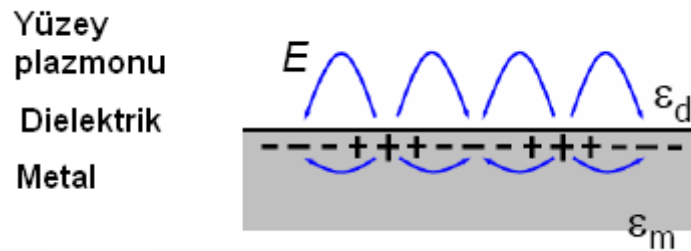
Bu çalışmaların dışında biyoölçümlerde kullanılan bir diğer yapı ise çekirdek-kabuk yapıya sahip nanopartiküllerdir. Özellikle süperparamanyetik yapılar kullanılan biyoyumlu materyallerin kaplanması ile biyoloji, biyoteknoloji ve diğer biyomedikal disiplinler arasında oldukça işlevsel özellik kazanıp ilgi görmektedir⁹³⁻⁹⁵. Bu çalışmalara örnek olarak, manyetik çekirdek-kabuk $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ nanopartiküller camsı karbon elektrot üzerine tutturularak miyoglobinin immobilizasyon/adsorpsiyonu sonrasında oluşan biyofilm üzerinden elektrokimyasal olarak ölçümü gerçekleştirilmektedir⁹⁶. Bir diğer çalışma ise manyetik çekirdek-kabuk $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ nanopartiküller kullanılarak protein bağlanma reaktivitesi üzerinden bioanaliz çalışmasına yöneliktir. Manyetik çekirdeği ile ortamdan biyoayırma işlemini gerçekleştirmede altın kabuğu ise tiyol grupları ile yüzeyi modifiye etmekte kullanılmaktadır⁹⁷. Biyoanalizlerde kullanılan bu metal nanopartiküller hakkında detaylı bilgi aşağıda verilmiştir.

2.3.2.7.1.3. Altın Nanopartiküller

Biyomedikal araştırmalar üzerine altın nanopartiküller ile yapılan son çalışmalarda biyolojik sistemler üzerine nanopartiküllerin boyut ve şekillerinin etkisi ile medikal alanda nanopartiküllerin dizaynı ve toksik etkilerinin anlaşılmasını içeren çalışmalar önem kazanmıştır. Bu çalışmalar dahilinde altın nanopartiküllerin sentezi tipik olarak altın klorürün sodyum borohidür ve sodyum sitratın kullanılması sonucu kimyasal indirgenme yolu ile gerçekleştirildiğinde sırasıyla 2-10 nm ve 12-100 nm boyutları arasında küresel nanopartiküller elde edilmektedir⁹⁸.

Sentezlenen bu nanopartiküllerin büyütülmesi için bir çekirdek çözeltisi (<15 nm) kullanılmalıdır⁹⁸. Bu yol dışında sitrat kullanımı ile de 50 nm'ye kadar artan boyutta partiküllerin eldesi mümkündür. Fakat; oluşan yapılar çözelti içerisinde polidispers özellik taşıyıp küresel yapıdan uzaklaşmaktadırlar⁹⁸. Bunun önüne geçerek daha büyük boyutta partikül sentezlemek için nano çekirdek yapılar kullanılarak altın bu nano çekirdekler üzerine indirgenir. Bu durum gerçekleştiğinde ise ortamda büyüyen nanopartiküller dışında ikincil popülasyon olarak kalan daha küçük boyutlu indirgenme sonucu ortamda oluşan partiküller olacaktır. Bu durum ise sentez sırasında bir yüzey aktif ajanın kullanılması ile aşılabilir⁹⁸.

Altın nanopartiküllerin farklı boylarda ve şekillerde sentezlenmesi hassas ölçümlerin gerçekleşmesini sağlayan optik özellikleri de beraberinde getirmektedir. Metaller için oda sıcaklığında metal içinde bulunan bir elektronun katedebileceği serbest yol yaklaşık 10-100 nm arasındadır⁹⁹. Bu özellik metaller üzerinde beklenen yönde ilginç etkiler olarak ortaya çıkarmaktadır. Işığın uygun frekanslarında uyarılan iletkenlik band elektronlarının toplam salınımlarından dolayı nano ölçekli soy metal partiküller çözeltiye parlak renkler kazandırır⁹⁹. Bu salınımlar “plazmon” olarak adlandırılır. Plazmon, metal nanopartiküllerin yüzeyi üzerinde oluşan elektron salınımlarının dalgaya benzer bir şeklin resmedilmiş hali olarak düşünülebilir (Şekil.11.).



Şekil.11. Metal nanopartikül üzerinde elektronların salınımı: “plazmon”

Küre nanopartiküllere kıyasla farklı şekillere sahip nanopartiküller optik özellikleri bakımından daha belirgin ve seçicidirler. Örneğin küre altın nanopartiküller 510-575 nm arasında boyuta ve dielektrik çevreye bağlı olarak değişen yalnız bir plazmon bandı verirken, altın nanoçubuklar ve diğer şekillerdeki partiküller en az iki plazmon bandı vermektedirler¹⁰⁰.

Küre nanopartiküller için plazmon salınımı küresel simetriden dolayı izotropiktir. Fakat nanopartikül şekline bağlı olarak ilginç farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Örneğin boy-en oranı 1 ile 20 arasında değişen nanoçubuklar için salınımlar nanoçubukların uzun olan kenarları (uzunlamasına plazmon bandı) ve kısa olan kenarları (enine plazmon bandı) için ayrı olarak gerçekleşir ve dolayısı ile nanoçubukların değişen boy-en oranları ile farkı iki plazmon bandı gözlenir⁹⁹. Altın nanoçubuklar ve hatta gümüş nanoçubuklar da dahil olmak üzere uzunlamasına plazmon bandı için 500-1600 nm arasında maksimum pik noktaları gözlenir⁹³. Kimyasal duyarlılık ve görüntüleme için metal nanoçubuklar metal küre nanopartiküllerle karşılaştırıldığında nanoçubukların bazı belirgin avantajları vardır. Öncelikle lazerlerin (633 nm, 785 nm, veya 1064 nm) frekansı nanoçubukların frekansı ile örtüşür. İkinci olarak, özellikle biyolojik uygulamalardaki yakın infrared (NIR) ışığının kullanılması, görünür ışığın kullanılmasına göre üstünlük sağlar. Çünkü; NIR, arka alanda oluşması muhtemel floresans için ortamdaki molekül üzerinde daha az bir uyarmaya sahiptir. Üçüncü olarak yine biyolojik çalışmalarda, NIR bölgesine ait ışık görünür bölgedeki ışığa göre dokulara daha derin nüfuz eder. Son olarak nanoçubukların uç kısımları, orta kısımları ile karşılaştırıldığında farklı kimyasal reaktivite gösterirler. Bu nedenle uzunlamasına ve enine plazmon bandları iki farklı kimyasal tayini mümkün kılar⁹⁹.

Nanoçubukların sentezinde kimyasal, elektrokimyasal ve fotokimyasal yöntemlerle sulu çözelti ortamında düzenli boy-en oranında (uzunlamasına 20-100 nm; enlemesine 10-20 nm) ve yüksek verimli (>%90) partiküller sentezlenmektedir¹⁰⁰. Nanoçubukların kimyasal sentezi küçük altın çekirdekler (2-3 nm) üzerine katyonik surfaktanın (CTAB), gümüş iyonu ve askorbik asitin ilavesiyle başlar¹⁰¹. CTAB molekülleri ve gümüş atomları, nanoçubuğun köşelerini oluşturan (111) ve (001) yüzeyleri yerine altın nanoçubukların kenarlarını oluşturan (110) yüzeylerine adsorbe olmayı seçerler¹⁰⁰. Böylesine yerel bir koruma sonucu, adsorpsiyonla altın atomlarının biriktirilmesi nanoçubukların oluşumunu sağlamaktadır.

Altın nanoçubuklar üzerindeki CTAB molekülleri koruyucu özellik gösterir ve partiküller üzerinde iki katmanlı bir yapı oluşturup sulu faz içerisinde nanoçubukların dağılmasını sağlamak için stabilizatör görevi üstlenir. Askorbik asit ise sentez sırasında indirgeyici ajan olarak kullanılır ve indirgeme sürecinin yavaş gerçekleşmesi ile büyümeyi sağlar. Partiküllerin oluşması için en az üç saat gereklidir.

Elektrokimyasal süreçte ise aseton ve siklohekzan, CTAB molekülü ve gümüş iyonları ile birlikte eklenir. Sonradan eklenen iki kimyasal, altın nanoçubuğun büyümesi için önemli rol oynarken ilk eklenen iki kimyasal ise CTAB molekülleri ile oluşan iki katmanlı yapıyı partikül yüzeyi üzerinden uzaklaştırır. Elektrokimyasal hücre içerisinde altın iyonları, altın metalinden yapılmış anod elektrot tarafından sağlanırken, 20 dakika boyunca 5 mA akım uygulanarak gerçekleştirilen indirgenme işlemi ise platin katot üzerinde gerçekleşir¹⁰⁰.

Fotokimyasal sentez ise CTAB, gümüş iyonları ve altın iyonlarının bulunduğu çözelti içinde gerçekleşir. Altın iyonlarının indirgenmesi 254 nm'de ultraviyole ışık ile gerçekleşir. Bu yöntemde,

partiküllerin hazırlanması yaklaşık 30 saati alır. Fakat; uzun süreli (>40 saat) ışınlama çalışması nanoçubukların bozunmasına ve küre yapılara dönüşümüne neden olmaktadır. Fakat kuvvetli bir ışınlama ile süre kısaltılırsa bu bozunma bir miktar azaltılabilmektedir¹⁰⁰.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kimyasal ve Biyokimyasal Malzemeler

- Tavşandan üretilmiş anti-*E. coli* poliklonal antikorlar Abcam plc. (Cambridge, UK) firmasından;
- Hidrojen tetrakloraurat (HAuCl_4),
- 3-Merkaptopropionik asit (3-MPA),
- Heksadesiltrimetil-amonyum bromür (CTAB),
- L-Askorbik asit (AA),
- 98% Etanolamin,
- N- (3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodimid hidroklorür (EDC),
- Trisodyum sitrat dehidrat,
- saf etanol ve
- Tween 20 Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Almanya) firmasından;
- Gümüş nitrat (AgNO_3),
- Sodyumborohidrür (NaBH_4),
- Demir(II) sülfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$),
- Sorbitol Mac-Conkey Agar (SMAC) ve
- Tryptic Soy Broth (TSB) Merck KGaA firmasından;
- Avidin Pierce Biotechnology (Rockford, IL) firmasından;
- N-Hidroksisülfosüksinimid sodyum tuzu (NHS) Pierce Biotechnology (Bonn, Almanya) firmasından;
- fosfat tamponu (PBS) için NaCl,
- Na_2HPO_4 ve

- KH_2PO_4 J.T.Baker (Deventer, Hollanda) firmasından temin edilmiş ve kullanılmıştır. Bütün çözeltiler ultra saf su ($18 \text{ M}\Omega, \text{ cm}$) ile hazırlanıp kullanılmıştır.

3.1.2. Kùltürler

E. coli K12 kùltürü “Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü’nden (Ankara) liyofilize formda sağlanmışır. *E. aerogenes* ve *E. dissolvens* kùltürleri ise Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliğı Bölümü, Mikrobiyoloji Birimi Kùltür Koleksiyonu’ndan temin edilmiştir.

3.1.3. SERS Ölçüm Düzeneğı

DeltaNu Examiner Raman Mikroskop (Deltanu Inc., Laramie, WY) 785 nm lazer kaynağı, mikroskop için hareketli lamel-numune- tutma haznesi ve CCD dedektor ile birlikte *E. coli* tayini için kullanılmışır. Cihaz parametreleri ise 20x objektif, 112 mW lazer gücü, 60 saniye veri toplama süresi olarak ayarlanmışır.



Şekil.12. Delta Nu Raman mikroskop

3.1.4. UV-Visible Spektrofotometre Düzeneđi

Sentezlenen altın nanopartiküllerin absorpsiyon spektrumları fotodiyot analiz dedektörüne sahip Agilent 8453 UV-Visible spektrofotometre (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) ile kaydedilmiştir.

3.1.5. Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) Ölçüm Düzeneđi

TEM ölçümleri JEOL 2100 HRTEM (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) ile gerçekleştirilmiştir. TEM örnekleri TEM haznesi üzerine pipetle 10 µL nanopartikül eklenerek 10 dakika bekleme süresi sonunda ölçüme hazır hale getirilmiştir.

3.1.6. Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM) Ölçümleri

Sandviç immunoanalizin her bir basamağı AFM (XE-100E, (Park Systems Corp., Suwon, Korea) ile takip edilmiş ve ölçümler 910M-NSC14/Cr-Au tip dirsek eşliğinde 0,3-0,5 Hz tarama hızında non-contact mod ile gerçekleştirilmiştir.

3.2. YÖNTEM

Bu çalışmada sandviç immunoanaliz yöntemine dayanan bir çalışma ile bakteri tayini gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada altın kaplanmış cam yüzey üzerinde bir platform oluşturarak hedef organizmanın tayini mümkün kılınmıştır.

Sandviç immunoanaliz sisteminin tamamlanabilmesi için sistemi oluşturan ikili yapıdan her biri, beşer aşamada tamamlanmak üzere gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada altın kaplı cam üzerinde serbest

karboksilat grupları oluşturmak üzere 3-Merkaptopropionik asit kullanılarak SAM oluşturulmuştur. İkinci aşamada EDC-NHS ile karbonil grupları üzerinden yüzey aktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonraki aşamada aktif hale gelen karbonil grupları ile avidin etkileştirilerek avidinin bağlanması sağlanmıştır. Dördüncü aşamada biyotinli antikorlar, avidin-biyotin etkileşimi üzerinden yüzeye tutturulmuş ve son aşamada, açıkta kalan aktif karbonil gruplarının kapatılması için etanolamin kullanılmıştır. Mikroorganizmayı tanıyan prob tamamlandıktan sonra, probun bağlı olduğu altın kaplı cam slaytlar bakteri çözeltisine daldırılıp bakterilerin yakalanma işlemi gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada gerçekleştirilen beş işlem ortamdaki bakterinin prob tarafından yakalanması ile tamamlanmıştır.

Ayrı bir ortamda hazırlanmış immünoanalizin ikinci kısmı olan yapı, bakteri üzerine gönderilip bakteriye spesifik antikor üzerinden bağlanması ile sandviç yapısı tamamlanmış ve ölçümlere geçilmiştir.

Sandviçin ikinci yapısı da ilk yapı gibi aynı prosedürle hazırlanmıştır. Bu kısımda yalnızca altın kaplı yüzey yerine altın küre ile çubuk nanopartiküller kullanılmış ve 5,5-Ditiyobis(2-Nitro benzoik asit) hem SERS aktif özelliği yüksek olan etiket hem de modifikasyon (SAM) için kullanılarak ikinci kısım tamamlanmıştır.

3.2.1. Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması

Karbonil gruplarının aktivasyonu ve aktif hale getirilen karbonil gruplarına avidinin bağlanması süreçlerinde MES tamponu; avidin üzerinden biyotinli antikorun bağlanması, bakteri dilüsyonlarının hazırlanmasında ve bakterilerin antikorlu yüzeye gönderilme süreçlerinde PBS tamponu; bakterilerin prob tarafından yakalanmasından sonra, yüzeye spesifik bağlanmayan bakterilerin uzaklaştırılması için yıkama

çözeltisi olarak PBST kullanılmıştır. Tamponların hazırlanmalarına ilişkin bilgiler aşağıda verilmiştir.

PBS çözeltisinin hazırlanmasında 0,1 M Na_2HPO_4 ve KH_2PO_4 çözeltileri karıştırılarak pH değeri 7,4 olan PB tamponu hazırlanmıştır. Daha sonra tampon içerisine son hacimde 8 g/L NaCl ve 0,2 g/L KCl olacak şekilde tuz ilavesi yapılarak PBS tamponu elde edilmiştir.

