T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GRAFİT TEMELLİ ELEKTROKİMYASAL SENSÖR İLE YAPAY İNSAN SIVILARINDA BAKTERİ TESPİTİ

Hazırlayan
Furkan SOYSALDI

Danışman
Doç. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU

Doktora Tezi

Haziran 2025
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GRAFİT TEMELLİ ELEKTROKİMYASAL SENSÖR İLE YAPAY İNSAN SIVILARINDA BAKTERİ TESPİTİ

(Doktora Tezi)

Hazırlayan
Furkan SOYSALDI

Danışman
Doç. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU

Haziran 2025
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Furkan SOYSALDI

İmza

“Grafit Temelli Elektrokimyasal Sensör ile Yapay İnsan Sıvılarında Bakteri Tespiti” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan	**Danışman**
Furkan SOYSALDI	Doç. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU

Biyomedikal Mühendisliği ABD Başkanı

Prof. Dr. Semra İÇER

TEŞEKKÜR

Bana çalışmalarım süresince her türlü yardımı ve fedakârlığı sağlayan, her zaman yol gösteren ve ilham veren değerli danışmanım Doç. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU'ya en içten teşekkürlerimi sunarım. Bilgisi ve yönlendirmeleri, bu zorlu süreçte bana rehberlik etti ve çalışmamın kalitesini artırmamı sağladı.

Bu çalışmanın yürütülmesi ve bilimsel makale hâline getirilmesinde değerli katkılarıyla yanımda olan Prof. Dr. Evren MUTLUGÜN ve Arş. Gör. Dr. Derya DİNÇYÜREK EKİCİ'ye, araştırmanın planlanmasından deneysel aşamaların uygulanmasına, verilerin değerlendirilmesinden makalenin yazım sürecine kadar her adımda sağladıkları bilgi birikimi, destekleri ve iş birlikleri benim için son derece kıymetli olmuştur.

Ayrıca değerli jüri üyelerim Doç. Dr. Ömer AYDIN ve Prof. Dr. Mustafa TÜRKMEN'e, tezimi değerlendirmeleri ve değerli geri bildirimleri için teşekkür ederim. Yorumlarınız ve önerileriniz, bu çalışmanın gelişmesinde önemli bir rol oynamıştır.

Emeği geçen bütün hocalarımın bu süreçte göstermiş oldukları özveri, titizlik ve bilimsel yaklaşımları sayesinde çalışmam daha nitelikli bir hâle gelmiştir. Kendileriyle bu süreci paylaşmış olmaktan büyük bir memnuniyet duyuyorum.

Her zaman yanımda olan, beni anlayan ve bu yolculukta bana güç veren sevgili aileme teşekkür ederim. Her birinizin fedakârlığı, sabrı ve destekleri bu başarıyı elde etmemde büyük bir önem arz etmiştir.

Bu başarı sadece benim değil, aynı zamanda beni her adımda destekleyen herkesin ortak başarısıdır.

Furkan SOYSALDI

Haziran 2025, KAYSERİ

GRAFİT TEMELLİ ELEKTROKİMYASAL SENSÖR İLE YAPAY İNSAN SIVILARINDA BAKTERİ TESPİTİ

Furkan SOYSALDI

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Doktora Tezi, Haziran 2025
Danışman: Doç. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU

ÖZET

Escherichia coli (*E. coli*) tespiti, uzun analiz süresi, yüksek maliyetler ve özgüllük gereksinimi gibi dezavantajlara sahiptir. Son teknoloji elektrokimyasal biyosensörler maliyet açısından verimli ve uygulanması kolay olsa da, duyarlılıkları ve analiz süreleri hâlâ iyileştirilmeye ihtiyaç duymaktadır. Bu çalışmada, hızlı tespit, düşük maliyet ve yüksek duyarlılık elde etmek için manyetik çekirdek-kabuk (Fe_2O_3@CdSe/ZnS) kuantum noktalarını (MQD'ler) kullanan kâğıt tabanlı bir elektrokimyasal biyosensör sunulmuştur. Algılama tekniği olarak elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EİS) kullanan biyosensör, 10^2–10^8 CFU/mL konsantrasyon aralığında *E. coli* bakterileri için $2{,}7 \times 10^2$ CFU/mL'lik bir tespit sınırına ve %3,5781'lik bir bağıl standart sapmaya (RSD) ulaşmıştır. Optik açıdan, *E. coli* konsantrasyonu 10^4'ten 10^7 CFU/mL'ye istikrarlı bir şekilde arttıkça, kuantum noktalarının floresan ömründe %60'tan fazla söndürülme gözlenmiştir. Bu hibrit biyosensör, 30 dakikalık hızlı bir analiz süresiyle hızlı, oldukça hassas *E. coli* tespiti sağlamıştır. Bu çalışma, elektrokimyasal ve optik biyosensör sistemlerinin tespit avantajlarını ilk kez grafit tabanlı bir kâğıt sensörde birleştirmesi bakımından, yerinde tanı uygulamalarının gereksinimlerini karşılama potansiyeline sahiptir. Üretim için optimize edilmiş, taşınabilir, grafit tabanlı sensör sisteminin gerçek gıda örnekleri, çevresel örnekler ve özellikle tıbbi klinik örnekler üzerindeki performansını incelemeyi amaçlayan gelecekteki çalışmaların umut verici olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Manyeto-optik, Biyosensör, Elektrokimyasal empedans spektroskopisi, Kuantum noktaları, Fe_2O_3@CdSe/ZnS

DETECTION OF BACTERIA IN ARTIFICIAL HUMAN FLUIDS WITH A GRAPHITE-BASED ELECTROCHEMICAL SENSOR

Furkan SOYSALDI

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences
PhD Thesis, June 2025
Supervisor: Assoc. Prof. Mehmet Çağrı SOYLU

ABSTRACT

Escherichia coli (*E. coli*) detection suffers from slow analysis time and high costs, along with the need for specificity. While state-of-the-art electrochemical biosensors are cost-efficient and easy to implement, their sensitivity and analysis time still require improvements. In this work, we present a paper-based electrochemical biosensor utilizing magnetic core-shell Fe_2O_3@CdSe/ZnS quantum dots (MQDs) to achieve fast detection, low cost, and high sensitivity. Using electrochemical impedance spectroscopy (EIS) as the detection technique, the biosensor achieved a limit of detection of 2.7×10^2 CFU/mL for *E. coli* bacteria across a concentration range of 10^2–10^8 CFU/mL, with a relative standard deviation (RSD) of 3.5781%. From an optical perspective, as *E. coli* concentration increased steadily from 10^4 to 10^7 CFU/mL, quantum dot fluorescence showed over 60% lifetime quenching. Thus, this hybrid biosensor provides rapid, highly sensitive *E. coli* detection with a fast analysis time of 30 min. This study, which combines the detection advantages of electrochemical and optical biosensor systems in a graphite-based paper sensor for the first time, has the potential to meet the needs of point-of-care applications. It is thought that future studies that will aim to examine the performance of the production-optimized, portable, graphite-based sensor system on real food samples, environmental samples, and especially medical clinical samples will be promising.

Keywords: Magneto-optic, Biosensor, Electrochemical impedance spectroscopy, Quantum dots, Fe_2O_3@CdSe/ZnS

İÇİNDEKİLER

GRAFİT TEMELLİ ELEKTROKİMYASAL SENSÖR İLE YAPAY İNSAN SIVILARINDA BAKTERİ TESPİTİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ii
TEŞEKKÜR v
ÖZET vi
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER viii
KISALTMALAR xii
TABLOLAR LİSTESİ xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ xv

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Erken Teşhisin Önemi 4
1.1.1. İdrar 5
1.1.2. İdrar Yolları Enfeksiyonu 6
1.1.3. İdrar Yolları Enfeksiyonuna Neden Olan Bakteriler 6
1.1.3.1. *Escherichia Coli* 6
1.1.3.2. *Proteus Mirabilis* 13
1.1.3.3. *Klebsiella Pneumoniae* 13
1.2. Nanomateryal 14
1.2.1. Manyetik Nanopartikül 14
1.2.2. Manyetik Kuantum Noktalar 17
1.3. Bakteri Tespit Yöntemleri 18
1.3.1. Halihazırda Kullanılan Klinik Yöntemler 20
1.3.1.1. Kültür Yöntemleri 20
1.3.1.2. IMViC Testi 21
1.3.1.3. Nükleik Asit Temelli Yöntemler (PCR) 21

1.3.1.4. Gerçek Zamanlı PCR **26**
1.3.1.5. İmmünolojik Temelli Yöntemler **26**
1.3.1.6. Lateks Aglütinasyon Testi **28**
1.3.1.7. MALDI-TOF **28**
1.3.2. Gelişmekte Olan Yöntemler **29**
1.3.2.1. Optik Biyosensörler **34**
1.3.2.2. Kütle Hassas Biyosensörler **36**
1.3.2.3. Elektrokimyasal Biyosensörler **39**
1.3.2.4. İmpedimetrik Elektrokimyasal Biyosensörler **41**
1.3.2.5. Kâğıt Tabanlı Grafit Temelli Elektrokimyasal Biyosensörler **47**
1.4. Tezin Hipotezi ve Amacı **53**

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2.1. Materyal **56**
2.1.1. Kimyasal Materyaller **56**
2.1.2. Biyolojik Materyaller **57**
2.1.3. Cihaz ve Ekipmanlar **58**
2.1.4. Ölçüm Sistemi **59**
2.2. Yöntem **61**
2.2.1. Kâğıt Sensör Üretimi **62**
2.2.1.1. Grafit Kaplama **63**
2.2.1.2. Hidrofobik Kaplama **65**
2.2.2. Hibrit Sensörün Üretimi **66**
2.2.2.1. Manyetik Kuantum Noktaları (MQDs) **67**
2.2.3. Nanopartikül Karakterizasyonu **67**
2.2.3.1. FTIR Analizi **68**
2.2.3.2. EDX Analizi **68**
2.2.4. Yüzey Modifikasyonları **68**
2.2.4.1. EDC/Sulfo-NHS Kaplama **68**
2.2.4.2. *E. coli* Antikorunun İmmobilizasyonu **69**
2.2.5. Yüzey Modifikasyonunun Karakterizasyonu **70**

2.2.5.1. QCM Analizi 70
2.2.6. *E. coli* Antijeni Tespiti 71
2.2.6.1. Biyosensörün Tespit Süresi Optimizasyonu 72
2.2.6.2. Biyosensörün Tespit Limiti ve Lineer Çalışma Aralığı Optimizasyonu 72
2.2.6.3. Biyosensörün Seçiciliği 72
2.2.6.4. Biyosensörün Kararlılığı 73
2.2.6.5. Biyosensörün Optik Optimizasyonu 73
2.2.7. Araştırılabilir İdrarda *E. coli* Tespiti 73
2.2.8. Seri Üretime Uygun Biyosensörle İdrar İçerisinde *E. coli* Tespiti 73
2.2.9. İstatistikî Analiz 74

3. BÖLÜM
YÖNTEMLERİN ANALİZİ VE BULGULAR

3.1. Kâğıt Tabanlı Grafit Temelli Hibrit Biyosensörlerin Üretimi 75
3.1.1. Hibrit Biyosensörün Karakterizasyonu ve Optimizasyonu 75
3.1.1.1. MNP ve MQD Kullanılan Yöntemlerin Analizi 75
3.1.1.2. Kuru Yöntemler Analizi 79
3.1.1.3. Nanopartiküllerin FTIR Karakterizasyon Analizi 81
3.1.1.4. Nanopartiküllerin TEM ve EDX Karakterizasyon Analizi 83
3.1.1.5. Nanopartiküllerin Elementel Karakterizasyon Analizi 83
3.1.1.6. Tespit Süresinin Analizi 84
3.1.1.7. Yüzey Modifikasyonlarının QCM ile Karakterizasyon Analizi 85
3.2. E. coli Tespiti 86
3.2.1. Kâğıt Sensörle Yapay İdrar İçerisinde E. coli Tespiti 86
3.2.1.1. Doz-Tepki Analizi ve Tespit Limitinin (LOD) Belirlenmesi 87
3.2.1.2. Seçicilik 88
3.2.1.3. Kararlılık 89
3.2.1.4. Optik Optimizasyonu 91
3.2.2. Kâğıt Sensörle Araştırılabilir İdrar İçerisinde E. coli Tespiti 94
3.2.2.1. Deney Prosedürü 95
3.2.2.2. Doz-Tepki Analizi ve Tespit Limitinin (LOD) Belirlenmesi 96

3.2.2.3. Kâğıt Biyosensörde Yapay İdrar ve Araştırılabilir İdrarın Karşılaştırılması 97
3.2.3. Seri Üretime Uygun Grafit Sensörle Araştırılabilir İdrar İçerisinde E. coli Tespiti 98
3.2.4. Seri Üretime Uygun Yeni Tasarımlı Grafit Sensörle Araştırılabilir İdrar İçerisinde E. coli Tespiti 99
3.2.4.1. Doz-Tepki Analizi ve Tespit Limitinin (LOD) Belirlenmesi 100
3.2.4.2. Seçicilik 102
3.2.4.3. Bütün Doz-Tepki Analizlerinin Karşılaştırılması 104
3.3. İstatistikî Analiz Sonuçları 106

4. BÖLÜM
TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1. Tartışma 108
4.2. Sonuç ve Öneriler 113
KAYNAKÇA 115
ÖZGEÇMİŞ 133

KISALTMALAR

$\%\Delta R_s$	: Elektrot-Çözelti Arayüz Direncinin Yüzdesel Değişimi
B. clausii	: *Bacillus clausii*
BSA	: Bovine Serum Albumin
C	: Kapasite
CFU	: Coloni Forming Units
C_s	: Elektrot-Çözelti Arayüz Kapasitansı
DIW	: Deiyonize Su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
E. coli	: *Esherichia coli*
EDC	: N-3-Dimethylaminopropyl-N′ethylcarbodiimide hydrochloride
EDX	: Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi
EİS	: Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
f	: Frekans
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
Hz	: Hertz
I	: Akım
İYE	: İdrar Yolları Enfeksiyonu
K. pneumoniae	: *Klebsiella pneumoniae*
kHz	: Kilohertz
mg	: Miligram
MHz	: Megahertz
mm	: Milimetre
MNP	: Manyetik Nanopartikül
MQD	: Manyetik Kuantum Noktacık
NP	: Nanopartikül
P. mirabilis	: *Proteus mirabilis*
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
QCM	: Kuartz Kristal Mikrobalans
R	: Direnç

R_m	: Ortam Çözeltisi Direncinden Oluşan Biyosensörün Empedansı
RNA	: Ribonükleik Asit
R_s	: Elektrot-Çözelti Arayüz Direnci
RSD	: Göreceli Standart Sapma
Sulfo-NHS	:N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
V	: Gerilim
Z	: Empedans
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. İshale neden olan *Escherichia coli*'nin beş ana patotipinin neden olduğu hastalıkların klinik, patolojik ve epidemiyolojik özellikleri 12
Tablo 1.2. *Escherichia coli* tespit yöntemleri 19
Tablo 3.1. CdSe/ZnS@Fe_2O_3 nanopartiküllerinin elementel analizi 84
Tablo 3.2. Temel tanımlayıcı istatistikler 106
Tablo 3.3. Normallik Testi Shapiro-Wilk 107
Tablo 4.1. *E. coli* tespit yöntemine göre çalışmalarının karşılaştırılması 111

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Bakteri sınıflandırması 7
Şekil 1.2. Tıbbi görüntüleme ve tedavide kullanılacak polimer kaplı MNP'lerin şematik gösterimi. a) Klinik olarak onaylanmış demir oksit çekirdekleri ve biyouyumlu kaplamalar b) Kabuk ve hidrofobik çekirdeğe sahip misel yapısı. 17
Şekil 1.3. PCR işlemi aşamaları 24
Şekil 1.4. Biyosensörün şematize edilmiş görünümü 30
Şekil 1.5. Nyquist ve Bode grafiklerinin gösterimi 45
Şekil 1.6. Randles hücresinin şematik olarak gösterimi: a) Eşdeğer bir devre, b) Nyquist grafiği ve c) Bode grafiği 46
Şekil 1.7. Grafitin atomik yapısı 49
Şekil 1.8. Grafit kurşun kalemlerin sertlik derecesi 51
Şekil 1.9. Grafitin atomik düzeyde bağlantısı 51
Şekil 2.1. EDC yapısı 56
Şekil 2.2. Sulfo-NHS yapısı 57
Şekil 2.3. *a)* PC arayüzü, empedans analizörü ve floresan ömür spektrometresi (ölçekli değil) içeren algılama sistemi b) Eşdeğer devre modeli 60
Şekil 2.4. Biyosensör fabrikasyonu, yüzey modifikasyonu ve bakteri tespit şematikleri 62
Şekil 2.5. Kâğıt tabanlı sensör çizimi 62
Şekil 2.6. Kâğıt tabanlı sensörün kurşun kalemle grafit kaplanması 63
Şekil 2.7. Seri üretime uygun olarak tasarlanan kalıp ve grafit sensörler 64
Şekil 2.8. Grafit sensör şeklinin tasarımsal değişikliği 65
Şekil 2.9. Kâğıt sensör hidrofobik kaplaması 66
Şekil 2.10. Grafit sensör hidrofobik kaplaması 66
Şekil 2.11. MQDs 67
Şekil 2.12. EDC/Sulfo-NHS mekanizması 69
Şekil 3.1. Farklı miktarlarda MNP ve MQD içeren 10^7 CFU/mL *E. coli* bakterisinin tespitinde ıslak ve kuru yöntemlerin karşılaştırılması 78

Şekil 3.2. Farklı miktarlarda MNP ve MQD içeren 10^7 CFU/mL *E. coli* bakterisinin saptanmasında kuru yöntemlerin karşılaştırılması 80
Şekil 3.3. CdSe/ZnS ve CdSe/ZnS@ Fe_2O_3 nanopartiküllerinin FTIR analizi 82
Şekil 3.4. CdSe/ZnS@ Fe_2O_3 nanopartiküllerinin enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) ve TEM analizleri 83
Şekil 3.5. Nanopartiküller için tespit süresi analizi a) MNP b) MQD 84
Şekil 3.6. Manyetik kuantum noktaları (MQD) içeren yüzey modifiye QCM sensörü ile *E. coli* ATCC 25922 bakterilerinin tespitinde her adım için elde edilen frekans kayması tepkileri 85
Şekil 3.7. Kâğıt Biyosensörle Yapay İdrar İçerisinde *E. coli* tespitinin Doz tepki analizi ve LOD hesaplanması 87
Şekil 3.8. Kâğıt biyosensörün yapay idrar içerisinde bakterilere olan seçiciliği 89
Şekil 3.9. Kararlılık testi 91
Şekil 3.10. Üzerlerine farklı konsantrasyonlarda *E. coli* bağlı kuantum noktalarının ortalama ömrü 93
Şekil 3.11. Kâğıt biyosensörde araştırılabilir idrarla yapılan doz-tepki analizi 97
Şekil 3.12. Kâğıt sensörle yapılan yapay idrarlı deneylerin ve araştırılabilir idrarlı deneylerin doz-tepki grafiklerinin kıyaslanması 98
Şekil 3.13. Seri üretime uygun üretilen grafit sensörler 99
Şekil 3.14. Yeni tasarıma sahip grafit sensörlerin üretim aşamaları 100
Şekil 3.15. Yeni tasarımlı grafit sensörlerde laboratuvar ortamında kullanılabilen idrar içerisinde *E. coli* tespitinin doz-tepki analizi 101
Şekil 3.16. Yeni tasarımlı grafit biyosensörün laboratuvar ortamında kullanılabilen idrar içerisinde bakterilere olan seçiciliği 103
Şekil 3.17. Doz-Tepki analizlerinin kıyaslanması 105

GİRİŞ

İnsan vücudundaki sıvılar, organizmanın fizyolojik durumunu yansıtan önemli biyolojik örneklerdir. Bu sıvılar arasında kan, idrar, tükürük, ter, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve vajinal sıvılar gibi çeşitli örnekler yer almaktadır. Her biri, içerdiği biyokimyasal bileşenler sayesinde farklı hastalıkların tanı ve takibinde kullanılmaktadır. Özellikle girişimsel olmayan (non-invaziv) yöntemlerle kolayca elde edilebilen idrar, enfeksiyonların tespiti açısından pratik ve değerli bir örneklerdir. Bu nedenle insan vücut sıvılarının analizine yönelik geliştirilen hassas tanı teknolojileri, sağlık alanında erken teşhis ve etkili tedavi süreçlerine önemli katkılar sağlamaktadır.

İdrar yolu enfeksiyonları (İYE), dünya genelinde her yıl yaklaşık 150 milyon kişiyi etkileyen yaygın bir sağlık sorunudur. Özellikle kadınlar, çocuklar ve yaşlılar bu enfeksiyonlar açısından daha yüksek risk altındaki gruplardır. İYE'lerin hızlı, güvenilir ve ekonomik bir şekilde tespit edilmesi; hem bireysel sağlık hem de sağlık sistemi üzerindeki yükün azaltılması açısından kritik öneme sahiptir. Bu bağlamda biyosensör teknolojileri, özellikle impedimetrik elektrokimyasal sensörler, idrarda patojen tespitinde umut verici bir yöntem sunmaktadır. Tez kapsamında geliştirilen yüzey modifikasyon stratejileri ve elektrot işlevselleştirmeleri, İYE tanısında kullanılabilecek hassas, düşük maliyetli ve pratik sensörlerin geliştirilmesine katkı sağlamayı hedeflemektedir.

Escherichia coli (*E. coli*), genellikle insan ve hayvanların bağırsaklarında bulunan zararsız bir bakteri türüdür. Ancak bazı suşları yani alt türleri idrar yollarına geçtiğinde enfeksiyona yol açabilir. Tüm idrar yolu enfeksiyonlarının yaklaşık %80'i *E. coli* kaynaklıdır. Bu bakteri, mesane ve böbrek gibi yapılarda iltihap oluşturarak ateş, ağrı, idrarda kan gibi belirtilere neden olabilir. Artan antibiyotik direnci, *E. coli* kaynaklı enfeksiyonların tedavisini güçleştirmekte; dolayısıyla erken ve doğru tanının önemini daha da artırmaktadır.

Gelişen tanı teknolojileri içinde biyosensörler, patojenlerin hızlı ve doğru bir şekilde saptanması açısından büyük bir potansiyel sunmaktadır. Biyosensörler, biyolojik bileşenlerin tanınmasıyla kimyasal veya fiziksel sinyallere dönüştürülmesini sağlayan elektronik elemanlardır. Bu sistemler; tıp, çevre sağlığı, gıda güvenliği ve biyoteknoloji gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. İdrar yolu enfeksiyonlarının erken teşhisinde özellikle impedimetrik elektrokimyasal sensörler, düşük maliyetli ve hızlı sonuçlar sunabilmektedir. Ancak bu sensörlerin hassasiyeti büyük ölçüde kullanılan elektrotların yüzey özelliklerine bağlıdır. Yüzey modifikasyonu, biyosensör performansını artıran en kritik aşamalardan biridir.

Tez kapsamında, *E. coli* bakterisi spesifik olarak klinik tespit sınırlarının altında bir hassasiyetle saptanmıştır. Grafit, kâğıt, oje gibi kolayca temin edilebilen ucuz materyaller kullanılarak el yapımı biyosensörler geliştirilmiştir. Elektrokimyasal ve optik ölçüm tekniklerini aynı anda gerçekleştirebilen hibrit bir biyosensör tasarlanmıştır. Bu sensörde nanomalzemeler kullanılmış; böylece 11-14 nm çapındaki parçacıklarla yapılan yüzey modifikasyonları sayesinde hem elektrokimyasal hem de optik ölçümlerden yüksek verim elde edilmiştir.

Tez kapsamında çeşitli metotlar ve materyaller test edilmiştir. İlk olarak, nanomalzeme seçimine odaklanılmıştır. MNP ve MQD nanoparçacıkları ile yapılan deneyler sonucunda MQD'nin daha verimli olduğu belirlenmiştir. Ardından, antikor immobilize edilen MQD'nin kâğıt sensöre kuru ve ıslak yöntemlerle bağlanma verimliliği karşılaştırılmıştır. Bu deneylerin ardından, EDC/Sulfo-NHS çapraz bağlayıcısı kullanılarak antikorların MQD'ye immobilize edilmesi ve kuru yöntemle sensöre uygulanması tercih edilmiştir.

İlerleyen aşamada, *E. coli* bakterisinin tespit edildiği ortamın gerçekliğini artırmak amacıyla yapay idrar (PBS) ile laboratuvar ortamında toksik olmayan negatif insan idrarı karşılaştırılmıştır. Kuru yöntemle hazırlanmış sensör, EDC/Sulfo-NHS ile antikor bağlanmış MQD'ler sayesinde, *E. coli* bakterisini 10^2–10^8 CFU/mL konsantrasyon aralığında, 2,7 × 10^2 CFU/mL tespit sınırıyla hem elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EİS) hem de optik olarak saptayabilmiştir.

Üretilen sensör ve MQD'ler ve yüzey modifikasyonları, elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EİS) ve floresan zamanla ilişkili tek foton sayma yöntemi (TCSPC) ile

doğrulanmıştır. Elde edilen olumlu sonuçlar neticesinde, biyosensörün seri üretime uygun hâle getirilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır.

Tez kapsamında bakteriyi özgül olarak tespit edebilen, uygun maliyetli ve hassas ölçüm yapabilen bir hibrit biyosensör geliştirilmesi literatüre kazandırılmıştır. Bu yaklaşımın kapsamı genişletilerek farklı bakteri, virüs gibi mikroorganizmaların tespiti ya da tükürük ve dışkı gibi diğer insan sıvılarından teşhis yapılması yönünde büyük bir potansiyele sahiptir.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Erken Teşhisin Önemi

E. coli'nin etkili bir şekilde tespiti için hızlı ve hassas yöntemlerin geliştirilmesi sadece hastalar için değil aynı zamanda halk sağlığı için de önemlidir. Çünkü, bakteriler ve virüsler yani mikroorganizmalar hayatımızın her yerindedir, ancak patojenik suşlar, izleme ve sınıflandırmanın doğru, hızlı, kolay, uygun fiyatlı ve yerinde yapılamadığı durumlarda bulaşıcı hastalıklara, salgınlara ve ölümlere neden olur [1]. 2019 yılında SARS-CoV-2 olarak isim verilen virüsün neden olduğu Covid-19 salgınının etkilerinin pandemiye dönmesiyle insanoğlunun hayatının nasıl olumsuz etkilendiği bilinmektedir. Hatta aşı olanların veya hastalığı geçirenlerin günümüzde hangi olumsuz etkilere sebep olduğu veya olacağı halen merak konusudur. Tabi ki SARS-CoV-2 virüsüne bağlı hasta olan kişiler erken teşhis edebilseydi bu durumların tamamen önüne geçilebilirdi.

E. coli'nin yetersiz tespiti, uzun tedavi süresine ve dolayısıyla bulaşıcı hastalıkların yayılmasına ve kötüleşmesine neden olur. Şu anda *E. coli* tespiti için kullanılan geleneksel tespit teknikleri, kültür (plakalama ve koloni sayımı) yöntemleri, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA) içerir. Bahsedilen tüm geleneksel yöntemler, bir salgının veya biyoterörizm saldırısı yanıtının zamanında tanımlanması için çok yavaştır. Hastalığın erken evrede belirlenmesi, tedavinin başarısını önemli ölçüde artırmaktadır. Erken tanı sayesinde hastalığın ciddi etkileri hafifletilebilir, oluşabilecek komplikasyonlar önlenebilir ya da geciktirilebilir. Bu durum hem hastanın yaşam kalitesini yükseltir hem de tedavi sürecinin maliyetini düşürerek hastanın karşılaşabileceği zorlukların azalmasına katkı sağlar [2, 3].

1.1.1. İdrar

İnsan vücudunda dolaşan kan hacmi cinsiyete göre değişiklik gösterir. Yetişkin bir kadında ortalama 4-5 litre, yetişkin bir erkekte ise 5-6 litre kan bulunmaktadır. Böbreklerimiz bu kanı günde yaklaşık 40 kez süzmekte ve bu sayede günlük 200 litre kan temizlenmektedir. Bu sürecin sonucunda vücut, günde ortalama 2 litre idrar üretmektedir.

İdrar oluşumu, üç temel fizyolojik mekanizma ile gerçekleşir. Bunlar; böbrek glomerüllerinde gerçekleşen pasif fiziksel filtrasyon, proksimal tübüllerde su ve elektrolitlerin yaklaşık %99'unun geri emilimi ve son olarak distal tübüllerde işleyen aktif atım mekanizmalarıdır. Bu işlemlerin sonucunda meydana gelen idrar, organizmadaki metabolik faaliyetlerin önemli bir biyolojik göstergesidir.

İdrarın kimyasal bileşimi yaklaşık %95 su ve %5 çözünmüş maddelerden oluşur. İnorganik bileşenler (%2) arasında sodyum (Na^+), potasyum (K^+), klorür (Cl^-), kalsiyum (Ca^{2+}) ve fosfat (PO_4^{3-}) bulunur. Organik bileşenler (%3) ise üre (2%), kreatinin ve ürik asitten oluşmaktadır. Normalde idrarda bulunmayan protein, glukoz ve keton cisimleri gibi maddelerin varlığı patolojik durumlara işaret edebilir.

İdrarın fiziksel ve kimyasal özellikleri klinikte önemli tanısal bilgiler sağlar. Renk değişiklikleri; koyu sarı (dehidratasyon), kırmızı (hematüri) veya kahverengi (bilirubinüri) gibi farklı patolojileri gösterebilir. Kimyasal anormallikler arasında nitrit pozitifliği (Gram-negatif bakteri varlığı, özellikle *E. coli*), pH >8 (üreaz üreten mikroorganizmalar, örneğin *Proteus mirabilis*) ve proteinüri (glomerüler hasar veya hipertansiyon) sayılabilir.

İdrar analizinde elektrolit düzeylerinin değerlendirilmesi önemli klinik bilgiler verir. Sodyum düzeyleri dehidratasyon veya böbrek yetmezliği, potasyum düzeyleri renal disfonksiyon veya diüretik etki, kalsiyum düzeyleri ise hiperkalsiüri veya nefrolitiazis hakkında bilgi sağlar. Lökosit esteraz varlığı üriner sistem enfeksiyonunu düşündürür.

Normal koşullarda idrar sterildir, ancak kadınlarda üretranın kısa olması nedeniyle özellikle *E. coli* kaynaklı idrar yolu enfeksiyonları sık görülür. Nitrit testi ile Gram-negatif bakteri varlığı taranabilir.

İdrarda amonyak düzeylerinin artışı karaciğer disfonksiyonunu, keton cisimlerinin varlığı diyabetik ketoasidozu, bilirubin ise hepatobilier patolojileri düşündürmelidir. İdrar analizi, rutin check-uplarda ve renal, metabolik ile enfeksiyöz hastalıkların erken tanısında kritik rol oynar. Özellikle asemptomatik bakteriürinin saptanmasında altın standart yöntem olarak kabul edilir [4-6].