PBST çözeltisi için 0,1 M PBS tamponu (pH 7.4) hazırlanmış ve üzerine % 1 (v/v) oranında Tween 20 ilave edilmiştir. MES tampon çözeltisi hazırlanırken 0,05 M MES monohydrate çözeltisi; derişik NaOH çözeltisi kullanılarak pH değeri 6,5 olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.2. Su Örneklerinin Toplanması

Gerçek örnek analizi her biri ayrı yerden alınan numuneler ile gerçekleştirildi. Geliştirilen yöntem ile tayin için örneklerden biri musluktan diğeri ise gölden alındı. Örneklerin her biri için steril numune kapları kullanıldı. Musluktan alınan örnek için steril şişe boyun kısmına kadar doldurulmadan önce musluk bir süre için açık bırakıldı. Numune alım işleminden sonra şişenin ağzı kapatıldı. Gölden alınan numune ise steril beherin numune ortamına daldırılarak sterilizasyonu gerçekleştirilmiş şişeye alınıp analiz yapılacak laboratuara getirilmesi ile gerçekleştirildi.

3.2.3. Besiyerlerinin Hazırlanması

TSB mikroorganizmaların geliştirilmesinde kullanılmıştır. TSB'nin hazır karışımından 30 gram tartılarak, 1 L damıtık su içinde çözdürülmüştür. TSB'nin bileşiminde kazein peptonu (17 g/L), soya peptonu (3 g/L), D-(+)-glukoz (2,5 g/L), NaCl (5 g/L) ve K_2PO_4 (2,5 g/L)

bulunmaktadır. Hazırlanan besiyeri, test tüplerine gerekli miktarlarda dağıtılarak otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Besiyerini içeren tüpler buzdolabında muhafaza edilmiş ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmiştir.

SMAC-Agar, mikroorganizmaların seçici katı besiyerine inokülasyonunda ve sayımında kullanılmıştır. SMAC-Agar hazır karışımından 51,6 gram tartılarak, 1 L damıtık su içinde çözündürülmüştür. SMAC-Agar'ın bileşiminde pepton (20 g/L), NaCl (5 g/L), safra tuzları (1,5 g/L), sorbitol (10 g/L), neutral red (0,03 g/L), Kristal violet (0,001 g/L) ve agar (15 g/L) bulunmaktadır. Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası, besiyeri petri kaplarına dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır. Besiyerleri içeren petri kapları ters olarak buzdolabında muhafaza edilmiş ve kullanım öncesi yüzeyleri kurutulmuştur .

VRB-Agar besiyeri bileşiminde bulunan safra tuzları ve kristal viyole başta Gram pozitifler olmak üzere refakatçi floranın gelişimini inhibe ederken, laktoz pozitif bakterilerin varlığı pH indikatörü ile koloni renginin kırmızıya dönüşmesi ve safra asitlerinin koloni etrafında çökelti oluşturması ile belirlenir. Dolayısıyla 30-32 ya da 35-37 °C'de 18-24 saat süren inkübasyondan sonra 1-2 mm çapında kırmızımsı bir presipitat zonu ile çevrili kırmızı koloniler, Enterobacteriaceae familyasının laktoz pozitif üyeleri olan koliform grup bakteriler olarak sayılır. Hazırlanışında dehidre besiyeri, 39,5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde karıştırılarak kaynatılır ve kaynama başladıktan sonra en çok 2 dakika daha kaynama sıcaklığında tutulup, soğuyunca steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Bazı standartlarda dökme kültür ve/ veya 2. kat ilavesi önerilmektedir. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. Mikrodalga fırında kaynatılarak sterilize edilebilir.

Sterilizasyon sonrası 25 °C'de pH'sı $7,4 \pm 0,2$ 'dir. VRB Agar besiyerinin aşırı ısıtılmasından kaçınılmalıdır. Aşırı ısıtma seçiciliği azaltır. Kaynar su banyosundaki ısı işlem etkinliğinin sağlanması için besiyerinin 250 mL'den fazla hacimlerde hazırlanmaması önerilir. Hazırlanmış besiyeri parlak ve karanlık kırmızı renklidir.

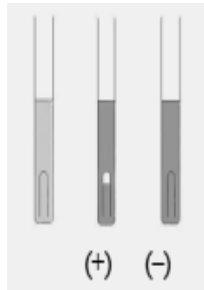
3.2.4. Besiyerlerinin Kullanılışı

Refik Saydam Hıfzısıhha Sağlık Merkezinden alınan kültürlerin stok derişimi, kalibrasyon eğrisi elde etmek için kullanılan dilüsyonların ve gerçek numune analizi için alınan numunelerin sayımında adı geçen besiyerleri kullanılmış ve bu besiyerlerine uygun ekimler uygulanarak mikroorganizma sayımları gerçekleştirilmiştir.

Stok ve dilüsyon derişimlerinin tayininde SMAC agar yayma yöntemi; gerçek numunede mikroorganizma derişimi ise TSB'de gaz çıkışına dayanan Durham tüpü yöntemi ve VRB agarda yayma yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

3.2.4.1. Durham Tüpü ile Kullanılan Besiyerleri

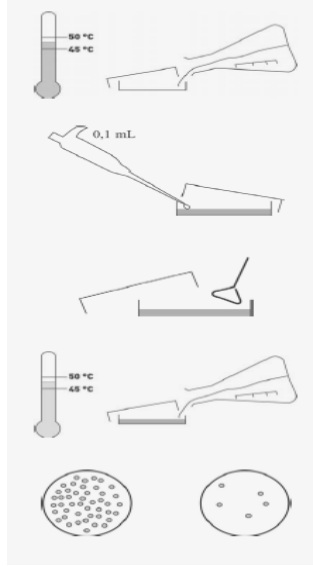
Koliform grup bakterilerin analizinde laktozdan gaz oluşumu tipik bir reaksiyondur. Besiyerinde gaz çıkışı, standart tüpün içine ters



olarak yerleştirilen ve Durham tüpü olarak adlandırılan küçük tüplerde gaz birikimiyle anlaşılır. Besiyeri hazırlanırken, standart tüpün içine önce Durham tüpünün atılması, üzerine besiyeri ilavesi ile sterilizasyon öncesinde daha az hava kalması sağlanır. Standart otoklavlamada tüpte kalan hava çıkar.

Şekil.13. Durham tüpü

3.2.4.2. Yayma Yöntemi ile Kullanılan Besiyerleri



Şekil.14. Yayma yöntemi ile ekim.

Steril petri kutularına önce steril besiyeri en az 2 mm kalınlıkta olacak şekilde dökülür (standart petri kutuları için 12–15 mL). Besiyeri dökme sıcaklığı 45–50°C olmalıdır. Ekim öncesi yüzey, yeterli bir şekilde kurutulmalıdır. Yüzey aşırı nemli ya da çok kuru olmamalıdır. Bunun üzerine 0,1 (0,33; 1,0) mL örnek - kontaminasyon olmamasına özen gösterilerek aktarılır. Önceden dökülüp, depolanmış olan besiyerleri kullanılabilir. Petri kutusunun tabanına daha önceden gerekli tüm bilgilerin yazılmış

olması olası bir karışıklığı engellemekte oldukça yardımcı olmaktadır.

Örnek aktarımından hemen sonra alkolde en az 2 dakika bekletilerek sterilize edilmiş Drigalski spatülü ile besiyeri yüzeyine homojen bir şekilde yayılır. Drigalski spatülü, Bunsen beki alevinden hafifçe geçirilerek alkolü uzaklaştırılmış olmalıdır. Bunun için kullan-at spatül tercih edilebilir. Gerekirse, 45–50°C'de tutulan 2. kat besiyerinden 5 mL kadar dökülür ve düzgün bir zeminde kendi halinde jelleşmeye bırakılır. 2. kat döküm standart uygulamada yoktur, koliform grup analizi gibi bazı özel analizlerde yapılan bir uygulamadır⁴¹.

İnkübasyondan sonra Petri kutuları sayım, var/yok analizlerine uygun bir şekilde değerlendirilir. Analizden sonra, ekim yapılmış tüm malzeme otoklavda sterilize ya da uygun bir kimyasal madde ile dezenfekte edilir. Daha sonra bu malzeme yıkanır ya da atılır.

Yayma yönteminde 0,1 mL pipetlenmesinin nedeni, besiyerinin daha fazla hacmi emmemesi değil, sadece hesap kolaylığıdır. Böylece 0,1 mL aktarılma sonunda koloni sayısı basit olarak 10 ile çarpılarak seyreltme çözeltisinin 1 mL'sindeki sayı bulunup, seyreltme faktörü ile çarpılarak orijinal örnekteki sayı hesaplanır.

3.2.5. Partiküllerin Sentezi

Çalışmada CTAB-stabil altın nanoçubuklar ve sitrat-stabil altın küre nanopartiküller kullanılmıştır ve sentezleri kimyasal yol ile çözelti ortamında gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1. Altın Nanoçubuklar

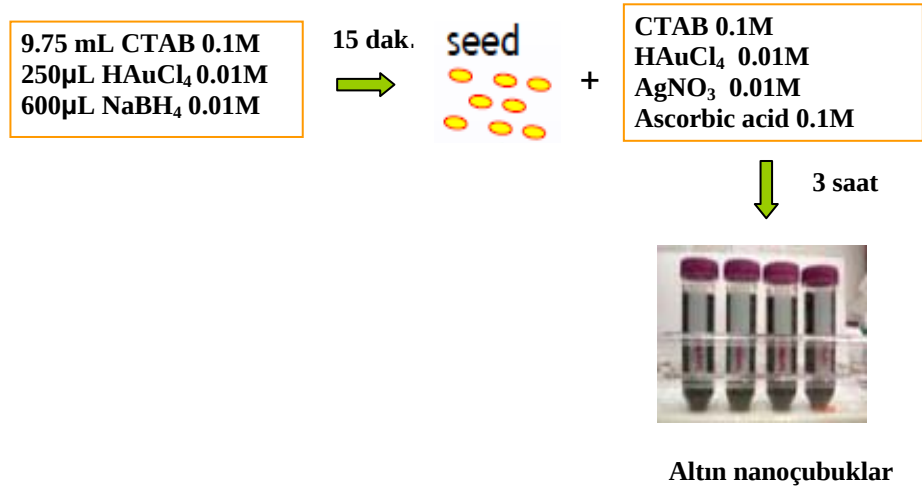
Altın nanoçubukların sentezi çekirdek partiküllerin kontrollü büyütülmesi ile sağlanmıştır¹⁰².

Sentez sırasında öncelikle çekirdek çözeltisi (yaklaşık 3-4 nm boyutta altın nanopartiküllerden oluşmaktadır) sentezlenmiş ve sentezlenen çekirdek çözeltisinin büyütme çözeltisinde kullanılması sonucu nanoçubukların sentezi gerçekleştirilmiştir.

Çekirdek çözeltisi bir vial içerisinde sırasıyla 7,5 mL 0,1 M CTAB ile 250 µL 0,01 M HAuCl₄ çözeltisinin konulup karıştırılması ve karıştırılan bu çözelti üzerine buz banyosunda soğutulmuş deiyonize su ile taze hazırlanmış 600 µL 0,01M NaBH₄ çözeltisinin hızlı bir şekilde ilavesi ile elde edilir. Oluşan çözeltinin rengi yeşil çay rengine olup çekirdek partiküllerin kullanılabilir hale gelmesi için 5-15 dakika oda koşullarında bekletilmesi gerekmektedir.

Büyütme çözeltisi bir vial içerisine sırasıyla 4,75 mL 0,1 M CTAB, 1 mL 0,01 M HAuCl_4 , 60 μL 4×10^{-3} M AgNO_3 koyularak karıştırılır. Çözeltinin rengi bu aşamada koyu oranj bir renk alır. Bu renk gözlemlendikten sonra çözeltinin üzerine 250 μL 0,01 M askorbik asit ilave edilir ve karıştırılır. Askorbik asitin eklenmesinden ve karıştırılmasından sonra çözeltinin rengi şeffaf olur. Bu halde elde edilen çözelti büyütme çözeltisi olarak kullanıma hazırdır.

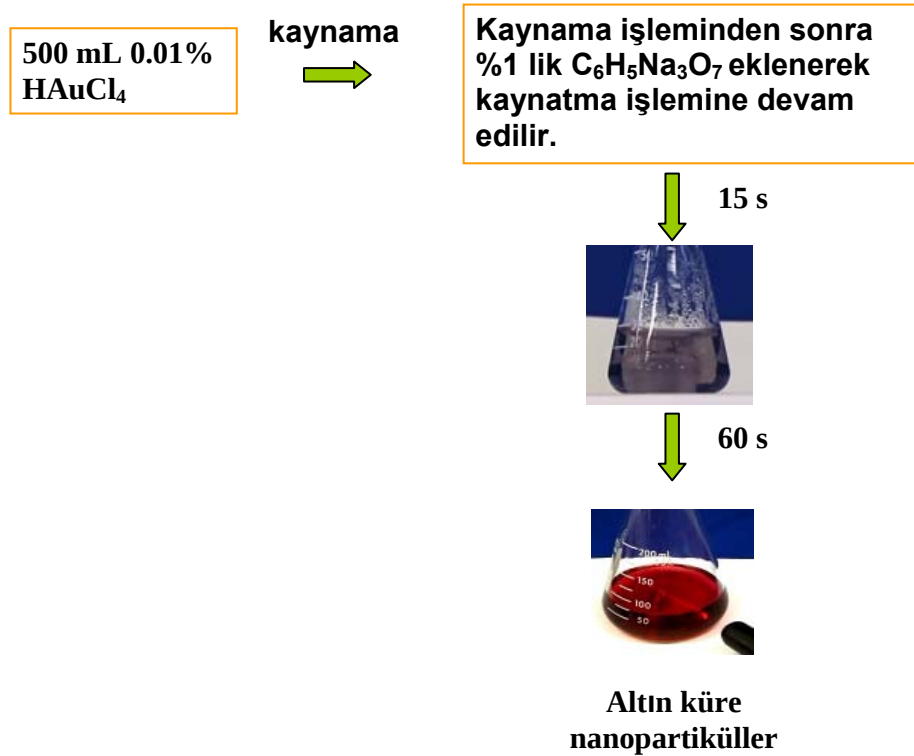
Büyütme çözeltisinin hazırlanması ile çekirdek çözeltisinden 5 μL alınıp büyütme çözeltisine eklenir. Çözelti birkaç saniye karıştırılarak 3 saat boyunca oda koşulları altında nanoçubuk sentezinin tamamlanması için bekletilir. Geçen bu 3 saat içerisinde çözeltinin rengi şeffaflıktan mavimsiye renk tonuna doğru değişir. Sentez aşaması aşağıda şematize edilmiştir.



Şekil.15. Altın nanoçubukların kimyasal sentezi

3.2.5.2. Altın Küre Nanopartiküller

Altın küre partiküllerin sentezi Sutherland'ın¹⁰³ prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir. Sentez 500 mL iki ağızlı balon jode geri soğutucuya bağlı olarak kaynatma sonucu tamamlanmıştır. 500 mL % 0,01 lik HAuCl_4 çözeltisi hazırlanıp balon jojeye konulmuş ve karıştırma işlemi ile birlikte kaynatılmak üzere balon joje yağ banyosu içerisine daldırılmıştır. Kaynama başladıktan sonra % 1 lik 7,5 mL sodyum sitrat çözeltisi balon jojenin serbest ağzından kaynayan çözeltinin üzerine dökülmüş ve kaynatma işlemine devam edilmiştir. Yaklaşık 15 saniye sonra çözeltinin rengi koyu maviye, bir dakika sonra şarap kırmızısı rengine dönmüş ve bu rengin gözlenmesinden sonra kaynatma işlemine 15 dakika daha devam edilmiştir. 15 dakika sonunda kaynatma işlemi durdurulmuş ve karıştırma işlemi devam ederken çözelti soğumaya bırakılmıştır. Sentez aşaması aşağıda şematize edilmiştir.