1.1.2. İdrar Yolları Enfeksiyonu

İdrar yolları enfeksiyonu (İYE), dünya çapında yılda yaklaşık 150 milyon kişiyi etkileyen ve ABD'de yıllık 8 milyon poliklinik başvurusuna neden olan yaygın bir sağlık sorunudur. Kadınlar, erkeklere göre 6 kat daha fazla risk altında olup, kadınların %50'si yaşamlarında en az bir kez İYE geçirmekte, %30'unda nüks görülmekte ve %20'sinde tekrarlayan enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır [7]. İYE'ler alt idrar yollarını etkilediğinde sistit (idrar yaparken yanma, sık idrara çıkma), üst idrar yollarını etkilediğinde ise piyelonefrit (ateş, böğür ağrısı) olarak kendini gösterir. Özellikle yaşlılar ve çocuklarda belirtiler atipik olabilir [8].

En sık etken %70-95 oranında *E. coli* olup, semptomatik bireylerde $\geq 10^2$ CFU/mL, asemptomatik bireylerde ise $\geq 10^5$ CFU/mL eşik değerleri tanı koydurucudur [9]. Diğer önemli patojenler arasında *Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis* ve *Staphylococcus saprophyticus* yer alır. Risk faktörleri (kadın cinsiyet, cinsel aktivite, diyabet vb.) ve uygun antibiyoterapi, hastalık yönetiminde kritik öneme sahiptir.

1.1.3. İdrar Yolları Enfeksiyonuna Neden Olan Bakteriler

1.1.3.1. *Escherichia Coli*

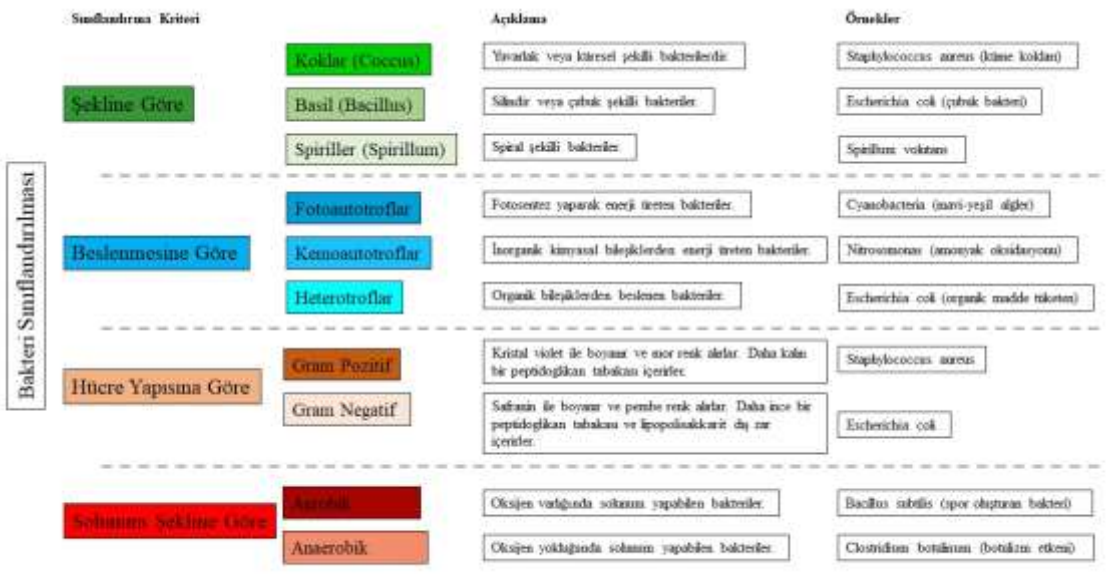
Bakteriler, bağımsız olarak yaşayabilen en küçük prokaryotik hücrelerdir ve 1-5 µm boyutlarındadır. Ancak mikroskop altında görülebilirler. Sitoplazma hücre zarı ile çevrilidir; DNA, mRNA, ribozomlar, metabolitler, enzimler, iyonlar, plazmitler ve depolanmış parçacıkların tümü bu amorf sulu sıvıda mevcuttur. DNA, ökaryotik hücrelerin aksine çift sarmallı bir sarmal yapıya sahiptir ve tektir. Ayrıca görünür bir zarı yoktur. DNA, sitoplazmanın nükleoid adı verilen bir bölgesinde bulunur [10].

Bakteriyel ribozomlar 30S ve 50S alt birimlerinden oluşur ve 70S şekline sahiptir. Ökaryotik ribozomlarda bu durum 80S (40S+60S) şeklindedir. Hücre duvarı, ökaryotik

hücrelerde bulunmayan, peptidoglikan (murein) adı verilen bir ağ yapısına sahiptir. Bakteri şeklinin korunmasını, osmotik basınç gibi dış etkenlere karşı direnci, fagositoza karşı korumayı sağlar. Aynı zamanda bakterilerin üreme evresindeki başlangıç yapısıdır [11].

Bakteriler iki parçaya bölünerek çoğalma özelliğine sahiptir. Ana hücreden iki özdeş yeni hücre oluşur. Bölünmenin zamanlaması türler arasında farklılık gösterir; dakikalar içinde veya birkaç gün içinde ortaya çıkabilir. Bireysel bakteri hücreleri katı ortama ekildiğinde, yeni çoğalan hücreler bir araya toplanır ve "koloni" adı verilen görünür hücre kümeleri oluşturur [12].

Bakterilerin mikroskobik özellikleri Gram boyama ile belirlendi. Gram lekeleri Gram-pozitif ve Gram-negatif lekeler olarak sınıflandırılır ve bakterileri bu iki gruba sınıflandırır. Bakteri duvar yapısındaki farklılıklar nedeniyle Gram-pozitif bakteriler mor renkte, Gram-negatif bakteriler ise pembe renkte boyanır. Bakteriler, Şekil 1.1.'de gösterildiği gibi Gram boyama, solunum, beslenme ve şekle göre sınıflandırılır [13].



Şekil 1.1. Bakteri sınıflandırması

E. coli, Enterobacteriaceae familyasına ait olup çubuk şeklinde Gram-negatif bir bakteridir. Bu bakteri, doğası gereği fakültatif anaerobiktir ve laboratuvar ortamlarında kolaylıkla yetiştirilebilir. *E. coli*, sıcakkanlı hayvanların bağırsak florasında yaygın olarak

bulunur ve özellikle insanlar için önemlidir. *E. coli*'nin serolojik profilinin anlaşılması, hangi fajlara sahip olduğu ve enterotoksin üretip üretmediğinin anlaşılması, farklı patojenik özelliklere sahip suşların ayırt edilmesinde önemlidir. *E. coli*'nin farklı türleri vardır ve bunlar özellikle enterotoksijenik türler, enterohemorajik türler, enteropatojenik türler, enteroinvazif türler ve enteroagregatif türler olarak ayrılır [14].

E. coli ismini, memelilerin kalın bağırsağında doğal olarak bulunmasından alır. Endospor oluşturmayan bu bakterinin boyutları yaklaşık olarak 2,0 μm uzunluk ve 0,5 μm çapındadır. İlk kez 1885 yılında Theodor Escherich tarafından bebek dışkısından izole edilerek tanımlanan *E. coli*, doğumdan kısa süre sonra yenidoğanların gastrointestinal sistemine yerleşerek burada kolonize olur. Çoğu zaman insan vücudunda herhangi bir zarara yol açmadan yaşamını sürdüren bu bakteri, bağışıklık sistemi zayıf bireylerde veya gastrointestinal bariyerleri aşabildiği durumlarda enfeksiyonlara sebep olabilir. İnsan kaynaklı *E. coli* suşları, hem bağırsak enfeksiyonları (örneğin diyare) hem de bağırsak dışı hastalıklarla ilişkilendirilebilir [15].

E. coli'nin insan sağlığı üzerindeki etkileri oldukça çeşitlidir ve özellikle gıda kaynaklı enfeksiyonlarda başlıca etkenlerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu bakteri, gıda güvenliği açısından ciddi bir tehdit oluşturur ve bu nedenle suşlarının belirlenmesi ve takibi, gıda endüstrisi için hayati öneme sahiptir. Ayrıca, bazı *E. coli* suşları hem insanlarda hem de hayvanlarda ağır hastalıklara yol açabilir. Bu bağlamda, *E. coli*'nin doğru şekilde tanımlanması, sınıflandırılması ve izlenmesi; halk sağlığının korunması açısından sağlık otoriteleri ve bilim insanları için büyük önem taşımaktadır [16, 17].

***Escherichia coli*'nin Genel Özellikleri**

***Escherichia coli*'nin taksonomik sınıflandırması:**

E. coli, Enterobacteriaceae familyasına ait olup Escherichia cinsinin bir üyesidir. Bu türün taksonomik konumu, bakterilerin genel sınıflandırma sistemi doğrultusunda aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır:

• Alem: *Bacteria*

• Şube: *Proteobacteria*

• Sınıf: *Gammaproteobacteria*

• Takım: *Enterobacterales*

• Familya: *Enterobacteriaceae*

• Cins: *Escherichia*

• Tür: *Escherichia coli*

E. coli'nin morfolojik, fizyolojik, ekolojik ve patojenik özelliklerine ilişkin temel bilgiler aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuştur [18].

***Escherichia coli* (*E. coli*) bakterisinin genel özellikleri:**

Morfoloji: Morfolojik olarak *E. coli*, çubuk formunda (basiller) bir bakteri olup, genellikle 2–6 µm uzunluğunda ve 0,5–1 µm çapında tek hücreli yapıya sahiptir. Bazı suşlar hafif eğri bir morfoloji sergileyebilir. Ayrıca, hücre duvarlarında "pili" olarak adlandırılan ince, ipliksi uzantılar gözlemlenebilir [19, 20].

Hücre Duvarı ve Gram Boyama: *E. coli* bakterileri, yapısal olarak gram-negatif hücre duvarına sahiptir. Bu duvar, ince bir peptidoglikan tabakasının yanı sıra dış membran ve lipopolisakkarit (LPS) bileşenlerinden oluşur. Bu özgün yapı, gram boyama sırasında bakterinin pembe ya da kırmızı renkte boyanmasına neden olur [19, 20].

Metabolizma: *E. coli,* heterotrofik bir mikroorganizmadır ve enerji üretimi için başlıca karbon kaynağı olarak genellikle glukozu tercih eder. Oksijenin mevcut olduğu koşullarda aerobik solunum gerçekleştirebilirken, oksijen bulunmadığında ise anaerobik solunum yolunu kullanabilir. Bunun yanı sıra, çeşitli karbon kaynaklarını metabolize edebilme kapasitesine de sahiptir [19, 20].

Habitat: *E. coli,* başta insanlar olmak üzere sıcakkanlı hayvanların kalın bağırsaklarında yoğun şekilde bulunan bir bakteridir. Bununla birlikte, dışkı kaynaklı kontaminasyon nedeniyle çevresel ortamlarda, özellikle su ve toprakta da yaygın olarak rastlanabilir. İnsan ve hayvan dışkıları, *E. coli*'nin doğal yaşam alanı olarak kabul edilmektedir [19, 20].

Üreme ve Çoğalma: *E. coli,* elverişli çevre koşullarında hızlı çoğalma yeteneğine sahip bir bakteridir. Uygun besin ortamlarında, hücre bölünme süresi genellikle 20–30 dakika arasında gerçekleşir. *E. coli*'nin optimum üreme sıcaklığı ise yaklaşık 37 °C olup, bu değer insan vücut sıcaklığıyla uyumludur [19, 20].

Patoloji ve Patojeniklik: *E. coli,* çoğu durumda insan sağlığı açısından zararsızdır ve normal bağırsak mikrobiyotası içerisinde yer alır. Ancak bazı suşlar patojenik özellikler taşıyabilir ve çeşitli gastrointestinal hastalıklara yol açabilir. Bu patojenik türler arasında enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC) ve enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) gibi klinik açıdan önemli alt tipler bulunmaktadır [19, 20].

Genetik Araştırmalarda Kullanımı: *E. coli,* mikrobiyoloji ve genetik araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir model organizmadır. Özellikle rekombinant DNA teknolojileri ve genetik mühendislik çalışmaları için önemli bir araçtır [19, 20].

Patojenik Escherichia Coli Bakterisi

E. coli bakterisi, 20. yüzyılın başlarında salgınlara yol açan, özellikle şiddetli bir infantil gastroenterit türü olan *kolera infantum'*un nedeni olduğu rapor edilen bir bakteridir. Ancak, *E. coli*'nin tanınmasını sağlayan önemli olaylar, Bray ve Beavan tarafından rapor edilen birincil bağırsak patojeni olduğu bulgusuyla başlamıştır. Özellikle, *Bacterium coli neopolitanum* adını verdikleri belirli bir *E. coli* suşunun çocuk ishaliyle ilişkilendirildiğini belirtmişlerdir [21-24].

Daha sonra, *E. coli* ile ilişkili ishal salgınları çeşitli hastane ve toplumda rapor edilmiştir; her salgın türü, keşfeden kişiden benzersiz bir ad alır. Ancak, *E. coli'*nin çeşitli suşlarının belirli O serogruplarına (somatik antijen) ait olduğunun fark edilmesi, bir kafa karışıklığına neden olmuştur. Bu karışıklık, Danimarkalı bakteriyolog Fritz Kauffmann tarafından çözülmüştür. Kauffmann, *Salmonella enterica* için geliştirdiği serotipleme şemasını *E. coli* ile kullanmak için uyarlama ihtiyacını fark etmiştir. Bu şema, *E. coli* izolatlarını yüzey O (somatik) ve H (kamçılı) antijenleriyle ayırt etmek için temel alınmıştır [21-24].

Bu şemanın hızlı bir şekilde fayda sağladığı görülmüştür; çünkü *E. coli* suşlarının çoğunun, özellikle O111 ve O55 gibi belirli O serogruplarına ait olduğu ortaya çıkmıştır. Günümüzde *E. coli*'nin 180'den fazla O sero grubu tanınmakta ve bunlar, potansiyel olarak 60'tan fazla H serotipine bölünebilmektedir. Ancak, bazı izolatlar tiplendirilememektedir çünkü serumda otoaglütinasyona neden olur veya mevcut antiserumlarla tiplendirilemez. Bu sınırlamalar, serolojik tiplendirmenin yerini genetik tiplendirmenin alabileceğini göstermektedir [21-24].

E. coli'nin patojenik potansiyeline dair ikna edici epidemiyolojik kanıtlar, araştırmacıları bu bakterilerin insan sağlığı üzerindeki etkilerini derinlemesine incelemeye sevk etmiştir. İlk olarak, enteropatojenik *E. coli* (EPEC) suşları, insanlar için önemli bağırsak patojenleri olarak tanımlanmıştır. Ancak, zamanla bazı *E. coli* suşlarının kolera benzeri ishale, bazılarının ise *Shigella* benzeri dizanteriye yol açabileceği gözlemlenmiştir. Bu bulgular, *E. coli*'nin patojenik özelliklerinin daha detaylı bir şekilde araştırılmasına olanak sağlamıştır [21-24].

Bugün, ishale neden olan farklı *E. coli* suşlarının patojenik kategorileri tanınmaktadır. Her kategori, hastalığın klinik, patolojik ve epidemiyolojik özelliklerini belirleyen spesifik virülans faktörleriyle tanımlanır. Bu virülans faktörleri, hastalığın gelişimini ve seyrini etkileyen unsurlardır. Koch'un postülatlarına uygun olarak beş ana patojenik kategori tanımlanmıştır: EPEC, ETEC, EIEC, EHEC ve EAEC (Tablo 1.1'de detaylandırılmıştır) [21]. Her kategori, belirli virülans faktörlerini paylaşan *E. coli* klonlarının bir grubunu temsil etmektedir

Tablo 1.1. İshale neden olan *Escherichia coli*'nin beş ana patotipinin neden olduğu hastalıkların klinik, patolojik ve epidemiyolojik özellikleri [21]

Patotip	**Klinik Sunum**	**Bağırsak Patolojisi**	**Duyarlı Nüfus**
ETEC	Sulu, kolera benzeri ishal	Kayda değer bir değişiklik yok	Az gelişmiş ülkelerdeki çocuklar; bu ülkelere seyahat edenler
EIEC	Basilli dizanteri	Çoğunlukla kalın bağırsak olmak üzere mukozanın iltihaplanması ve bozulması	Her yaştan; az gelişmiş ülkelerde daha yaygın
EPEC	Spesifik olmayan gastroenterit	Bağırsak boyunca yapışan-silinen lezyonlar	Az gelişmiş ülkelerde 2 yaşın altındaki çocuklar
EHEC	Kanlı ishal	"Hemorajik kolit"; kalın bağırsakla sınırlı olan yapışma-silme lezyonları; Şiddetli vakalarda nekroz	Sanayileşmiş ülkelerde çocuklar ve yaşlılar
EAEC	Kalıcı ishal	Enflamasyon	Az gelişmiş ülkelerdeki çocuklar; bu ülkelere seyahat edenler

Escherichia Coli ATCC 25922 Suşu

ATCC 25922 numaralı *E. coli* suşu, ilk kez 1946 yılında Washington'daki bir klinik örnekten izole edilmiştir ve patojenik olmayan bir türdür. Genetik ve biyokimyasal araştırmaların yanı sıra laboratuvar testlerinde de yaygın olarak kullanılan bu suş, özellikle antibiyotik duyarlılık testlerinde kontrol suşu olarak referans alınmaktadır [25].

Laboratuvar testlerinde doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edebilmek için güvenilirlik büyük önem taşır, bu nedenle standart ve kararlı kontrol suşları kullanılır. ATCC 25922, Gram-negatif bakteriler arasında bu rolü üstlenen suşlardan biri olarak kabul edilmekte ve antibiyotik duyarlılık testleri ile diğer laboratuvar çalışmalarında sonuçların güvenilirliğini sağlamak için referans noktası olarak kullanılmaktadır. Bu sebeple, araştırmacılar ve laboratuvar teknisyenleri, deneylerinin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini temin etmek amacıyla sıklıkla ATCC 25922 suşunu kontrol suşu olarak kullanmaktadırlar [25].

1.1.3.2. *Proteus Mirabilis*

Proteus mirabilis, Gram-negatif, fakültatif anaerobik ve çubuk şeklinde bir bakteri olup, ince bir peptidoglikan tabakasıyla çevrili bir hücre zarına sahiptir. Fakültatif anaerobik olması, oksijenli ve oksijensiz ortamlarda yaşamını sürdürebilmesine olanak tanır. Bu bakteri, kendine özgü kaynayan hareketlilik sergileyerek hareket eder ve yüksek miktarda üreaz enzimi üretir. Üreaz, üreyi amonyağa ve ürik asite parçalayarak amonyak üretir, bu da idrarın pH'ını yükseltir ve taş oluşumunu kolaylaştırabilir. *Proteus mirabilis,* insanlarda birçok enfeksiyona yol açar ve tüm *Proteus* kaynaklı enfeksiyonların yaklaşık %90'ından sorumludur. Toprak ve su gibi çevresel alanlarda yaygın olan bu bakteri, sürü hareketliliği adı verilen işbirlikçi bir hareket mekanizması kullanarak katı yüzeylerde veya cihazlarda hareket edebilir. Bu özellik, enfeksiyonların yayılmasında ve cihazlara yapışmasında etkili olabilir. Özellikle, *Proteus mirabilis* idrar yolu enfeksiyonlarıyla ilişkilidir ve komplike ya da kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonlarında sıkça görülür. Bu tür enfeksiyonlar, dışarıdan gelen mikroorganizmaların idrar yollarına girmesi veya normal floradaki bakterilerin aşırı büyümesiyle meydana gelir. Üreaz aktivitesi, idrar yolu enfeksiyonları oluşumuna katkıda bulunabilir, çünkü yüksek idrar pH'ı taş oluşumuna neden olabilir ve enfeksiyonların şiddetini artırabilir. Sonuç olarak, *Proteus mirabilis,* özellikle idrar yolu enfeksiyonları ile ilişkilendirilen ve enfeksiyon oluşumunda flagella kaynaklı hareketliliğiyle üreaz aktivitesinin önemli rol oynadığı sık görülen bir patojendir [26-29].

1.1.3.3. *Klebsiella Pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae Gram-negatif, çubuk şeklinde bir bakteri olup, *Enterobacteriaceae* ailesine aittir ve insan vücudunun ağız, deri ve bağırsak gibi normal

bölgelerinde bulunur, çoğu zaman zararsızdır. Ancak, bazı durumlarda solunum yolu enfeksiyonlarına, özellikle pnömoniye neden olabilir ve idrar yolu enfeksiyonları gibi diğer hastalıkları da tetikleyebilir. Bu bakterinin hastalık yapma potansiyelini artıran özelliklerinden biri, hücre yüzeyinde bulunan kapsüllü polisakkarit yapıdaki K antijenlerinin bağışıklık sisteminden kaçınmasına ve enfeksiyon yapmasına yardımcı olmasıdır. O antijenleri de patojenik özellikler gösterebilir. *Klebsiella pneumoniae*, hastane ortamlarında önemli bir patojen olarak dikkat çeker; hastane enfeksiyonlarının yayılmasında rol oynayabilir ve antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilir. Bu nedenle, hastane enfeksiyonlarının önlenmesi ve kontrolü için büyük önem taşır. Ayrıca, bazı *Klebsiella pneumoniae* suşları azot fiksasyonu yapabilme yeteneğine sahiptir, bu da onları toprakta ve tarım alanlarında önemli bir rol üstlenmelerini sağlar. Bu özellik, bitkilerin azot alımını artırarak tarım ürünlerinin verimliliğini yükseltebilir. Sonuç olarak, *Klebsiella pneumoniae*, özellikle hastane ortamlarında ciddi enfeksiyonlara yol açabilen ve birçok hastalığa neden olabilen bir bakteridir, bu yüzden bu bakteriyle ilgili enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisi büyük önem taşır [30-33].

1.2. Nanomateryal

Maddenin en küçük yapı taşları olan atom ve moleküllerin bir araya gelmesiyle oluşan, çıplak gözle görülmeyen ve metrenin milyarda biri (nanometre) ölçeğinde olan malzemelere nanomalzemeler denir. Bu malzemeler, küçük boyutlarına rağmen yüksek dayanıklılık, hafiflik, üstün elektrik iletkenliği gibi dikkat çekici özelliklere sahip olabilirler. Bu nedenle tıp, elektronik ve enerji gibi birçok alanda yaygın kullanım alanları bulmuşlardır. Mikro veya milimetre ölçekli malzemelere kıyasla çok daha fazla yüzey alanına sahiptirler ve bu da yeni malzeme geliştirme, kimyasal tepkimelerin hızlandırılması gibi pek çok süreci olumlu yönde etkiler. Nanoskobik ölçekte, kuantum etkileri daha belirgin hale gelir ve bu da klasik fizik kurallarıyla tam olarak açıklanamayan bazı davranışların ortaya çıkmasına neden olur. Ayrıca fonksiyonel özellikler göstererek ilaç taşıma, hastalık teşhisi veya çevresel kirleticilerin tespiti gibi görevlerde de kullanılabilmektedirler [34].

1.2.1. Manyetik Nanopartikül

Kanser, günümüzde tıbbi araştırmaların karşılaştığı en zorlu sağlık sorunlarından biri olarak öne çıkmaktadır. Mevcut tedavi yöntemleri sınırlı olup, çoğu vakada erken tanı ve

etkili müdahale yapılamadığından hastalık tedavisi güçleşmektedir. Ayrıca cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi gibi yaygın tedavi yöntemleri ciddi yan etkilere neden olabilmektedir. Bu sebeple, güncel araştırmalar kanserin tanı ve tedavisinde daha yenilikçi yaklaşımların geliştirilmesine odaklanmaktadır [35].

Manyetik Nanopartiküller (MNP'ler), kendilerine özgü fiziksel özellikleri ve hücresel ile moleküler seviyedeki biyolojik etkileşim kabiliyetleri sayesinde biyomedikal alanda umut vadeden nanomalzemelerden biridir. Biyosensör tasarımı, hipertermi terapisi, ilaçların kontrollü salınımı ve kanser hücrelerinin manyetik rezonans görüntülemesi gibi birçok alanda kullanılma potansiyeline sahiptirler. MNP'lerin tercih edilme nedeni yüksek manyetik hassasiyetleri, biyouyumlu yapıları, kararlılıkları ve çeşitli sentez yöntemlerine uygunluklarıdır. Ayrıca harici bir manyetik alanla yönlendirilebilmeleri sayesinde, antikanser ilaçların hedeflenen bölgede ve belirlenen hızda salınımı sağlanabilir; böylece geleneksel tedavi yöntemlerinin bazı kısıtlamaları aşılabilir [35-39].

Bu malzemelerin nano boyutları ve arttırılmış yüzey alanı/hacim oranı, araştırmacıları MNP'lerin yapısı ile özellikleri arasındaki ilişkiyi incelemeye yöneltmiştir. Bileşim, boyut, şekil ve yüzey kimyası, manyetik özelliklerin iyileştirilmesi ve nanopartiküllerin in vivo (vücut içi) ortamda istenilen davranışı sergilemesi için çeşitli süreçlerle özelleştirilebilir. Biyomedikal alanda, MNP'lerin başarılı kullanımı büyük ölçüde onların manyetik özelliklerine, yani dış bir manyetik alan etkisiyle kontrol edilen dağılımlarına ve agregasyon derecelerine bağlıdır. Bu nedenle, moleküler kararlılığı artırmak amacıyla, sentez sırasında ya da sonrasında biyouyumlu polimerler kullanılarak MNP'lerin kaplanması işlemi, biyolojik ortamda agregat oluşumunu ve biyodegredasyonu engeller [35-39].

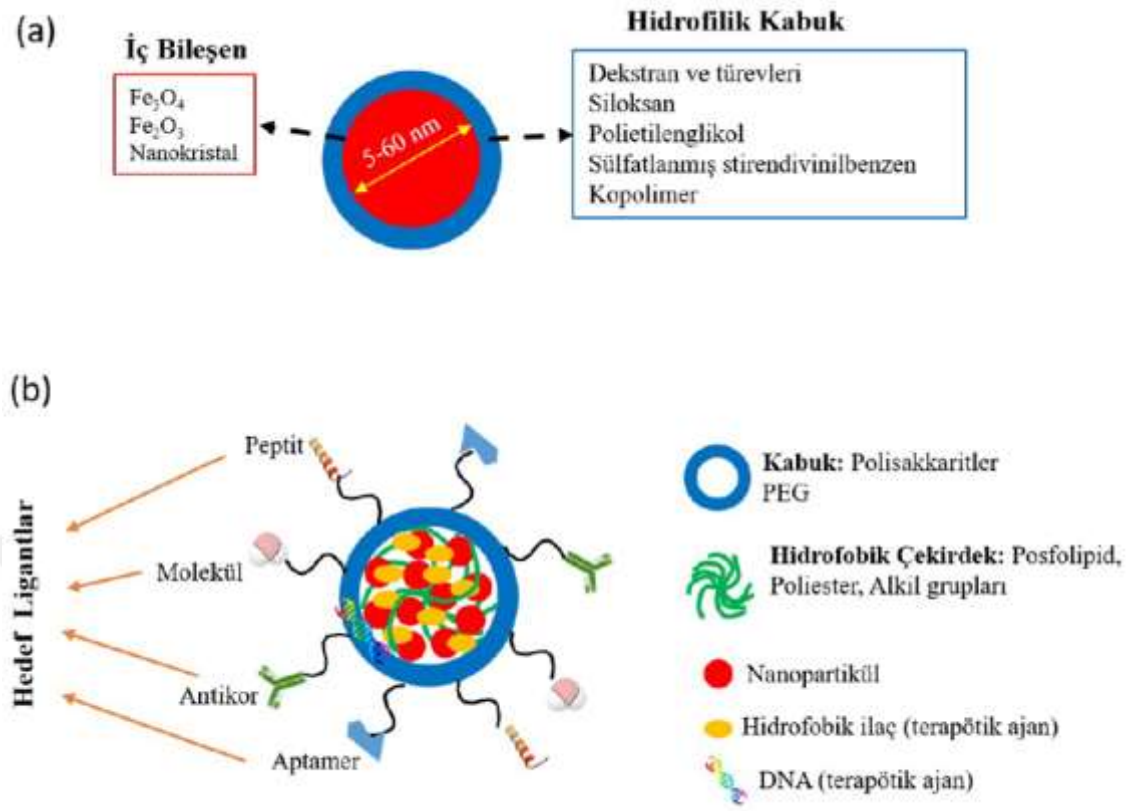
Amerikan Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) tarafından onaylanmış çeşitli polimerler, MNP'lerin kaplanmasında kullanılmaktadır. Örnekler arasında polietilen glikol (PEG), polikaprolakton (PCL), polilaktik asit (PLA), polilaktikkoglikolik asit (PLGA), dekstran ve kitosan yer alır. Dekstran ve karbonhidrat türevleriyle kaplanmış MNP'ler, başarılı bir şekilde manyetik rezonans görüntüleme (MRG) kontrast ajanı olarak kullanılmıştır. Ferridex, Resovist ve Combidex, klinik uygulamalarda kullanılan bu tür kontrast ajanlarına örnek teşkil etmektedir. MNP'ler, tıbbi ve biyolojik teşhislerde in vivo

görüntüleme için kullanıldığında, görüntüleme tekniklerinin çözünürlüğünü iyileştirmeye yardımcı olur [35-39].

Kanser tedavisinde, Manyetik Nanopartiküller (MNP'ler) ilaç dağılımı ve hipertermi gibi terapötik amaçlarla da kullanılabilir. Manyetik ilaç dağılım sisteminde, antikanser ilaçlarla yüklenmiş MNP'ler, bir dış manyetik alan kullanılarak tümör bölgesine yönlendirilir. Hipertermi tedavisinde ise partiküller kanser hücrelerine hedeflenir ve dış manyetik alan uygulanarak tümör ısıtılır. Ayrıca, ısıtma işlemi sırasında ilaç moleküllerini salan MNP'ler, hipertermi temelli ilaç dağılımı için de kullanılabilir [35-39].

Günümüzde klinik olarak en yaygın onaylanan MNP'ler, inorganik demir oksit çekirdekleri ile polisakaritler (örneğin dekstran ve türevleri) ve poli(etilen glikol) (PEG) gibi kaplama malzemelerinden oluşmaktadır (Şekil 1.2.-a). Görüntüleme ve tedavi uygulamaları için araştırmalarda kullanılan polimer bazlı MNP'ler şu bileşenleri içerir (Şekil 1.2.-b):

- MNP'yi içeren hidrofobik çekirdek
- Tedavide kullanılacak ilaç veya gen yükü
- Hedeflenen ligandlar



Şekil 1.2. Tıbbi görüntüleme ve tedavide kullanılacak polimer kaplı MNP'lerin şematik gösterimi. a) Klinik olarak onaylanmış demir oksit çekirdekleri ve biyouyumlu kaplamalar b) Kabuk ve hidrofobik çekirdeğe sahip misel yapısı [35].

1.2.2. Manyetik Kuantum Noktalar

Kuantum noktalar (KN), inorganik ve nanokristal yapıda, yarı iletken ve floresan özellikler gösteren parçacıklardır. Boyutları 1-10 nm arasında değişir ve genellikle küresel bir şekle sahiptirler. Elektron tutma yetenekleri ile tanınırlar [40].