Şekil.16. Altın küre nanopartiküllerin kimyasal sentezi

3.2.6. Sabit Yüzey Üzerinde Gerçekleştirilen İmmunoanaliz Metodu

3.2.6.1. Yüzeyde Moleküllerin Tek Tabaka Halinde Oluşturulması (SAM)

Cam slayt yüzeylerinde SAM oluşturulmadan önce bütün altın kaplı cam slaytlar yüzeyde bulunması muhtemel safsızlıklardan arındırılmak üzere piranha çözeltisi (3:1 oranında $H_2SO_4:H_2O_2$) ile temizlenip ardından etanol ile yıkanarak ağız kapalı bir petride saklandı. Slaytların yüzeyinde SAM oluşturma işlemi saf etanol içerisinde 100 mM 3-MPA ile gece boyunca bekletilerek gerçekleştirildi. Ardından yüzeyler MES tamponu ile yıkanarak bir sonraki basamağa hazır hale getirildi.

Altın nanopartiküller (1'er mg) yüzeyinde SAM oluşturma işlemi ise yine aynı prosedürle gerçekleştirilip kimyasal olarak 3-MPA yerine SERS aktif molekül olan 50 mM DTNB kullanılmıştır.

3.2.6.2. Raman Etiketlerinin Hazırlanışı

Eşit miktarda (1 mg) altın küre nanopartikül ve nanoçubuk kullanılarak DTNB'nin alkol içerisinde altın nanopartiküllerin yüzeyine tiyol gruplarından bağlanması sağlanmıştır (SAM işlemi). Bunun için 50 mM DTNB kullanılmış ve SERS sinyalini takip etmek için partiküllerin üzerinde SAM oluşturulma işlemi alkol içerisinde bir gece boyunca bekletilip tamamlanmıştır. SERS sinyalini takip etmek için kullanılacak olan molekül (DTNB) yüzeye bağlandıktan sonra modifikasyon işlemleri DTNB'ye ait karbonil grupları üzerinden gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.3. Karbonil Gruplarının Aktif Hale Getirilmesi

Altın kaplı cam yüzeyler üzerinde oluşturulan SAM sonrasında uç kısımda serbest halde bulunan karbonil grupları ile bu gruplar üzerine gönderilen amin gruplarının kovalent bağ oluşturmalarını mümkün kılmak için MES tamponu içerisinde çözölmüş 0,05 M NHS ve 0,2 M EDC kullanarak yüzey üzerinde amin reaktif NHS esterleri oluşturulur. Aynı prosedür altın nanopartiküller için de tekrarlanır. Bu işlem için yüzeyler ve partiküller EDC-NHS çözeltisi içerisinde iken 30 dakika karıştırıcı üzerinde tutulur. İşlem tamamlandıktan sonra yıkama işlemi MES tamponu ile gerçekleştirilir.

3.2.6.4. Avidinin Bağlanması

Yüzeyler üzerinde aktif hale getirilen karbonil grupları üzerinden avidinin bağlanması gerçekleştirilmiştir. Bunun için 0,5 mg/mL avidin MES tamponu içerisinde çözölüp 30 dakika yüzeyler ile etkileştirilmiştir. Aynı süreç partiküller için de gerçekleştirilmiştir.

Yıkama işlemi PBS tamponu ile yapılmıştır. Yıkama işleminde PBS tamponuna geçilmesinin sebebi bir sonraki aşamanın PBS tamponu ile gerçekleştiriliyor olmasıdır.

3.2.6.5. Avidin Üzerinden Biotinli Antikörün Bağlanması

0,1 mg/mL biotin işaretli antikörün PBS tamponu ile hazırlanmış çözeltisi içerisinde avidinin bağlı olduğu yüzeylerin bırakılması ve 30 dakika karıştırılması sonrasında biotinli antikörlerin avidin-biotin afinitesi üzerinden bağlanması sağlanır. Partiküller için de aynı prosedür takip edilmiştir. Yıkama işlemi PBS tamponu ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.6. Spesifik Olmayan Bağlanmaların Engellenmesi

Altın kaplı cam yüzeylere ve partiküllere avidinin bağlanmasından sonra biontinli antikorun bağlanması sağlanarak bakteriyi tanıyan prob çalışması sonlandırılmıştır. Bu aşamadan sonra ortamda olması muhtemel açıkta kalan karbonil gruplarının kapatılması için % 10 luk (v/v) etanolamin çözeltisi kullanılmıştır. Çözelti, yüzeyler üzerinde pipetleme işlemi ile ve partiküller ile karıştırıcı üzerinde bir saat boyunca etkileştirilmiştir. İşlem sonunda yüzeyler ve partiküller PBS ile iki kez yıkanmıştır.

3.2.6.7. Bakteri Dilüsyonlarının Hazırlanması

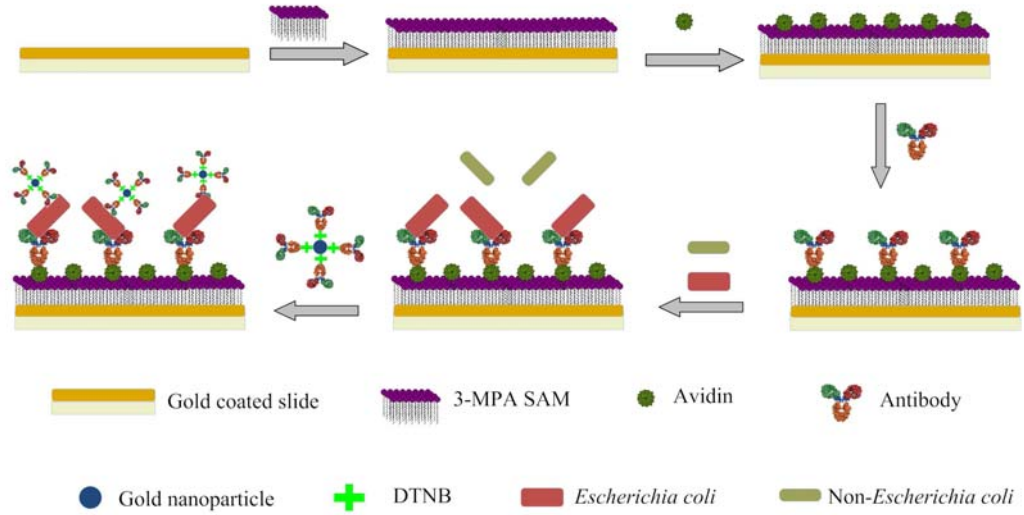
Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsünden alınan *E.coli* K-12 kültürü ana stok olarak kabul edilip bu mevcut ana stoktan 5 mL ye 50 µL olacak şekilde ekim yapılarak *E.coli*'nin çoğaltılması sağlanmıştır. Deney için gerekli olan dilüsyonlar ana stok kullanılarak hazırlanan yeni stok üzerinden yapılmıştır. Seyreltme işleminden önce stoktan alınan 1 mL çözelti içerisindeki bakterinin gelişmesi için kullanılan besiyerinin uzaklaştırılması sağlanmış ve bu işlemle birlikte yapılan diğer 3 paralel yıkamada da PBS tamponu kullanılmıştır. Yıkama işlemi sonrasında 7 eppendorf tüpüne 900 µL PBS tamponu konulmuş ve tüpler numaralandırılmıştır. Önce stoktan 100 µL alınıp ilk eppendorf tüpüne ilk dilüsyonu belirtmesi adına “-1” kod numarası verilmiş ve 100 µL eklenmiştir. İkinci dilüsyon basamağı ise “-1” kod numaralı tüpten 100 µL alınarak “-2” kodlu tüpe eklenmesi ile yapılmıştır. Bu işlem beş kez daha tekrarlanmış ve “-5”, “-6” kodlu tüplerden 100'er µL alınıp katı besiyerlerine ekim yapılarak ana stoktan deneyde kullanılmak için çoğaltılan stok bakteri derişimi tespit edilmiş ve bu 7 dilüsyon deneyde kullanılmıştır.

3.2.6.8. Hazırlanan Prob ile Bakterilerin Yakalanması

Ucunda *E. coli* için spesifik serbest antikorların bulunduğu yüzeyler ayrı ayrı 10^1 - 10^7 kob/mL bakteri dilüsyonlarının bulunduğu eppendorf tüplerine bırakılarak 30 dakika inkübasyon için beklenmiştir. Bu süre sonunda her yüzey üç defa PBST ile ve ardından PBS ile yıkanmıştır.

3.2.6.9. Sandviç İmmunoanaliz İçin Yapının Tamamlanması

Bu son aşamada sandviç yapısını tamamlamak için altın kaplı cam yüzey üzerinde hazırlanmış birinci yapı üzerine - serbest ucunda seçici antikora sahip olan prob tarafından yakalanmış bakterilerin bulunduğu yapı - SERS aktif molekülünü üzerinde bulunduran ve serbest ucunda seçici antikorlu olan ikinci yapı olan altın nanopartiküller gönderilmiştir. Bu işlemden sonra her bir yüzey ve partikül çözeltileri karıştırıcıda oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrasında bağlanmayan partiküllerin yüzeyden uzaklaştırılması için yıkama işlemine geçilmiştir. Yıkama işlemi 3 kez PBST ile ardından 3 kere PBS ile yapılmış ve son yıkamadan sonra yüzeyler deiyonize suyun bulunduğu bir vialle alınıp ultrasound banyosunda 10 saniye kadar bekletilmiştir. Bu işlem sonrasında yüzeyler son bir kez daha deiyonize sudan geçirilip kurutulduktan sonra AFM görüntüsü ve SERS ölçümü için hazır hale gelmiştir. Tüm aşamalar aşağıdaki şemada gösterilmiştir.



Şekil.17. Sandviç immunoanaliz için gerçekleştirilen basamaklar

3.2.6.10. Geliştirilen Yöntemin Seçiciliği

Geliştirilen yöntemde *E.coli* hedef mikroorganizma olarak seçilmiş ve tayini gerçekleştirilmiştir. *E.coli* üzerinde çalışan sandviç immunoanaliz yönteminin sadece *E. Coli*'ye seçicilik deneyi, *E. aerogenes* ve *E. dissolvens* bakteri kültürleri kullanılıp aynı deneysel prosedürün bu bakteriler ile uygulanması sonucu gerçekleştirilmiştir .

3.2.7. Su Numunesinde *E. coli* Tayini

Geliştirilen analiz yönteminin gerçek su örneklerinde kullanılabilirliğinin test edilmesi amacıyla Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampüsü girişindeki musluktan ve kampus yerleşkesine yakın bir göletten alınan su örneklerinde *E. coli* tayinine yönelik çalışma yapılmış ve elde edilen sonuçlar klasik sayım yöntemleri ile karşılaştırılmıştır.

Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampüsü girişindeki musluk suyundan alınan örneğin içerisine ayrıca *E. coli*'nin TSB besiyerinde hazırlanan 18 saatlik saf kültüründen inoküle edilmiştir. Bilinen derişimin (10^3 kob/mL) kullanılması ile yöntemin çalışırılığı gerçek numune analizi dışında denenmiştir. Musluk suyu numunesine inokülasyon, *E.coli* stoğunun musluk suyuna 10^8 den 10^3 bakteri derişimine gelene kadar yapılan ardışık dilüsyonlar sonrasında gerçekleştirilmiştir.

Göletten ve musluk suyundan alınan örneklerde geleneksel sayım yöntemi kullanılarak doğrudan 1 mL örneğin SMAC-Agar besiyerine yüzeye yayma yöntemi ile inokülasyonu yapıldıktan sonra, besiyerleri 45,5°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyerinde gelişen koloniler sayılarak su örneklerindeki *E. coli*'nin konsantrasyonları belirlenmiştir.

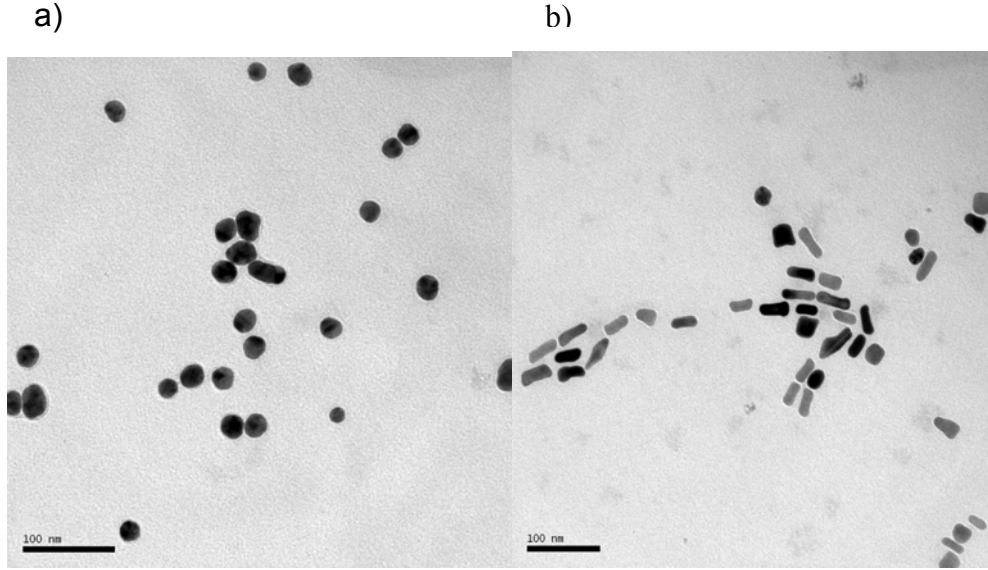
Altın kaplı cam slaytlar, analiz için hazırlanıp eppendorf tüpü içine alınan 1'er mL su örnekleri içine daldırılarak; altın kaplı demir oksit partiküller ise hazır olan su numunelerinden 1 mL partiküller üzerine eklenerek *E. coli* tayini yapılmıştır.

4. BULGULAR

Escherichia coli gıdalarda ve sularda fekal kontaminasyonun indikatörü olarak kullanılmaktadır. Herhangi bir örnekte *E. coli*'ye rastlanması, örneğin alındığı ortama doğrudan ya da dolaylı olarak dışkı bulaştığının ve yine bağırsak kökenli *Salmonella* ve *Shigella* gibi primer patojenlerin de olabileceğinin bir göstergesidir. Bu nedenle gıdalarda ve suda *E. coli*'nin hızlı, hassas ve seçici bir şekilde saptanması büyük önem taşımaktadır. Bu doğrultuda *E. coli* tayini için altın nanopartiküller kullanılarak uygun bir analiz yöntemi geliştirilmiş ve yöntemin çalışırılığı hem laboratuvar koşullarında su numunesi içine derişimi bilinen *E. coli* ekimi yapılarak hem de derişimi bilinmeyen gerçek numune ile çalışılarak test edilmiştir. Bu bölümde, geliştirilen analiz yönteminin performansına yönelik optimizasyon sonuçları ve tayin sonuçları sunulmuştur.