Boyutlarının deneysel parametrelerle kolayca ayarlanabilmesi, spektral özelliklerinin uygulama alanına göre esnek bir şekilde değiştirilmesine olanak tanır. Parçacık boyutlarının değişmesi, UV ışığından görünür ışığa kadar geniş bir absorbsiyon bandının oluşmasına yol açar. Ayrıca, dar bantlı emisyon spektrumları, tek dalga boyu ile uyarıldığında çoklu biyoanalizler için uygunluk, termal ve fotokimyasal stabilite gibi özellikleri ile KN'ler, organik floresan boyalara göre birçok uygulamada avantaj sağlar. KN'ler, yüzey modifikasyonu yapıldığında değişen polariteleri ve farklı fonksiyonel

gruplarla entegrasyon yetenekleri ile dikkat çekerler. Kuantum noktalarının sentezinde kullanılan malzemeler ve yöntemler çeşitlilik gösterir; bunlar arasında grup II-VI (CdSe, CdTe, ZnS vb.), III-V (GaAs, GaN, InAs, InP) ve IV-VI (PbS, SnTe vb.) elementleri bulunmaktadır. Ancak, literatürde en yaygın olarak sentezlenen kuantum noktalar CdTe ve CdSe'dir. CdSe KN'leri, homojen parçacık boyutları sayesinde dar bantlı emisyon spektrumları sunar ve boyutları sentez süresiyle kolayca kontrol edilebilir, bu da onları yüksek kaliteli KN'ler olarak tanımlar [40-44].

Manyetik Kuantum Noktaları (MQDs), karmaşık in vivo ortamlarda dahi floresan özelliklerini ve stabilitelerini koruyan malzemelerdir. Bu özellikleri nedeniyle tıbbi alanlarda moleküler ve hücresel görüntüleme, ilaç taşıma, yüksek hassasiyetli biyoanaliz ve tanı yöntemlerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Ayrıca, yüksek çözünürlük ve duyarlılıkla eş zamanlı görüntüleme, KN'lerin konjugasyon çalışmalarıyla mümkün hale gelmektedir [45-48].

KN'ler, fotolüminesans özellikleri sayesinde yüzeylerinde meydana gelen çok küçük değişikliklere karşı hassasiyet gösterir. Bu özellikleri sayesinde, yüzeydeki fiziksel ve kimyasal değişikliklerin etkisiyle fotolüminesans sinyallerinin artışı veya azalması izlenebilir. Bu mekanizma, KN temelli floresans problarının oluşturulmasına olanak tanır. Böylece, analitler, fonksiyonel gruplarla modifiye edildiklerinde veya serbest haldeki KN'lerle etkileştiklerinde spesifik bir şekilde tespit edilebilir. Biyoanalitik çalışmalarda, antikor-antijen etkileşimi temelli immünolojik yöntemlerde MNP ve KN'ler, analitlerle etkileşime girdikten sonra dışarıdan uygulanan manyetik alan ile toplanabilir. Analit matriksten ayrıldıktan sonra floresans sinyali KN'ler aracılığıyla izlenir, burada KN'ler floresan prob olarak işlev görür. Ayrıca, KN'ler biyosensör uygulamalarında, tümör hücrelerinin tespiti, ilaç salım sistemleri, pestisitler ve patojen mikroorganizmaların tayini gibi çeşitli biyoanalitik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle, CdTe KN'ler bu tür çalışmalarda tercih edilmektedir [45-48].

1.3. Bakteri Tespit Yöntemleri

E. coli bakterisinin saptanması için halihazırda kullanılan klinik yöntemler ve gelişmekte olan yöntemler bulunmaktadır. Halihazırda kullanılan klinik yöntemlerin, cihaz ve kit maliyetlerinin yüksek olması, işlem süreçlerinin oldukça zaman alıcı olması ayrıca uzman laboratuvar personeline ihtiyaç duyulması ve tespit için ön işleme ihtiyaç duyulması gibi

dezavantajları bulunmaktadır. Son zamanlarda maliyetlerin azaltılması ve hastalıkların erken teşhis edilebilmesi adına, hassas ve spesifik yeni tespit yöntemleri araştırılmaktadır. Yeni tespit yöntemlerinin araştırılmasında, en önemli noktalardan birisi bakterilerin hangi hassasiyet seviyesinde tespit edileceğidir. Son yıllarda halihazırda kullanılan klinik yöntemlerin eksik yönlerini giderecek, biyosensör temelli *E. coli* bakterisini yüksek hassasiyet ve özgüllükle tespit edebilecek ve bunları düşük maliyetlerle yapabilecek sistemler geliştirilmektedir. Tablo 1.2.'de *E. coli* bakterisinin tespit edilmesinde, halihazırda kullanılan ve geliştirmeye çalışılan yöntemlerin avantajları, dezavantajları ve hassasiyet seviyeleri hakkında bilgiler yer almaktadır.

Tablo 1.2. *Escherichia coli* tespit yöntemleri

Tespit Yöntemleri	**Avantajları**	**Dezavantajları**	**Hassasiyet**
Halihazırda Kullanılan Klinik Yöntemler			
Kültür Yöntemleri	-Maliyet -Güvenilirlik -Kararlılık	-Zaman alıcıdır (18-24 saat) -Eğitimli personel ihtiyacı	10^5 CFU/mL [9]
IMViC Testleri	-Biyokimyasal özellikleri doğrular	- Zaman alıcıdır	-
Nükleik Asit Temelli Yöntemler (PCR)	- Duyarlılık - Özgüllük - Güvenilirlik - Düşük konsantrasyonlarda çalışma olanağı	- Maliyet ve zaman - Eğitimli personel ihtiyacı - DNA saflaştırma gereksinimi - Canlı ve cansız hücreler arasında ayrım eksikliği	$3{,}5 \times 10^3$ CFU/mL [49]
Real-Time PCR	- PCR'a göre daha hızlı ve anlık sonuç verir. - Çok hassas ve spesifik.	- Maliyetli ve özel laboratuvar ekipmanları gerektirir.	10^2 CFU/mL [50]

İmmünolojik Temelli Yöntemler (ELISA)	- Zaman - İş gücü - Çok sayıda örnek ile çalışma olanağı	- Spesifiklik - Eğitimli personel ihtiyacı - Antikor-antijen etiketleme ve ön zenginleştirme ihtiyacı	$6,8 \times 10^3$ CFU/ml [51]
Lateks Aglütinasyon Testi	- Hızlı sonuç verir. - Kolay uygulanabilir.	- Spesifik suşları ayırt etmede yetersiz olabilir. - Hassasiyeti sınırlıdır.	-
MALDI-TOF	- Çok hızlı ve güvenilirdir. - Yüksek doğruluk sağlar.	- Yüksek teknoloji ve maliyet gerektirir. - Başlangıç maliyetleri yüksek olabilir.	-
Gelişmekte Olan Yöntemler			
Elektrokimyasal Biyosensörler	- Maliyet - Etiketsiz tespit - Çok sayıda örnek ile çalışma olanağı	- Duyarlılık - Seçicilik	$7,8 \times 10^1$ CFU/mL [52]
Optik Biyosensörler	- Hassasiyet - Etiketsiz tespit - Gerçek zamanlı tespit	- Maliyet	3×10^3 CFU/mL [53]
Kütle Hassas Biyosensörler	- Maliyet - Hassasiyet - Etiketsiz tespit - Kullanım kolaylığı - Gerçek zamanlı tespit	- Ortam şartları	$1,46 \times 10^3$ CFU/mL [54]

1.3.1. Halihazırda Kullanılan Klinik Yöntemler

1.3.1.1. Kültür Yöntemleri

E. coli bakterisinin tespitinde kullanılan kültür yöntemi, bakterinin laboratuvar ortamında çoğaltılarak tanımlanmasını sağlar. Bu amaçla, su, gıda, dışkı veya idrar gibi örnekler steril kaplarda toplanır ve uygun besiyerlerine ekilir. *E. coli*'nin diğer bakterilerden ayırt edilmesi için genellikle MacConkey Agar gibi özel besiyerleri kullanılır. Bu besiyerinde

E. coli, laktozu fermente ederek pembe-kırmızı renkli koloniler oluşturur. Ayrıca, Eosin Methylene Blue (EMB) agar üzerinde yeşilimsi bir parlaklık gösterir. Numuneler genellikle 37°C'de inkübe edilir ve 24-48 saat sonra koloniler gözlemlenir. Daha kesin sonuçlar elde etmek için biyokimyasal testler yapılır ve bazı durumlarda patojenik türlerin tespiti için ek serolojik testler uygulanabilir [55].

Geleneksel yöntemler her ne kadar düşük maliyetli ve uygulanması kolay olsa da, ön işlem aşamaları oldukça zaman alıcıdır. Ön tanı süreci genellikle 2 ila 3 gün sürerken, patojen türlerinin doğrulanması en az bir haftayı bulmaktadır. Bu yöntemler, kültür ortamlarının hazırlanması ve koloni sayımı gibi zahmetli adımlar içerdiğinden pratiklik açısından sınırlıdır. Ayrıca, yalnızca kültürde çoğalabilen mikroorganizmaları tespit edebildikleri için canlı ancak kültürde üretilemeyen patojenleri saptayamazlar; bu da hassasiyetlerinin düşük olmasına ve tanıdaki yetersizliklerine yol açmaktadır [55].

1.3.1.2. IMViC Testi

IMViC testi, bakterilerin tanımlanmasında kullanılan dört biyokimyasal testten oluşan bir dizi testtir. Bu testlerin baş harfleri, testlerin isimlerinden alınarak IMViC olarak kısaltılmıştır. *E. coli* için bu testlerin sonuçları şu şekildedir:

- İndol Testi: Pozitif (*E. coli*, triptofandan indol üretir)
- Metil Kırmızı Testi: Pozitif (*E. coli*, glikozu fermente ederek stabil asit üretir)
- Voges-Proskauer Testi: Negatif (*E. coli*, asetoin üretmez)
- Sitrat Testi: Negatif (*E. coli*, sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanmaz)

Bu testler genellikle 2-4 gün içerisinde tamamlanır [56].

1.3.1.3. Nükleik Asit Temelli Yöntemler (PCR)

PCR, Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun (Polymerase Chain Reaction) kısaltmasıdır ve 1985 yılında Kary Mullis tarafından tanımlanmıştır. O günden bu yana sürekli olarak geliştirilen bu teknik, bakteriler, virüsler, mantarlar, parazitler ve protozoonlar gibi hastalık etkenlerinin hedef nükleik asit zincirlerini çoğaltmak için kullanılan özgün ve güvenilir bir moleküler biyolojik yöntemdir. PCR, spesifik komplementer

oligonükleotidler (primerler) ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri (Taq) kullanılarak hedef genetik materyali in vitro (vücut dışı) ortamda çoğaltır (amplifikasyon). Bu yöntem, genetik materyalin çok az miktarda ve hatta ilgisiz DNA'lar arasında olsa dahi, homojen bir DNA materyali haline getirilmesine ve kolayca tanımlanmasına olanak tanır.

PCR, uygun ortamda polimeraz enzimi ve DNA sentezi için gerekli maddeler bulunduğunda, DNA'nın karşıt dizilerini sentezleyebilme yeteneğinden yararlanarak gerçekleştirilen bir reaksiyondur. Bu süreçte, hedef DNA dizisi çoğaltılırken istenmeyen diziler baskılanabilir ve böylece DNA dizisinin tanımlanması daha kolay hale gelir. PCR'ın başlıca kullanım alanları arasında mikrobiyolojik araştırmalar, adli tıp ve genetik bozuklukların tespiti sayılabilir. PCR'ın tıp ve diğer bilim dallarında yaygın bir şekilde kullanılmasının temel nedenleri arasında, sıcaklığa dayanıklı DNA polimeraz enzimi ve PCR cihazlarının (Thermocycler) gelişmiş olması önemli faktörlerdendir [57].

PCR'ın altı adet temel bileşeni vardır: Kalıp DNA, primerler (oligonükleotidler), polimeraz enzimleri, deoksinükleotid-trifosfat (dNTPs) karışımı, tampon solüsyonlar ve reaksiyon koşulları. Bu bileşenleri detaylı olarak inceleyelim:

1. Kalıp DNA: PCR'de çoğaltılacak genetik materyaldir. Eğer hedef zincir RNA ise, reaksiyon öncesinde reverse transkriptaz enzimi kullanılarak RNA, komplementer DNA (cDNA)'ya dönüştürülür ve bu cDNA, PCR için kalıp olarak kullanılır. Bu işlemde, amplifiye edilecek DNA'nın fonksiyonel özellik taşıması çok önemlidir.

2. Primerler (Oligonükleotidler): 4-10 nükleotidden oluşan işaretlenmiş diziler, PCR'da DNA'nın amplifikasyonunu başlatmak için kullanılır. Bu kısa, tek sarmallı DNA molekülleri, hedef DNA'nın belirli bir bölümünün sonuyla komplementer yapıdadır. Primerler, kontaminant DNA'larla çapraz reaksiyon yapmayacak şekilde tasarlanır, bu nedenle hedef DNA'nın sırası çok iyi bilinmelidir.

3. Polimeraz Enzimleri: PCR'de DNA amplifikasyonunu sağlayan enzimlerdir. İlk olarak 1987'de Thermus aquaticus'tan elde edilen Taq-DNA polimeraz enzimi kullanılmıştır. Bu enzim, yüksek sıcaklıklara dayanıklı olup, her denatürasyon siklusunda yeni bir enzim eklemeye gerek kalmadan çalışır. Bu özellik, PCR işlemini daha verimli hale getirir. Taq-DNA polimeraz dışında, *Thermus thermophilus, Bacillus stearothermophilus, Thermus*

brockianus ve *Thermus litoralis* gibi diğer termofilik DNA polimeraz enzimleri de ticari olarak temin edilebilir.

4. Deoksinükleotid-Trifosfat (dNTPs) Karışımı: Yeni DNA sarmallarının sentezlenebilmesi için dATP, dTTP, dGTP ve dCTP olmak üzere 4 farklı deoksinükleotid trifosfat (dNTP) gereklidir. Bu dNTP'ler, genetik materyalin oluşturulmasında temel yapı taşlarıdır ve genellikle nötralize edilmiş, molaritesi belirlenmiş dörtlü setler halinde kullanılır. Hedef DNA'nın uzunluğu, sayısı ve PCR döngüsünün kaç kez yapılacağı, dNTP'lerin miktarına doğrudan bağlıdır. dNTP'ler reaksiyonun fosfat grubunun kaynağını oluşturur ve bu sayede DNA'nın doğru şekilde çoğaltılmasını sağlar.

5. PCR'da Kullanılan Tampon Solüsyonlar: PCR reaksiyonlarında, DNA polimeraz enziminin ve dNTP'lerin etkili çalışabilmesi için belirli tampon solüsyonları kullanılır. Bu tamponlar, reaksiyonun pH'ını, iyonik gücünü ve diğer kimyasal koşulları dengeleyerek DNA'nın amplifikasyonunu sağlar. Yaygın olarak kullanılan tampon bileşenleri arasında 10 mM Tris (pH: 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, Jelatin, %0,01 NP-40 ve Tween 20 bulunmaktadır.

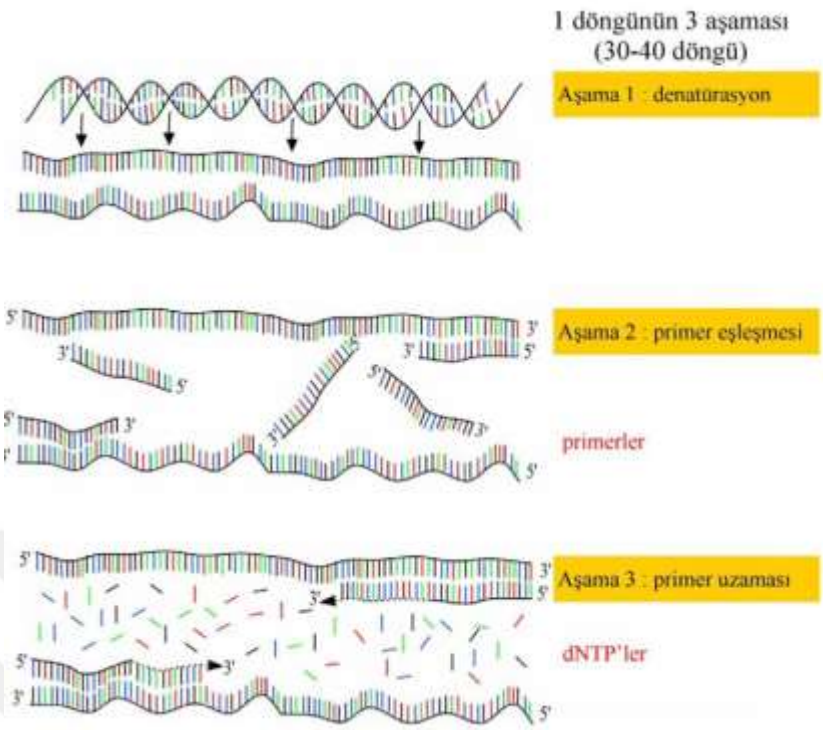
6. Reaksiyon Koşulları: PCR'da kullanılan sıcaklık, zaman ve döngü sayısı, hangi DNA'nın hangi primerle amplifiye edileceğine bağlıdır. PCR, hücre içindeki (in vivo) DNA eşlemesi mekanizmasına dayanır. Çift zincirli DNA (dsDNA), tek zincirli DNA (ssDNA) şeklinde çözülür, kopyalanarak çoğaltılır ve tekrar bağlanır. PCR ile DNA çoğaltma işlemi, üç ana aşamada gerçekleştirilir (Şekil 1.3.):

Denatürasyon: Çift zincirli DNA, yüksek sıcaklıkta çözülerek tek zincirli hale gelir.

Hizalanma (Annealing): Primerler, hedef DNA'nın belirli bölümlerine bağlanır.

Uzama (Extension): DNA polimeraz, primerlerin bağlandığı bölgeyi çoğaltarak yeni DNA zincirini oluşturur.

Her bir PCR döngüsünde bu üç aşama sırasıyla tekrar edilir ve böylece DNA miktarı her döngüde iki katına çıkar [57].



Şekil 1.3. PCR işlemi aşamaları [57]

1. Ayrıştırma (Denatürasyon):

Bu aşamada, çift iplikçikli kalıp DNA'nın denatürasyonu sağlanır. Isı, DNA'nın iki iplikçik arasında bulunan hidrojen bağlarını kırarak, DNA'yı tek iplikçikli hale getirir. Reaksiyon ortamında tampon, dNTP'ler (deoksinükleotid trifosfatlar), hedef DNA'ya özgü primerler (15-30 baz uzunluğunda oligonükleotidler) ve ısıya dayanıklı Taq polimeraz enzimi bulunur. Isı, bu aşama için 91-95 °C arasında olmalı ve reaksiyon 5 dakika sürer. Döngüye başlamadan önce genellikle 3-5 dakika ön ısıtma yapılabilir.

2. Primerlerin Bağlanması (Birleşme):

Denatürasyon işlemi sonrasında, DNA'nın her iki iplikçiği tek iplikçikli hale gelir. Primerler, hedef DNA'nın 3′ uçlarına bağlanarak DNA'nın bu bölgesinde eşleşir. Isı, birdenbire 50 °C civarına düşürülerek, primerlerin DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu aşama genellikle 37-65 °C arasında gerçekleştirilir ve reaksiyon süresi yaklaşık 5 dakikadır.

3. Polimerizasyon:

Bu aşamada, Taq DNA polimeraz enzimi, primerlerle ve tek iplikçikli kalıp DNA ile çalışarak çift iplikçikli DNA sentezler. Polimeraz, primerlerin bağlandığı 3′ uçlardan başlar ve 5′-3′ yönünde yeni DNA zincirini inşa eder. Bu reaksiyon, Taq DNA polimeraz enzimi için optimum sıcaklık olan 70-72 °C arasında gerçekleşir ve genellikle 5 dakika sürer.

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) teknikleri, 1 DNA molekülünden yapılan 30 döngü sonucunda milyarlarca kopya elde edilmesini sağlar. Bu döngülerde, 1.073.741.764 adet hedef DNA kopyası elde edilir. Ayrıca, bu süreçte 60 farklı uzunluktaki DNA parçaları ortaya çıkar. PCR işlemi, Thermal Döngüleyici adı verilen cihazlar sayesinde yaklaşık 4 saat sürede tamamlanır.

Ancak, PCR gibi amplifikasyon teknikleri doğrudan teşhis yöntemleri olarak kabul edilmez. Bu yöntemler, hastalıkların tanısına büyük katkı sağlamakla birlikte, çok hassas, spesifik ve güvenilir sonuçlar elde edilmesini mümkün kılmaktadır. PCR, tanının kesinleştirilmesinde destekleyici bir araçtır, ancak tanı genellikle sonraki aşamalarda yapılan hibridizasyon yöntemleriyle konulmaktadır [57].

PCR'ın Avantajları:

1. Hız ve Spesifiklik: PCR tekniği, hızlı ve son derece spesifik bir yöntemdir. Bu özellikleri sayesinde tanı süreçlerinde önemli bir avantaj sağlar.

2. Çeşitli Numune Türlerinden Kullanılabilmesi: Kan, serum, doku, hücre ve hatta eski zamanlardan kalma kurutulmuş örneklerden bile (özellikle antropolojik çalışmalarda) nükleik asitlerin ekstrakte edilebilmesi, PCR'yi pratik bir yöntem haline getirir. Hedef DNA'nın çok küçük konsantrasyonları bile yeterli olabilir.

3. Zorlu Etkenlerin Teşhisi: Toksin üreten etkenlerin, zor tespit edilen toksinlerin, bakteri alt tiplerinin ve laboratuvar koşullarında üretilmesi zor olan virüslerin teşhisini mümkün kılar.

4. Antibiyotik Direnç Genlerinin Tespiti: Antibiyotiklere dirençli bakterilerin tespit edilmesi için direnç genlerinin belirlenmesine olanak tanır.

5. Adli Tıp ve Diğer Alanlar: Adli tıp, popülasyon genetiği ve epidemiyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılır. Özellikle babalık testi gibi durumlarda önemli bir rol oynar [57].

PCR'ın Dezavantajları:

1. Kontaminasyon Riski: PCR'ın en büyük avantajı, aynı zamanda en önemli dezavantajını da yaratabilir. Eğer ortamda tek bir kontaminant DNA varsa ve bu DNA, reaksiyonda kullanılan primer ile ortak bir baz dizisine sahipse, bu kontaminant da çoğalarak sonuçları olumsuz etkileyebilir.

2. Deneyim Gerekliliği: PCR tekniği, deneyimli personel gerektirir. Sonuçların doğru bir şekilde yorumlanabilmesi için tekniğin yeterli duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olması önemlidir.

3. Yüksek Maliyet: PCR, kullanılan cihazlar ve malzemelerin pahalı olması nedeniyle maliyetli bir tekniktir [57].

1.3.1.4. Gerçek Zamanlı PCR

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), DNA'yı laboratuvar ortamında çoğaltarak analiz yapılmasını sağlayan bir tekniktir. Geleneksel PCR yöntemi ile çok az miktarda DNA örneği, birçok kopyaya dönüştürülür ve sonuçlar genellikle jel elektroforezi ile incelenir. Bu yöntemle amplifikasyon süreci sırasında ne kadar DNA üretildiği izlenemez, yalnızca DNA'nın varlığı belirlenir [58].

Gerçek zamanlı PCR (qPCR) ise bu süreci bir adım öteye taşır. Bu yöntemde, her PCR döngüsünde DNA floresan boyalarla işaretlenir ve cihazlar aracılığıyla her aşamada DNA miktarı ölçülür. Böylece, hem DNA'nın varlığı hem de miktarı gerçek zamanlı olarak izlenebilir. Gerçek zamanlı PCR, geleneksel PCR'a göre daha hassas ve hızlı sonuçlar sunar. Bu özellikleri sayesinde genellikle virüs, bakteri gibi patojenlerin tespitinde ya da gen ekspresyon seviyelerinin ölçülmesinde tercih edilir [58].

1.3.1.5. İmmünolojik Temelli Yöntemler

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), biyolojik örneklerde proteinler, antijenler, antikorlar, hormonlar gibi çeşitli molekülleri tespit etmek amacıyla kullanılan

bir laboratuvar testidir. Bu testin temeli, antijen ve antikorlar arasındaki spesifik etkileşimlere dayanır ve bu etkileşimlerin sonucunda enzimlerin yardımıyla ölçülebilir bir sinyal elde edilir. Testte, önce bir mikroplaka üzerine numune yerleştirilir ve bağlanmamış bölgeler bloke edilir. Ardından, spesifik antikorlar ya da antijenler eklenir. İkinci bir enzimle işaretlenmiş antikor, önceki antijen ya da antikorla bağlanır ve son aşamada uygun bir substrat eklenir. Enzim, substratı dönüştürdüğünde genellikle bir renk değişimi meydana gelir. Bu renk değişimi, hedef molekülün miktarını göstermek için spektrofotometreyle ölçülür [59].

ELISA'nın dört ana türü vardır:

1. Doğrudan ELISA: Antijen, plaka üzerine sabitlenir ve enzimle işaretlenmiş antikor kullanılır.

2. Dolaylı ELISA: Antijen kaplanır, birincil antikor ve enzimle işaretlenmiş ikincil antikor eklenir.

3. Sandviç ELISA: Plaka yakalayıcı antikorla kaplanır, ardından hedef antijen ve ikinci bir antikor eklenir.

4. Kompetitif ELISA: Antijen ve antikor arasında rekabet mekanizmasıyla çalışır; sinyalin azalması hedef molekülün artışını gösterir [59].

ELISA'nın Avantajları:

1. Yüksek duyarlılık

2. Aynı anda birçok numuneyi analiz edebilme

3. Hem kantitatif hem de kalitatif sonuçlar verebilme

Bu avantajları sayesinde ELISA, tıbbi tanı (örneğin HIV ve hepatit gibi hastalıkların teşhisi), gıda güvenliği (alerjen tespiti) ve biyomedikal araştırmalarda (protein düzeyi ölçümü) yaygın olarak kullanılmaktadır [59].

1.3.1.6. Lateks Aglütinasyon Testi

Lateks Aglütinasyon Testi (LAT), antijenlerin veya antikorların mevcudiyetini çabuk ve basit bir şekilde belirlemek için kullanılan temel bir metottur. Bu testin ana prensibi, lateks taneciklerinin antijenlerle veya antikorlarla yüzeylerinin kaplanması ve incelenen örnekteki aranan moleküle karşılaştıklarında bu taneciklerin bir araya gelerek topaklanma (aglütinasyon) reaksiyonu göstermesidir. Uygulaması oldukça kolay olan bu yöntemde, öncelikle lateks tanecikleri hedeflenen moleküle etkileştirilir, ardından örnek eklenir ve eğer örnekte araştırılan antijen veya antikor bulunuyorsa, lateks tanecikleri birbirine bağlanarak çıplak gözle fark edilebilen kümeler oluşturur. Sonuçlar genellikle birkaç dakika içinde alınabilir, bu da bu metodu süratli ve maliyet açısından avantajlı hale getirir [60].

Tıp alanında, bakteriyel ve viral kaynaklı enfeksiyonların tanısında sıklıkla başvurulan bir yöntemdir. Örneğin, streptokok enfeksiyonları veya menenjit gibi rahatsızlıkların teşhisinde hızlı neticeler sunar. Bununla birlikte, gebelik testlerinde ve başta romatoid artrit olmak üzere otoimmün hastalıkların belirlenmesinde de kullanım alanı bulmaktadır. Ancak, lateks aglütinasyon testlerinin hassasiyeti ve özgüllüğü daha sofistike testlere kıyasla daha düşük seviyededir, bu nedenle negatif çıkan sonuçların ileri tetkiklerle doğrulanması gerekebilir. Bu metot genellikle sadece maddenin var olup olmadığını gösterir, yani incelenen maddenin kesin miktarını saptayamaz. Bütün bu özelliklerine karşın, özellikle acil müdahale gerektiren durumlarda veya kaynakların kısıtlı olduğu yerlerde oldukça işe yarar bir tanı aracıdır [60].

1.3.1.7. MALDI-TOF

MALDI-TOF, biyolojik moleküllerin kütlelerini süratli ve kesin bir şekilde belirlemek için kullanılan bir kütle spektrometrisi yöntemidir. Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon (MALDI), büyük biyomoleküllerin lazerle iyonlaştırılmasını sağlarken, Uçuş Zamanı (TOF) analizörü ise bu iyonların kütlelerine göre farklı hızlarda hareket ederek dedektöre ulaşma sürelerini ölçer ve böylece kütleleri saptanır. İşlem, numunenin lazer ışığını absorbe eden bir matriksle karıştırılmasıyla başlar. Lazerin etkisiyle matriks buharlaşırken numunedeki moleküller iyonlaşır ve gaz fazına geçer. Elektrik alan yardımıyla hızlandırılan bu iyonlar, TOF analizöründe kütlelerine göre

ayrışır; hafif olanlar daha çabuk, ağır olanlar daha geç dedektöre ulaşır ve bu süreler kütlelerinin belirlenmesinde kullanılır.

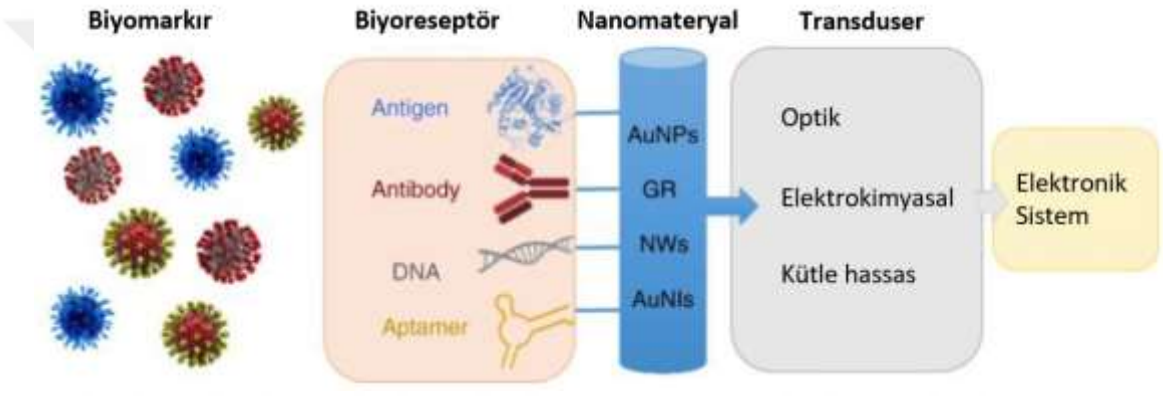
MALDI-TOF'un en büyük avantajları arasında hızlı ve hassas olması yer alır. Özellikle hastanelerde bakteri ve mantar türlerinin tanısında yaygın olarak kullanılır ve kısa sürede sonuç verir. Ayrıca, az miktarda numune ile büyük biyomoleküllerin analizinde etkili sonuçlar sunar. Mikrobiyoloji laboratuvarlarının yanı sıra proteomik araştırmalar ve ilaç geliştirme süreçlerinde de önemli bir rol oynayan MALDI-TOF, biyomedikal araştırma ve tanı alanlarında değerli bir araçtır [61].

1.3.2. Gelişmekte Olan Yöntemler

Biyosensörler, temel olarak bir biyolojik algılayıcı (enzim, antikor, DNA gibi) ve bu algılayıcının tepkisini ölçülebilir bir sinyale dönüştüren bir transdüserden (dönüştürücü) meydana gelir. Bu sistemler, özgül bir biyolojik hedefle (bakteriyel DNA, proteinler vb.) etkileşime girerek bir sinyal oluştururlar. Biyosensörlerin geleneksel yöntemlere göre sunduğu avantajlardan bazıları, çok daha hızlı sonuç vermeleri, oldukça düşük bakteri yoğunluklarını bile tespit edebilmeleri ve laboratuvar ortamına ihtiyaç duymadan sahada kullanıma uygun taşınabilir cihazlar olabilmeleridir. Ek olarak, anlık izleme ve sürekli veri kaydı yapabilme yetenekleri de bulunmaktadır. Bu özellikleriyle biyosensörler, bakteri tespiti konusunda zaman tasarrufu sağlayan, yüksek hassasiyetli ve kullanıcı dostu bir alternatif olarak giderek daha fazla önem kazanmaktadır.

Geleneksel tanı yöntemleri bazı uygulamalarda hâlâ altın standart olarak kabul edilse de, biyosensörlerin sağladığı hız, taşınabilirlik ve doğruluk gibi nitelikler, onları çeşitli endüstriyel ve pratik alanlarda ön plana çıkarmaktadır. Biyolojik analizler için özel olarak tasarlanan bu sensörler, Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından "kimyasal bir maddeye karşı oluşan biyolojik yanıtı termal, elektriksel veya optik sinyallere çeviren cihazlar" şeklinde tanımlanır. Son yıllardaki teknolojik ilerlemeler, biyosensör tasarımlarının hızlanmasına katkıda bulunmuş ve bunun sonucunda biyomedikal uygulamalar, gıda güvenliği, tıp, çevre kirliliği, eczacılık ve askeri uygulamalar gibi birçok farklı alanda geliştirilmişlerdir. Canlıların çevrelerindeki değişimleri algılama ve bunlara tepki verme mekanizmaları, biyosensörlerin geliştirilmesinde önemli bir temel oluşturmakta olup, biyosensörler özünde iki ana bileşenden oluşmaktadır [62].

Biyosensörler, yapısal olarak iki ana kısımdan oluşur. Bunlardan ilki, biyoreseptör veya diğer adıyla liganddır ve bu kısım, hedeflenen molekülün özgül olarak bağlandığı biyolojik alandır. İkinci kısım ise, bu bağlanma neticesinde meydana gelen biyokimyasal veya fiziko-kimyasal etkileşimleri algılayarak bunları ölçülebilir elektronik sinyallere dönüştüren transdüser (dönüştürücü) olarak tanımlanır. Biyosensörlerin sınıflandırılması, büyük ölçüde kullanılan ligandın ve transdüserin niteliğine bağlıdır [62]. Şekil 1.4.'te biyosensörün çalışma mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Biyosensörün şematize edilmiş görünümü

Biyosensörlerin yapısında en sık kullanılan biyomoleküller enzimler ve antikorlardır. Bu biyolojik moleküller arasındaki etkileşimin temel adımı, analiz edilecek maddenin protein moleküllerine bağlanmasıdır. Bir molekülün biyoreseptör olarak işlev görebilmesi için, hedeflediği moleküle özgü olması ve yüksek bir bağlanma yeteneğiyle ayırt edici özellikler sergilemesi gerekmektedir [63].

Transdüserler, biyoreseptörlerin biyolojik olarak gerçekleştirdiği reaksiyonu ölçebilir görünür bir sinyale dönüştürürler. Gerçekleşen biyokimyasal reaksiyona göre transdüser seçilir [63].

Biyoreseptörler, transdüser yüzeylere fiziksel veya kimyasal yöntemlerle immobilize edilebilir. Fiziksel yöntemler arasında adsorpsiyon ve polimer matris içinde tutuklama yer alır. Kimyasal bağlanmada ise kovalent bağlar veya fonksiyonel gruplar aracılığıyla çapraz bağlama uygulanır [63].

Biyosensörler, hedef madde ile biyoaktif bileşen arasındaki etkileşime göre iki sınıfa ayrılır. Biyokatalitik biyosensörlerde enzim veya mikroorganizma kullanılırken, biyoafinite esaslı biyosensörlerse antijen–antikor ya da ligand–reseptör etkileşimlerine dayananmaktadır [64].

Şekil 1.4.'te gösterilen biyosensörün, biyoreseptör çeşidine göre bir sınıflandırma yapıldığında; DNA temelli sensörler, doku temelli sensörler, enzim temelli sensörler, mikrobiyal kökenli biyosensörler ve antikor/antijen temelli (immünobiyosensörler) sensörler olarak sınıflandırılmaktadır.

1. DNA Temelli Biyosensörler:

DNA esaslı biyosensörler, biyoreseptör olarak 20 ila 30 baz uzunluğunda kısa, tek sarmallı DNA oligomerlerinin kullanıldığı sistemlerdir. Bu sistemlerde, DNA aracılığıyla bir elektrokimyasal sinyal meydana gelir ve bu sinyal, elektrokimyasal, optik veya piezoelektrik bir dönüştürücü vasıtasıyla ölçülebilir hale gelir.

2. Doku Temelli Biyosensörler:

Enzim saflaştırma sürecinin uzunluğu ve yüksek maliyeti göz önüne alındığında, hedef analitin tespiti için farklı enzimlerin ayrı ayrı kullanılması yerine, bu enzimleri içeren dokunun doğrudan kullanılması veya enzim bulunmaması durumunda doku parçalarının biyoreseptör olarak kullanılması bir dezavantaj teşkil etmez. Ancak dokular kullanıldığında, her bir elektrot tipi farklı bir yanıt verdiğinden, her biri için ayrı ayrı optimizasyon yapılması gereklidir.

3. Enzim Temelli Biyosensörler:

Biyosensör alanındaki ilk çalışmalar, enzim sensörleriyle başlamıştır. Glikoz analizine yönelik glikoz oksidaz enzim elektrotları, bu alandaki ilk örnekler olarak 1962'de Clark ve Lyons, ardından 1967'de Updike ve Hick tarafından bildirilmiştir. Biyosensör teknolojisi başlangıçta potansiyometrik ve amperometrik temelli enzim elektrotları üzerine kurulmuştur; bu durum o dönemdeki bilimsel çalışmaların sınırlılığından kaynaklanmaktaydı. Enzim temelli biyosensörleri diğer türlerden ayıran temel özellik, biyoaktif katmanda enzimlerin bulunmasıdır.

4. Antikor/Antijen (İmmünosensörler) Temelli Biyosensörler:

İmmünosensörler olarak bilinen bu biyosensörler, antikorları temel alır. Antikor, vücuda giren yabancı mikroorganizmalara (bakteriler, protozoalar ve virüsler gibi) veya bu organizmalara karşı bağışıklık sisteminin ürettiği özel moleküllere verilen isimdir. Antijen ise, vücuda girerek bağışıklık sistemini antikor üretimi için tetikleyen yabancı yapılardır. Antijen ve antikorların birbirlerine olan spesifik bağlanma yetenekleri, immünosensörlerin özgül ve duyarlı ölçümler yapabilmesine olanak tanır. Antikorlar, etkin dönüştürücülerle entegre edildiğinde, virüslerden hormonlara, pestisitlerden bakterilere, ilaçlardan çevresel kirlilik etkenlerine kadar birçok farklı molekülün tespiti için immünosensörler üretilebilir ve performansları iyileştirilebilir. İmmünosensörlerin antijen-antikor etkileşimini temel alarak çok çeşitli amaçlara hizmet edebilmesi, onları gelecekteki teknolojik gelişmeler için önemli bir potansiyele sahip biyosensör türü yapmaktadır.

5. Mikrobiyal Biyosensörler:

Mikrobiyal biyosensörler, bir dönüştürücü aracılığıyla in vivo veya in vitro mikrobiyal hücrelerin sabitlenip birleşmesiyle oluşturulmaktadır. Biyosensörlerde kullanılan mikroorganizmaların çeşitli avantajları vardır. Örneğin, geniş bir kimyasal bileşik aralığını katalizleme yeteneklerine sahiptirler. Ayrıca mikroorganizmalar, ortam koşullarının olumsuz etkilerine uyum sağlama yeteneğine sahip olup, bu olumsuz koşullardan kurtulup kendilerini geliştirerek yeni moleküller üretebilirler [64].

Şekil 1.4.'te gösterilen biyosensörün transdüser içeriğine göre sınıflandırma yapıldığında; elektrokimyasal esaslı sensörler, optik esaslı sensörler ve kütle hassas esaslı sensörler olarak sınıflandırılmaktadır.

İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler vardır. Bunlar; duyarlılık (hassasiyet), seçicilik, hızlı cevap süresi, tekrarlanabilirlik, kararlılık, doğrusallık, kullanım kolaylığı, maliyet, miniyatürizasyon, çoklu tespit yeteneği, biyouyumluluk gibi özelliklerdir [65].

Duyarlılık (Hassasiyet) (Sensitivity):

Biyosensörün çok düşük konsantrasyonlardaki hedef molekülleri tespit edebilme yeteneğidir. Cihazın analitteki değişime birebir cevap vermesidir. Duyarlılık yüksekse analitteki birim değişim sensörün ekranından okunur.

Burada tespit sınırını (Limit of Detection, LOD) ifade etmek gerekirse; Biyosensörün tespit edebileceği en düşük analit konsantrasyonunu ifade eder.

Tasarlanan biyosensör ne kadar yüksek hassasiyet yeteneğine sahip olursa, LOD o derece düşük çıkacaktır.

Seçicilik (**Specificity**):

Biyosensörün hedef molekülü ayırt edebilme yeteneği, cihazın yalnızca analite özgünlüğünü gösterir. Bu özellik, cihazın başka reaktiflere tepki vermemesini ve yanlış sonuçlar üretmemesini sağlar.

Ölçüm aralığı, cihazın ölçebildiği analit konsantrasyonunun sınırlarını belirtir. Analit, belirli bir konsantrasyonun altına veya üstüne çıkarsa, cihazın duyarlılığı düşük olabilir.

Cevap süresi (Response Time):

Biyosensörün hedef molekülü tespit etme süresidir. Ne kadar kısa olursa, o kadar iyidir. Hızlı yanıt süresine sahip biyosensörler real-time, yani gerçek zamanlı izleme imkânı sunar. Ki bu imkân acil durumlarda kritik öneme sahiptir.

Tekrarlanabilirlik (Repeatability):

Biyosensörün aynı koşullar altında benzer sonuçlar üretebilme yeteneğidir.

Kararlılık (Stability):

Biyosensörün zaman içinde ve farklı çevresel koşullarda performansını koruyabilme yeteneğidir. Uzun süreli kullanım ve depolama için önemlidir.

Bir biyosensörün kullanıcı tarafından kullanımının kolay olması, biyosensörün temininin uygun fiyatlar aralığında olması, küçük kompakt boyutlarda olması gerekmektedir. Bazı durumlarda biyosensörün aynı anda birden fazla hedef molekülü tespit edebilmesi

istenebiliyor ve tabii ki kullanılan biyosensörün toksik etkiler göstermemesi yani biyolojik ortamlarla uyumlu olması istenmektedir.

1.3.2.1. Optik Biyosensörler

Optik yöntemler, kimyasal yöntemler gibi uzun süredir kullanılan ve artık sınırlı yenilik potansiyeli taşıyan teknikler arasında yer almaktadır. Biyosensörlerin geliştirilmesinde çeşitli optik tekniklerden yararlanılmıştır. Temel olarak, optik biyosensörler beş ana bileşenden oluşur: ışık kaynağı, ışık demetini oluşturan optik sistem, ışığı yönlendiren bileşenler, algılama ünitesi ve ışığı ölçen dedektör.

Optik biyosensörler başka bir tanımla, uygun bir biyomolekülün optik fiberler üzerine immobilize edilerek, absorbans, emilim veya saçılma prensiplerine dayalı ölçüm yapan cihazlar olarak tanımlanabilir. Bu sensörlerde dönüştürücü tarafından sağlanan çıktı ışık sinyali şeklindedir. Optik kırılma veya elektrokemilüminesans prensiplerine dayalı olarak geliştirilen bu sistemler, dönüştürücü yüzeyindeki reseptörlerin analiz edilecek hücrelerle (analit) etkileşime girmesi sonucu oluşan kırılma indisindeki veya yüzey kalınlığındaki küçük değişimleri algılayabilir. Işıkla ilgili bu değişimler, ortamda bulunan moleküllerin yoğunluğu, kütlesi ya da sayısıyla doğrudan ilişkilidir [57].

Işık ve biyomoleküller arasındaki etkileşimler; absorpsiyon, floresans, yüzey plazmon rezonansı ve interferometri gibi çeşitli optik prensiplere dayanır. Bu teknikler sırasıyla; biyomoleküllerin belirli dalga boylarındaki ışığı soğurma özelliği, belirli dalga boylarında ışığı emip farklı bir dalga boyunda yayma yeteneği, metal yüzeylerde (geleneksel olarak altın ve gümüş, ancak artık karbon nanotüpler ve grafen gibi yeni nesil malzemeler de kullanılmaktadır) ışığın yüzey plazmonlarını uyarması ve bu rezonansın biyomoleküllerle etkileşime girmesiyle değişmesi, ve ışık dalgalarının girişiminden yararlanılarak biyomoleküllerin sebep olduğu optik yol farklarının ölçülmesi temeline dayanmaktadır.

Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR):

Optik biyosensörlerin en erken örneklerinden biri olan Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR), ışığın bir metal yüzeydeki yüzey plazmonlarını uyarması ve bu uyarının biyomoleküllerin bağlanmasıyla değişimini esas alan bir tekniktir. Bu yöntem, biyomoleküler etkileşimlerin gerçek zamanlı ve etiket kullanılmadan gözlemlenmesini sağlar. Metal yüzeydeki serbest elektronların kolektif titreşimleri yüzey plazmonları olarak adlandırılır

ve bu plazmonlar belirli bir açı ve dalga boyundaki ışıkla uyarılabilir. Genellikle bir prizma veya optik fiber yardımıyla, ışık belirli bir açıyla metal yüzeye gönderilir ve bu açıda ışığın enerjisi yüzey plazmonlarını tetikler. Bu etkileşim sonucunda yansıyan ışığın şiddetinde azalma gözlenir ve bu durum rezonans olarak tanımlanır.

Biyomoleküller metal yüzeye bağlandığında, yüzey plazmonlarının karakteristik özelliklerinde bir değişiklik meydana gelir. Bu değişim, rezonans açısında ya da dalga boyunda bir kayma şeklinde kendini gösterir ve bu kayma dedektör aracılığıyla tespit edilir. Elde edilen bu kayma miktarı, yüzeye bağlanan biyomolekül miktarıyla orantılıdır [66].

Floresans Biyosensörler:

Optik biyosensörlerin ikinci türü olan floresans biyosensörler, bir molekülün belirli bir dalga boyundaki ışığı emip, ardından daha uzun dalga boyunda (daha düşük enerjili) bir ışık yayması şeklinde tanımlanan çalışma prensibini kullanmaktadır. Bu prensip üç temel aşamadan oluşur: İlk aşamada, floresan molekül belirli bir dalga boyundaki ışıkla uyarılır (uyarılma). Ardından, bu molekül daha uzun dalga boyunda ışık yayar. Son olarak, yayılan sinyal bir dedektör aracılığıyla ölçülür. Bu ölçüm sonucunda, hedef molekülün bağlanması durumunda üç farklı sonuç gözlemlenebilir: sinyalin artması, azalması ya da yayılan ışığın dalga boyunda bir kayma oluşması. Gelişen nanomalzeme teknolojisi sayesinde floresans sinyali güçlendirilebilir. Örneğin, sinyal yoğunluğunu artırmak için metal nanoparçacıklar ve kuantum noktalar (KN) kullanılmakta, sinyal-gürültü oranını iyileştirmek amacıyla karbon nanotüpler ve silika nanoparçacıklardan (NP) yararlanılmakta, özgüllüğü artırmak için ise aptamer işlevli ya da antikorla kaplı nanoparçacıklar tercih edilmektedir. Ayrıca, çoklu hedef tespiti için farklı renklerde kuantum noktalarına başvurulmaktadır [67].

Fiber Optik Biyosensörler:

Optik biyosensörlerin üçüncü türü olan fiber optik biyosensörler, ışığı iletme yeteneğine sahip optik fiberleri kullanarak biyomoleküllerin tespitini ve miktar tayinini gerçekleştirir. Bu sensörlerde genellikle, optik fiberin ucu ya da yüzeyine yerleştirilen biyoreseptörler kullanılır. Hedef biyomolekül bu reseptörle bağlandığında, ışığın yoğunluğu, dalga boyu, fazı veya polarizasyonunda değişiklik meydana gelir. Bu optik değişiklikler, bir dedektör tarafından algılanarak analiz edilir ve biyomolekül hakkında

bilgi elde edilir. Fiber optik biyosensörler, çoğunlukla diğer optik tekniklerle birlikte kullanılır. Örneğin, yüzey plazmon rezonansına dayalı fiber optik sensörler, interferometrik sistemler veya floresans temelli fiber optik biyosensörler bu kapsamda değerlendirilebilir [68].

İnterferometrik Biyosensörler:

Optik biyosensörlerin dördüncü tipi olan interferometrik biyosensörler, birden fazla ışık dalgasının girişiminden (interferans) yararlanarak, biyomoleküller ya da hücrelerin neden olduğu optik yol uzunluğundaki değişiklikleri tespit eder. Bu değişimler genellikle biyomoleküllerin yüzeye bağlanması veya hücrelerin yüzeye tutunmasıyla oluşur. Ölçüm dört temel adımda gerçekleşir: İlk olarak, lazer ya da geniş bantlı bir ışık kaynağıyla ışık dalgaları üretilir. Ardından splitter adı verilen bir aygıt aracılığıyla bu ışık ikiye ayrılır. Işığın bir kısmı referans yolundan geçerken, diğer kısmı sensör yüzeyine yönlendirilerek burada bulunan biyomolekül ya da analit ile etkileşime girer. Son aşamada ise bu iki ışık dalgası dedektör üzerinde birleştirilerek bir girişim modeli oluşturulur. Girişim desenindeki değişiklikler, hedef biyomolekül hakkında bilgi verir. Bu tür sensörler farklı interferometre tasarımlarına dayanabilir: Mach-Zehnder interferometresi iki farklı yolun sonunda sinyali birleştirirken; Michelson tasarımı aynalarla yansıtma esasına dayanır; Fabry-Pérot interferometresi ise iki paralel ayna arasında yansıyan ışıkların girişimini kullanır. Young interferometresi ise çift yarık prensibiyle çalışır [69].

1.3.2.2. Kütle Hassas Biyosensörler

Viskoelastisite, kütle ve elektriksel özellikler üzerine geliştirilen bu biyosensörler, kuartz kristal mikrodalga ayarlayıcıları gibi piyasada mevcut hassas ekipmanları kullanmaktadır. Bu tür biyosensörler; yüksek duyarlılık, çok yönlü kullanım alanları, düşük maliyet ve kullanım kolaylığı gibi avantajları sayesinde sıklıkla tercih edilmektedir. En dikkat çeken özelliklerinden biri, etiket kullanımı gerektirmeden tasarlanabilmeleridir. Geleneksel immünosensörler ise çoğunlukla sandviç formatında olup, hedef antikorun tespiti için sabitlenmiş birincil antikorun optik veya elektrokimyasal yöntemlerle doğrudan ya da dolaylı olarak izlenmesine dayanır. Piezoelektrik temelli ilk immünosensör, Shons ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilmiş olup, BSA (sığır serum albümini) kullanılarak tasarlanmış ve anti-BSA antikorlarının tayini amacıyla test edilmiştir [62].

Kütle hassas biyosensörler, farklı teknolojilere dayanır. En yaygın kullanılan çeşitleri Kuvars kristal mikrodenge (Quartz Crystal Microbalance, QCM), Yüzey akustik dalga (Surface Acoustic Wave, SAW) ve Mikrokantilever (Microcantilever) sensörlerdir.

QCM Sensörleri:

QCM sensörleri, piezoelektrik etkiye dayalı çalışır. Piezoelektrik malzemeler, üzerine mekanik stres uygulandığında elektrik yükü üretirken, elektrik alan uygulandığında ise mekanik deformasyon meydana getirir. Kuvars kristali, bu piezoelektrik özelliği sergileyen malzemelerdir. QCM cihazı, kuvars kristaline alternatif bir elektrik alan uygulayarak kristali belirli bir rezonans frekansında titreştirir. Bu frekans, kristalin fiziksel özellikleri (kalınlık, yoğunluk, elastik modül) ile ilişkilidir. Kristal yüzeyine bir madde (örneğin bir biyomolekül) bağlandığında, kristalin kütlesi artar. Bu kütle artışı, rezonans frekansında bir azalmaya yol açar. Frekans değişimi, Sauerbrey denklemi ile ilişkilendirilerek hesaplanabilir. Sauerbrey denklemi, QCM'deki kütle değişimi ile frekans değişimi arasındaki ilişkiyi tanımlar:

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}}\Delta m$$

Burada;

Δf = Frekans değişimi (Hz),
f_0 = Temele rezonans frekansı (Hz),
A = Kristalin aktif alanını (cm^2),
ρ_q = Quartz kristalinin yoğunluğu (g / cm^3),
μ_q = Quartz kristalinin kayma modülü ($g / cm \times s^2$),
Δm = Kütle değişimi (g),

Bu denklem, kütle değişiminin frekans değişimi ile doğru orantılı olduğunu gösterir [70].

Yüksek hassasiyet, gerçek zamanlı ölçüm yapabilme ve etiketleme işlemi gerektirmemesi avantajlarıyken seçicilik, karmaşık örnek matrisleri, maliyet ve cihaz karmaşıklığı dezavantajlarıdır [70].

SAW (Yüzey Akustik Dalgaları) Biyosensörleri:

Kütle hassas biyosensörlerden biri olan SAW sensörleri, yüzey akustik dalgalarının yayılma prensibine dayanarak çalışır. Bu dalgalar, piezoelektrik bir malzeme (genellikle lityum niobat veya kuvars) üzerinde oluşturulur ve yüzey boyunca ilerler. Yüzeye bağlanan biyomoleküller, dalganın hızını ve frekansını değiştirir, bu da sensör tarafından ölçülebilir.

SAW sensörleri, piezoelektrik malzemelerin elektrik alan uygulandığında mekanik stres üretme veya mekanik deformasyon meydana getirme özelliklerinden faydalanır. Sensör yüzeyine uygulanan elektrik sinyali, piezoelektrik malzeme üzerinde mekanik titreşimler yaratır ve bu titreşimler yüzey akustik dalgaları olarak yayılır.

SAW sensörlerin temelinde yer alan piezoelektrik malzeme (örneğin, lityum niobat, kuvars) piezoelektrik substrat olarak bilinir. Sensör yüzeyine yerleştirilen ve elektrik sinyallerini mekanik titreşimlere dönüştüren parmak şeklindeki elektrotlar ise interdigital transducer (IDT) olarak adlandırılır. IDT'ler, akustik dalgaların üretilmesi ve algılanmasından sorumludur. Biyomoleküllerin bağlanmasını sağlamak için yüzey modifikasyonu yapılır; bu işlemde antikorlar, DNA probları veya polimer kaplamalar kullanılabilir.

SAW sensörlerin iki ana çalışma modu vardır. Delay line modunda, bir IDT tarafından üretilen akustik dalga yüzey boyunca ilerler ve diğer IDT tarafından algılanır. Yüzeye bağlanan moleküller, dalganın hızını ve gecikme süresini değiştirir. Rezonatör modunda ise akustik dalga, rezonatör yapısı içinde sürekli olarak yansıtılır ve yüzeye bağlanan moleküller rezonans frekansını değiştirir.

SAW sensörlerinin avantajları arasında yüksek hassasiyet, gerçek zamanlı ölçüm yapabilme ve etiketleme işlemi gerektirmemesi yer alırken, dezavantajları arasında düşük seçicilik, karmaşık örnek matrisleri, yüksek maliyet ve cihaz karmaşıklığı bulunur [71].

Mikrokantilever Biyosensörleri:

Kütle hassas biyosensörlerin son örneği olan mikrokantilever sensörler, genellikle silikon veya silikon nitrür gibi malzemelerden üretilen küçük, kiriş benzeri yapılardır. Bu yapılar, biyomoleküllerin bağlanması sonucu meydana gelen kütle değişikliklerini veya yüzey gerilmesindeki değişimleri algılar. Mikrokantileverler, adından da anlaşılacağı üzere

birkaç mikrometre kalınlığında ve yüzlerce mikrometre uzunluğunda olup, biyolojik materyalleri tespit etmek için yüzeyleri modifiye edilir.

Mikrokantilever sensörlerin iki farklı çalışma modu bulunmaktadır: statik ve dinamik. Statik modda, mikrokantilever üzerine bağlanan moleküller, yapının bükülmesine neden olur. Bu bükülme, optik veya piezoelektrik yöntemlerle ölçülür. Dinamik modda ise mikrokantilever belirli bir frekansta titreştirilir. Üzerine bağlanan moleküller, bu frekansı değiştirir ve bu frekans değişiminden kütle değişimi hesaplanır. Bu işlem, QCM (Quartz Kristal Mikrokantilever) mantığına benzer şekilde çalışır ve frekans değişikliği kullanılarak kütle değişimi hesaplanır. Bu hesaplama için aşağıdaki formül kullanılabilir:

$$\Delta f = -\frac{f_0}{2}\frac{\Delta m}{m}$$

Burada;

Δf = Frekans değişimi (Hz),
f_0 = Temele rezonans frekansı (Hz),
Δm = Kütle değişimi (g),
m = Mikrokantileverın kütlesi (g),

Bu denklem, QCM mantığında olduğu gibi mikrokantilever mantığının da, kütle değişiminin frekans değişimi ile doğru orantılı olduğunu göstermektedir [72].

Yüksek hassasiyet, gerçek zamanlı ölçüm yapabilme ve etiketleme işlemi gerektirmemesi avantajlarıyken seçicilik, karmaşık örnek matrisleri, maliyet ve cihaz karmaşıklığı dezavantajlarıdır [72].

1.3.2.3. Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, gelişmiş biyosensörler arasında yer almakla birlikte en eski türlerindendir. Diğer biyosensörlerle kıyaslandığında, gelişimlerini büyük ölçüde tamamlamış olan bu sensörler, ilk dönemlerinde kandaki glikoz seviyesini tespit etmek için kullanılan enzim elektrotları olarak tasarlanmışlardır. Zamanla, elektrokimyasal biyosensörlerin hassasiyetini artırmak amacıyla enzim bağlantılı immünoelektrokimyasal (IEC) sensörler geliştirilmiştir.

Amperometrik/Voltmetrik Biyosensörler:

Amperometrik sensörlerde, elektrokimyasal hücrelere sabit bir potansiyel fark uygulanır ve buna bağlı olarak ilişkili akım, kimyasal bir reaksiyon sonucunda elde edilir. Amperometrik biyosensörler, biyolojik olarak aktif materyallerle kaplanmış elektrotlar kullanarak, konsantrasyonla orantılı akımı ölçer. Bu sensörler, oksidasyon ve elektroaktif türlerin elektrot yüzeyinde indirgenmesi üzerine çalışır.

Amperometrik bir dönüştürücü, enzimler, antikorlar, DNA probu, tam hücreler veya dokular gibi biyoalgılama materyalleriyle kullanılabilir. Örneğin, glutamat biyosensörü geliştirmek amacıyla stabil bir enzim elektrodu tasarlanmış ve geniş bir lineer aralıkta, uzun ömürlü ve yüksek hassasiyetle çalıştığı belirtilmiştir. Bir başka çalışmada ise trigliserid algılamak için amperometrik bir biyosensör hazırlanmış; bir diğer çalışmada ise meyve suyu gibi sıvılardaki antioksidan kapasitesini belirlemek amacıyla yüksek hassasiyetli amperometrik enzim biyosensörü oluşturulmuştur [57].

Potansiyometrik Biyosensörler:

Potansiyometrik biyosensörler, uygun biyoreseptörler ve uyumlu transdüserler kullanarak, bir iyonun iyonofora bağlanmasından kaynaklanan elektriksel gerilim değişikliklerini izler. Potansiyometrik tespit, biyolojik algılama elementi içeren bir elektrokimyasal hücrede genellikle ya bir ürünün aktivitesinin ya da elektrokimyasal reaksiyondaki bir tepkenin gerilimini ölçer.

Bu sensörler çeşitli şekillerde kullanılabilir. Örneğin, Alan Etkili Transistör (FET: Field Effect Transistor), Bergveld tarafından önerilmiştir ve etiketsiz bağlanma işlemleri için uygundur. FET'lerin küçük boyutları, istenen özelliklerinden biridir.

Diğer bir potansiyometrik biyosensör grubu ise daha büyük partikülleri tespit edebilmek için tasarlanmıştır ve bu sensörler, ışıkla yönlendirilebilen potansiyometrik sensör (LAPS) olarak adlandırılır. Bir çalışmada, LAPS potansiyometrik biyosensörü gıdada *E. coli O157:H7*'nin tespitinde kullanılmıştır. Başka bir çalışmada ise, LAPS sensörü sülfat ve nitrat iyonlarını tespit etmek için anyon seçici olarak kullanılmıştır. Bir başka örnekte ise, enzim potansiyometrik biyosensör, gıda bitkilerindeki siyanitleri tespit etmek amacıyla tasarlanmış ve geliştirilmiştir. Güncel çalışmalardan birinde, 2016 yılında bal

ve propolis örneklerinde toplam fenol miktarının tespiti için katı temaslı bir potansiyometrik biyosensör geliştirilmiştir.

Başka bir çalışmada, *E. coli* pH'ya duyarlı hidrojel nanofiber-ışıklı adreslenebilir potansiyometrik sensör (NF-LAPS) ile tespit edilmiştir. Ayrıca, vanadyum pentoksit nanorodlarının spin destekli montajı ile kimyasal türlerin potansiyometrik tespiti yapılmıştır. Bu örnekler, elektrokimyasal uygulamaların sıkça kullanıldığını göstermektedir [57].

1.3.2.4. İmpedimetrik Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EİS), bir elektrokimyasal hücreye uygulanan küçük genlikli (~5-50 mV) alternatif voltaj (AC) ile sistemin empedansını ölçen bir tekniktir. Bu teknik, bir elektrokimyasal sistemin elektriksel özelliklerini anlamak için kullanılır. Empedans (Z), bir sistemin alternatif akıma karşı gösterdiği dirençtir ve iki ana bileşenden oluşur: gerçek bileşen (rezistif) ve sanal bileşen (kapasitif/indüktif).

Kondansatörler, iki iletken plaka arasına yerleştirilen yalıtkan bir madde ile elektrik enerjisini depolayan elemanlardır. Kondansatör üzerinden geçen akım, birim zamanda depolanan yük miktarıyla ifade edilir. Bu depolama, kondansatörün kapasitesine ve üzerindeki elektrik alanına bağlıdır. EİS, kondansatör gibi elemanların davranışını, yani kapasitif özelliklerini, sistemdeki yük transferi ve elektrokimyasal reaksiyonlarla birlikte ölçmek için ideal bir yöntemdir.

EİS, özellikle elektrot yüzeylerinde meydana gelen fiziksel ve kimyasal değişiklikleri, reaksiyon hızlarını ve bileşenlerin etkileşimlerini incelemek için yaygın olarak kullanılır. Bu teknik, biyosensörlerin geliştirilmesinde, elektrokimyasal hücrelerin performansının izlenmesinde ve çeşitli materyallerin elektriksel özelliklerinin analiz edilmesinde son derece kullanışlıdır.

$$i(t) = \frac{dq}{dt} \rightarrow i(t) = \frac{C.dV}{dt} \rightarrow V_c = \frac{1}{C}\int_0^t i.dt + V(0)$$

Yukarıdaki formülle kapasitör gerilimi izah edilir.