4.1. Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

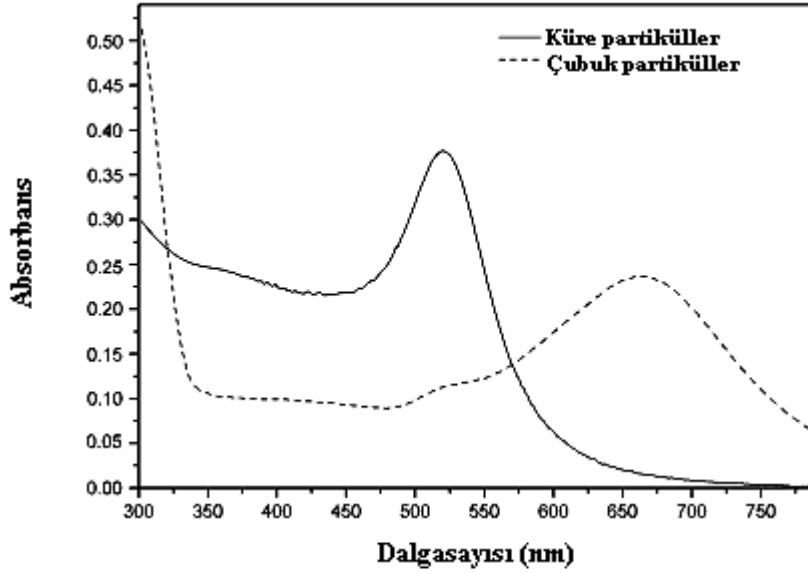
Nanopartiküllerin karakterizasyonunda, partiküllerin optik özellikleri ve anizotropilerini anlayabilmek için UV-Visible spektrofotometre ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanılmıştır. Partiküllerin boyut ve şekilleri üzerine nanometre boyutunda bilgi edinmek üzere şekil 18'de TEM görüntüleri verilmiştir. Altın küre nanopartiküller ve altın nanoçubuklar sırasıyla şekil 18 a ve şekil 18 b'de verilmiştir. Şekil 18 a'da altın küre nanopartiküllerin ortalama boyutunun 20 nm civarında olduğu görülmektedir. Şekil 18 b'de ise altın nanoçubuklar verilmiştir.



Şekil.18. Nanopartiküllerin TEM görüntüleri: Altın küre nanopartiküller (a); altın nanoçubuklar

Nanoçubukların şekilleri ve dolayısı ile büyüklükleri boy-en oranı ile verilmektedir. Nanoçubukların boy-en oranı partiküle ait olan uzunluğun aynı partiküle ait olan genişliğe oranı ile bulunur. Sentezlenen şekil 18 b’de verilen nanoçubukların boy-en oranı yaklaşık 3 olarak görülmektedir (uzunluk ~ 45 nm, genişlik ~ 15 nm).

Partiküllerin optik özelliklerinin yanında şekilleri hakkında da fikir veren absorpsiyon spektrumları şekil 19’da verilmiştir. Şekilde görülen ilk plazmon bandı altın nanoçubuğa ait 524 nm deki çapraz (enine) plazmon bandıdır. Spektrumda 665 nm de görülen plazmon bandı ise nanoçubuk için boylamasına plazmon bandı olarak tanımlanan banttır. Diğer spektrum ise altın küre nanopartiküllere aittir. Küre partiküllerde 521 nm de plazmon bandı görülmektedir.



Şekil.19. Altın küre ve çubuk nanopartiküller için UV-Visible absorpsiyon spektrumları

Şekil 19’da görüldüğü üzere altın nanopartiküller plazmon rezonansından ötürü dar ve şiddetli absorpsiyon sergilemektedirler. Bu durum uygun dalga boyunda gönderilen ışın ile iletkenlik elektronlarının elektromanyetik alan varlığında osilasyon hareketi sırasında rezonansa girmesi ile gerçekleşir. Altın nanopartiküllerin plazmon rezonans özellikleri boyutlarına, şekillerine, yapılarına (katı veya boşluklu yapıda bulunmaları vs.) ve bulundukları ortamın refraktif indeksine göre değişir. Bundan dolayı şekil 19’da farklı iki partikül için farklı karakterde iki spektrum elde edilmiştir. Klasik olarak küre altın nanopartiküller için 520 nm civarında bir pik gözlenmektedir. Küre partiküller için boyutta ya da partikülün bulunduğu ortamda refraktif indeks değişiminin, ayrıca ortamda kuvvetli bir absorptör ve/veya saçılım yapan türün bulunması küre partiküllere ait dalga boyunda fark edilir bir kaymaya sebep olmamaktadır. Dolayısıyla bu dalga boyu bazı durumlarda ışığın etkisinin zayıf olduğu bir dalga boyudur¹⁰⁴. Bu özelliğinden dolayı bazı biosensör uygulamalarında tercih edilmemektedir. Yapılan çalışmada ise nanoküreler, SERS kuvvetlendirme

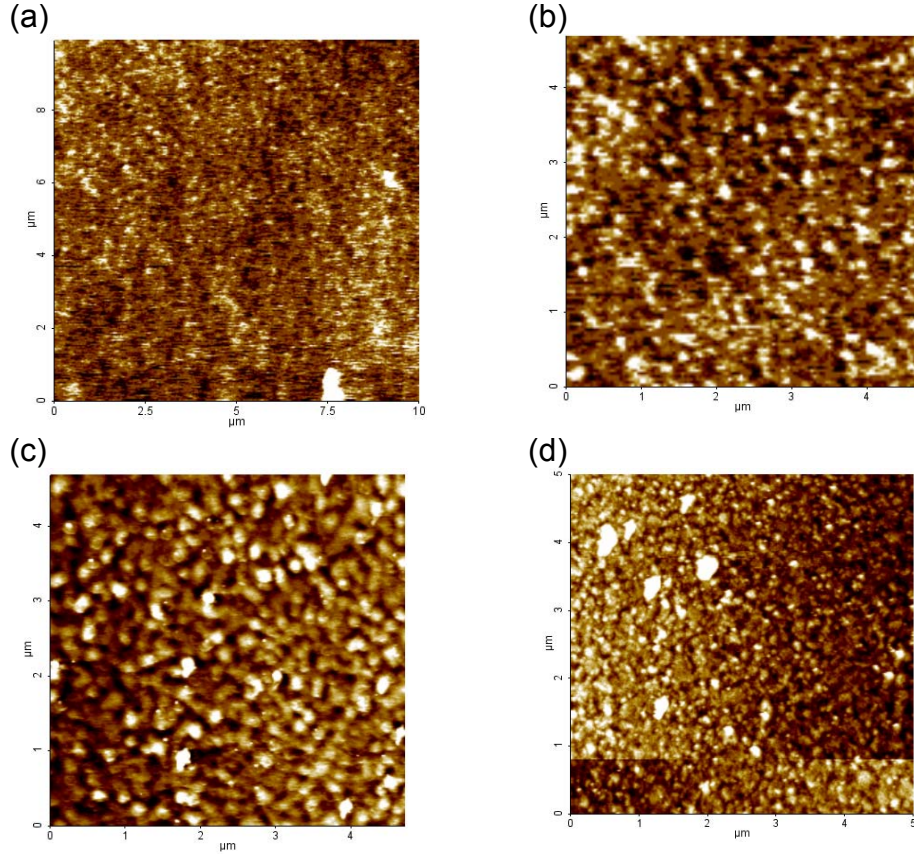
gücü ve elde edilen kuvvetlendirme ile mikroorganizma tayininde kullanılabilirliklerinin nanoçubuklar ile karşılaştırılması için kullanılmışlardır.

Nanoçubukların iki plazmon rezonans özelliği sergilemeleri kısa ve uzun yüzleri üzerinde bulunan iletkenlik elektronlarının salınımından kaynaklanmaktadır. Nanoçubuklara ait ilk bant çapraz rezonans band ve ikinci band ise boyuna rezonans band olarak adlandırılır. Çapraz plazmon bandı 520 nm civarında iken, boyuna plazmon bandı kırmızıya doğru kaymıştır. Nanoçubuklarda kırmızıya kayma çubukların boy-en oranı ile ilgilidir. Yani boy-en oranı ne kadar büyük olursa kırmızıya doğru kayma daha çok olacaktır. Dolayısı ile düşük enerjili görünür bölge ile NIR arasında yapılacak olan çalışmalarda biouyumluluğu ile kullanışlıdır. Nanoçubukların boy-en oranı ile oynanarak istenilen boyuta getirilen partiküllerden optik görüntülemeye ve biotayinde oldukça faydalanılmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada özellikle nanoçubuklar üzerinde durulmuş ve kıyaslama yapılmıştır. Çubuk partiküllerin daha iyi olmasında; uyarılma ışığının polarizasyonu nano çubuğun uzun eksenine göre değiştirilmesiyle farklı optik özellikler ve saçılma verimliliği kazanması sayesinde olur. Nano boyutta küre yapıya göre nanoçubukların saçılma verimliliği oldukça yüksektir. Nanoçubuklarda boy-en oranı arttıkça ışımsız durulma azalmakta ve Raman verimliliği artmaktadır.

4.2. Slaytlar Üzerinde Yapılan Modifikasyonların AFM Sonuçları

Altın kaplı cam yüzeyler üzerinde oluşturulan her modifikasyonun, analiz yöntemine ait tasarlanan teoriye göre gerçekleşip gerçekleşmediğini takip edebilmek için, tamamlanmış her bir basamağın ardından atomik kuvvet mikroskobu kullanılarak yüzeydeki değişimler takip

edilmiş ve sonuçlar yüzey topografyasında meydana gelen değişimler olarak kaydedilmiştir.



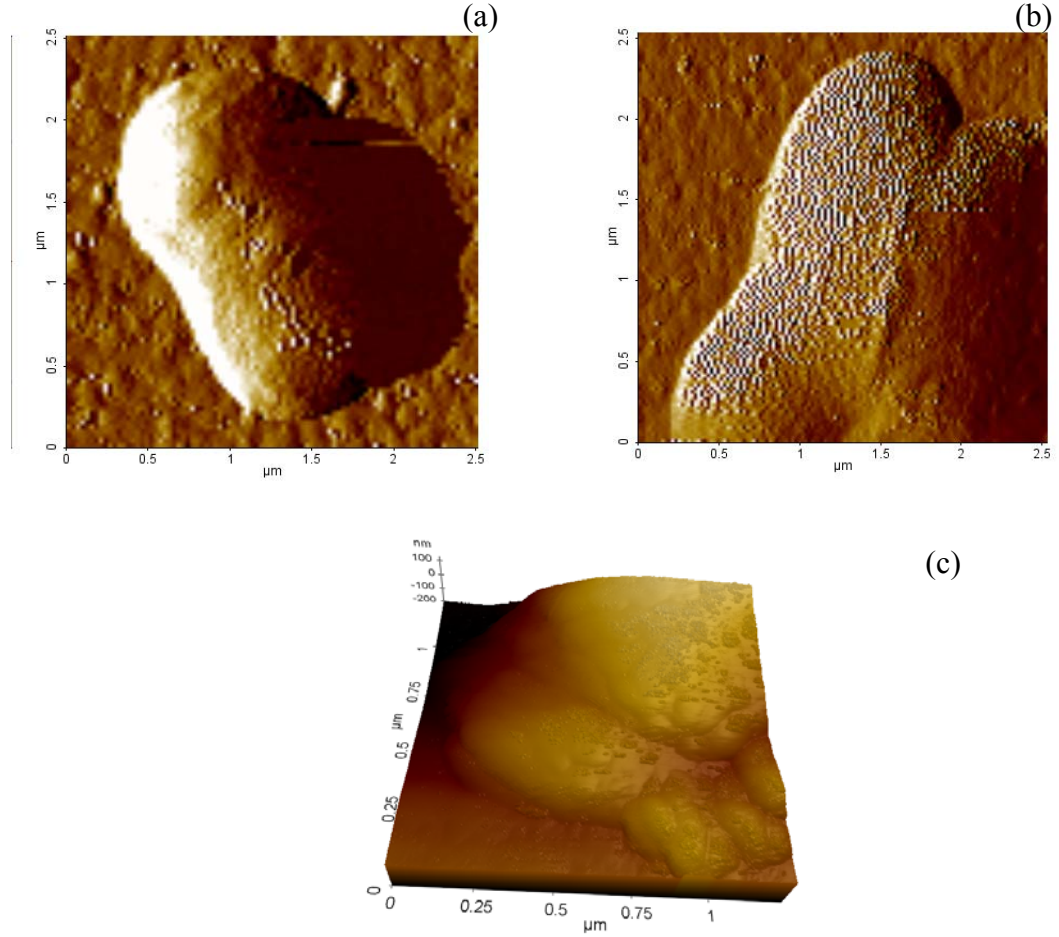
Şekil.20. AFM topografya görüntüleri (a) altın kaplanmış cam slayt, (b) 3-MPA ile SAM, (c) 3-MPA ile SAM + avidin, (d) 3-MPA ile SAM + avidin + antikor

Şekil 20 , SERS ile bakteri tayini sağlayacak sandviç yapısını oluşturan birincil antikorun bağlı olduğu yüzeyin her bir aşamasını AFM ölçümleri sonucu elde edilen görüntüler olarak göstermektedir. Şekil 20 a'da alkolle temizlenmiş altın kaplı cam slayt oldukça düzgün bir yüzeye sahip olup aritmetik ortalaması (Ra) 0,250 ve pürüzlülüğü (Rq) 0,384 nm olarak kaydedilmiştir. Temiz olan yüzey üzerinde 3-MPA ile SAM oluşturunca yüzeyin görüntüsü şekil 20 b'de görüldüğü üzere değişmiştir. SAM oluşturulan bu yüzey için Ra ve Rq değerlerinde artış gözlenmiş ve sırasıyla Ra ve Rq değerleri bu yüzey için 0,281 ve 0,387 nm olarak

kaydedilmiştir. Yüzeyde SAM oluşturulduktan sonra diğer bir basamak olan avidinin bağlanması işlemi gerçekleştirilmiş ve bu yüzeyde oluşan değişiklikler şekil 20 c'de verilmiştir. Şekil üzerinde avidin kümelenmiş halde görülmektedir. Avidinin kümelenmiş olarak bulunması ihtimali şekil 20'c de görülen oluşumların yaklaşık 200 nm ölçülmesi üzerine düşünülmüştür. Bir avidin molekülü tek başına bu büyüklüğü gösteremeyeceği için yüzey üzerinde avidinin kümelenmiş olduğu düşünülmektedir. Literatürde avidinin AFM görüntüsüne örnek bir çalışma N. Misawa ve arkadaşlarının¹⁰⁵ yapmış olduğu çalışma olarak gösterilebilir. N. Misawa ve arkadaşları karboksilat yüzeyli SiO₂/Si yüzeyler üzerine avidin bağlayıp yüzeydeki oriyantasyonunu AFM ile incelemişlerdir. Avidin bağlandıktan sonra yüzeyde oluşan değişim Ra ve Rq değerleri olarak sırayla 0,981 ve 1,326 nm olarak kaydedilmiştir. Avidin bağlanma işleminden sonra yüzey üzerine birincil antikor gönderilmiş ve bu yüzey üzerindeki değişim şekil 20 d'de verilmiştir. Biotinli antikor bağlandıktan sonra beklendiği üzere Ra ve Rq değerlerinde artış gözlenmiştir. Ra ve Rq değerleri antikorun bağlanmış olduğu yüzey için 2,422 ve 3,297 nm olarak kaydedilmiştir. AFM ölçümleri sonrasında Rq değerlerine bakıldığında pürüzlülüğün arttığı ve yüzey modifikasyonları sonrasında her bir basamak için altın kaplı slayt üzerinde başarılı olduğu görülmüştür.

Birincil yapının yüzey üzerinde tamamlanıp bakterinin antikor tarafından tutulması ve bakteri üzerine antikor ile ikincil yapının bağlanıp sandviç yapısının tamamlanması işlemleri sonrasında tekrar AFM ölçümleri alınarak görüntüler AFM error ve 3D topografya ölçümleri olarak kayıt edilmiştir. Bu sonuçlar Şekil 21'de verilmiştir. Şekil 21 a'da bakterinin modifiye edilmiş yüzeye immobilizasyonu görülmektedir. Şekil 21 a ve b'de AFM error ve Şekil 21 c'de 3D topografya sonucu olarak verilmiştir. Şekil 21 c'de bakteri üzerini örtmüş altın küre partiküller için 3D topografya sonucunun verilmesinin nedeni, altın küre partiküllerin boyutlarının

nanoçubuklardan küçük olması ve bakteri üzerinde küre partikülleri daha ayrıntılı görebilmesi içindir.