Burada dikkat edilmesi gereken husus şudur;

Sabit DC gerilim uygulandığında formüldeki gerilim zamanla değişmediği için DC devrelerde kapasitör açık devre rolünü üstlenmektedir.

Bobin telleri, manyetik alanı elektrik enerjisi olarak depolamaktadır. Bobin üzerinde oluşan gerilim, birim zamanda A alanında oluşan manyetik akıya eşittir.

$$V(t) = \frac{dQ}{dt} \rightarrow V(t) = \frac{d.L.i(t)}{dt} \rightarrow V_L = L.\frac{di}{dt}$$

Yukarıdaki formülle bobin gerilimi izah edilir.

Burada dikkat edilmesi gereken husus şudur;

Sabit DC gerilim uygulandığında formüldeki akım zamanla değişmediği için DC devrelerde bobin kısa devre rolünü üstlenmektedir.

$$X_L = \omega.L = 2.\pi.f.L$$

Yukarıdaki formül bobinin frekans bağımlı empedansını ifade etmektedir.

Aşağıdaki formül kapasitörün frekans bağımlı empedansını ifade etmektedir.

$$X_C = \frac{1}{C.\omega} = \frac{1}{2.\pi.f.C}$$

X_L ve X_C ifadelerini koordinat düzleminde yerleştirelim. Bu durumda y ekseni üzerinde düşünürsek, X_L ifadesi pozitif kısımda X_C ifadesi ise negatif kısımda yer edinecektir. X ekseni üzerinde ise saf rezistif direnç olan ve R sembolü ile ifade ettiğimiz direnç yer alacaktır. Bu koordinat düzleminde y ekseni imajiner yani sanal eksen olurken X ekseni reel eksen olarak isim almaktadır. Bu sistemlerde maksimum güç elde edilebilmek için öyle C ve L değerleri seçilir ki, sonuçta bobinden kaynaklı indüktüf yük ile kapasitörden kaynaklı kapasitif yük birbiri ile zıt yönlerde aynı değere sahip olur ve ortaya maksimum güç çıkartılır. Bobinin ve kapasitörün empedans formülleri üzerinden yorum yaparsak şu durumları kolaylıkla söyleyebiliriz;

1. Frekansın 0 olduğu durumda bobin direnci 0 olur. Dolayısıyla, DC potansiyelde kısa devredir.

2. Frekansın ∞ olduğu durumda bobin direncinin ∞ olacağı aşikâr. Bu durumda yüksek frekanslarda açık devredir.

3. Frekansın 0 olduğu durumda kapasitörün direnci ∞ olur. Dolayısıyla, DC potansiyelde açık devredir.

4. Frekansın ∞ olduğu durumda kapasitörün direncinin 0 olacağı aşikâr. Bu durumda yüksek frekanslarda kısa devredir.

Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EİS), elektrot-çözelti ara yüzeyindeki fiziksel ve kimyasal süreçleri analiz etmek için yaygın olarak kullanılan güçlü bir tekniktir. EİS, özellikle yüksek frekanslı sinyaller uygulandığında kapasitanstan ve indüktif değişikliklerden etkilenen direnç ölçümü ile çalışır. Bu, elektrot yüzeyindeki reaksiyonların karakterize edilmesine ve izlenmesine olanak tanır.

EİS'in güçlü yönlerinden biri, farklı modifikasyonların veya katmanların fiziko-kimyasal süreçlerini karakterize edebilmesidir. Ayrıca, yüksek frekanslarda yük transferi ve düşük frekanslarda kütle transferi gibi farklı süreçlerin analiz edilmesine imkân verir. Bu da, elektrokimyasal sensörler ve biyosensörler gibi uygulamalarda çok değerli bir avantajdır.

EİS, voltametrik veya amperometrik yöntemlerle karşılaştırıldığında, küçük genlikli bozulmalarla çalıştığı için tahribatsız bir yöntem olarak öne çıkar. Büyük genlikli perturbasyon teknikleri (örneğin dönüşümlü voltametri veya diferansiyel puls voltametri) elektrokimyasal arayüzü bozabilirken, EİS, sistemin etkileşimini bozmadan hassas ölçümler yapabilmesine olanak sağlar. Ayrıca, voltametrik ölçümler için gereken gerilim taraması ihtiyacını ortadan kaldırarak daha hızlı ve verimli ölçümler yapar.

Bu avantajları nedeniyle EİS, son yıllarda elektrokimyasal analizlerde giderek daha fazla tercih edilen bir teknik haline gelmiştir. Özellikle biyosensör geliştirme, çevresel izleme ve biyomoleküllerin tespiti gibi alanlarda önemli bir yer tutmaktadır [73].

EİS, biyolojik olayları doğrudan elektriksel sinyallere dönüştürerek yüksek kaliteli veriler sağlar ve tahribatsız bir yöntem olarak oldukça dikkat çekicidir. Tahribatsız olmasının nedeni, uygulanan gerilimin dar bir aralıkta uygulanmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, EİS, kanser hücresi tespiti için biyosensörlere alternatif bir yöntem sunan

immünosensörlerin yük transfer süreçlerini izlemek için etkili ve kullanışlı bir araçtır [73].

İmpedans terimi, ilk olarak 1886 yılında elektrik mühendisi, matematikçi ve fizikçi Oliver Heaviside tarafından kompleks sayıları elektrik devrelerine uyarlarken kullanılmıştır. İmpedans ölçüm yöntemleri, elektrot kinetiği, çift tabaka çalışmaları, bataryalar, korozyon, katı faz elektrokimyası ve biyoelektrokimya gibi birçok elektrokimya dalında yaygın olarak kullanılmaktadır. EİS, frekans düzleminde elektriksel bilgi sağlayan bir karakterizasyon tekniğidir. Bu yöntemle, elektrokimyasal hücrede gerçekleşen süreçler, kapasitörler ve rezistörler kullanılarak modellenebilir. Eşdeğer devre kullanılarak deneysel spektrumlar, ilgili teorik eğrilerine kolaylıkla yerleştirilebilir ve elektriksel parametre verileri elde edilebilir. EİS genellikle, elektrokimyasal hücreye AC potansiyeli uygulanarak ve hücreden geçen akım belirlenerek ölçülür [74].

İmpedans ölçümleri için küçük bir sinüzoidal AC gerilimi (tipik olarak 5-50 mV) uygulanır ve akım yanıtı belirlenir. Bir elektrokimyasal sistemin impedansı da tipik olarak kartezyen koordinatlarda ifade edilebilir.

$$Z(\omega) = Z_{re} + i.Z_{im}$$

Burada Z_{re} (veya Z') ve Z_{im} (veya Z") sırasıyla impedansın gerçek ve sanal kısımlarıdır. Kutupsal koordinatlarda bu ifade aşağıdaki şekilde düzenlenir.

$$Z(\omega) = |Z|.e^{i\theta}$$

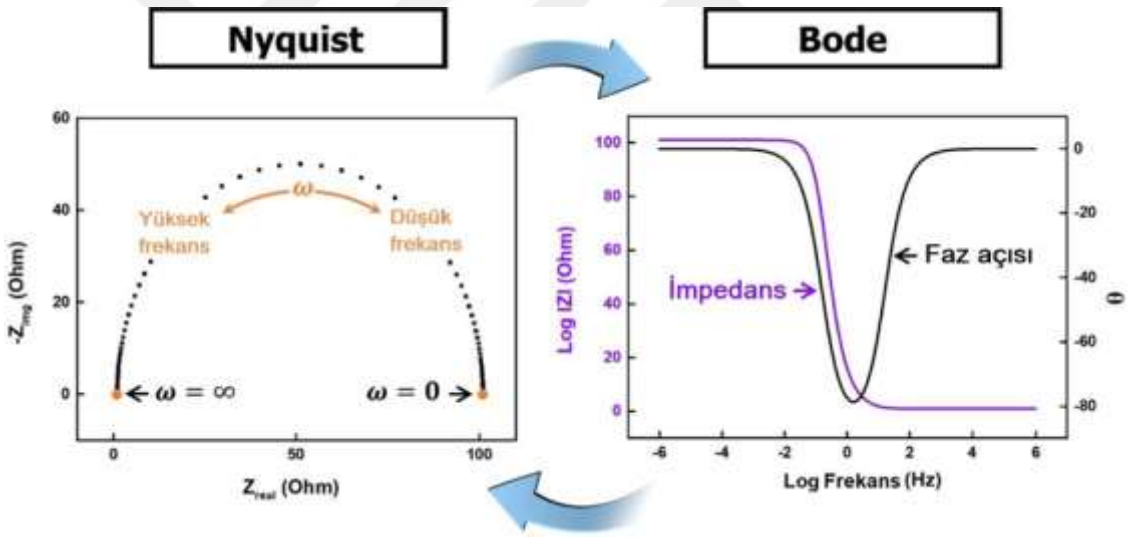
$$|Z| = \sqrt{(Z_{re})^2 + (Z_{im})^2}$$

Z, modülüstür ve θ ise, verilen frekanstaki fazdır.

İmpedans spektrumu, uygulanan frekans aralıklarındaki faz kayması ve büyüklüğünü gösteren "Bode grafiği" ve Z(ω)'nin gerçek ve hayali kısımlarını kartezyen koordinatlar kullanarak temsil eden "Nyquist grafiği" olmak üzere iki farklı şekilde sunulabilir. Şekil 1.5.'de gösterildiği üzere, her iki grafikte de genellikle yüksek frekansta başlar ve düşük frekansta sona erer, bu da ilk direncin daha hızlı belirlenmesini sağlar. Bir Nyquist grafiğinde, deneysel veri seti $Z(Z_{re,i}, Z_{im,i}, \omega_i)$, farklı frekanslarda ölçülen n noktadan (i =

1, 2,…, n) oluşur ve her nokta belirli bir frekanstaki impedansın gerçek ve hayali kısmını temsil eder [74].

Nyquist grafikleri, genellikle gerçek eksende uzanan bir yarım daire bölgesi ve ardından düz bir çizgi içerir. Nyquist grafiğindeki yarım daire kısmı (daha yüksek frekansta) elektron transferiyle sınırlı bir süreci temsil ederken, düz çizgi (daha düşük frekansta) difüzyonla sınırlı süreci gösterir. Bu spektrum, elektron transfer kinetiği ve difüzyon özelliklerini incelemek için kullanılabilir. Hızlı elektron transfer süreçlerinde, impedans spektrumu yalnızca doğrusal kısmı içerirken, yavaş elektron aktarım süreçlerinde daha büyük bir yarım daire şeklindeki bölge gözlemlenir. Nyquist grafiği, eşdeğer devre modelindeki olası mekanizmalar veya yönetim fenomenleri hakkında da bilgi sağlar [74].



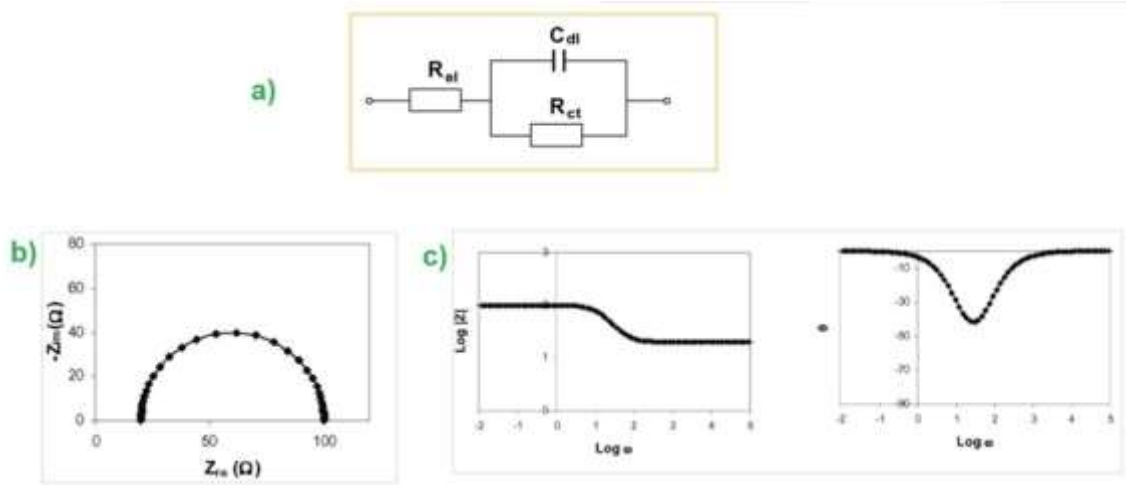
Şekil 1.5. Nyquist ve Bode grafiklerinin gösterimi [84]

Bode grafiği ise, impedansın alternatif bir gösterimidir. Modül ve fazın frekans bağımlılıklarını gösteren iki tür Bode diyagramı bulunur: log Z ~ logω (veya Z ~ logω) ve θ ~ logω. Bode grafiği genellikle ölçülen frekans aralığında logaritmik olarak sunulur çünkü her onlu grupta aynı sayıda nokta toplanır. Bode grafiği, sistemin kararsız hale geldiği faz sınırlarını gözlemlemek için büyük avantajlar sunar (faz veya büyüklükteki şiddetli değişiklikler). Bu nedenle, elektronik cihazlardaki sensörler, filtreler ve

transistörlerin incelenmesi için kullanışlıdır. Ancak deneysel impedansın en yaygın grafik temsili, genellikle daha açıklayıcı olan Nyquist grafiğidir [74].

EİS veri analizi, genellikle eşdeğer bir elektrik devresi modeline uyarlanarak yapılır. Eşdeğer devre modelleri, impedans spektrumlarını yorumlamakta son derece yararlıdır. Bu modeller, dirençler, kapasitanslar, indüktanslar ve bazı özel elektrokimyasal elemanların (örneğin Warburg difüzyon elemanları ve sabit faz elemanları) birleşiminden oluşur ve aynı uyarma sinyali uygulandığında elektrokimyasal sistemle aynı yanıtı verir. Eşdeğer devre modelleri tamamen veya kısmen deneysel olabilir. Modeldeki her devre elemanı, elektrokimyasal hücredeki bir fiziksel işlemden türetilir ve karakteristik bir impedans davranışı sergiler. İmpedans spektrumunun şekli, modeldeki elektrik elemanlarının tipi ve aralarındaki bağlantı türü (seri veya paralel kombinasyonlar) tarafından belirlenir. Eşdeğer devre, elektrokimyasal sistemi mümkün olduğunca basit bir şekilde temsil etmelidir. Önerilen model, en az bir elektrolit direnci, çift katman kapasitansı ve faradaik veya faradaik olmayan sürecin impedansını içeren bir eşdeğer devre modelinden elde edilen impedans ile sistemden ölçülen impedans arasında en iyi uyumu sağlamalıdır [74].

Bir elektrokimyasal arayüzün en basit ve en yaygın kullanılan modeli Randles devresidir. Bir Randles hücresi için eşdeğer devre ve Nyquist-Bode grafiklerinin tümü Şekil 1.6.'da verilmiştir.



Şekil 1.6. Randles hücresinin şematik olarak gösterimi: a) Eşdeğer bir devre, b) Nyquist grafiği ve c) Bode grafiği [84]

Devre, bir elektrolit direnci, çift tabaka kapasitansı ve bir yük aktarım direncini içerir. Şekil 1.6.a'da görüldüğü gibi, R_{ct} yük transfer direncini, C_{dl} çift tabakanın kapasitansını ve R_{el} elektrolitin direncini ifade etmektedir.

Devrede C_{dl}, yük aktarım direnci ile paralel olarak yerleşim gösterir. Bir Randles hücresinin Nyquist grafiği her zaman yarım daire şeklindedir.

Yüksek frekanslarda C_{dl}'nin impedansı çok düşüktür, bu nedenle ölçülen empedans R_{el} olma eğilimindedir.

Çok düşük frekanslarda ise, C_{dl}'nin impedansı aşırı derecede yükselir ve bu nedenle ölçülen toplam direnç $R_{ct} + R_{el}$ olma eğilimindedir.

Buna göre, orta frekanslarda, empedans R_{el} ve $R_{ct} + R_{el}$ arasındadır. Bu nedenle, yüksek frekanslı kesişme, elektrolit direnci ile ilişkilidir, düşük frekanslı kesişme ise yük aktarım direnci ve elektrolit direncinin toplamını yansıtır. Yani, yarım dairenin çapı yük aktarım direncine eşittir. Bode diyagramında, bir büyüklük grafiği ve bir faz açı grafiği içerdiğinde, Randles hücresi için elektrolit direnci değerleri ve elektrolit direnci ile polarizasyon direncinin toplamı, büyüklük grafiğindeki yatay çizgiden kolayca belirlenebilir. Faz açıları, yüksek veya düşük frekanslarda 0°'ye yakınken, ara frekanslarda 0° ile 90° arasında değişir. Randles hücresi modeli yalnızca faydalı olmakla kalmaz, aynı zamanda daha karmaşık modellerin oluşturulmasında başlangıç noktası olarak da kullanılabilir [74].

1.3.2.5. Kâğıt Tabanlı Grafit Temelli Elektrokimyasal Biyosensörler

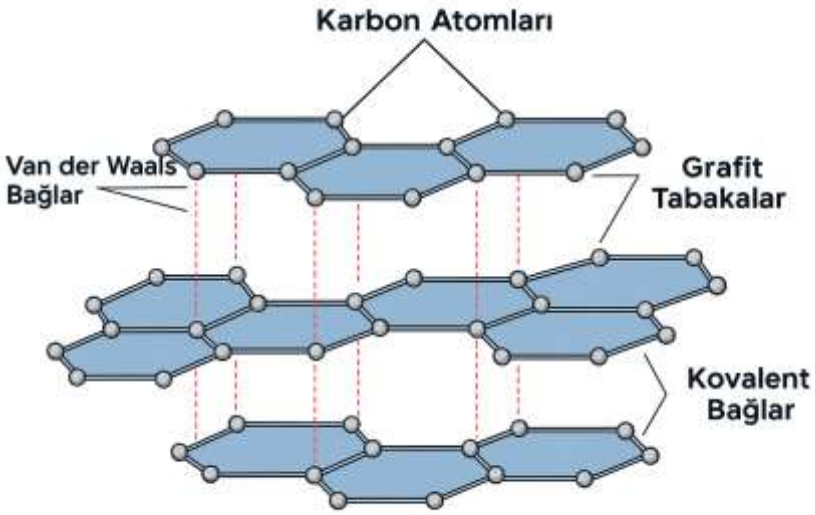
Kâğıt tabanlı grafit temelli elektrokimyasal biyosensörler, düşük maliyetli, taşınabilir ve tek kullanımlık olmaları nedeniyle son yılların büyük ilgi gören bir teknolojidir. En genel ifadeyle kâğıt substrat, grafit temelli elektrotlar ve biyolojik tanıma elementleri ile oluşturulmaktadır. Kâğıt substrat olarak genelde filtre kâğıdı veya kromatografik kâğıtlar tercih edilmektedir. Grafit temelli elektrotlar olarak karbon bazlı grafit mürekkep kullanılmaktadır. Elektrokimyasal ölçüm gereği kâğıt substrat malzeme üzerine karbon bazlı grafit mürekkep basılarak çalışma elektrodu (WE), referans elektrodu (RE) ve karşı elektrot (CE) oluşturulur.

Oluşturulan bu yüzey üzerine hedef molekülü tespit edecek biyolojik tanımlama ajanları yerleştirilir. Hedef molekül bağlandığında amperometrik, voltametrik veya empedans spektroskopisi (EİS) yöntemleriyle biyosensörün elektrokimyasal değişimi üzerinde hedef moleküle dair bilgiler elde edilir.

Diğer yöntemlerde ifade ettiğimiz altın, gümüş vb. malzemelere nazaran kâğıt ve grafit ucuz malzemeler olduğu için düşük maliyetlidir. Hafif, taşınabilir yapıda olması sahada kullanım için önem arz etmektedir. Ölçüm sonuçlarını hızlıca üretebilmektedir. Tek kullanımlık olması kontaminasyon riskini ortadan kaldırmaktadır. Biyolojik olarak parçalanabilir olduğu için ise çevre dostu bir biyosensör olarak çok avantajlıdır. Bu durumlardan ötürü özellikle günümüz on yılında nano malzeme entegre edilerek ölçüm hassasiyetin artırıldığı [75], özellikle pandemi döneminde akıllı telefonların bluetooth marifetiyle veri aktarımının yapılması sonucu COVID-19 antijeninin tespit edildiği [76], tek kağıt şerit üzerinde kardiyovasküler rahatsızlıklara sebep olacak C-reactive protein (CRP), troponin I (cTnI) ve procalcitonin (PCT) parametrelerinin çoklu tespitini yapıldığı [77] biyosensörleri görüyoruz.

Grafit

Kömür ve organik bileşiklerin ana elementi olan Karbon (C), periyodik tablonun 4A grubunda yer alan ametal bir elementtir ve yerkabuğunun yaklaşık %0,2'sini oluşturur. Karbonun allotropları arasında elmas ve grafit bulunur; allotrop, aynı elementin farklı kristal yapılarında bulunan çeşitleridir. Grafit, karbon mineralleri arasında yer alırken, kömür ve elmastan çok farklı özelliklere sahiptir. Hekzagonal kristal yapısına sahip grafitte, karbon atomları, Şekil 1.7.'de görüldüğü gibi üst üste yığılmış geniş, yassı levhalar oluşturacak şekilde iki boyutlu düzlemlerde birbirlerine bağlanır. Bu karbon levhalar, birbirleri üzerinde kolayca kayarak grafite iyi bir yağlayıcı özellik kazandırır. Grafitte, düzlemler içindeki bağlar oldukça kuvvetliyken, düzlemler arasındaki bağlar zayıftır. Bu yapısal farklılık, grafitin kaygan ve pul pul bir davranış sergilemesine neden olur [78-81].



Şekil 1.7. Grafitin atomik yapısı [78]

Günümüzde oldukça popüler hale gelen ve son yıllarda art arda stratejik madenler listesinde yer alan grafiti bu denli önemli ve stratejik yapan üç temel özelliği bulunmaktadır: mükemmel ısı iletkenliği, mükemmel elektrik iletkenliği (hatta bazı koşullarda bakırdan 20 kata kadar daha iyi iletken olabilmesi) ve yüksek ısıya dayanıklılığıdır. Bu üstün fiziksel özellikler, grafiti birçok endüstriyel uygulama için vazgeçilmez bir hammadde haline getirmiştir [78-81].

Doğal kaynakların tarihsel süreçte artan stratejik önemi doğrultusunda, pek çok ülke, uluslararası topluluk ve özellikle Avrupa Birliği (AB), kritik hammaddeler üzerine kapsamlı çalışmalar gerçekleştirmiştir. Bu çalışmaların en dikkat çekici olanları arasında AB'nin hazırladığı "AB için Kritik Hammaddeler Raporu" ve Britanya Jeolojik Araştırmalar Konseyi'nin (British Geological Survey - BGS) oluşturduğu "Risk Listeleri" yer almaktadır. AB raporunda toplam 41 hammadde değerlendirilmiş ve bunlar arasından 14'ü kritik olarak sınıflandırılmıştır; grafit de bu 14 kritik hammaddeden biri olarak tanımlanmıştır.

Benzer şekilde, Britanya Jeolojik Araştırmalar Konseyi de 2011 yılında 52 element veya element grubunu analiz ederek "Risk Listesi 2011"i yayımlamış, 2012 yılında ise endüstriyel minerallere odaklanan ayrı bir çalışma ile "BGS Endüstriyel Mineraller Risk Listesi 2012"yi hazırlamıştır. Her iki listede de grafit, yüksek risk ve stratejik değer

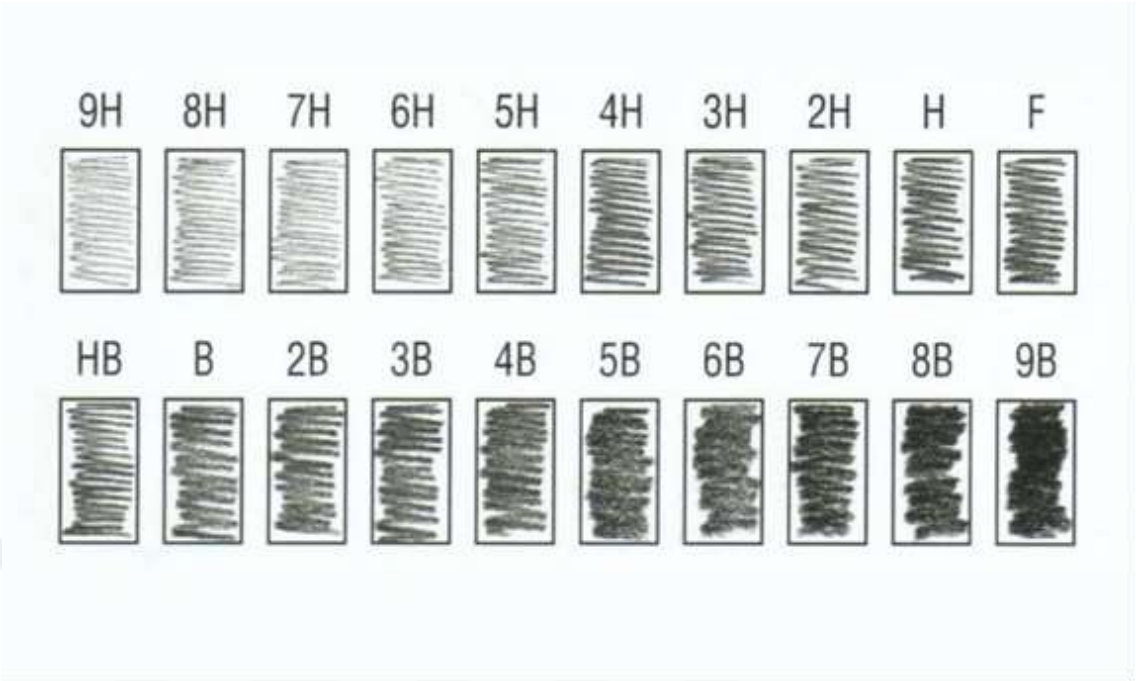
taşıyan hammaddeler arasında yer almıştır. Bu durum, grafitin gelecekteki teknolojik gelişmelerde ve endüstriyel üretimdeki kritik rolünü vurgulamaktadır [78-81].

Kurşun (Grafit) Kalem

Günlük yaşantımızda sıkça kullandığımız ve halk arasında "kurşun kalem" olarak bilinen yazım araçları, literatürde pencil graphite olarak tanımlanır. Bu kalemlerin uçları aslında kurşun içermez; temel olarak grafit (%65), kil (%30) ve bağlayıcı maddelerden (örneğin mum, reçineler veya yüksek moleküllü polimerler) oluşan bir kompozit malzeme içermektedir [82-85]. Bu bileşenlerin oranları, kalemin sertlik ve siyahlık özelliklerini belirleyen önemli faktörlerdir.

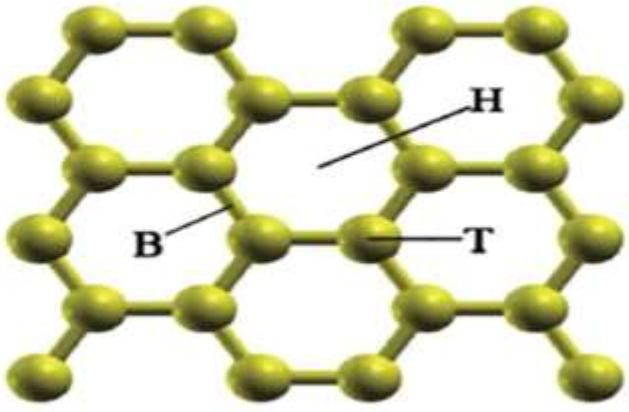
Grafit kalemler, Avrupa Harf Ölçeği'ne göre H (sertlik) ve B (siyahlık) harfleriyle etiketlenir. Bu ölçek 9H'den (en sert) 9B'ye (en yumuşak ve siyah) kadar uzanır. H tipi uçlar daha fazla kil içerdikleri için serttir ve daha az iz bırakırlar, bu da teknik çizimlerde tercih edilmelerini sağlar. Öte yandan, B tipi uçlar daha fazla grafit içerdiğinden daha yumuşaktır ve daha koyu bir iz bırakır, bu nedenle genellikle sanat uygulamalarında kullanılır. HB tipi ise grafit ve kilin dengeli bir karışımını içerdiği için günlük yazımda en yaygın kullanılan kalem türüdür. Şekil 1.8.'de gösterilmektedir.

Kariuki'nin yaptığı bir çalışmada, uçlara eklenen kilin kurşun kalem grafitlerinin kimyasal (örneğin iyon değişim kapasitesi) ve yapısal özellikleri (örneğin kristal düzensizlik derecesi, yüzey morfolojisi gibi) üzerinde doğrudan etkili olduğu ortaya konmuştur [86]. Bu bulgu, sadece yazım deneyimini değil, aynı zamanda bu malzemenin elektriksel, mekanik ve yüzey özelliklerini etkileyebileceğinden, daha geniş bir uygulama alanı için de önem arz etmektedir.



Şekil 1.8. Grafit kurşun kalemlerin sertlik derecesi

Grafit, hem metalik hem de metalik olmayan özellikler göstererek elektrot malzemesi olarak ideal bir seçenek oluşturur. Chehreh Chelgani ve ekibinin çalışmalarına göre, dünya genelinde üretilen grafitin yaklaşık %4'lük kısmı, inorganik (reçine) veya organik (kil veya selüloz gibi polimerler) bağlayıcı matrisler içindeki ince grafit tozundan kalem üretiminde kullanılmaktadır [87].



Şekil 1.9. Grafitin atomik düzeyde bağlantısı [88]

Grafitin atomik düzeyinde bulunan karbon (C) atomlarından oluşan hekzagonal yapı yani bal peteği mimarisinde cisimler 3 noktaya temas edebilirler. Bunlar altıgenlerin ortasındaki oyuk (H), karbon-karbon bağı üzerindeki köprü (B) veya bir karbon atomunun üstü (T) olabilir (Şekil 1.9.).

Kâğıt Sensör

Kâğıt, doğası gereği bazı kendine özgü özelliklere sahiptir. Selüloz liflerinden üretilen bu materyal, doğal olarak hidrofilik bir yapıya sahip olup, sıvıların lifli yapı içerisine kolayca nüfuz etmesine olanak tanır [89].

Selüloz bazlı kâğıdın yüzeyine grafit kaplanarak sensör elde edilebilmesi, onu düşük maliyetli ve kolay erişilebilir bir malzeme hâline getirmiştir. Sahip olduğu bu özellikler sayesinde, son yıllarda kâğıt, biyosensör üretiminde dikkat çeken ve araştırmacılar tarafından yaygın olarak tercih edilen bir platform hâline gelmiştir. Literatürde yer alan birçok çalışma, kâğıt tabanlı biyosensörlerin avantajlarını vurgulamaktadır. Örneğin, "önerilen kâğıt tabanlı biyosensör düşük maliyetli, kolay kullanımlı ve yüksek hassasiyetli bir yapıya sahipti; bu da onu kaynakların sınırlı olduğu ortamlarda bakım noktası (POC) teşhisleri için uygun maliyetli ve uygulanabilir kıldı" şeklinde değerlendirmeler yer almaktadır. Bu tür biyosensörlerin literatürde güçlü bir konumda olduğu görülmektedir [90-96].

Son dönemlerde, kâğıt temelli mikroakışkan cihazlar (µPADs) tanısal uygulamalarda ve özellikle noktada bakım (Point-Of-Care, POC) testlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. POC tanı cihazlarının kullanıcı dostu ve ekonomik olması gerekmektedir. µPAD'ler bu ihtiyacı karşılayan önemli bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır. Bu cihazların üretiminde fotolitografi, plazma aşındırma, serigrafi baskı, fleksografik baskı, mum kaplama ve mürekkep püskürtmeli baskı gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir [89].

µPAD sistemleri; klinik tanılarda, gıda güvenliği analizlerinde ve çevresel izleme gibi çeşitli alanlarda kullanılabilmektedir. Doğru tanı, hastalıkların önlenmesi ve tedaviye başlanması açısından temel adımdır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), gelişmekte olan ülkelerde kullanılacak teşhis cihazlarının ASSURED kriterlerini taşıması gerektiğini vurgulamaktadır: uygun maliyetli, hassas, özgül (spesifik), kullanıcı dostu, hızlı ve

sağlam, ekipman gerektirmeyen ve yaygın şekilde dağıtılabilir olmalıdır. Kâğıt temelli mikroakışkan analitik cihazlar, yani µPAD'ler, desenlenmiş kâğıt yapılarıyla bu kriterleri karşılayacak yenilikçi bir platform sunmaktadır. Bu cihazlar, klasik mikroakışkan sistemlerin işlevselliğini, strip testlerin basitliğiyle birleştirirken; sıvı akışı büyük oranda kapillarite ve buharlaşma yoluyla sağlandığı için, harici güç ya da ekipman gerektirmeden, oldukça küçük miktarlarda sıvıyla analiz gerçekleştirebilmektedirler [89].

1.4. Tezin Hipotezi ve Amacı

E. coli bakterisi idrar yolları enfeksiyonuna sebep olmaktadır [7, 8]. Erken teşhisle uygun tedavi edilemediği durumlarda mortaliteye sebep olmaktadır [1]. Gelişmiş ülkelerde tam teçhizatlı kliniklerde yüksek meblağlara temin edilen cihazlarla ve yıllarca emek verilerek mezun edilen alanında uzman doktor ve teknik ekiplerle *E. coli* bakterisinin tespiti 48 saatte gerçekleştirilmektedir [8]. İdrar yollarında bakteri tespitinin tedaviye erken başlanması için, olası salgınların önüne geçilebilmesi için, gereksiz teşhis ve tedavi masraflarının önüne geçilebilmesi için daha hızlı, kolay, hassas, spesifik, yetişmiş operatör ihtiyacı duymayan ve düşük maliyetli bir ölçüm metodu ile gerçekleştirilmesi gerekmektedir [2, 3]. Halihazırdaki konvensiyonel ve gelişme altında olan ölçüm metotlarının bu eksiklikleri tam olarak karşılayamamaktadır [97-103]. Daha önce yapılan çalışmalarda *E. coli* bakterisinin tayininin kâğıt tabanlı grafit temelli manyetik kuantum noktalarıyla yüzey modifikasyonu sonucu hibrit, yani hem optik hem de elektrokimyasal biyosensörle yapılmamış olduğu görülmektedir.

Mevcut literatürdeki bu boşluğu gidermek amacıyla, serolojik olarak *E. coli* bakterisini tespit edebilen yöntemler arasından, yapay insan sıvılarında *E. coli* tespiti için en uygun elektrokimyasal biyosensör yapısının belirlenmesi ve bu biyosensörün üretim sürecinin oluşturulması gerekmektedir. Bu amaçla *E. coli* bakterisinin serolojik tespiti için son yıllarda ideal biyosensörlerin en temel iki özelliği olan hassasiyet ve seçicilik hususunda kendisini kanıtlamış elektrokimyasal tekniklerden biri olan impedimetrik elektrokimyasal biyosensör yapısını ve bununla beraber optik tekniklerden floresans yönteme sahip hibrit biyosensör yapısı tercih edilmiştir.

Yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip, taşınabilir, basit, tasarımı ve kullanımı kolay, düşük maliyetli, yüksek minyatürleştirme yetenekleri ve hızları olan ve gerçek zamanlı, hızlı, erken ve düşük algılama limitlerinde (LOD) algılama yapabilen hem impedimetrik

elektrokimyasal biyosensör hem de aynı zamanda floresans biyosensör özelliklerine sahip hibrit biyosensör ve ölçüm sistemi geliştirilerek *E. coli* bakterisi tespit edilebilir, hipotezinden yola çıkılarak bu çalışma yapılmıştır.

Hibrit biyosensörler, hızlı ve özgül tespit kabiliyeti, düşük maliyeti ve yüksek hassasiyeti nedeniyle bu tür çalışmalar için avantaj sağlayacaktır. Gelişmiş, kolay ve hızlı bir yüzey modifikasyon protokolü ile geliştirilmekte olan yöntemler, şu anda mevcut olan ticari uygulamaların yerini alma potansiyeline sahip olacaktır.

Yapılacak ölçümler için hangi deney düzeneğinin kullanılacağı, kâğıt sensör oluşturulması için hangi bileşenlerin kullanılacağı, en iyi iletkenlik ve optimum sensör yapısı için kullanılacak olan bileşenlerin miktarının ne kadar olması gerektiği, grafitin kâğıt yüzeyine nasıl aktarılacağı, ölçüm düzeniyle sensör arasında sıvı temasını engellemek için hidrofobik etkinin nasıl oluşturulacağı, *E. coli* antijenini yakalayacak *E. coli* antikor yapısının sensörün tespit alanına hangi yüzey modifikasyonları kullanılarak immobilize edileceği, yüzey modifikasyonunun karakterizasyonu, sensörün hassasiyetini artırmak ve hibrit biyosensör tasarlamak için hangi manyetik nanopartikülün kullanılabileceği, nanopartikülün karakterizasyonu, hangi lineer aralıkta ölçümler elde edileceği, en düşük tespit etme limitinin ne olacağı, biyosensörün kararlı çalışıp çalışmadığı, biyosensörün tekrarlanabilirliği, biyosensörün optimum tespit süresinin ne kadar olduğu, *E. coli* antijenini spesifik tespit edip edemeyeceği, insan sıvılarında tespit yapılıp yapılamayacağının bu çalışmadan araştırılması gerekecektir.

Literatür, kısa sürede yüksek hassasiyetle ölçüm yapabilen, sensör hazırlaması uzun sürmeyen, optik ve elektrokimyasal ölçüm yöntemlerine olanak sağlayabilen ve tüm bunları düşük maliyetle yapabilen bir biyosensörden hâlâ yoksundur. Bu nedenle, yukarıda belirtilen dönüştürücü engellerini, hızlı ve özgül algılama yeteneği, düşük maliyeti ve yüksek hassasiyeti ile aşmak için hibrit biyosensör çalışmamız, kâğıt tabanlı bir elektrokimyasal biyosensör ve manyetik kuantum noktalarını (MQD'ler) yeni bir yaklaşımla birleştiriyor. Önerdiğimiz biyosensörün aşağıdaki gibi dikkate değer avantajları vardır: (i) algılama sistemi 30 dakikada yüksek hassasiyetle ölçüm alabilmektedir, (ii) sensör 90 dakika içinde stok manyetik kuantum noktaları kullanılarak elde edilebilmektedir, (iii) sistemde kâğıt ve kalem gibi düşük maliyetli malzemeler

kullanmaktadır, (iv) sistem eş zamanlı elektrokimyasal ve optik algılama ile çoklu algılama yapabilmektedir.

Kâğıt tabanlı grafit temelli elektrokimyasal biyosensörü ve manyetik kuantum noktalarını (Fe_2O_3@CdSe/ZnS, MQDs) birleştirecek yeni bir yaklaşıma haiz olan hibrit biyosensör kullanılarak 30 dakikada 10^3 CFU/mL 10^8 CFU/mL aralığında *E. coli* bakterisinin tespit edilmesi ve seri üretime uygun biyosensörler üretmeye odaklanan bu tez çalışmasında, yapay insan sıvılarında (yapay idrar) ve laboratuvar ortamında kullanılabilen toksik olarak negatif insan idrarı içerisinde *E. coli* bakterisinin $2{,}7\times10^2$ CFU/mL algılama limitiyle tespit edilebildiği kanıtlanmıştır.

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal Materyaller

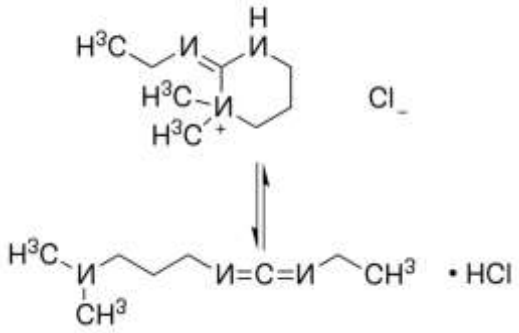
1. Deiyonize Su (Deionized Water, DIW) (Erciyes Üniversitesi Çevre Mühendisliği laboratuvarından temin edildi). Yıkama işlemlerinde ve solüsyonların üretiminde kullanılmıştır.

2. Etil Alkol (Merck: 1117272500). Yıkama işlemlerinde kullanılmıştır.

3. Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline (PBS)) (Chembio). Bakteri konsantrasyonun ayarlanmasında ve yapay idrar olarak kullanılmıştır.

4. N-3-Dimethylaminopropyl-N′ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) (Sigma Aldrich: 03450) Antikoru yüzeye bağlamak için kullanılmıştır.

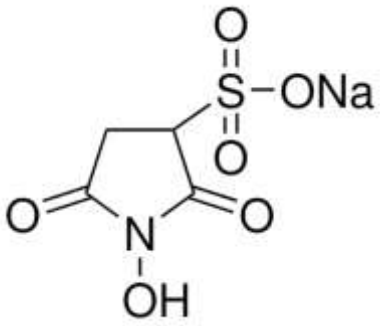
Kimyasal Formülü = $C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$



Şekil 2.1. EDC yapısı

5. N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt (Sulfo-NHS) (Sigma Aldrich: 56485) Antikorun yüzeydeki bağlantısını sağlamlaştırmak için kullanılmıştır.

Kimyasal Formülü: $C_4H_4NNaO_6S$



Şekil 2.2. Sulfo-NHS yapısı

6. Aseton (Sigma Aldrich: 179124) Grafit sensör üretimi karışımında kullanılmıştır.

7. MNP (1. parti Alfa Aesar: 47141) Antikorların sensör yüzeyine bağlantısında yüzey alanını büyütmek, verimliliği artırmak için kullanılmıştır.

8. MQD (Abdullah Gül Üniversitesi Nanoteknoloji Mühendisliği laboratuvarında üretilmiştir.) Hibrit sensör üretiminde antikorların sensör yüzeyine bağlantısında yüzey alanını büyütmek, verimliliği artırmak için kullanılmıştır.

2.1.2. Biyolojik Materyaller

1. Bovine Serum Albumin- Büyükbaş Serum Albümini (BSA) (Sigma Aldrich: A2153) Spesifik olmayan bağlantıların engellenmesi amacıyla sensör yüzeyi %5 oranında proteinle doyurulmuştur.

2. *E. coli* Antikoru (AB25823 koduyla Abcam Cambridge'den temin edildi. 2. parti Genetex GTX13626 koduyla Genesuz firmasından temin edildi.) Hedeflenen *E. coli* antijenlerini tespit etmek için kullanılmıştır.

3. *E. coli* ATCC 25922 Suşu (Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında üretilmiştir) Hedef analit olarak çeşitli konsantrasyonlarda kullanılmıştır.

4. *Klebsiella pneumoniae* Bakterisi (Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında üretilmiştir) Seçicilik çalışmalarında kullanılmıştır.

5. *Proteus mirabilis* Bakterisi (Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında üretilmiştir) Seçicilik çalışmalarında kullanılmıştır.

6. *Bacillus clausii* Bakterisi (Enterogermina markalı probiyotik) Seçicilik çalışmalarında kullanılmıştır.

7. İnsan İdrarı (Laboratuvar ortamında çalışmaya uygun toksikolojik olarak negatif olan Veritas Innovation marka insan idrarı OH2050 koduyla Genesuz firmasından temin edilmiştir)

2.1.3. Cihaz ve Ekipmanlar

1. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS) (Array Solutions - Aim 4300)

2. Enerji dağılımlı X-ışını (Energy-dispersive X-ray, EDX) (Zeiss Gemini 300 model)

3. Geçirimli elektron mikroskobu (Transmission electron microscopy, TEM) (TecnaiG2-F30 TEM)

4. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) (Thermo Scientific Nicolet 6700 FTIR spektrofotometre)

5. Kuvars kristal mikro terazi (Quartz Crystal Microbalance, QCM) (Biolin Scientific–QSX 301)

6. Floresans spektrometre (Fluorescence Spectrometer) (PicoQuant FluoTime 200)

7. Karıştırıcı (Vorteks) (Stuart)

8. Hassas terazi (Radwag)

9. Mikro pipet (Eppendorf)

10. Multimetre (Brymen BM800)

11. Mikro pipet uçları (Eppendorf)

12. Grafit tozu (kimyaciniz web sitesinden temin edilmiştir)

13. Kurşun kalem 8B (Amazon)

14. Oje (Amazon)

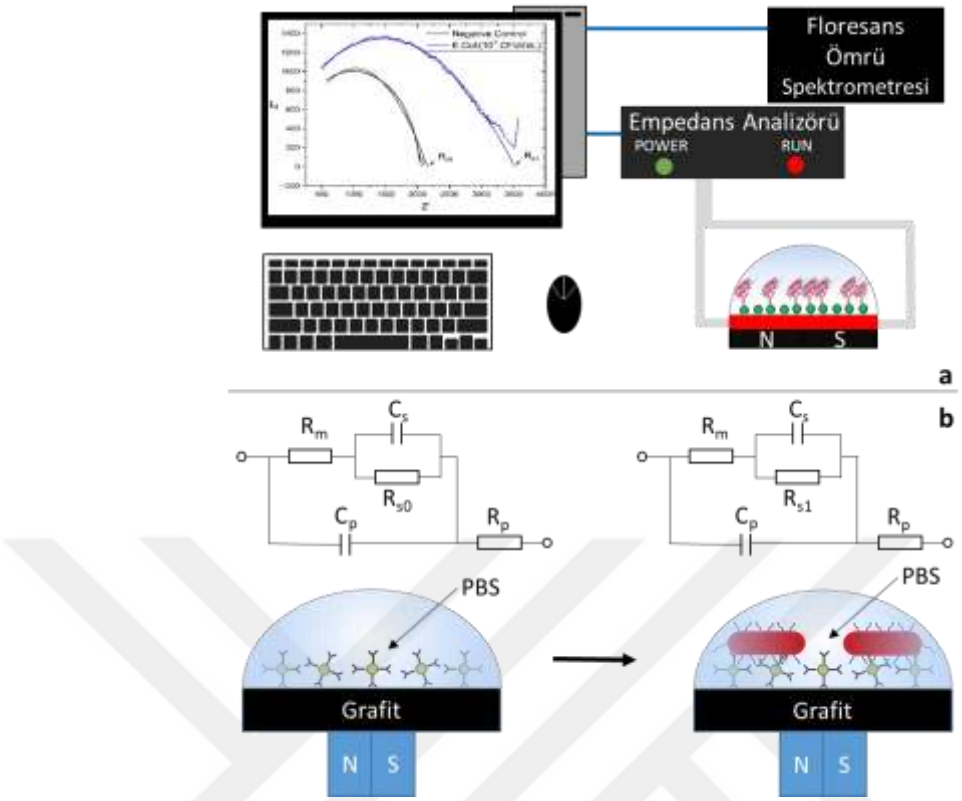
15. Neodyum mıknatıs (Amazon)

16. A4 kâğıt (80 g / m^2)

17. Sıvı silikon yapıştırıcı (Amazon)

2.1.4. Ölçüm Sistemi

AIM 4300 cihazı iki adet elektroduyla elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) yapmaktadır. Cihaz 5 kilohertz (kHz) ile 5 megahertz (MHz) frekans değerleri arasında çalışacak şekilde ayarlanmıştır. Şekil 2.3.'te ölçüm sistemi gösterilmiştir.



Şekil 2.3. *a)* PC arayüzü, empedans analizörü ve floresan ömür spektrometresi (ölçekli değil) içeren algılama sistemi b) Eşdeğer devre modeli

Neodiyum mıknatıs üzerine yüzey modifikasyonları yapıldıktan sonra yerleştirilen hibrit biyosensör uygun iki ucundan ölçüm sistemine bağlanmıştır. Bu sayede biyosensör yüzeyinde gerçekleşen faaliyetler hususunda bilgi sahibi olunabilmektedir. Şekil 2.3.'te Randles eşdeğer devresi görülmektedir. Bu devrede;

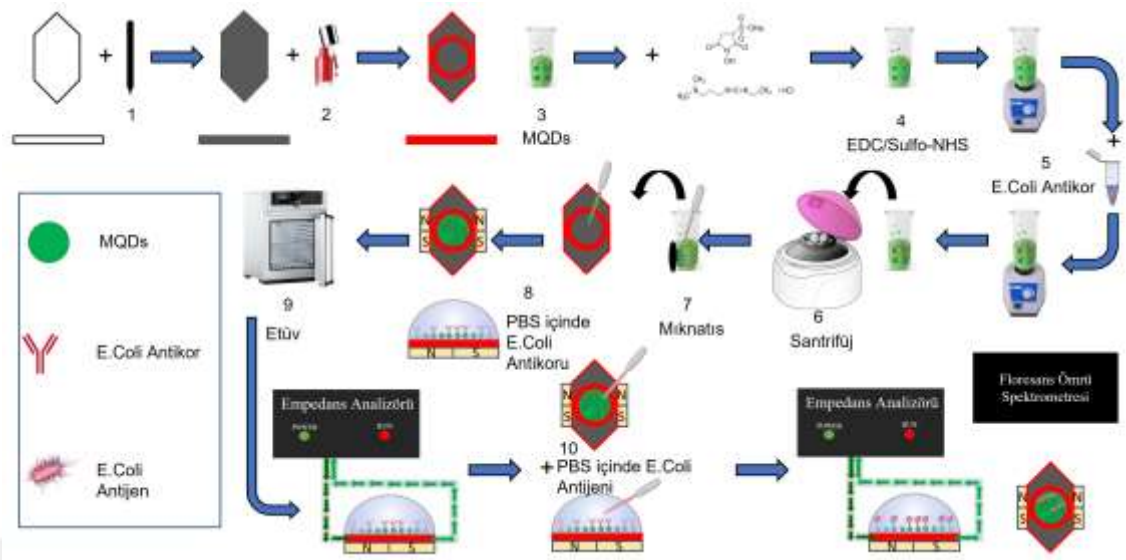
R_m ortam çözeltisi direncinden oluşan biyosensörün empedansını temsil eder, R_s elektrot-çözelti arayüz direnci, C_s elektrot-çözelti arayüz kapasitansı, C_p parazitik kapasitans ve R_p parazitik direnç bilgisini verir.

Klasik üç elektrotlu sistemlerde çalışma, referans ve karşı elektrotları bulunurken tez kapsamında üretilen biyosensörde iki adet elektrot bulunmaktadır. Bu sistemde bir elektrot çalışma işlevini görürken, diğeri hem karşı hem referans işlevini bir arada üstlenmektedir. Sistemin 5 kHz – 5 MHz yüksek frekans aralığında çalıştırılmaktadır. Nyquist eğrisi takip edilerek, biyosensör tespit alanındaki *E. coli* antikorlarına *E. coli* bakterisi bağlandıkça iyonların elektrotlar arasında serbestçe hareket etmesi zorlaşarak R_s artışı gözlenmektedir. Yani bakteri hücreleri elektrot yüzeyini kapladıkça iyonik yol

daralır, elektrot yüzeyinin aktif alanı azalır ve bu durumda R_s artışı meydana gelmektedir. Benzer şekilde sistemin reaktif davranışında kapasitif etkiler ve frekans birlikte değerlendirilmektedir. Normalde nyquist eğrisinde frekans azaldıkça Z'' (sanal eksen)'in artması beklenir fakat burada bakteriden kaynaklı C (kapasitans)'ın azalmasından kaynaklı Z'' (sanal eksen)'de azalma meydana gelmektedir. Elektrot yüzeyi yoğun bir şekilde *E. coli* kaplanıyor bakteri hücreleri yalıtkan olduğundan iyonların yüzeye erişimini engellemektedir, bakteriyal blokaj söz konusu olmaktadır. Frekansla beraber değerlendirince frekans 5 MHz'den 5 kHz'e azalıyor bu durum Z‴'yi artırmalıydı, ama sistemde C daha da fazla azalıyor. Sonuç olarak Z‴'nin toplamda azaldığı görülüyor [74].

2.2. Yöntem

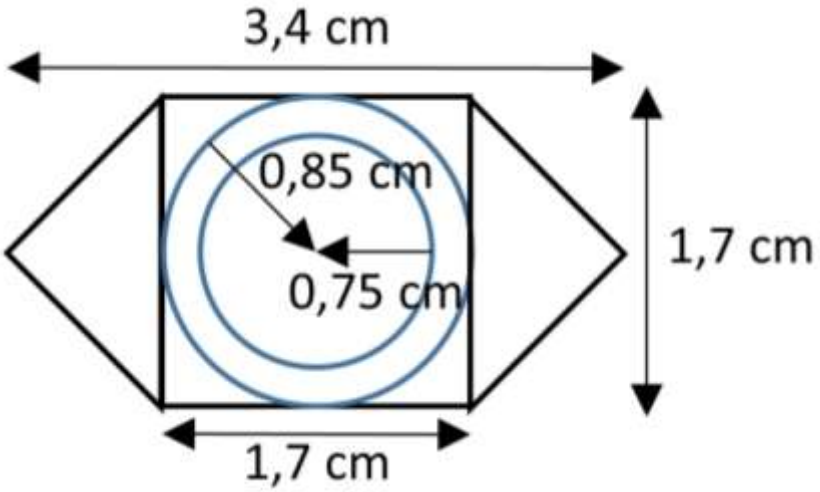
Bu tez çalışmasında *E. coli* antijeninin tespiti için ilk olarak hangi nanopartikülün kullanılacağına karar vermek için MNP ve MQD deneyleri yürütülmüştür. Bahsi geçen MNP ve MQD seçimi deneyleri ıslak (wet) ve kuru (dry) yüzey işlevselleştirme yöntemleri olarak yapılmıştır. Bilimsel olarak en az 3 tekrarlı yapılan deneylerin ortalama değerleri ve standart sapmalarına göre sonuçlar değerlendirilmiş ve en uygun yöntem seçilmiştir. Kâğıt sensör elde edilirken kurşun kalemle boyama yöntemi yerine grafit tozu kullanılarak serigrafik üretim yöntemine geçiş yapılarak üretim sürecinin hızlandırılması sağlanmıştır. Nihayetinde yapay idrar (PBS) yerine laboratuvar ortamında çalışılabilir insan idrarında *E. coli* antijeni tespitleri yapılmıştır. Şekil 2.4.'te biyosensör fabrikasyonu, yüzey modifikasyonları ve bakteri tespitinin nasıl yapıldığına dair şematik bulunmaktadır.



Şekil 2.4. Biyosensör fabrikasyonu, yüzey modifikasyonu ve bakteri tespit şematikleri

2.2.1. Kâğıt Sensör Üretimi

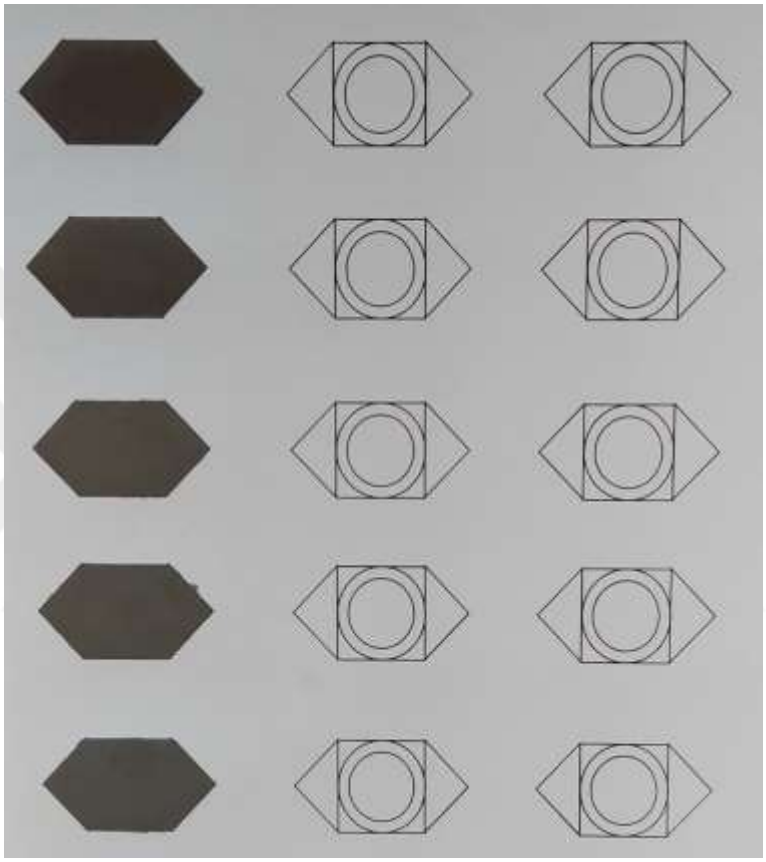
Kâğıt-tabanlı sensör üretilmesi için Şekil 2.5.'de gösterilen çizim oluşturulmuştur. Bu sensör 3,4 cm genişliğinde ve 1,7 cm uzunluğunda olup 4,25 cm^2'lik bir yüzey alanına sahiptir. Bu yüzey alanının ortasındaki dairesel 1,3 cm^2'lik kısım tespit alanı olarak düşünülmüştür.



Şekil 2.5. Kâğıt tabanlı sensör çizimi

2.2.1.1. Grafit Kaplama

Staedtler marka 8B kurşun kalem ile sensörün görünen üst yüzeyi komple boyanmıştır. Şekil 2.6.'da gösterildiği gibi sensörün üst kısmı tamamen grafit ile kaplanmıştır.



Şekil 2.6. Kâğıt tabanlı sensörün kurşun kalemle grafit kaplanması

Kâğıt-tabanlı sensörün elektriksel iletkenliğinin artırılması için elektriksel direncinin olabilecek en küçük değere indirilmesi sağlanmıştır. Bunun için Brymen firmasının BM800 serisi ölçü aleti ile ölçümler alınmıştır. Elektriksel direncin kurşun kalem ile iyice bastırılarak ve çeşitli yönlerde tarama işlemi yapılarak minimum seviyeye yani 300 Ω değerinin altına düşürülmesi ve böylece sensörlerin iletkenliğinin 3 mS değerine benzer olması amaçlanmıştır. Kâğıt ve kurşun kalem kullanılarak üretilen bu sensöre bundan sonra kâğıt sensör denilecektir. Grafit kaplama adımı Şekil 2.4.'te 1. adımda gösterilmiştir.

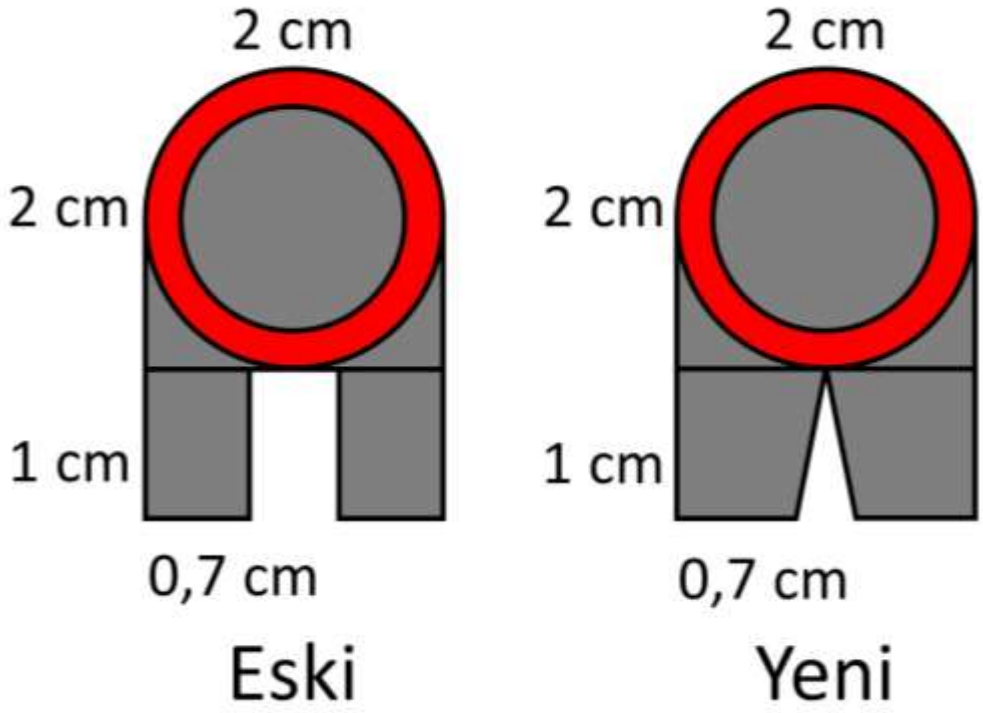
Tez çalışmasında kâğıt sensöre alternatif olarak grafit sensör üretilmiştir. Buradaki amaç seri üretime uygun olarak çok daha kısa sürede sensör üretebilmektir. Sensör şekli üzerinde tasarımsal değişiklikler yapılarak serigrafik üretim yöntemine uygun bir şekilde çelik kalıplar üretildi. Şekil 2.7.'de çelik kalıp ve kalıba dökülen grafit sensörler gösterilmektedir.



Şekil 2.7. Seri üretime uygun olarak tasarlanan kalıp ve grafit sensörler

Grafit sensör karışımının ve üretiminin nasıl olacağı hususunda literatür taraması yapıldı ve buna göre karışımda grafit tozu, sıvı silikon ve aseton kullanıldı [104].

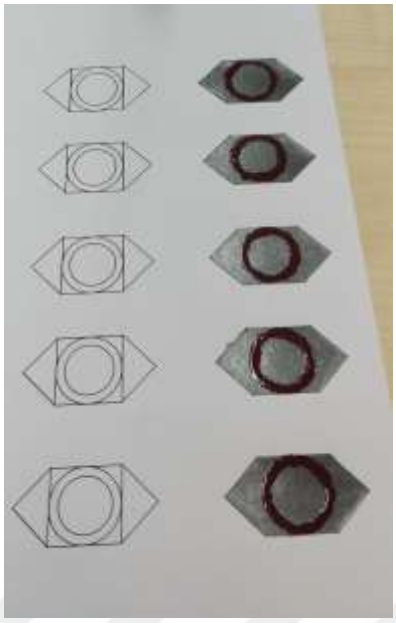
Yapılan kontrollerde grafit sensörlerin antijen tespiti için kalın olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca sensörlerin bacaklarının çok hassas olduğu deneyler esnasında kırılıp deneylerin yürütülmesine zorluk çıkardığı için sensörlerin şeklinde ve üretim mekanizması üzerinde değişiklik yapılması kararı alınmıştır. Şekil 2.8.'de eski ve yeni tasarımlı sensör şekli bulunmaktadır.