Şekil.21. AFM hata görüntüleri (a) *E. coli*, (b) altın nanoçubuklar *E. coli* üzerinde (c) *E. coli* üzerinde altın küre partiküllerin 3D topografya görüntüleri

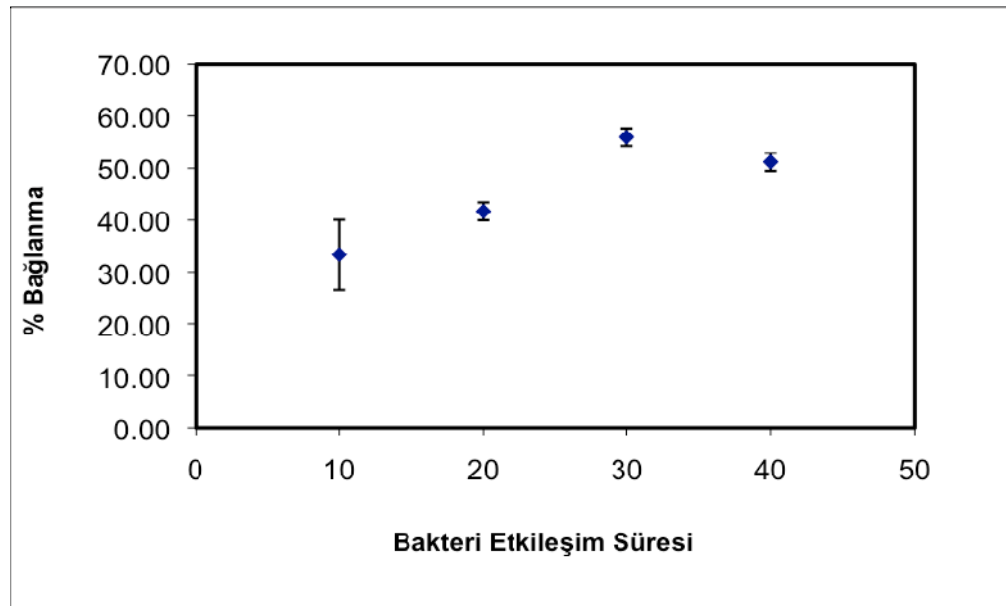
Şekil 21 a'da yüzeyde immobilizasyonu gerçekleştirelen 2,2 μm büyüklükte ve kok şeklindeki bakteri görülmektedir. *E. coli*'nin bu boyut ve şekli daha önce literatürde kayıtlı çalışmalarda verilen görüntülere benzemektedir^{106,107}. Şekil 21 b ve c'de bakteri üzerindeki altın nanoçubuklar ve altın küre partiküller görülmektedir. Bakteri yüzeyinin altın küre ve çubuk nanopartiküller ile kaplandığının tespiti olarak pürüzlülük

değerindeki artış gösterilebilir. Modifikasyonlu yüzeye immobilize olmuş bakteri tek başına sırasıyla 20,716 ve 24,116 nm R_a ve R_q değerlerine sahip iken bakteri üzerine altın küre nanopartiküller bağlandığında R_a ve R_q değerleri 50 ve 91 nm, nanoçubuklar bağlandığında ise 74 ve 98 nm değerlerini almaktadır. Bu artışlar bakterinin ve bakteri üzerine modifikasyonlu nanopartiküllerin bağlandığını göstermektedir.

Tablo2. Sandviç immunoanaliz için farklı yüzeylerin AFM pürüzlülük değerleri

	Altın yüzey	SAM	Avidin	Antikor	<i>E. coli</i>	Altın küre nano-partiküller	Altın nano-çubuklar
R_a (nm)	0.250	0.281	0.981	2.422	20.716	50	74
R_q (nm)	0.384	0.387	1.326	3.297	24.116	91	98

4.3. Bakteri-Antikor Etkileşmesinde Zamana Bağlı Olarak Maksimum Bağlanmanın Saptanması

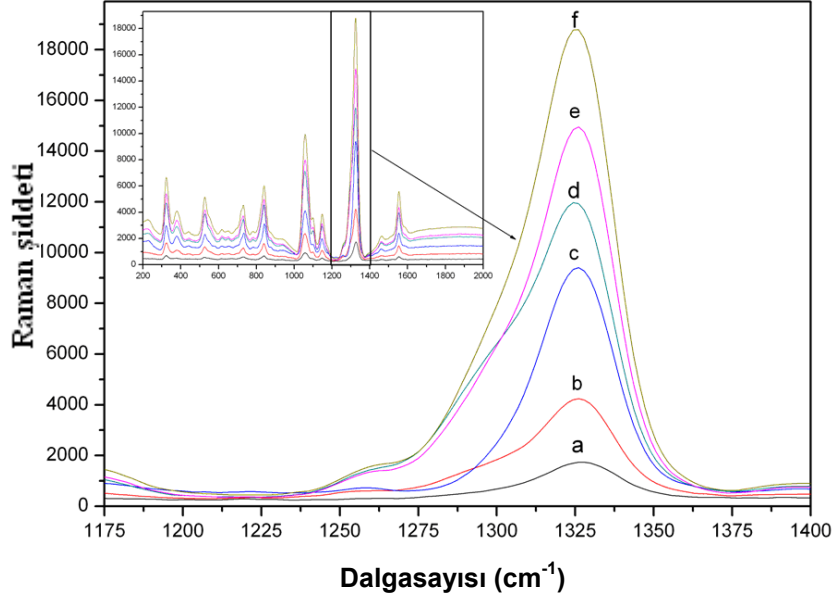


Şekil.22. Maksimum % bakteri bağlanma oranının saptanma süresi

Altın kaplı yüzey üzerine modifikasyonlar sonunda bağlanan antikor ve antikorun spesifik olduğu bakteri oda koşullarında maksimum bağlanmayı şekil 22’de görüldüğü üzere 30 dakika içinde % 60’a yakın bir bağlanma oranı ile gerçekleştirmektedir. Bağlanma fizyolojik pH ve oda koşullarında, bakteri çözültisi içeren eppendorf tüpleri içerisine altın kaplı slaytların yerleştirilmesi ve karıştırılması ile sağlanmıştır. Belirtilen sürelerde bağlanma, antikor tarafından yakalanmayan ve eppendorfta bağlanmadan kalan bakterilerin katı besiyerine ekimi ve inkübasyon sonrasında sayımı ile saptanmıştır.

4.4. Sandviç Yapısının Tamamlanmasından Sonra SERS ile bakteri Tayini

SERS ile *E. coli* tayini için uygulanan sandviç sisteminde ikincil antikorun bulunduğu yapıda SERS etiketi olarak DTNB molekülü kullanılmıştır. Altın nanopartiküllerden oluşturulmuş Raman etiketi kullanılarak elde edilmiş SERS spektrumları *E. coli* analizi için şekil 23 ve 24’de verilmiştir. Bu iki spektrumun DTNB ye ait baskın olan 1336 cm^{-1} deki simetrik NO_2 gerilme bandı takip edilerek artan bakteri konsantrasyonlarına karşı 1336 cm^{-1} nitro grubunun artan Raman sinyali grafiğe geçirilerek şekil 25’ de verilen kalibrasyon grafiği çizilmiştir.

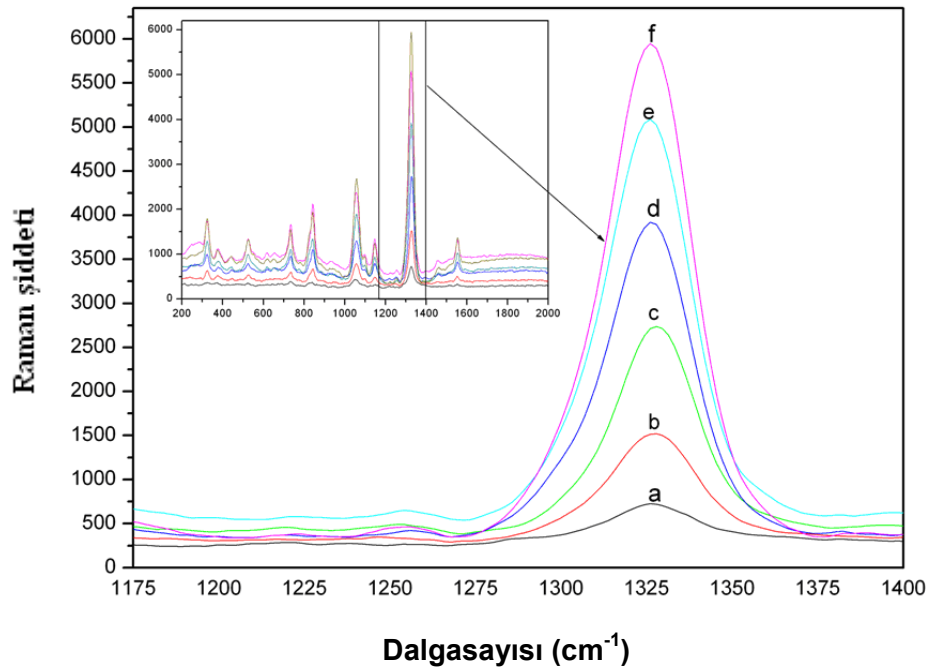


Şekil.23. DTNB'nin 10^1 - 10^5 kob/mL bakteri derişimleri arasında altın nanoçubukların varlığında gösterdiği simetrik NO_2 gerilme pikleri. a) *E coli* yok, b) 10^1 kob/mL, c) 10^2 kob/mL, d) 10^3 kob/mL, e) 10^4 kob/mL, f) 10^5 kob/mL.

Şekil 23'de nanoçubuklar kullanılarak tamamlanan analizin SERS spektrumu görölmektedir. DTNB ye spesifik olan bu spektrumda 1336 cm^{-1} deki DTNB'nin nitro grubuna ait pik kullanılarak artan bakteri konsantrasyonuna karşı sinyalin arttığı görölmektedir. 1336 cm^{-1} de bulunan pikin seçilmesinin nedeni etiket olarak kullanılan molekülün 200 cm^{-1} ile 2000 cm^{-1} arasında en keskin piki bu dalga sayısında vermiş olmasındandır. Şekil 23 üzerinde moleküle ait spektrum verilmiştir.

Şekil 24'de ise altın küre partiküller kullanılarak tamamlanan analizde aynı molekül etiket olarak kullanılmış ve 1336 cm^{-1} deki NO_2 pikinin artan şiddet miktarı ile artan bakteri konsantrasyonu takibi yapılmıştır. DTNB ye ait spektrum her bir bakteri konsantrasyonu için şekil 24' de verilmiştir.

Maksimum bakteri konsantrasyonunda en yüksek SERS pik şiddeti nanoçubuklar ile elde edilmiştir. Bu durum, nanoçubukların gönderilen ışık ile etkileşimi sonucu oluşan Raman saçılmasının, küre nanopartiküllerden daha iyi olduğunu göstermektedir. SERS için böyle bir kuvvetlendirme ile düşük konsantrasyonların tayini, uygun etiketlerle veya eğer varsa analitin kendi sinyali ile gerçekleştirilebilir.

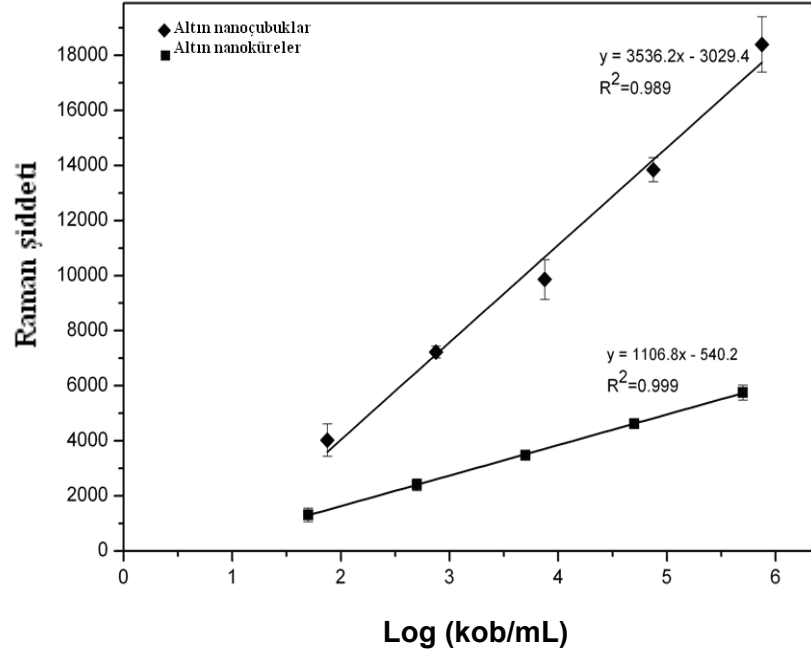


Şekil.24. DTNB'nin 10^1 - 10^5 kob/mL bakteri derişimleri arasında altın küre nanopartiküller varlığında gösterdiği simetrik NO₂ gerilme pikleri. a) *E coli* yok, b) 10^1 kob/mL, c) 10^2 kob/mL, d) 10^3 kob/mL, e) 10^4 kob/mL, f) 10^5 kob/mL.

Çalışma aşamasında hiç bakteri kullanılmadan birincil antikorun bağlı olduğu yüzey üzerine ikincil antikorun bağlı olduğu altın nanopartiküller gönderilerek kör denemesi gerçekleştirilmiştir. Ortamda bakteri olmadığı zaman bir kısım ikincil antikorun bağlı olduğu nanopartiküller spesifik olmayan bir bağlanma göstermiş ve yıkama prosedürü sonrasında ortamdan uzaklaşmadığı görülmüştür. Nanoçubukların ve küre nanopartiküllerin kullanıldığı analizde bu bağlanma spesifik nitro piki üzerinden sırayla 1301 ve 623 pik şiddeti

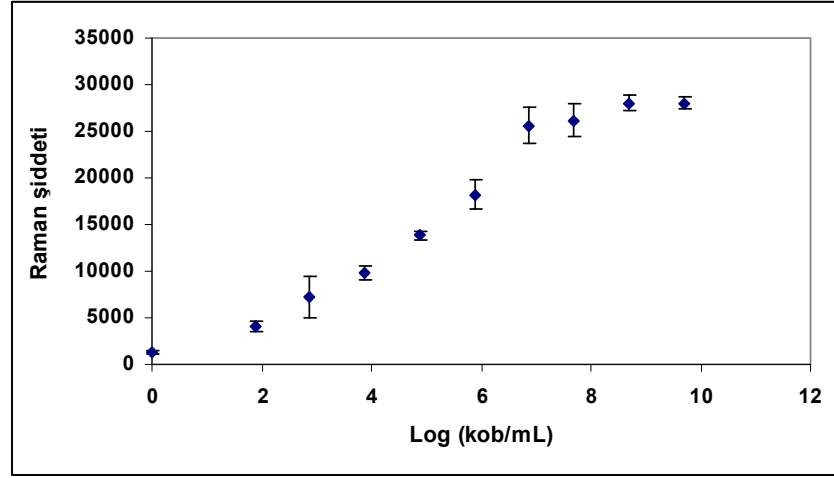
olarak kaydedilmiştir. Spesifik olmayan bu bağlanmanın avidin üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir. Avidinin bozunması için ısı uygulanması gereklidir. Çalışmada bu varsayımı söz konusu yapan basamak, yıkama sırasında ultrasonik banyoda tutulan yapının zarar görme olasılığıdır. Ultrasound sıvı içerisinde akustik bir boşluk oluşturur. Bu akustik boşluğun devamlı bir şekilde süregelmesi sıvı ortamında uç noktada sayılabilecek kadar güçlü kuvvetler oluşturur. Bu kuvvetler türbülans ve ısı gibi kuvvetlerdir. Bu tür kuvvetler yapıda bulunan hidrojen bağları ve polar olmayan hidrofobik etkileşimleri etkilemektedir. Bu etkilenme sırasında molekülün kinetik enerjisinde bir artış gözlenir ve bu artış molekülün daha hızlı bir şekilde titreşmesine sebep olur. Titreşimde gerçekleşen artış molekül içi bağları etkileyerek yapının bozulmasına neden olabilir. Bu titreşim ile yapı hidrofobik etkileşimler ve disülfid bağı oluşturarak agregat oluşturabilir. Bu oluşumlar sırasında ortamda bulunan bir molekül ile etkileşim ya da disülfid bağı mümkün olabilir. Aynı şekilde bu oluşum antikorun bulunduğu taraf ile avidin için de geçerlidir. Ya da diğer taraftan daha basit bir şekilde bakıldığında, açıkta kalmış aktif karbonil uçlarının yüzeyde bulunması durumunda, söz konusu yüzeye gönderilen ikincil yapı ucundaki antikorda mevcut amin gruplarının kovalent bağ ile bağlanması düşünülebilir.