Şekil 2.8. Grafit sensör şeklinin tasarımsal değişikliği

2.2.1.2. Hidrofobik Kaplama

Bu yüzeyde 1,3 cm^2'lik dairesel bir çalışma alanı elde etmek için, bu çalışma alanının dışında kalan yaklaşık 1 cm^2'lik dairesel alan ticari oje ile kaplanarak hidrofobik bir alan oluşturuldu. Ayrıca, sensörün alt ve yan tarafı tamamen oje ile kaplanarak hidrofobik alanlar oluşturuldu. Ayrı ayrı üretilen bu sensörlerin aynı iletkenlik değerine sahip olması, multimetre ünitesiyle ölçüm yapılarak sağlandı. Hidrofobik kaplama işlemi Şekil 2.4.'te 2. adımda şematize edilirken bununla ilgili görseller Şekil 2.9. ve Şekil 2.10.'da gösterilmiştir. Şekil 2.9.'da kâğıt sensörün kalınlığı yaklaşık 100 µm, grafit kaplama yaklaşık 10 µm ve hidrofobik kaplama yaklaşık 30 µm olarak tespit edilmiştir. Şekil 2.10.'da grafit sensörün kalınlığı yaklaşık 1 mm ve hidrofobik kaplama yaklaşık 30 µm olarak tespit edilmiştir.



Şekil 2.9. Kâğıt sensör hidrofobik kaplaması



Şekil 2.10. Grafit sensör hidrofobik kaplaması

2.2.2. Hibrit Sensörün Üretimi

Hibrit sensörde kullanılacak nanopartikülün seçilmesi için MNP ve MQD ile deneyler yürütülmüştür. MNP ve MQD nanopartiküllerinin 1 mg ve 5 mg miktarınca sensör yüzeyine uygulanmasıyla ne kadar değişime sebebiyet verdiği araştırılmıştır. Bahsi geçen yöntemde nanopartiküller ıslak halde oldukları için ıslak (wet) yöntem olarak değerlendirilirken, sensör tespit yüzeyine MNP veya MQD uygulandıktan sonra etüv cihazında 40°C'de kâğıt ve grafit sensörler kurutulmuştur. MNP ve MQD'nin kuru (dry) olduğu yöntemle MNP ve MQD'nin ıslak (wet) olduğu yöntem kıyaslanmıştır. Yapılan

deneylerde 5 mg MQD'nin kuru (dry) olduğunda en iyi sonuçlara sahip olduğu görülmüştür. Buna bağlı olarak sensörlerde nanopartikül olarak 5 mg MQD'ler kullanılmış ve kuru (dry) yöntemle yüzeye yerleştirilmiştir. Şekil 2.4.'te 3. adımda şematize edilmiştir.

MNP veya MQD, grafit kaplı biyosensörün yüzeyinde atomik düzeyde karbon (C) atomlarından oluşan hekzagonal yapı yani bal peteği mimarisinde 3 noktaya temas edebilir. Bunlar Şekil 1.4'te verildiği üzere altıgenlerin ortasındaki oyuk, karbon-karbon bağı üzerindeki köprü veya bir karbon atomunun üstü olabilir. MNP'lerin ve MQD'lerin temasını artırmak için kuvvetli bir mıknatıs olan neodyum mıknatısı kullanılmıştır.

2.2.2.1. Manyetik Kuantum Noktaları (MQDs)

MQD'ler Abdullah Gül Üniversitesi Nanoteknoloji Bölümü laboratuvarında üretilmiştir. Şekil 2.11.'de MQD'lerin görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2.11. MQDs

2.2.3. Nanopartikül Karakterizasyonu

CdSe/ZnS@Fe_2O_3 nanopartikülün karakterizasyonu için TEM görüntüleme, EDX analizi ve FTIR analizi yapılmıştır.

2.2.3.1. FTIR Analizi

Kızılötesi (IR) spektrumları Thermo Scientific Nicolet 6700 FTIR spektrofotometresinde (Waltham, MA, ABD) gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.2. EDX Analizi

Transmisyon elektron mikroskobu (TecnaiG2-F30 TEM, FEI, Hillsboro, OR, ABD) CdSe/ZnS@Fe_2O_3 nanopartiküllerinin morfolojisini analiz etmek için kullanılmıştır. Heksan içinde çözülmüş 2 µL'lik bir CdSe/ZnS@Fe_2O_3 çözeltisi damlası bir bakır ızgaraya yerleştirilmiş ve ardından hava ile kurutulmuştur. TEM görüntüleme için 200 keV'de çalışan bir alan emisyon elektron kaynağı kullandı. Enerji dağılımlı X-ışını (EDX) analizi bir Zeiss Gemini 300 model cihazda (Oberkochen, Almanya) gerçekleştirilmiştir.

2.2.4. Yüzey Modifikasyonları

Manyetik nanoparçacıkların (MNPs) ve manyetik kuantum noktaların (MQDs) yüzeyine tespit edilmek istenen bakterinin antikorunun bağlanabilmesi için sensör yüzeyinin stabil olarak amin reaktif olması gerekmektedir.

Bu bağlamda, N-(3-Dimethylaminopropyl)-N′-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) + N-hydroxysuccinimide (Sulfo-NHS) çapraz bağlayıcıları ile sensör yüzeyi (MNP, MQD) amin reaktif olarak işlevselleştirilmiş ve *E. coli* bakterisi antikorunun sensör yüzeyine immobilizasyonu sağlanmıştır.

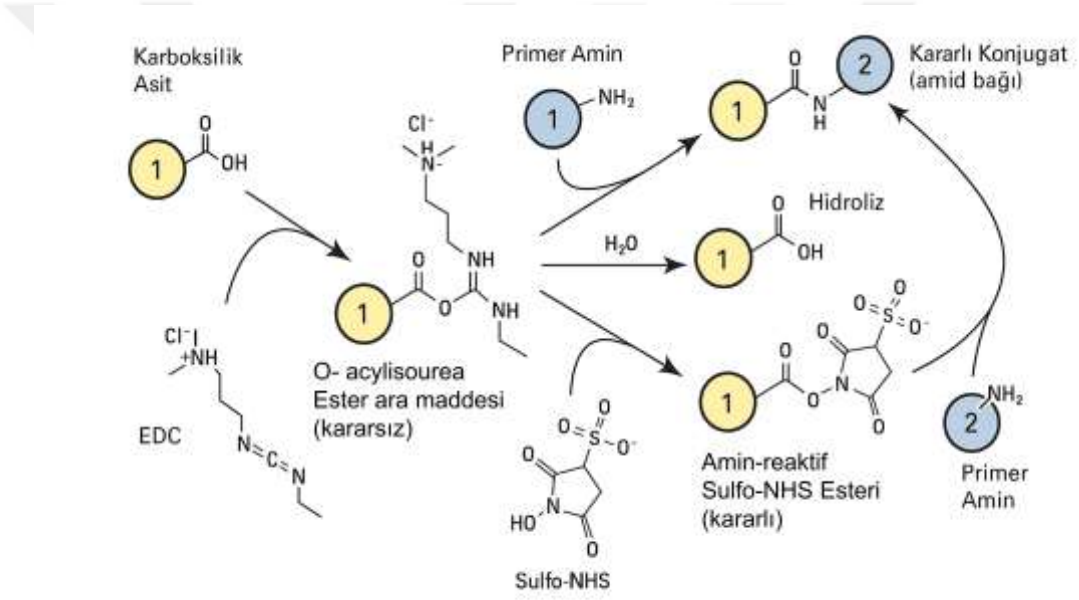
2.2.4.1. EDC/Sulfo-NHS Kaplama

Amin gruplarıyla kovalent bağ oluşturmak için karboksil gruplarının aktivasyonunda en yaygın kullanılan ve kabul edilen yöntem, EDC/Sulfo-NHS kimyasıdır.

1-Etil-3- (3-Dimetilaminopropil) Karbodiimid (EDC), kullanımı kolay, nispeten ucuz ve suda çözünen bir çapraz bağlayıcıdır. Karboksil ve hidroksil gruplarını, birincil aminlerle birleştirmek için çeşitli birleşme tekniklerinde kullanılmaktadır. EDC, ilk olarak birincil aminleri, bir aktif ester ara maddesi (O- asilisourea) oluşturarak karboksilik asit ve hidroksil grubu ile birleştirir. Daha sonra oluşan aktif ester ara maddesi doğrudan amin

ile reaksiyona girerek karboksilik asit ve hidroksil grubu ile amit bağı oluşturur ve yan ürün olarak bir üre türevi ortaya çıkar.

N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt (Sulfo-NHS), verimliliği artırmak ve kararlı (aminle reaktif) ara ürünler oluşturmak için genellikle EDC birleştirme protokollerine dahil edilir. Sulfo-NHS, birincil aminler ile karboksilatların aktivasyonunu içeren EDC çapraz bağlama reaksiyonlarının kontrolünü sağlar [105]. Şekil 2.4.'te 4. aşamada yer alan bu mekanizma Şekil 2.12.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.12. EDC/Sulfo-NHS mekanizması [115]

2.2.4.2. *E. coli* Antikorunun İmmobilizasyonu

Deneylerin başlangıcında AB25823 koduyla Abcam Cambridge'den temin edilen *E. coli* antikoru kullanılırken deneylerin sonlarına doğru Genetex GTX13626 koduyla Genesuz firmasından temin edilen *E. coli* antikoru kullanılmıştır.

E. coli antikorunun yapısında aktif amin ($-NH_2$) grubu bulunur. Özellikle lizindeki primer amin grupları vardır. Manyetik nanopartiküle EDC/Sulfo-NHS uygulanmasıyla yüzeyinde amin reaktif NHS esterleri elde edilir. Amin reaktif NHS esterleri ile *E. coli*

antikorunun amin grupları arasında nükleofilik atak sonucu stabil amid bağı (-CONH-) oluşur.

Grafit kaplama, manyetik nanopartikül, yüzey modifikasyon işlemleri yani EDC/Sulfo-NHS kaplama ve *E. coli* antikorunun yüzeye immobilize işlemleri sonucunda *E. coli* antikoru manyetik nanopartikülün yüzeyine stabil amid bağı ile bağlanmıştır. Antikor yüzeye kovalent olarak bağlandığı için bağlantı oldukça sağlam olmuştur. Aynı zamanda biyosensörün dayanıklılığı artmıştır. Antikorun yüzeyde biyolojik olarak daha aktif olmasını, yüzeyden kolay kolay kopmamasını dolayısıyla her ne kadar çalışmamızda gündeme gelmese de tekrarlı kullanımlar için daha elverişli olmasını sağlamaktadır.

5 mg amin grubu modifiye edilmiş manyetik kuantum verileri tartıldı ve 180 µL pH (7,4) sodyum fosfat tamponu eklendi ve partikülleri dağıtmak için sonikasyona tabi tutuldu. Antikor modifikasyonu sağlamak için, bu hazırlanan çözeltiye 10^{15} konsantrasyonda 20 µL amin aktif *E. coli* antikoru eklendi. Bu karışım 30 dakika boyunca sonikasyona tabi tutuldu ve ardından reaksiyon 45 dakika boyunca bir orbital mikserde tamamlandı. Karışım, çökene kadar yaklaşık 1-2 dakika santrifüj edildi (Şekil 2.4. Adım 6). Amin aktif antikorlar, kararlı bir amid bağı yoluyla bağlandı. İşlem sonunda bağlanmamış antikorları uzaklaştırmak için 3 kez fosfat tamponu ile yıkama yapıldı.

Hazırlanan antikor-(CdSe/ZnS@Fe_2O_3) nanopartikülleri harici bir mıknatısla tutuldu (Şekil 2.4. Adım 7), 200 µL hacmindeki karışım, hazırlanan biyosensörlerin algılama yüzeyine damlatıldı (Şekil 2.4. Adım 8) ve inkübatör cihazında 40°C'de 15 dakika kurumaya bırakıldı (Şekil 2.4. Adım 9). Kurutma işleminden sonra sensörler empedans ve kuantum verimliliğiyle analize hazır hale gelir.

2.2.5. Yüzey Modifikasyonunun Karakterizasyonu

Yüzey modifikasyonlarının karakterizasyonu, kütle hassas biyosensör yöntemlerinden olan QCM cihazıyla yapılmıştır.

2.2.5.1. QCM Analizi

5 MHz AT-kesimli kuvars kristalinin (Biolin Scientific–QSX 301, Göteborg, İsveç) altın yüzeyini temizlemek için, en az 2 dakika boyunca 10 kat deiyonize suyla (DIW) (Erciyes Üniversitesi Çevre Mühendisliği, Kayseri, Türkiye) seyreltilmiş piranha çözeltisine (1,5

mL sülfürik asit (1120801000, Merck, İstanbul, Türkiye), 0,5 mL hidrojen peroksit (Merck)) yerleştirildi.

Daha sonra sensör sırayla etil alkol (Merck, %99,9) ve damıtılmış su ile yıkandı. Temizlenen altın yüzey, 12 saat boyunca deiyonize sudaki 2,5 mM cysteamine (Merck) çözeltisine maruz bırakıldı.

QCM kristalindeki frekans kaymaları bir empedans analizörüyle (Array Solutions, AIM-4300, Sunnyvale, TX, ABD) izlendi. Amin reaktif MQD'ler 1 × Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS, 18912014, Thermo Fisher, İstanbul, Türkiye) solüsyonunda 5 mg/mL konsantrasyonu, peristaltik pompa (Longer Pump, BT100-2J, İstanbul, Türkiye) vasıtasıyla 30 dakika boyunca QCM sensörüne uygulandı.

Her ölçüm adımından sonra, 5 dakika boyunca peristaltik pompa ile PBS yıkaması yapıldı. PBS'de 10^{13} Ab/mL konsantrasyonunda *anti-E. coli* antikoru, sensör yüzeyine 30 dakika boyunca uygulandı. Yüzey, PBS'de %1 BSA solüsyonu uygulanarak nonspesifik bağlanma için bloke edildikten sonra, sensörün negatif kontroldeki stabilitesi 30 dakika boyunca takip edildi. Son adımda, sensör yüzeyine %1 BSA + PBS'de 10^{7} CFU/mL konsantrasyonunda *E. coli* bakterisi uygulanarak tespit tamamlandı.

2.2.6. *E. coli* Antijeni Tespiti

Hazırlanan çok fonksiyonlu sensörlerin yüzeyindeki modifiye edilmiş MNP'lerin ve MQD'lerin altına, manyetizma kullanılarak grafit kaplı yüzeydeki Karbon atomlarıyla daha iyi temas etmesi için bir mıknatıs yerleştirildi ve daha sonra empedans ölçümü için elektrokimyasal empedans spektroskopisi cihazının (AIM4300, Array Solutions, Sunnyvale, TX, ABD) problarına bağlandı.

Üzerine 150 µL fosfat tamponu eklendi ve ilk ölçüm yalnızca antikor bağlandığında alındı. Daha sonra tekrar tampon solüsyonu çekildi ve 150 µL fosfat tamponuna *E. coli* bakterileri farklı konsantrasyonlarda eklenerek empedans ölçümleri alındı. Sonrasında sensör yüzeyi fosfat tamponu ile yıkandı ve bağlanmamış bakteriler sensörden uzaklaştırıldı. Yıkama işleminin ardından sensör yüzeyinde 150 µL fosfat tampon solüsyonu olduğunda tekrar empedans ölçümü alındı ve veriler kaydedildi. ΔR_s hesaplamaları için MATLAB programında yazdığımız yazılım kullanıldı. 5 kHz ile 5 MHz frekans aralığında empedans değişikliği izlendi.

Araştırmamızda tüm deneyler en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Deneylerin tüm aşamalarından gelen ham veriler tek tek alınarak veri işleme yazılımına aktarıldı, bu veriler doğrusal olmayan eğri uydurma (parabol) işlemiyle 1000 veriye kadar işlendi ve data fitting işlemi uygulandı. 1000 veriye ulaşamayan veriler için ekstrapolasyon yapıldı. R_s hesaplaması, verilerin x eksenini kestiği noktalar dikkate alınarak yapıldı.

Ayrıca biyosensörü geliştirme faaliyetleri olarak tespit süresi optimizasyonu, tespit limiti optimizasyonu, lineer çalışma aralığının optimizasyonu, seçicilik deneyleri, kararlılık çalışmaları, optik optimizasyon çalışmaları, laboratuvar ortamında çalışmaya uygun idrar içerisinde tespitler ve seri üretime uygunlaştırma süreçleri yürütüldü.

2.2.6.1. Biyosensörün Tespit Süresi Optimizasyonu

Hazırlanan biyosensörün üzerine 150 µL fosfat tamponu eklenip ilk ölçüm alındıktan sonra yüzeyden tampon solüsyon çekildi ve ardından *E. coli* bakterisi eklendi (Şekil 1. Adım 10). Empedans ölçümleri farklı zamanlarda alındı (t = 0, 10, 20, 30 dk.). 30 dk. sonra sensör yüzeyi fosfat tamponu ile yıkandı ve bağlanmamış bakteriler sensörden uzaklaştırıldı. Yıkama işleminin ardından sensör yüzeyinde 150 µL fosfat tampon solüsyonu olduğunda tekrar empedans ölçümü alındı ve veriler kaydedildi. Veriler ışığında biyosensörün doyuma ulaştığı süre bulunarak, ideal tespit süresi belirlenmiştir.

2.2.6.2. Biyosensörün Tespit Limiti ve Lineer Çalışma Aralığı Optimizasyonu

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarından temin edilen *E. coli* ATCC 25922 suşu stok halinden seyreltme işlemi yapılarak 150 µL ölçüm yapılacak sıvı içerisinde (fosfat tamponu veya laboratuvarda çalışılabilir idrar) *E. coli* bakterisinin 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 CFU/mL konsantrasyonları hazırlanmıştır. Ayrıca içerisinde *E. coli* bakterisi bulunmayan negatif kontrol solüsyonu da hazırlanmıştır. Hazırlanan *E. coli* dilüsyonları ve negatif kontrol solüsyonu ile doz tepki analizi çalışması her bir konsantrasyonda en az 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Böylece sensörün lineer çalışma aralığı ve tespit limiti belirlenmiştir.

2.2.6.3. Biyosensörün Seçiciliği

Hazırlanan biyosensörün bakteriyel özgüllüğünü (seçiciliğini) ölçmek amacıyla, 150 µL'de 10^6 CFU/mL konsantrasyonda *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*

ve *Alkalihalobacillus clausii* (eski adıyla *Bacillus clausii*) bakterileri ile en az 3 tekrarlı olacak şekilde ölçümler yapılmıştır.

2.2.6.4. Biyosensörün Kararlılığı

Biyosensörün kararlılığını test etmek amacıyla, her biri 10 tekrarlı test ve kontrol deneyleri yapıldı. Bunun için; 150 µL'de 10^6 CFU/mL konsantrasyonda *E. coli, Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae* ve *Alkalihalobacillus clausii* bakterileri içeren ilk çözelti ve 150 µL'de 10^6 CFU/mL konsantrasyonda *Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae* ve *Alkalihalobacillus clausii* bakterileri içeren ikinci çözelti hazırlandı. Deneyler sırasıyla test ve kontrol olarak yürütüldü. Araştırmamızda tüm deneyler en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.2.6.5. Biyosensörün Optik Optimizasyonu

Üretilen hibrit biyosensörün optik optimizasyonu için zamanla ilişkili tek foton sayımı yapılmıştır. Zamanla ilişkili tek foton sayımı, emisyonlu MQD'ler üzerindeki eksitonik etkileşimleri izlemek için güçlü bir tekniktir. Bakteriler ve MQD'ler arasındaki etkileşimin etkisini aynı anda izlemek için bu araç kullanılmıştır. İşlem tamamlandıktan sonra, bakteriye bağlı ve bakteriye bağlı olmayan sensörlerin ışınlama kinetiğindeki değişiklikler, her örnek için PicoQuant FluoTime 200 (Berlin, Almanya) kullanılarak gerçek zamanlı bir cihazda analiz edildi.

2.2.7. Araştırılabilir İdrarda *E. coli* Tespiti

İnsan idrarını modellemek için fosfat tamponu içerisinde idrar yolları enfeksiyonlarına sebebiyet veren bakteriler ve özellikle *E. coli* bakterisinin farklı konsantrasyonlarında bahsi geçen deneyler yürütülmüştür. Bunlara ilaveten Genesuz firmasından temin edilen Veritas Innovation marka OH2050 kodlu laboratuvar ortamında çalışmaya uygun toksikolojik olarak negatif olan insan idrarıyla doz tepki analizi ve seçicilik çalışmaları yapılmıştır.

2.2.8. Seri Üretime Uygun Biyosensörle İdrar İçerisinde *E. coli* Tespiti

Kâğıt sensörle yukarı kısımlarda bahsi geçen deneylerde sensörün etkili bir şekilde çalıştığı görülünce, bu sensörün seri üretime uygun hale getirilmesi için çalışmalar yürütülmüştür. Birinci versiyon serigrafi yöntemiyle üretilmiş üzerinde deneyler

yapılmıştır. Birinci versiyondaki eksiklikler yine serigrafi yöntemiyle üretilen ikinci versiyonda giderilerek yeni tasarımlı seri üretime uygun grafit sensör elde edilmiştir. Bu grafit sensörle laboratuvar ortamında çalışmaya uygun toksikolojik olarak negatif olan insan idrarı kullanılmıştır. Doz tepki analizi ve seçicilik çalışmaları yapılmıştır.

2.2.9. İstatistikî Analiz

Biyosensörün kararlılığı kısmındaki test ve kontrol verilerinin arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığının anlaşılması için çeşitli istatistiksel hesaplamalar yapılmıştır. Bunlar;

1. Temel tanımlayıcı istatistikler,

2. Dağılım analizi olarak Shapiro-Wilk analizi,

3. Grup karşılaştırmaları olarak Bağımsız t-testi, Levene testi ve Mann-Whitney u testi yapılmıştır. Bunlara ilaveten göreceli standart sapma analizi yapılmıştır.

4. Göreceli Standart Sapma (Relative Standard Deviation, RSD), bir veri setindeki değişkenliğin ortalamaya oranını ölçen bir istatistiksel ölçümdür. Yüzdelik olarak ifade edilir ve özellikle farklı büyüklükteki veri setlerini karşılaştırmak için kullanılır. Tıp ve klinik araştırmalarda klinik testlerin hassasiyetini ve güvenilirliğini belirlemek için kullanılır.

Göreceli Standart Sapma (RSD) (%) $= \sigma/\mu \times 100$

σ, her bir deney setinde ölçülen konsantrasyonların standart sapmasını ve μ, her bir deney setinde ölçülen konsantrasyonların ortalama değerini temsil eder.

Düşük RSD değeri, verilerin ortalamaya daha yakın olduğunu ve ölçümlerin tutarlı olduğunu gösterir.

Yüksek RSD değeri, veriler arasındaki değişkenliğin fazla olduğunu ve ölçümlerin güvenilirliğinin düşük olabileceğini işaret eder.

Bu analizle 10'ar tekrarlı alınan dört farklı bakteriyel grup arasında gerçekleştirilen ölçümlerin $\%\Delta R_s$'lerinin iki grup arasındaki ortalama farkının birbirinden anlamlı derecede farklı olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. BÖLÜM

YÖNTEMLERİN ANALİZİ ve BULGULAR

3.1. Kâğıt Tabanlı Grafit Temelli Hibrit Biyosensörlerin Üretimi

3.1.1. Hibrit Biyosensörün Karakterizasyonu ve Optimizasyonu

3.1.1.1. MNP ve MQD Kullanılan Yöntemlerin Analizi

Kâğıt tabanlı grafit temelli sensörde nano materyalin nasıl kullanılacağına dair deneyler yapılmıştır. MNP ve MQD kıyaslaması ilk başta ıslak yöntemle araştırılmıştır. Bu deneylerde nano materyalin kaç mg kullanılacağı ve MNP, MQD nano materyallerinden hangisinin deney prosedürüne daha uygun sonuçlar vereceğine bakılmıştır [106].

Islak yöntem için kullanılan deney prosedürü aşağıdadır.

1. Kâğıt sensör mıknatıs üstündeki platformuna yerleştirildi.

2.15 mg Sulfo-NHS, pyridine (5 mL) içinde çözüldü. Bu çözeltiye 0,25 mL kloroform içinde EDC (15 mg) eklendi. 40 mg nano partikül eklendi ve ardından karışım 2 saat çalkalandı. Oluşan amin reaktif NP'leri heksan eklenerek çöktürüldü, harici bir mıknatısla ayrıldı ve etanol ve saf su ile yıkandı [107]. Bu şekilde, sensör yüzeyi amin reaktif olarak işlevselleştirildi.

3. Yapılacak deneye göre 1 veya 5 mg amin grubu modifiye edilmiş nano partikül (yapılacak deneye göre MNP veya MQD) tartıldı ve 180 µL pH (7,4) sodyum fosfat tamponu eklendi ve parçacıkları dağıtmak için sonikasyona tabi tutuldu. Antikor modifikasyonu sağlamak için, hazırlanan bu çözeltiye 10^{15} konsantrasyonda 20 µL amin aktif *E. coli* antikoru eklendi. Bu karışım 30 dakika sonikasyona tabi tutuldu ve ardından reaksiyon 45 dakika boyunca bir orbital mikserde tamamlandı. Bakteriler, Şekil 2.4.

Adım 4 ve 5'te gösterildiği gibi MQD'ler, EDC/Sulfo-NHS ve antikorlarla reaktif hale getirildi. Karışım, çökene kadar yaklaşık 1-2 dakika santrifüj edildi (Şekil 2.4. Adım 6). Amin aktif antikorlar, kararlı bir amid bağı yoluyla bağlandı. İşlemin sonunda, bağlanmamış antikorları uzaklaştırmak için bir fosfat tamponu ile 3 kez yıkama yapıldı.

4. Hazırlanan antikor bağlı NP'leri harici bir mıknatısla tutuldu, grafit kaplı (Şekil 2.4. Adım 7 ve 8) ve ojelenmiş kâğıt bazlı biyosensörün algılama yüzeyine 200 µL damlatıldı ve ilk empedans ölçümü alındı.

5. Sensör yüzeyindeki NP'lere zarar vermeden, sensör yüzeyindeki fazla sıvı çekildi.

6. 150 µL fosfat tamponunda 10^7 CFU/mL *E. coli* bakterisi olacak şekilde solüsyon hazırlandı ve sensör yüzeyine uygulandı (Şekil 2.4. Adım 10). Empedans ölçümleri sensör doyuma ulaşıncaya kadar her 5 dakikada alındı.

7. Sensör yüzeyi fosfat tamponu ile 3 defa yıkandı ve bağlanmamış bakteriler sensörden uzaklaştırıldı. Yıkama işleminin ardından sensör yüzeyinde 150 µL fosfat tampon solüsyonu olduğunda tekrar empedans ölçümü alındı ve veriler kaydedildi.

Kuru yöntem için kullanılan deney prosedürü aşağıdadır.

1. Kâğıt sensör mıknatıs üstündeki platformuna yerleştirildi.

2. 15 mg Sulfo-NHS, pyridine (5 mL) içinde çözüldü. Bu çözeltiye 0,25 mL kloroform içinde EDC (15 mg) eklendi. 40 mg nano partikül eklendi ve ardından karışım 2 saat çalkalandı. Oluşan amin reaktif NP'leri heksan eklenerek çöktürüldü, harici bir mıknatısla ayrıldı ve etanol ve saf su ile yıkandı [107]. Bu şekilde, sensör yüzeyi amin reaktif olarak işlevselleştirildi.

3. Yapılacak deneye göre 1 veya 5 mg amin grubu modifiye edilmiş nano partikül (yapılacak deneye göre MNP veya MQD) tartıldı ve 180 µL pH (7,4) sodyum fosfat tamponu eklendi ve parçacıkları dağıtmak için sonikasyona tabi tutuldu. Antikor modifikasyonu sağlamak için, hazırlanan bu çözeltiye 10^{15} konsantrasyonda 20 µL amin aktif *E. coli* antikoru eklendi. Bu karışım 30 dakika sonikasyona tabi tutuldu ve ardından reaksiyon 45 dakika boyunca bir orbital mikserde tamamlandı. Bakteriler, Şekil 2.4. Adım 4 ve 5'te gösterildiği gibi MQD'ler, EDC/Sulfo-NHS ve antikorlarla reaktif hale

getirildi. Karışım, çökene kadar yaklaşık 1-2 dakika santrifüj edildi (Şekil 2.4. Adım 6). Amin aktif antikorlar, kararlı bir amid bağı yoluyla bağlandı. İşlemin sonunda, bağlanmamış antikorları uzaklaştırmak için bir fosfat tamponu ile 3 kez yıkama yapıldı.

4. Hazırlanan antikor bağlı NP'leri harici bir mıknatısla tutuldu, grafit kaplı (Şekil 2.4. Adım 7 ve 8) ve ojelenmiş kâğıt bazlı biyosensörün algılama yüzeyine 200 µL damlatıldı.

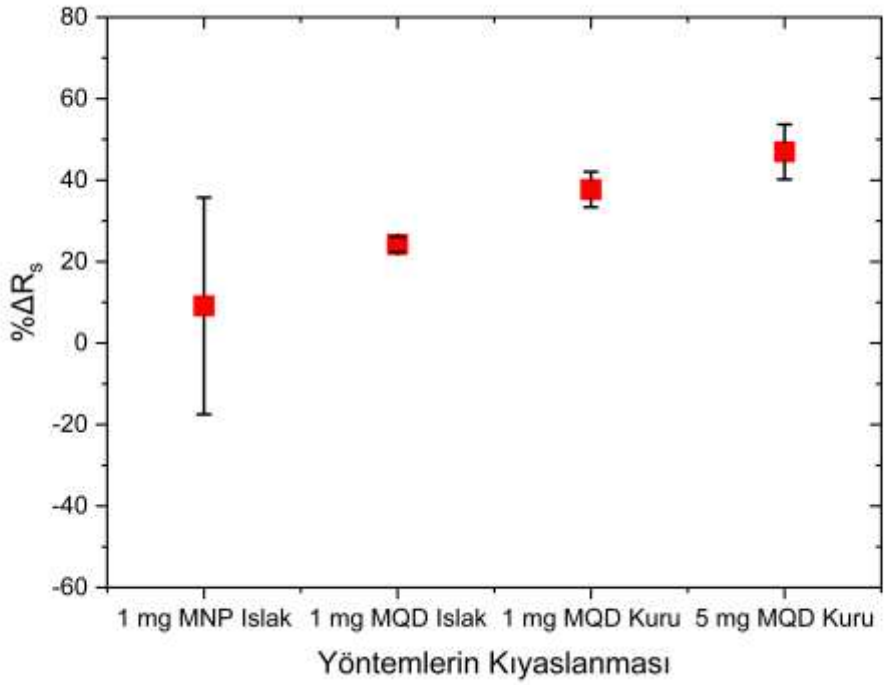
5. İnkübatör cihazında 40°C'de 15 dakika kurumaya bırakıldı (Şekil 2.4. Adım 9). Kurutma işleminden sonra sensörler empedans ve kuantum verimliliği ile analize hazır hale geldi.