Şekil 25’de tamamlanan imünoanaliz sistemin artan bakteri derişiminde verdiği SERS sinyalleri baz alınarak çizilmiş kalibrasyon grafiği yer almaktadır. Kalibrasyon grafiğinde her bir derişim için alınan NO₂ pik şiddeti düzenli bir şekilde nanoçubuklar ve altın küreler için artmaktadır. Değişen her *E. coli* konsantrasyonuna karşılık SERS sinyali alınmaktadır ve grafikten görüldüğü üzere 10¹ kob/mL bakteri ayırt edici bir şekilde örnek içinde tayin edilebilmektedir. Kalibrasyon grafiği altın küre nanopartiküller için SERS sinyalinin doğrusal bir artış gösterdiği 4,9x10¹-4,9x10⁵ kob/mL bakteri konsantrasyonu aralığında; altın nanoçubuklar için ise 7,5x10¹-7,5x10⁵ kob/mL bakteri konsantrasyonu arasında çizilmiştir.



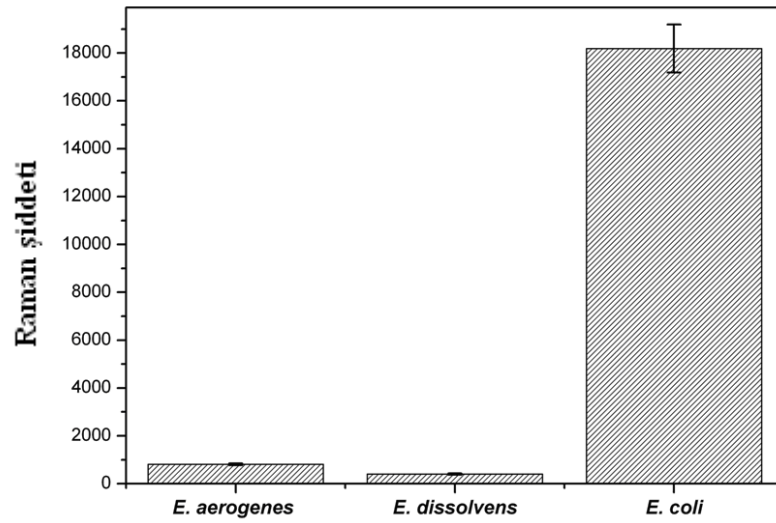
Şekil.25. Altın küre ve çubuk partiküller kullanılarak elde edilmiş kalibrasyon grafiği

Şekil 25’de pik şiddetine göre çizilen kalibrasyon eğrisine bakıldığında kalibrasyon eğrilerinden 10^1 - 10^5 kob/mL arasında doğrusallık sırasıyla nanoçubuklar ve nanoküreler için 0,989 ve 0,999 korelasyon kat sayıları (R^2) ile elde edilmiştir. Grafik üzerinde eğimler değerlendirildiğinde altın nanoçubukların kullanıldığı yapı üzerinden alınan sonuçlara bakıldığında altın nanoçubuklar nanokürelere göre ~3,2 kez daha güçlü cevap alınmasını sağlamıştır. Altın nanoçubuklar ve altın küre nanopartiküller ile *E. coli* tayini için LOD değerleri sırasıyla 4 kob/mL ve 5 kob/mL olarak bulunmuştur. LOD değerleri kör çözelti üzerinden sırayla alınan üç ölçüm sonunda standart sapmaların ortalamaları kullanılarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemde hazırlanan altın kaplı cam slaytlar üzerindeki antikorlar 10^6 kob/mL bakteri derişiminden sonra doymaya başlamışlardır (Şekil26).



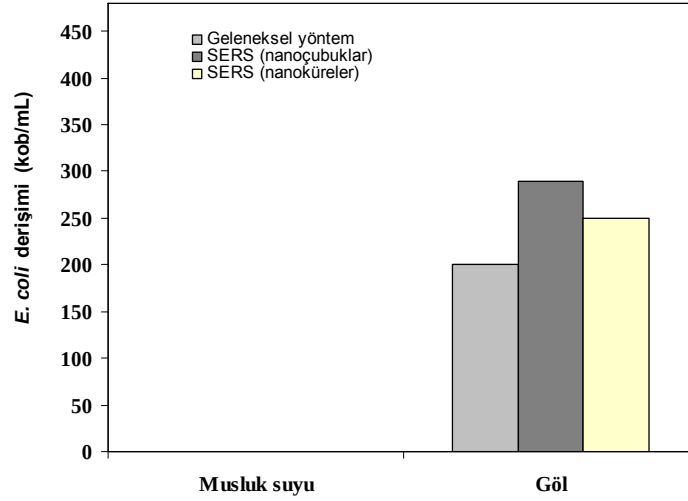
Şekil.26. 10^1 - 10^9 kob/mL *E. coli* için altın nanoçubukların varlığında DTNB'nin 1336 cm^{-1} deki pik şiddeti değerleri. Hazırlanan yüzeyin *E. Coli* için doygunluğa ulaşmış plato oluşturmaya başladığı derişimin saptanması.

Geliştirilen immunoanaliz yönteminin seçiciliğini kontrol etmek için diğer koliform grubu bakteriler ile çalışılmıştır. Bu amaç için derişimi daha önceden katı besi yerine yayma yöntemi ile tayin edilen ve dilüsyonu gerçekleşen *E. aerogenes* ($3,1 \times 10^5$ kob/mL) ve *E. dissolvens* ($4,3 \times 10^5$ kob/mL) kullanılmıştır. Deneysel prosedür *E. coli* tayininde olduğu gibi bire bire gerçekleştirilmiş ve SERS ölçümleri alınmıştır. Seçicilik için kullanılan koliform grubu bakterilerin ölçümlerinden alınan SERS sinyalleri ile aynı zamanda *E. coli* için gerçekleştirilen ölçüm sonrası alınan sinyallerle karşılaştırılmış ve sonuçlar şekil 27'da verilmiştir. Yüksek konsantrasyonda kullanılmış *E. aerogenes* ve *E. dissolvens* için alınan SERS sinyallerinden varılan sonuçlar *E. coli* için geliştirilen analiz yöntemi ile belirlenen LOD değerinin altında çıkmıştır. Bu sonuçlar geliştirilen analiz yönteminin yüksek seçicilikte olduğunu göstermektedir.



Şekil.27. *E. aerogenes* ($3,1 \times 10^5$ kob/mL), *E. dissolvens* ($4,3 \times 10^5$ kob/mL) ve *E. coli* ($7,5 \times 10^5$ kob/mL) için DTNB'nin 1336 cm^{-1} deki pik şiddeti değerleri.

Kullanılan analiz yönteminin doğruluğunun kontrolü gerçek numune analizi ile *E. coli* tayini için gerçekleştirilip elde edilen sonuçlar klasik sayma yöntemleri olan katı besi yerine dökerek yayma yöntemi ve en muhtemel sayma yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Gerçek numuneler göl ve musluk suyundan olmak üzere ayrı yerlerden alınarak geliştirilen analiz yönteminde tayin edilmiş ve *E. coli* için çizilmiş kalibrasyon eğrisinden SERS sinyalleri kullanılarak gerçek numunedeki bakteri konsantrasyonu tayin edilmiştir. Klasik sayım yöntemleri ile musluk suyundan alınan örnekte *E. coli* sayımında pozitif sonuç alınamamış ve geliştirilen yöntemde de SERS sinyali gözlenmemiştir. Fakat; gölden alınan numunede, geliştirilen yöntem ile *E. coli* derişimi SERS sinyalleri kalibrasyon eğrisinden okunarak altın küre nanopartiküller için $2,5 \times 10^2$ kob/mL, altın nanoçubuklar için ise $2,9 \times 10^2$ kob/mL bakteri olarak tayin edilmiştir (Şekil 28). Bu sonuçlar klasik sayma yöntemleri ile desteklenmiş ve sonuçlar, katı besiyerine ekim sonucu 2×10^2 kob/mL ve muhtemel sayma yöntemine göre 3:3:2 (10^2 kob/mL) olarak belirlenmiştir.



Şekil.28. Gerçek numunelerde altın nanopartiküller ile elde edilen analiz sonuçları

Analizin doğruluğu üzerine yapılan bir diğer çalışmada stok derişimi sayım yöntemi ile tespit edilip dilüsyonlar halinde hazırlanmış ve konsantrasyon değerleri $3,5 \times 10^3$ ile $3,5 \times 10^5$ kob/mL arasında olan dilüsyon seti kullanılarak bu dilüsyonlar su numunesine inoküle edilmiştir. İnokülasyon sonrasında geliştirilen analiz yöntemi hem altın küre nanopartiküller hem de altın nanoçubuklar ile bu dilüsyon setinin derişimini tayin etmek için kullanılmıştır ve kalibrasyon eğrisinden elde edilen sonuçlar tablo 3 de verilmiştir.

Tablo 3. Derişimi bilinen bakteri dilüsyonlarının geliştirilen analiz yöntemi ile elde edilen sonuçları.

Derişimi bilinen dilüsyonlar	$3,5 \times 10^3$ kob/mL	$3,5 \times 10^4$ kob/mL	$3,5 \times 10^5$ kob/mL
Altın küre nanopartiküller ile elde edilen sonuçlar	$1,0 \times 10^3$ kob/mL	$3,0 \times 10^4$ kob/mL	$3,9 \times 10^5$ kob/mL
Altın nanoçubuklar ile elde edilen sonuçlar	$1,6 \times 10^3$ kob/mL	$2,0 \times 10^4$ kob/mL	$3,2 \times 10^5$ kob/mL

Analiz sonunda toplam süreye bakıldığında, altın kaplı cam slayt üzerinde bakterinin yakalanması ve yakalanmış olan bakteri ile sinyalin alındığı SERS etiketinin bağlı olduğu partiküllerin etkileşimi 30’ar dakikadan bir saat, yıkama işlemleri ile ölçüm ise yaklaşık 10 dakika almaktadır. Toplam analiz 70 dakika gibi bir zaman dilimi içerisinde gerçekleştirilmektedir. Bu süreyi diğer tayin yöntemleri ile kıyasladığımız zaman geliştirilen analiz yöntemi oldukça hızlı sonuç vermektedir. Örneğin ELISA ile *E. coli* tayini bir günü¹⁰⁸, gerçek zamanlı PCR ile ise 5 saati almaktadır¹⁰⁹.

5. TARTIŞMA

Geliştirilen yöntem için elde edilen kalibrasyon eğrisi göz önüne alındığında altın kaplı cam yüzey üzerinde altın nanoçubuklar kullanılarak gerçekleştirilen *E. coli* tayini daha hassastır. Her bakteri derişimine karşı alınan yüksek Raman şiddeti, kalibrasyon eğrisi üzerinde okumayı kolaylaştırıp hassas sonuçları daha net gösterebilmektedir. LOD değeri göz önüne alındığında gerçekleştirilen analizler ile tayin sınırı olarak düşük bakteri derişimlerine inilebilmektedir. Doğruluk ve kesinlik açısından bakıldığında ise yöntem yüksek ölçüde başarılı olarak *E. coli* tayini için kullanılmıştır.

E. coli'nin özellikle karışık bir numune matriksi içeren gıdalarda tayini, düşük derişimde olduğu zaman oldukça zordur ve bu nedenle hızlı ve hassas bir yöntem ile matriks içinde tayine gidilmelidir. Fekal kontaminasyonun göstergesi olan *E. coli*'nin tayini, kullanılan su kaynaklarının sağlık açısından güvenilirliği, tıpta tanı açısından ve patojenik olarak biyolojik saldırılarda önemlidir. Bu nedenlerle daha önceden geliştirilmiş ve çeşitli çalışma gruplarının ortaya koydukları çalışmalar sonucu değişik yöntemler geliştirilmiştir. *E. Coli*, genellikle en güvenilir yol olan hücre kültürü üzerine dayanan geleneksel yöntemler ile tayin edilmektedir. Fakat; bu yöntemler zaman alan (24-48 saat) ve uzun inkübasyon süresi gerektiren yöntemlerdir¹¹⁰. Son zamanlarda farklı ölçüm prensiplerine dayanan özellikle *E. coli* tayini olmak üzere patojen tayini için geliştirilmiş yöntemler söz konusudur. Bu ihtiyaç, tayinin kısa ve güvenilir olması temeli üzerine gelişmiştir. Örneğin; Polimeraz zincir reaksiyonu immunoanaliz yöntemi¹¹¹, optik analiz¹¹², ATP-tabanlı biyoluminesans, peptit nükleik asit (PNA) imünoanaliz yöntemi¹¹³, akışa enjeksiyon teknikleri, paramanyetik partiküller ile enzimatik biyosensör yöntemleri¹¹⁴, Floresans¹¹⁵, SPR¹¹⁶, amperometrik teknikler¹¹⁷ ile patojen tayinleri yapılmıştır. Bu çalışmalarda kullanılan yöntemler ile ortaya konulan

sonuçlardan farklı olarak bir diğer geliştirilen yöntem ise tez kapsamında gerçekleştirilen SERS ölçümlerine dayalı altın nanopartikül tabanlı patojen sayım tekniğidir. Bu teknik üzerine geliştirilen farklı platform diğer bazı çalışmaların gösteremediği kadar hassas ölçümler gerçekleştirerek düşük derişimlerin numune içinde tayinini mümkün kılmaktadır. Başka çalışmalar ile geliştirilen bu yöntem sayısal verilerle kıyaslandığında, örneğin; J.N. Miller ve arkadaşları¹¹⁸ akışa enjeksiyon ile bakteriyel ATP'nin tayinini lüminesans yöntemi ile gerçekleştirdiklerinde tayin sınırını 10^3 - 10^4 kob/mL olarak bulmuşlardır. Bir diğer çalışma da ise Viviane Casimiri ve arkadaşları¹¹⁹ *E. coli*'nin kültür ortamında laktat oluşturması üzerine laktat enzim sensörü geliştirip tayini spektrofotometre ile gerçekleştirilmesine dayanmaktadır. Bu yöntem ile 2×10^3 kob/mL bakteri tayini gerçekleştirilebilmektedir. Andrew G. Gehring ve arkadaşları¹²⁰ ise *Salmonella typhimurium*'un elektrokimyasal tayinini enzim bağlı imünomanyetik partiküller ile gerçekleştirerek 80 dakikada tayin sınırını 8×10^3 kob/mL olarak belirlemişlerdir. Tüm bu çalışmalar ve geliştirilen yöntem dışında en mükemmel sonucu ise Irene. O. L. McHugh ve arkadaşları¹²¹ elde etmişlerdir. 1 kob/mL bakteri sayımını akış sitometrisi ile gerçekleştirip oluşturdukları yöntem ile geliştirilen diğer tüm akış sitometri ve farklı prensipteki yöntemlerin önüne geçmişlerdir.

Yapılan tez çalışmasında ise altın nanoçubuklar ve altın küre nanopartiküller kullanılarak geliştirilen yöntemde tayin edilebilen bakteri derişimi 10 kob/mL olup LOD değerleri altın nanoçubuklar ve altın küre nanopartiküller için sırasıyla 4 kob/mL ve 5 kob/mL olarak hesaplanmıştır.

6. SONUÇ

Bu çalışmada, *E. coli*'nin hızlı bir şekilde tayini ve sayımı için nanopartikül tabanlı SERS ölçümüne dayanan bir sandviç imünoanaliz yöntemin geliştirilip kullanılması hedeflenmiş ve gerçekleştirilmiştir. Altın nanopartiküller boyutları ve şekillerine bağlı olarak farklı optik ve elektronik özellikler göstermektedirler. Özellikle nanoçubukların kimyasal yolla çözelti ortamında gerçekleşen sentez koşulları değiştiğinde partiküle ait boy-en oranı değişmekte ve partikül farklı optik özellikler kazanmaktadır. Nanoçubukların ve farklı diğer nanopartiküllerin bu özellikleri değiştirilip geliştirilen imünoanaliz yönteminde kullanılarak *E. coli* veya diğer patojen tayinleri farklı olarak gerçekleştirilebilir.

Altın küre nanopartiküller ile nanoçubukların kıyaslandığı platformda bir yüzey altın kaplı cam slayt olarak seçilmiş ve sandviç yapısı bu yüzey üzerinde tamamlanmıştır. SERS sonuçlarına bakıldığında zaman, altın nanoçubuklar imünoanaliz yönteminin hassasiyetini altın nanokürelere kıyasla arttırmaktadırlar. Bu kıyaslamaya göre nanoçubukların analize getirisi, küre nanopartiküllere göre, Raman şiddetinde sağladıkları yaklaşık üç kat artıştır.

Analiz aşamasında SERS-aktif olarak partiküllere bağlanan DTNB nin 1336 cm^{-1} deki simetrik NO_2 gerilme piki, artan bakteri konsantrasyonuna karşı takip edilmiş ve doğrusal bir artış elde edilip kalibrasyon grafiği pik şiddeti kullanılarak çizilmiştir. Analiz yöntemi gerçek numunelerde kullanılmadan önce seçiciliğinin saptanabilmesi için koliform grubundan farklı iki mikroorganizma kullanılarak tekrarlanmış ve elde edilen sonuçların, *E. coli*'den elde edilen cevapla karşılaştırıldığında, ihmal edilebilir düzeyde olduğu görülmüştür.

Geliştirilen analiz yönteminin gerçek su örneklerinde kullanılabilirliğinin test edilmesi amacıyla su örneklerinde *E. coli* tayini yapılmış ve elde edilen cevapların kültürel sayım yöntemiyle benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Gıdalarda, atık sularda, içme sularında ve klinik örneklerde mikroorganizmaların tayini için geliştirilen yöntemlerin kısa sürede tamamlanması, seçici, zahmetsiz ve yüksek hassasiyete sahip olmasının istenmesi bu alanda yapılan çalışmalar için oldukça önemlidir ve günümüzde hala bir ihtiyaçtır. Bu çalışma, söz konusu ihtiyaç üzerine mümkün olan en hızlı şekilde düşük miktarda bakteri derişimlerini tayin edebilecek şekilde tasarlanmaya çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar son derece tatmin edici olup gelecekte analiz süresinin daha da kısaltılması yöntem üzerinde yapılacak modifikasyonlar ile mümkün kılınabilir.

Geliştirilen analiz yöntemi pek çok yöntemden daha hızlı ve hassas olup analiz süresini uzatacak herhangi bir ön zenginleştirme veya filtrasyon işlemine gereksinim duyulmamaktadır.

Geliştirilen yöntem ile elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde birçok numunede kullanılabilecek hassasiyettedir. Örneğin, İçme ve kullanma sularındaki *E. coli* miktarı 1 kob/100 ml'den az olmalıdır. Sahil sularında ve yüzme havuzlarındaki *E. coli* miktarı ise 126 kob/ 100 ml'yi geçmemelidir¹²². Geliştirilen analiz yöntemi için LOD değerleri su kalite standartları için uygun olup içme suyu için 10 kob/mL altındaki bakteri derişimlerine cevap verememektedir. İhtiyaç dahilinde bu derişimin altında bir tayin gerektiğinde bir önzenginleştirmeye başvurulabilir.

Ayrıca *E. coli* için geliştirilen dış raman etiketleri gıda, ilaç gibi farklı çalışma alanları içerisinde keskin Raman pikleri ile nicel ve nitel analizler üzerine kullanılabilir özellik taşımaktadırlar.

7. ÖZET

BAKTERİ TAYİNİ İÇİN NANOPARTİKÜL TABANLI SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Bu çalışmada, yüzeyde kuvvetlendirilmiş Raman saçılması (SERS) ve altın nanopartiküllere dayalı olan çok hassas ve oldukça seçici bir heterojen immünoanaliz sistemi, bakteri ve diğer patojenlerin tayini için geliştirilmiştir. İki farklı tipte altın nanopartikül (sitrat-stabil altın nanoküre ve hekzadesiltrimetilamonyum bromür (CTAB)-stabil altın nanoçubuk partiküller) incelenmiş ve bu immünoanaliz *Escherichia coli* tayini için uygulanmıştır. İlk olarak 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoik asit) (DTNB) ve ardından moleküler tanıyıcı kısım ile kaplanan Raman etiketleri, kullanılan küre ve çubuk şekilli altın nanopartikülleri ile oluşturulmuştur. *E. coli*'nin konsantrasyonunun, 1.336 cm^{-1} 'de DTNB'nin simetrik NO_2 gerilmesine ait SERS sinyal şiddetine karşı çizilmesi ile çalışır bir eğri elde edilmiştir. Altın partiküllerin analitik performansı sandviç immünoanaliz ile değerlendirilmiştir ve 60 saniye data toplama süresi ile 10^1 - 10^5 kob/mL arasında değişen *E. coli* konsantrasyonu ile doğrusal bir kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Altın nanoçubuklar ile üretilen Raman etiketlerinin duyarlılığı küre altın nanopartiküllerden üç kez daha yüksektir. Geliştirilen sensörün seçiciliği *Enterobacter aerogenes* ve *Enterobacter dissolvens* ile incelenmiş ve kayda değer bir cevap gözlenmemiştir. Geliştirilen immünoanaliz yönteminin kullanılabilirliği gerçek su örneği içinde *E. coli* tayini ile ayrıca ispat edilmiştir.

8. SUMMARY

NANOPARTICLE BASED SENSOR DEVELOPMENT FOR DETECTION OF BACTERIA

A very sensitive and highly specific heterogeneous immunoassay system, based on surface-enhanced Raman scattering (SERS) and gold nanoparticles, was developed for the detection of bacteria and other pathogens. Two different types of gold nanoparticles (citrate-stabilized gold nanosphere and hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)-stabilized gold nanorod particles) were examined and this immunoassay was applied for the detection of *Escherichia coli*. Raman labels were constructed by using these spherical and rod-shaped gold nanoparticles which were first coated with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and subsequently with a molecular recognizer. The working curve was obtained by plotting the intensity of the SERS signal of the symmetric NO₂ stretching of DTNB at 1336 cm⁻¹ versus the concentration of the *E.coli*. The analytical performance of gold particles was evaluated via a sandwich immunoassay, and linear calibration graphs were obtained in the *E.coli* concentration range of 10¹–10⁵ cfu/mL with a 60-s accumulation time. The sensitivity of the Raman label fabricated with gold nanorods was more than three times higher than spherical gold nanoparticles. The selectivity of the developed sensor was examined with *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter dissolvens*, which did not produce any significant response. The usefulness of the developed immunoassay to detect *E.coli* in real water samples was also demonstrated.

9. KAYNAKLAR

- 1) Rice E.W, Allen M.J, Brender D.J. and Edberg S.C. Assay for beta glucuronidase in species of the genus *Escherichia* and its applications for drinking-water analysis. Appl. Environ. Microbiol. 2001; 57: 592-593.
- 2) Bitton G. Waste Water Microbiology. 1 st ed. New York: Wiley-Liss Inc; 1999. p.578.
- 3) Ray, B. Fundamental Food Microbiology. 1 st ed. Boca Raton: CRC; 1996. p.516.
- 4) Zhou X, Jiao X. Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* using oligonucleotide primers targeting actA gene. Food Control 2004; 16; 125-130.
- 5) Prior J.L, Titball R.W. Monoclonal antibodies against Yersinia pestis lipopolysaccharide detect bacteria cultured at 28 degrees C or 37 degrees C. Mol. Cell. Probes 2002; 16; 251-256.
- 6) Jofre A, Martin B, Garriga M, Hugas M, Pla M, Rodriguez-Lazaro D, Aymerich T. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. Food Microbiol. 2005; 22; 109-115.
- 7) Sapsford K.E, Rasooly A, Taitt C.R, Ligler F.S. Detection of *campylobacter* and *Shigella* species in food samples using an array biosensor. Anal. Chem. 2004; 76; 433-440.

- 8) Gonzalez S.F, Krug M.J, Nielsen M.E, Santos Y, Call D.R. Simultaneous Detection of Marine Fish Pathogens by Using Multiplex PCR and a DNA Microarray. J. Clin. Microbiol. 2004: 42; 1414-1419.
- 9) El-Boubbou K, Gruden C, Huang X.F. Magnetic Glyco-nanoparticles: A Unique Tool for Rapid Pathogen Detection, Decontamination, and Strain Differentiation. J. Am. Chem. Soc. 2007: 129; 13392-13393.
- 10) Yang L, Li Y.B. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* using quantum dots as fluorescence labels. Analyst 2006: 131; 394.
- 11) Naja G, Bouvrette P, Hrapovic S, Luong J.H.T. Raman-based detection of bacteria using silver nanoparticles conjugated with antibodies. Analyst 2007: 132; 679-686.
- 12) Malvadkar N, Kao P, Wang H, Allara D.L, Demirel M.C. Surface Enhanced Raman Detection of Bacteria on Metalized Nanostructured Poly(p-xylylene) Films. Advanced Materials 2008: 20; 3562-3565.
- 13) Efrima S, Zeiri L. Understanding SERS of Bacteria. J. Raman Spectrosc. 2009: 40; 277-288.
- 14) Jarvis R.M, Goodacre R. Characterisation and identification of bacteria using SERS. Chem. Soc. Rev. 2008: 37; 931-936.
- 15) Park H-Y, Schadt M.J, Wang L, Lim I-Im S, Njoki P.N, Kim S.H, Jang M-Y, Luo J, Zhong C-J. Fabrication of magnetic core@shell Fe

oxide@Au nanoparticles for interfacial bioactivity and bio-separation. Langmuir 2007: 23; 9050-9056.

- 16) Anonymous. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Ders Notları. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti; 1994-95.
- 17) Ünlütürk A, Turantaş F. Gıda Mikrobiyolojisi. 3. baskı. İzmir, Bornova: Meta Basım Matbacılık Hizmetleri; 2003.
- 18) Available from: URL: [http://sites.google.com/site/scienceprofonline/Bacterial Shapes-medium-init-.jpg](http://sites.google.com/site/scienceprofonline/Bacterial-Shapes-medium-init-.jpg).
- 19) Noveir M.R. Gıda Kaynaklı *Escherichia coli* O157:H7 Üzerine Bir Araştırma. Doktora tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 1998.
- 20) Şahin İ. Genel Mikrobiyoloji. 1. basım. Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi; 1999. s.15-17.
- 21) Available from: URL: <http://water.me.vccs.edu/courses/ENV108/clipart/cellwall.gif>.
- 22) Available from: URL: <http://reynoldsscienceonline.wordpress.com/image-gallery/>
- 23) Temiz A. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. 3'üncü baskı. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi; 2000.
- 24) Available from: URL: <http://gcserevision101.files.wordpress.com/2009/02/bacteria-growth.jpg>.

- 25) Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. İzmir: Şafak Matbaacılık; 2002.
- 26) Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Basımevi; 1999.
- 27) Kubitschek H.E. Cell Volume Increase in *Escherichia coli* After shifts to richer media. J. Bacteriol. 1990: 172; 94-101.
- 28) Ingledew W.J, Poole R.K. The Respiratory Chains of *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 1984: 48; 222-271.
- 29) Darnton N.C, Turner L, Rojevsky S, Berg H.C. On Torque and Tumbling in Swimming *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 2007: 189; 1756-1764.
- 30) Brüssow H, Canchaya C, Hardt W.D. Phages and The Evolution of Bacterial Pathogens: From Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004: 68; 560-602.
- 31) Akşit F. Bakterilerin Yapı ve Fizyolojileri. Serter N. Mikrobiyoloji. Eskişehir: T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları NO: 490; 1996.
- 32) Kayser F.H, Bienz K.A, Eckert J, Zinkernagel R.M. Tıbbi Mikrobiyoloji. Gözden geçirilmiş genişletilmiş 9. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.; 2002.
- 33) Akça M.Ö. Gastroenteritli Olgularda Etken Olarak *E. coli* O157:H7 Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi; 1994.

- 34) Blattner F.R, Plunkett G, Bloch C.A, Perna N.T, Burland V, Riley M, Colladovides J, Glasner J.D, Rode C.K, Mayhew G.F, Gregor J, Davis N.W, Kirkpatrick H.A, Goeden M.A, Rose D.J, Mau B, Shao Y. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. Science 1997: 277; 1453-1462.
- 35) Available from: URL: <http://gcserevision101.files.wordpress.com/2009/02/bacteria-growth.jpg>.
- 36) Hobson N.S, Tothill I, Turner A.P.F. Microbial Detection. Biosensors and Bioelectronics 1996: 11; 455-477.
- 37) Ray B. Fundamental Food Microbiology. Boca Raton: CRC; 1996.
- 38) TSE, Mikrobiyoloji-Muhtemel *Escherichia coli* Sayımı İçin Genel Kurallar En Muhtemel Sayı Tekniği. 1996: TS 6063 ISO 7251.
- 39) Andrews W.H. Official methods of analysis of AOAC international. Microbiology methods. Food and Drug Administration. 16th edition. Virginia-USA: 1995; p.1-111.
- 40) Çakır İ. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. 2. baskı. Ankara: Sim Matbaacılık Ltd. Şti.; 2000 s.335-411.
- 41) Anonymous. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Halkman A.K. (çev), Ankara, Başak Matbaacılık Ltd. Şti, 2005.
- 42) Bell C, Neaves P, Williams A.P. Food Microbiology and Laboratory Practice. Blackwell Publishing. Oxford: 2005; p.324.

- 43) Hobson N.S, Tothill I, Turner A.P.F. Microbioal detection. Biosensors and Bioelectronics 1996: 11; 455-477.
- 44) Pharmeuropa. Alternative Methods for Controlling of Microbiological Quality. Pharmeuropa 2006: 16; 555-565.
- 45) Moldenhauer J, Yvon P. Environmental Monitoring Using Scan RDI Polym'air. Moldenhauer J. Environmental Monitoring: A Comprehensive Handbook. River Grove: IL and Bethesda, MD; 2005. p.249-260.
- 46) Newby P.J, Johnson B. Overview of Alternative Rapid Microbiological Technologies. Washington: Interpharm/CRC; 2003. p.41-60.
- 47) Karaboz İ, Kayar E, Akar S. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR 2008: 2; 1-18.
- 48) Cudjoe K.S. Immunomagnetic Particle-Based Techniques. Robinson R.K, Batt C.A, Patel P.D. Encyclopedia of Food Microbiology. San Diego: Academic Pres; 2000. p.1088-1095.
- 49) Safarik I, Safarikova M, Forsythe S.J. A Review: the Application of Magnetic Separations in Applied Microbiology. Journal of Applied Bacteriology 1995: 78; 575-585.
- 50) Bange A, Halsal H.B, Heineman W.R. Microfluidic Immunosensor Systems. Biosensors and Bioelectronics 2005: 20; 2488-2503.

- 51) Wild D, Davies C. Components. Wild D. The Immunoassay Handbook. New York: Stockton Pres; 1994. p.618.
- 52) Yıldız A, Genç Ö, Bektaş S. Enstrümental Analiz Yöntemleri. 2. Baskı. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları; 1997.
- 53) Available from: URL: <http://wpcontent.answers.com/wikipedia/commons/thumb/f/f9/Ramanscattering.svg/480px-Ramanscattering.svg.png>
- 54) Skoog D.A, Holler F.J, Nieman T.A. Enstrümental Analiz İlkeleri. Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H. (eds) Raman Spektroskopisi. 1. Ankara: Baskı. Bilim Yayıncılık; 1998. p.441.
- 55) Campion A, Kambhampati P. Surface-Enhanced Raman Scattering. Chemical Society Reviews 1998; 27; 241-250.
- 56) Smith E, Dent G. Introduction, Basic Theory and Principles. Dent G. Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach. Chichester: Wiley; 2005. p.1-20.
- 57) Lombardi J.R, Birke R.L, Lu T, Xu J. Charge-Transfer Theory of Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Herzberg-Teller Contributions. J. Chem. Phys. 1986; 84; 4174-4180.
- 58) Gramlich H.U, Yan B. Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2001.

- 59) Freire P.T.C. Proceedings of the International Conference on Raman Spectroscopy. Zhang S.L, Zhu B.F. New york: John Wiley & Sons; 2000. p.440.
- 60) Schuster K.C, Reese I, Urlab E, Gapes J.R, Lendl B. Multidimensional Information on the Chemical Composition of Single Bacterial Cells by Confocal Raman Microspectroscopy. Anal Chem. 2000: 72; 5529-5534.
- 61) Alexander T.A, Pelligrino P.M, Gillespie J.B. Appl. Spectrosc. Near-Infrared Surface enhanced Raman Scattering Mediated Detection of Single Optically Trapped Bacterial Spores. 2003: 57; 1340-1345.
- 62) Sockalingum G.D, Lamfarraj H, Beljebbar A, Pina P, Delavenne M, Witthuhn F, Allouch P, Manfait M. Vibrational spectroscopy as a probe to rapidly detect, identify, and characterize micro-organisms. SPIE 1999: 3608; 185-194.
- 63) Arcangeli C, Cannistraro S. In situ Raman microspectroscopic identification and localization of carotenoids: approach to monitoring of UV-B irradiation stress on Antarctic fungus. Biopolymers 2000: 57; 179-186.
- 64) Piot O, Autran J.C, Manfait M. J.Cereal Sci. 2001: 34; 191-205.
- 65) Matsi H, Pan S. J. Phys. Chem B. Conformation Change of Poly(dG-dC)•Poly(dG-dC) in Cationic Polyamine Liposome Complexes: Effect of Charge Density and Flexibility of Amine Chains in Headgroups. 2000: 104; 8871-8875.

- 66) Zheng J, Zhou Q, Zhou Y, Lou T, Cotton T.M, Chumanov G. J. Electroanal. Chem. 2002 530 75-81.
- 67) Manfait M, Lamaze P, Lamfarraj H, Pluot M, Sockalingum G.D. Biomed. Spec. Vibrational Spectroscopy and Other Novel Techniques. SPIE 2000: 3918; 135-143.
- 68) Nagarajan R, Hatton T.A. Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation and Functionalization. Washington, DC: Oxford University Pres; 2008.
- 69) Feldheim D.L, Foss C.A.Jr. Metal Nanoparticle: Synthesis, Characterization, and Application. New York: Marcel Dekker; 2002.
- 70) Hayatt M.A. Colloidal Gold, Principles, Methods and Applications. San Diego: Academic Press; 1989.
- 71) Lyon A.L, Musick M.D, Natan M.J. Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance immunosensing. Anal Chem. 1998: 70; 5177-5183.
- 72) Elghanian R, Storhoff J.J, Mucic R.C, Letsinger R.L, Mirkin C.A. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. Science 1997: 277; 1078-1080.
- 73) Bruchez M, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos A.P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. Science 1998: 281; 2013-2016.

- 74) Elaissari A. Colloidal Nanoparticles in Biotechnology. New Jersey: John Wiley & Sons; 2008.
- 75) Parak W.J, Gerion D, Zanchet D, Woerz A.S, Pellegrino T, Micheel C, Williams S.C, Seitz M, Bruehl R.E, Bryant Z. Conjugation of DNA to silanized colloidal semiconductor nanocrystalline quantum dots. Chem Mater. 2002: 14; 2113-2119.
- 76) Goldman E.R, Balighain E.D, Mattoussi H, Kuno M.K, Mauro J.M, Tran P.T, Anderson G.P. Avidin: a natural bridge for quantum dot antibody conjugates. J Am Chem Soc. 2002: 124; 6378-6382.
- 77) Wu X, Liu H, Liu J, Haley K.N, Treadway J.A, Larson P.J, Ge N, Peale F, Bruchez M.P. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her-2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. Nat Biotechnol. 2003: 21; 41-46.
- 78) Parak W.J, Boudreau R, Le Grod M, Gerion D, Zanchet D, Micheel C.M, Williams S.C, Alivisatos A.P, Larabell C. Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks. Adv Mater. 2002: 14; 882-885.
- 79) Wang J, Liu G, Merkoci A. Electrochemical coding technology for simultaneous detection of multiple DNA targets. J Am Chem Soc. 2003: 125; 3214-3215.
- 80) Medintz I.L, Clapp A.R, Mattoussi H, Goldman E.R, Fisher B, Mauro J.M. Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors. Nat Matter. 2003: 2; 630-638.

- 81) Ozsoz M, Erdem A, Kerman K, Ozkan D, Tugrul B, Topcuoglu N, Ekren H, Talyan M. Electrochemical genosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of factor V Leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes. *Anal Chem.* 2003; 75; 2181-2187.
- 82) Wang J, Polsky R, Xu D. Silver-enhanced colloidal gold electrochemical stripping detection of DNA hybridization. *Langmuir* 2001; 17; 5739-5741.
- 83) Taton TA, Lu G, Mirkin CA Two color labeling of oligonucleotides arrays via size-selective scattering of nanoparticle probes. *J Am Chem Soc.* 2001; 123; 5164-5165.
- 84) Shlyahovsky B, Katz E, Xiao Y, Pavlov V, Willner I. Optical and electrochemical detection of NADH and NAD⁺ dependent biocatalyzed processes by the catalytic deposition of copper on gold nanoparticles. *Small* 2005; 1; 213-16.
- 85) Zayats M, Baron R, Popov I, Willner I. Biocatalytic Growth of Au Nanoparticles: From Mechanistic Aspects to Biosensors Design. *Nano Lett.* 2005; 5; 21-25.
- 86) Cao Y.C, Jin R, Mirkin C.A. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science* 2002; 297; 1536-1540.
- 87) Santra S, Zhang P, Wang K, Tapeç R, Tan W. Conjugation of biomolecules with luminophore-doped silica nanoparticles for photostable biomarkers. *Anal Chem.* 2001; 73; 4988-4993.

- 88) Battersby B.J, Lawrie G.A, Johnston A.P.R, Trau M. Optical barcoding of colloidal suspensions: applications in genomics, proteomics and drug discovery. *Chem Commun (Camb)*. 2002: 14; 1435-1441.
- 89) Nam J, Park S, Mirkin C.A. Bio-barcodes based on oligonucleotide-modified nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2002: 124; 3820-3821.
- 90) Nam J.M, Thaxton C.S, Mirkin C.A. Nanoparticle-based bio-barcodes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science* 2003: 301; 1884–1886.
- 91) Nicewarner-Pena S.R, Freeman R.G, Resiss B.D, He L, Pena D.J, Walton I.A, Cromer R, Keating C.D, Natan M.J. Submicrometer metallic barcodes. *Science* 2001: 294; 137-141.
- 92) Li Y, Hong Ju Y.T, Luo D. Multiplex detection of pathojen DNA with DNA-based fluorescence nanobarcodes. *Nature Biotech.* 2005: 23; 885-889.
- 93) Kim D.K, Zhang Y, Kehr J, Klason T, Bjelke B, Muhammed M. Characterization and MRI study of surfactant-coated superparamagnetic nanoparticles administered into the rat brain. *J.Magn.Magn.Mater.* 2001: 225; 256–261.
- 94) Jun Y.K, Choi J, Cheon J.W. Hetero structured magnetic nanoparticles: their versatility and high performance capabilities. *Chem.Commun.* 2007: 1203–1214.

- 95) Niemeyer C.M. Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science. *Angew.Chem.,Int.Ed.* 2001: 40; 4128–4158.
- 96) Qiu J-D, Peng H-P, Liang R-P, Xia X-H. Facile preparation of magnetic core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ nanoparticle/myoglobin biofilm for direct electrochemistry. *Biosensors and Bioelectronics* 2010: 25; 1447-1453.
- 97) Park H-Y, Schadt M.J, Wang L, Lim I-Im S, Njoki P.N, Kim S.H, Jang M-Y, Luo J, Zhong C-J. Fabrication of Magnetic Core@Shell Fe Oxide@Au Nanoparticles for Interfacial Bioactivity and Bio-separation. *Langmuir* 2007: 23; 9050-9056.
- 98) Perrault S.D, Chan W.C.W. Synthesis and Surface Modification of Highly Monodispersed, Spherical Gold Nanoparticles of 50-200 nm. *J. Am. Chem. Soc.* 2009: 131; 17042-17043.
- 99) Murphy C.J, Gole A.M, Hunyadi S.E, Stone J.W, Sisco P.N, Alkilany A, Kinard B.E, Hankins P. Chemical sensing and imaging with metallic nanorods. *Chem. Commun.* 2008: 544-557.
- 100) Mitamura K, Imae T. Functionalization of Gold Nanorods Toward Their Applications. *Plasmonics* 2009: 4; 23-30.
- 101) Sau T.K, Murphy C.J. Seeded high yield synthesis of short Au nanorods in aqueous solution. *Langmuir* 2004: 20; 6414-6420.

- 102) Nikoobakht B, El-Sayed M.A. ChemMater. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. 2003: 15; 1957–1962.
- 103) Sutherland W.S, Winefordner J.D. a novel substrate preparation method for surface-enhanced Raman spectroscopy J. Colloid. Interface Sci. 1992: 48; 129–141.
- 104) Rayavarapu R.G, Petersen W, Ungureanu C, Post J.N, van Leeuwen T.G, and Manohar S. Synthesis and bioconjugation of gold nanoparticles as potential molecular probes for light-based imaging techniques. Int J Biomed Imaging. 2007: 2007; 29817.
- 105) Tero R, Misawa N, Watanabe H, Yamamura S, Nambu S, Nonogaki Y, Urisu T. Fabrication of avidin single molecular layer on silicon oxide surfaces and formation of tethered lipid bilayer membranes. e-J. Surf. Sci. Nanotechn. 2005: 3; 237–243.
- 106) Undomrat S, Prapam S, Puntheeranurak T. High-resolution Atomic Force Microscopic Imaging of Escherichia coli Immobilized on Mica Surface. J. Microscopy Soc. Thail. 2009: 23; 38-41.
- 107) Jing W, Shiyang H, Lina X, Ning G. Transmission electron microscopy and atomic force microscopy characterization of nickel deposition on bacterial cells. Chinese Science Bulletin 2007: 52; 2919-2924.
- 108) Lazcka O, Del Campo F.J, Munoz F.X. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. Biosens. Bioelectron. 2007: 22; 1205-1217.

- 109) Dudak F.C, Boyacı İ.H, Jurkevica A, Hossain M, Aquilar Z, Halsal H.B, Seliskar C.J, Heineman W.R. Determination of viable *Escherichia coli* using antibody coated paramagnetic beads with fluorescence detection. *Anal Bioanal. Chem.* 2009: 393; 949-956.
- 110) Waswa J, Irudayaraj J, DebRoy C. Direct detection of *E. coli* O157:H7 in selected food system by a surface plasmon resonance biosensor. *LWT-Food Science and Technology* 2007: 40; 187–192.
- 111) Sandhy S, Chen W, Mulchandani A. Molecular beacons: A real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Escherichia coli* from fresh produce and water. *Anal. Chim. Acta.* 2008: 614; 208–212.
- 112) Shen Z. H, Huang M.C, Xiao C, Zhang Y, Zeng X.Q, Wang P.G. Non-labeled Quartz Crystal Microbalance Biosensor for Bacterial Detection Using Carbohydrate and Lectin Recognitions. *Anal. Chem.* 2007: 79; 2312–2319.
- 113) Kim N, Park I. Application of a flow-type antibody sensor to the detection of *Escherichia coli* in various foods. *Biosens. Bioelectron.* 2003: 18; 1101–1107.
- 114) Ruan C, Wang H, Li Y. A bienzyme electrochemical biosensor coupled with immunomagnetic separation for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples. *Trans ASAE* 2002: 45; 249–255.

- 115) Dudak F.C, Boyacı I.H. Enumeration of Immunomagnetically Captured *Escherichia coli* in Water Samples Using Quantum Dot-Labeled Antibodies. *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* 2008: 16; 122–131.
- 116) Dudak F. C, Boyacı I. H. Development of an immunosensor based on surface plasmon resonance for enumeration of *Escherichia coli* in water samples. *Food Research International* 2007: 40; 803–807.
- 117) Boyacı İ.H, Aguilar Z.P, Hossain M, Halsal H.B, Seliskar C.J, Heinemann W. R. Amperometric Enumeration of *Escherichia coli* Using Antibody-coated Paramagnetic Beads. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005: 382; 1234–1241.
- 118) Miller J.N, Nawawi M.B, Burgess C. Detection of bacterial ATP by reversed flow-injection analysis with luminescence detection. *Anal. Chim. Acta* 1992: 266; 339-343.
- 119) Casimiri V, Burstein C. Biosensor for L-lactate determination as an index of *E. coli* number in crude culture medium. *Anal. Chim. Acta* 1998: 361; 45-53.
- 120) Gehring A.G, Crawford C.G, Mazenko R.S, Van Houten L.J, Brewster J.D. Enzyme-linked immunomagnetic electrochemical detection of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Immunological Methods* 1996: 195; 15-25.

- 121) McHugh I.O.L, Tucker A.L. Flow Cytometry for the Rapid Detection of Bacteria in Cell Culture Production Medium. Cytometry Part A 2007: 71; 1019-1026.
- 122) Water Microbiology Section, Environmental Health Division, of the Wisconsin State Laboratory of Hygiene, 2006. Available from: URL: <http://www.slh.wisc.edu/ehd/watermicro/index.ph>

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimi planlayıp yöneten, bilgi ve tecrübesi ile çalışmalarına yön veren, tezimin her aşamasında yanımda olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Uğur Tamer'e,

Çalışmalarım boyunca bilimsel katkılarını ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlanmamı sağlayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı'ya,

Deneysel çalışmalar süresince gerçekleştirdiğim basamakların işlevselliğini doğrulamak amacıyla bana laboratuvarını açan ve AFM sonuçlarının alınıp yorumlanmasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Nihal Aydoğan'a ve Sayın Arş. Gör. Hande Ünsal'a,

Çalışmalarım boyunca bana her konuda yardımcı olan, zamanını ve desteğini esirgemeyen Sayın Gıda Mühendisi Özlem Torun'a, ve Sayın Arş. Gör. Deniz Baş'a,

Her türlü destek ve dostluklarından dolayı tüm Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine,

Beni her konuda destekleyen, hayatta en değerli varlığım olan aileme saygı, sevgi ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

Adı	:Erhan
Soyadı	:Temür
Doğum Yeri ve Tarihi	:Beyoğlu – 1983
Eğitimi	:Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2002 – 2007) Mecidiyeköy Lisesi (1998 – 2001) Şair Behçet Kemal Çağlar İlköğretim Okulu (1995 – 1998) Lütfi Banat İlköğretim Okulu (1990-1995)
Yabancı Dili	: İngilizce
İş Deneyimleri	: Öz-Kimsan Sodyum silikat fabrikası-Bolu (stajyer) Hacettepe Üniversitesi Analitik Kimya Bölümü (stajyer) Gazi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Bölümü Araştırma Laboratuvarı Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Araştırma Laboratuvarı