6. Üzerine 150 µL fosfat tamponu eklendi ve ilk EİS ölçümü alındı.

7. Sensör yüzeyindeki NP'lere zarar vermeden, sensör yüzeyindeki fazla sıvı çekildi.

8. 150 µL fosfat tamponunda 10^7 CFU/mL *E. coli* bakterisi olacak şekilde solüsyon hazırlandı ve sensör yüzeyine uygulandı (Şekil 2.4. Adım 10). Empedans ölçümleri sensör doyuma ulaşıncaya kadar her 5 dakikada alındı.

9. Sensör yüzeyi fosfat tamponu ile 3 defa yıkandı ve bağlanmamış bakteriler sensörden uzaklaştırıldı. Yıkama işleminin ardından sensör yüzeyinde 150 µL fosfat tampon solüsyonu olduğunda tekrar empedans ölçümü alındı ve veriler kaydedildi.



Şekil 3.1. Farklı miktarlarda MNP ve MQD içeren 10^7 CFU/mL *E. coli* bakterisinin tespitinde ıslak ve kuru yöntemlerin karşılaştırılması [106]

Şekil 3.1.'de görüldüğü üzere;

1 mg ıslak MNP ile yapılan deneylerde 9,12858 (± 26,63394) $\%\Delta R_s$ değişime sebep olmuştur.

1 mg ıslak MQD ile yapılan deneylerde ise 24,21248 (± 1,861141) $\%\Delta R_s$ değişime sebep olmuştur.

1 mg sabit nano partikül miktarıyla yapılan ve ıslak metodoloji kullanılan deneylerin sonuçlarına göre, MQD kullanılan yöntemde MNP kullanılan yönteme göre yaklaşık olarak 3 katına kadar daha iyi sonuç elde edilmiştir. Ve standart sapma değerinde (± 26,63394) $\%\Delta R_s$ değerinden (± 1,861141) $\%\Delta R_s$ değerine ciddi iyileşme görülmüştür.

Ayrıca ıslak yöntemde kimyasalların sensörden taşarak akması sonucu sensörün iletkenlik göstererek bozulması ve kullanılamaz duruma gelmesi gibi durumlarla karşılaşıldığı için kuru yöntemler çok daha kullanışlı bulunmuştur [106].

Antikora bağlı MQD'ler sensör yüzeyine uygulandıktan sonra kurutulduğu için antikora bağlı MQD'ler grafit kaplı sensör yüzeyindeki mıknatısla iyi etkileşime girebilir. Bu nedenle, grafit kaplı sensör yüzeyinde türbülans etkisi daha az olmuştur.

1mg kuru MQD ile yapılan deneylerde 37,72521 (± 4,33159) $\%\Delta R_s$ değişime sebep olmuştur.

1 mg ıslak MNP ve 1 mg ıslak MQD'ye göre oldukça iyi sonuçlar elde eden bu yöntemin 1 mg ıslak MNP'ye göre yaklaşık %400, 1 mg ıslak MQD'ye göre yaklaşık %50 daha etkili olduğu görülmüştür.

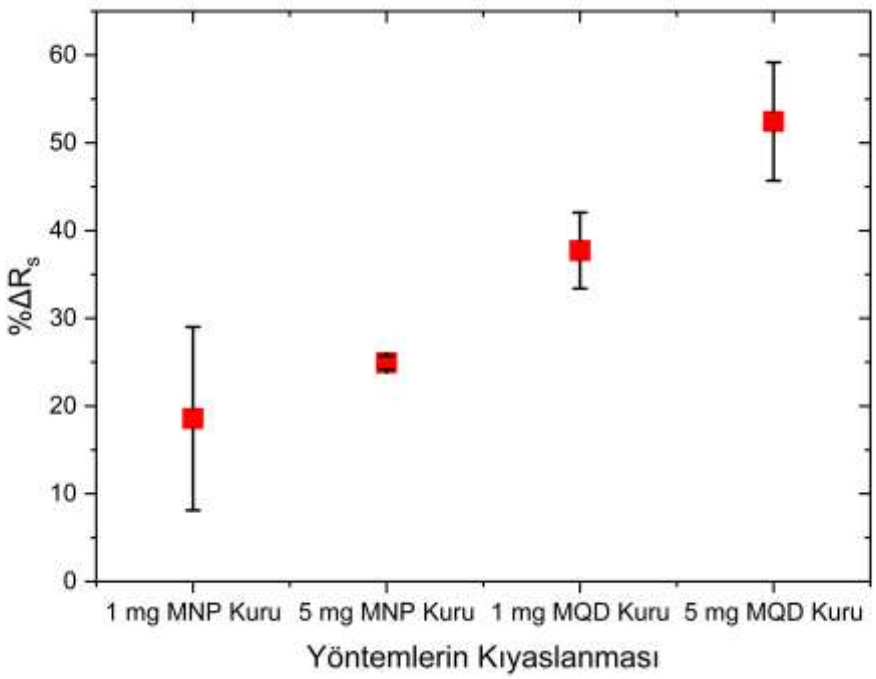
Literatürde $\%\Delta R_s$ varyasyonu daha yüksek olduğu için [108, 109], MQD miktarının artırıldığı yöntem 5 mg manyetik kuantum noktaları 5 mg kuru MQD yöntemi fonksiyonelleştirmeye geçilmiştir.

5 mg kuru MQD ile yapılan deneylerde 46,94122 (± 6,75283) $\%\Delta R_s$ değişime sebep olmuştur.

5 mg kuru MQD ile yapılan deneyler, 1 mg ıslak MNP'ye göre yaklaşık %500, 1 mg ıslak MQD'ye göre yaklaşık %200 ve 1 mg kuru MQD'ye göre yaklaşık %125 daha iyi sonuç üretmiştir.

3.1.1.2. Kuru Yöntemler Analizi

Kuru yöntemlerde sensör yüzeyinde vorteks etkisinin ve sıvı taşması gibi olumsuz durumların olmamasından ötürü, kuru yöntemle farklı miktarlardaki MNP ve MQD'nin nasıl değişime sebep olacağı araştırılmıştır.



Şekil 3.2. Farklı miktarlarda MNP ve MQD içeren 10^7 CFU/mL *E. coli* bakterisinin saptanmasında kuru yöntemlerin karşılaştırılması [106]

Deneyler, Şekil 3.2.'de görüldüğü gibi 10^7 CFU/mL *E. coli* bakterisini tespit etmek için 1 mg MNP kullanılarak başlatıldı. 18,57026 (±10,4499) $\%\Delta R_s$ değişimi elde edildi. Deneyin sonraki bölümünde, 5 mg MNP test edildi ve 24,94076 (±0,76582) $\%\Delta R_s$ sonuçları elde edildi. Bu noktada, yaklaşık %40 daha fazla değişim elde edildi. Daha sonra, 1 mg MQD kullanıldı. Değişim 37,72521 (±4,3315) $\%\Delta R_s$ elde edildi. 1 mg MQD, 5 mg MNP'den yaklaşık %50 daha fazla değişim üretti.

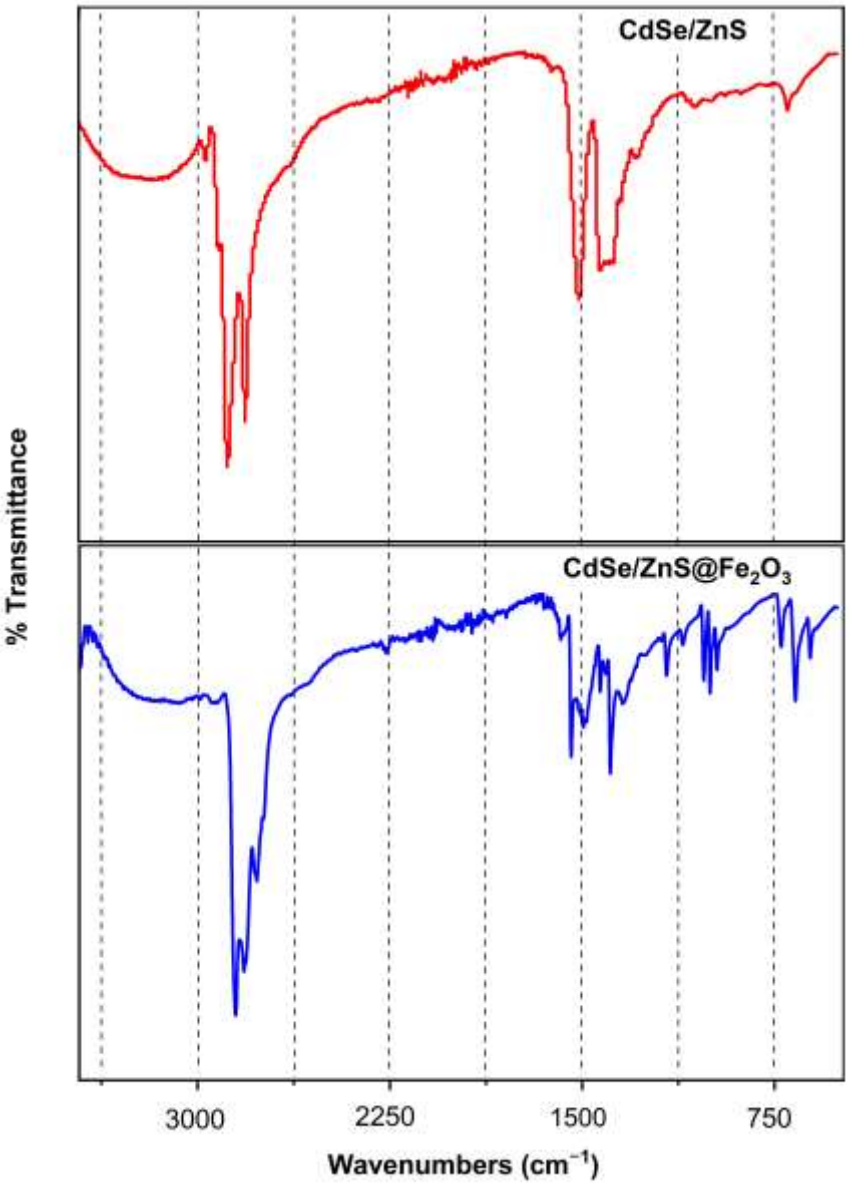
Daha sonra, 5 mg MQD kullanıldı ve değişim 52,434 (±6,7400) $\%\Delta R_s$ elde edildi. Bu durumda literatür taramasına benzer şekilde 1 mg MQD'ye göre yaklaşık %40, 5 mg MNP'ye göre ise yaklaşık %110 daha fazla değişim elde edilmiştir [108, 109]. Bu yöntem karşılaştırması ile deneylerde 5 mg MQD kullanılmasına karar verilmiştir.

Şekil 3.2. detaylı olarak incelendiğinde, kuantum noktalarının sensör performansını artırmadaki rolünü açıklamak için çok önemlidir bilgiler sunmaktadır. Grafit + Fe_2O_3 + antikor elektrotlarının elektrokimyasal tepkisini, grafit + Fe_2O_3 + kuantum noktaları

(CdSe/ZnS) + antikor elektrotlarıyla karşılaştırılması sunulmuştur. Empedans spektroskopisi, 5 mg kuru nanopartikül örnekleri için kuantum noktası içeren elektrot için ΔR'de ~%52'lik bir bağıl değişim olduğunu, yalnızca Fe_2O_3 içeren elektrot için ise ~%25'lik bir değişim olduğunu ortaya koymuştur. Bu gelişme, kuantum noktalarının sağladığı üstün elektrokimyasal aktiviteye ve artan yüzey alanına atfedilir ve daha verimli yük transferi ve daha yüksek antikor bağlama kapasitesi sağlar. Dahası, kuantum noktaları optik algılamayı mümkün kılarak yalnızca Fe_2O_3 içeren elektrotta bulunmayan ikili algılama yetenekleri sunar. Bu sonuçlar, önerilen hibrit biyosensörde daha yüksek hassasiyet, özgüllük ve çok modlu algılama elde etmede kuantum noktalarının kritik rolünü vurgular [106].

3.1.1.3. Nanopartiküllerin FTIR Karakterizasyon Analizi

CdSe/ZnS ve CdSe/ZnS@Fe_2O_3 nanopartiküllerinin karakterizasyonu için FTIR analizi yapılmıştır. Sentezlenen CdSe/ZnS@Fe_2O_3 nanokompozitinin ve yalın haldeki CdSe/ZnS'nin FTIR spektrumları Şekil 3.3.'te gösterilmiştir.



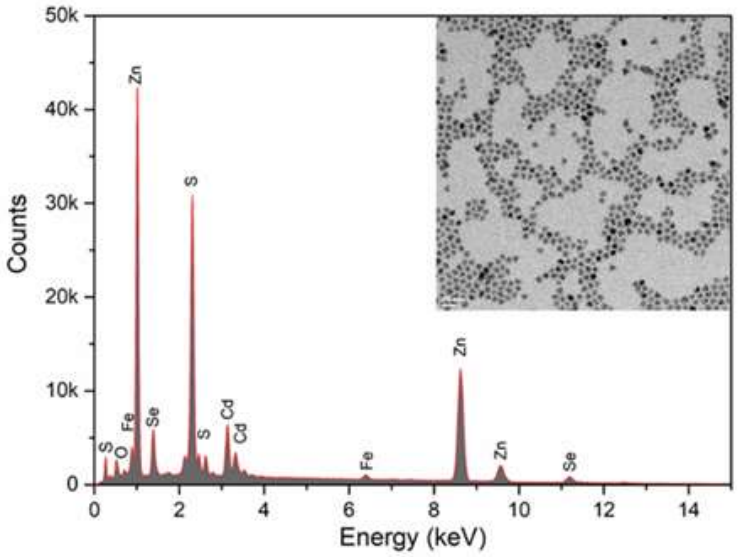
Şekil 3.3. CdSe/ZnS ve CdSe/ZnS@ Fe_2O_3 nanopartiküllerinin FTIR analizi [106]

FTIR analizindeki kırmızı renkle gösterilen CdSe/ZnS'nin karakteristik zirveleri, sırasıyla O-H ve C-O bantlarının gerilme titreşimlerine karşılık gelen 3004 ve 2900 cm^{-1} civarındadır. Tiyol kaplamanın stres titreşimleri nedeniyle 1540 ve 1454 cm^{-1} civarında iki keskin dip gözlemlenmiştir.

FTIR analizindeki mavi renkle gösterilen CdSe/ZnS@Fe_2O_3 nanokompoziti için, FTIR'deki 694 cm^{-1} civarındaki zirveler Fe-O'nun karakteristik titreşim zirvesini gösterir ek olarak bu zirveler maghemitin (γ-Fe_2O_3) varlığını gösterir [110, 111].

3.1.1.4. Nanopartiküllerin TEM ve EDX Karakterizasyon Analizi

Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) görüntüsüyle birlikte, Enerji Dağıtıcı X-ışını Analizi (EDX) (Zeiss, Gemini 300, (Oberkochen, Almanya)) ile nanopartiküllerin elementel stokiyometrisi Şekil 3.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 3.4. CdSe/ZnS@ Fe_2O_3 nanopartiküllerinin enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) ve TEM analizleri [106]

Gözlemlenen tepe noktaları kullanılan kimyasallarla tutarlıdır. Demir ince bir şelat tabakası halinde olduğundan, düşük miktarlarda görünmelidir ve sonuçlar kullanılan malzeme miktarıyla tutarlıdır.

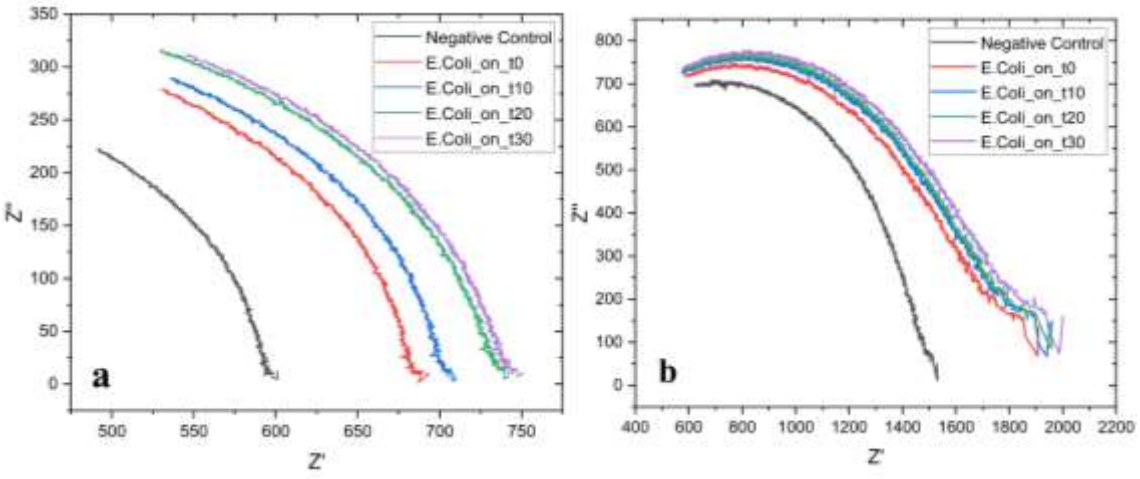
3.1.1.5. Nanopartiküllerin Elementel Karakterizasyon Analizi

Tablo 3.1.'de sentezlenen manyetik kuantum noktalarının elementel analizi gösterilmektedir.

Tablo 3.1. CdSe/ZnS@Fe_2O_3 nanopartiküllerinin elementel analizi [106]

Element	%Ağırlık	%Atomik
O K	2,24	7,36
S K	22,16	36,4
Cd L	9,62	4,51
Fe K	1,04	0,98
Zn K	53,61	43,2
Se K	11,33	7,56

3.1.1.6. Tespit Süresinin Analizi



Şekil 3.5. Nanopartiküller için tespit süresi analizi a) MNP b) MQD [106]

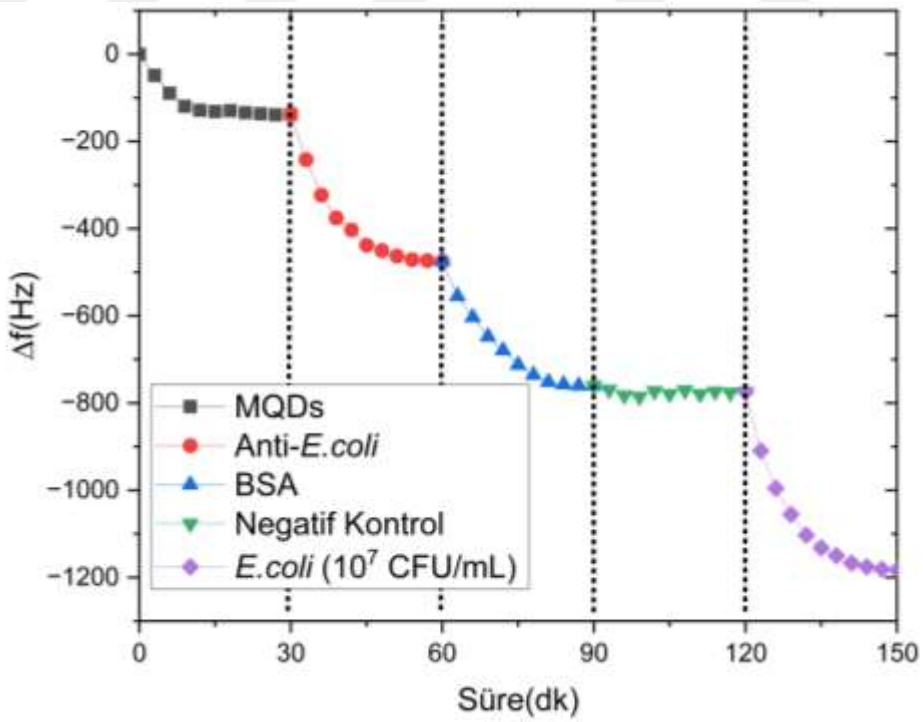
Hazırlanan biyosensörlerin ne kadar sürede *E. coli* bakterisini tespit ederek doyuma ulaştığı incelenmiştir. Bunun için sensörlerden her 5 dakikada bir EİS ölçümü alınarak kaydedilmiştir. Şekil 3.5.'deki nyquist grafiklerinde sırasıyla MNP ve MQD nanopartikülleri içeren biyosensörlerin 10 dk'lık periyotlarındaki veriler gösterilmiştir.

Buna göre 30. dk. itibariyle artık biyosensörlerin doyuma ulaştığı görülmektedir. Bu sebepten ötürü deneylerde tespit süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir.

3.1.1.7. Yüzey Modifikasyonlarının QCM ile Karakterizasyon Analizi

Kâğıt biyosensör yüzey fonksiyonelleştirme metodolojisinin işlevselliği, tüm adımları gösteren ve biyosensör uygulamalarında geçerliliği kabul edilen QCM verileri ile doğrulanmıştır (Şekil 3.6.).

Kâğıt biyosensör üzerindeki MQD'lerin bir QCM sensörü kullanılarak işlevsel olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda kullanılan aynı çapraz bağlayıcı ajanlar ve reseptör ile, kovalent bağ yoluyla QCM'nin altın yüzeyine immobilize edilen MQD'ler işlevselleştirilmiş ve genel olarak kabul görmüş [112-114] kütle duyarlı QCM sensörlerinde bu işlevselleştirme yöntemiyle [115, 116] bakteri tespiti yapılabileceği gösterilmiştir [106].



Şekil 3.6. Manyetik kuantum noktaları (MQD) içeren yüzey modifiye QCM sensörü ile *E. coli* ATCC 25922 bakterilerinin tespitinde her adım için elde edilen frekans kayması tepkileri [106]

QCM yöntemiyle yapılan karakterizasyon çalışmasında her aşama için ayrı ayrı frekans kaymalarının olması, sensör yüzeyinde uygun karakteristik bağlantıların olduğunu ifade etmektedir. Bunlar sırasıyla kâğıt sensör yüzeyine MQD'lerin yerleştirilmesi, ardından MQD'lerin yüzeyine *E. coli* antikorunun bağlanması ve spesifik olmayan bağlantıların engellenmesi için BSA'nın sensör yüzeyine uygulanması durumlarında frekans kayması beklenir. Ayrıca yine yüzey modifikasyonlarının devamında içerisinde *E. coli* bakterisi bulunmayan solüsyona biyosensör frekans kayması göstermezken, içerisinde 10^7 CFU/mL konsantrasyonunda *E. coli* bakterisi bulunan solüsyona frekans kayması ile cevap vererek karakterizasyon çalışmalarında beklenen şekilde çalışmıştır.

3.2. *E. coli* Tespiti

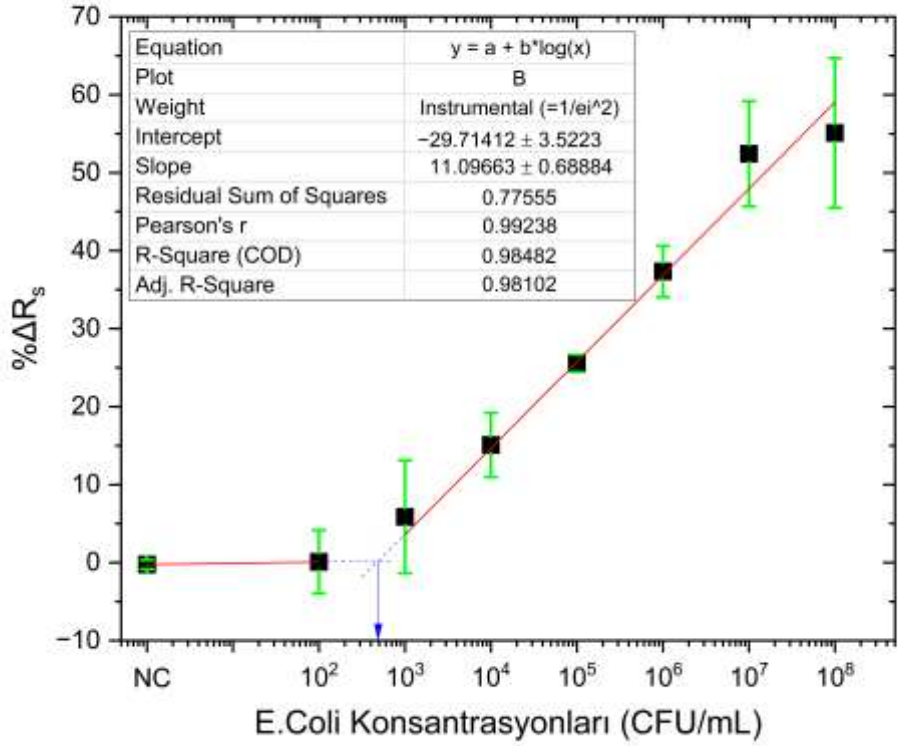
E. coli bakterisini tespit etmek için çeşitli yöntemler denenmiştir. İlk aşamada, biyosensör tarafında MNP mi yoksa MQD mi kullanımının daha uygun olacağı belirlenmiştir. Ardından, grafit kaplamanın nasıl yapılacağı araştırılmış ve seri üretime uygun yöntemler geliştirilmiştir. Bu kapsamda, ilk nesil grafit sensörler test edilmiş; karşılaşılan olumsuzlukların ardından yeni tasarıma sahip, seri üretime uygun grafit sensörler üretilmiştir.

Nihai olarak geliştirilen biyosensörler hem yapay idrar içerisinde hem de laboratuvar ortamında kullanılan, toksik olmayan (negatif kontrol amaçlı) insan idrarı içinde *E. coli* bakterisinin bakterisinin tespiti amacıyla test edilmiş ve kıyaslanmıştır [106].

3.2.1. Kâğıt Sensörle Yapay İdrar İçerisinde *E. coli* Tespiti

İlk olarak kâğıt sensör ve yapay idrar kombinasyonuyla *E. coli* bakterisini tespit etmek üzerine araştırılmalar yapılmıştır. Elde edilen analizler ilerleyen kısımlarda sunulmuştur.

3.2.1.1. Doz-Tepki Analizi ve Tespit Limitinin (LOD) Belirlenmesi



Şekil 3.7. Kâğıt Biyosensörle Yapay İdrar İçerisinde *E. coli* tespitinin Doz tepki analizi ve LOD hesaplanması [106]

Kâğıt biyosensörün yüzey modifikasyonları yapılarak biyosensör yüzeyine PBS içerisinde *E. coli* bakterisinin farklı konsantrasyonları uygulanmıştır. Her konsantrasyon en az 3 tekrarlı olacak biçimde deneyler yapılmıştır. Deney sonuçlarının ortalama empedans değişim değerleri ve standart sapma değerleri aşağıda sunulmuştur.

Negatif Kontrol (NC) için -0,2422 (± 0,58) $\%\Delta R_s$,

10^2 CFU/mL konsantrasyon için 0,0914 (± 4,0532) $\%\Delta R_s$,

10^3 CFU/mL konsantrasyon için 5,8769 (± 7,2423) $\%\Delta R_s$,

10^4 CFU/mL konsantrasyon için 15,0806 (± 4,1235) $\%\Delta R_s$,

10^5 CFU/mL konsantrasyon için 25,5584 (± 1,1232) $\%\Delta R_s$,

10^6 CFU/mL konsantrasyon için 37,3312 (± 3,2752) $\%\Delta R_s$,

10^7 CFU/mL konsantrasyon için 52,434 (± 6,74) $\%\Delta R_s$,

10^8 CFU/mL konsantrasyon için 55,10 (± 9,6033) $\%\Delta R_s$, elde edildi.

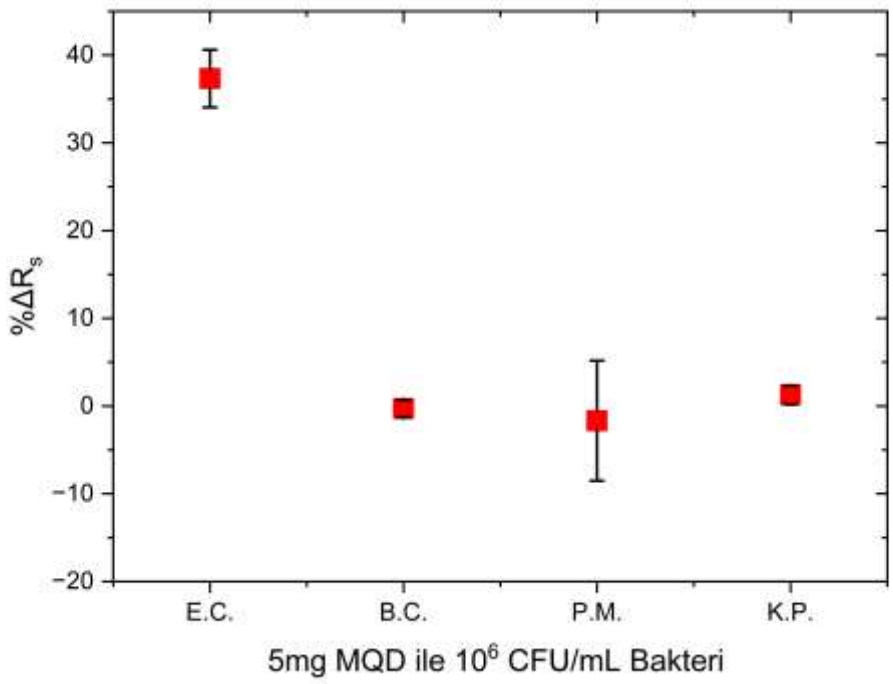
Yapılan deneyler neticesinde elde edilen sonuçlar kalibrasyon eğrisi, lineer dinamik aralık ve tespit limiti (limit of detection, LOD) elde edildi. Şekil 3.7.'de gösterildiği üzere negatif kontrol (NC) ile 10^2 CFU/mL arasına eğri oturtuldu. 10^3 CFU/mL ile 10^8 CFU/mL arasına eğri oturtuldu [106]. Bu iki eğrinin kesiştiği nokta LOD değerini $2,7 \times 10^2$ CFU/mL ve 10^3-10^8 CFU/mL lineer dinamik aralığını elde etmemizi sağladı [117].

3.2.1.2. Seçicilik

Sensörün yüzeyi yalnızca *E. coli* bakterisinin antijenini tespit edebilmesi için işlevselleştirildiği için, başka bakterilerin antijenleriyle tepki vermesi istenmeyen bir durumdur. Bu noktada yüzeyde bulunan *E. coli* antikorlarının yalnızca *E. coli* antijeni ile etkileşim kurması amaçlanmaktadır. Bunun için ortamda başka bakterilerin de olduğu durumda sensörün nasıl davrandığı test edilmiştir [118-121].

E. coli gibi çoğunlukla Gram-negatif olan ve idrar yolları enfeksiyonuna sebep olan aşağıdaki bakteriler kullanılmıştır.

Proteus mirabilis	*P.M.* (Gram-negatif)
Klebsiella pneumoniae	*K.P.* (Gram-negatif)
Alkalihalobacillus clausii	*B.C.* (Gram-pozitif)



Şekil 3.8. Kâğıt biyosensörün yapay idrar içerisinde bakterilere olan seçiciliği [106]

Şekil 3.8.'de görüldüğü üzere, geliştirdiğimiz metodolojiyle üretilen kâğıt biyosensöre uygulanan 10^6 CFU/mL konsantrasyonuna sahip PBS içerisindeki bütün bakterilerden sadece *E. coli* bakterisine cevap verirken, idrar yollarında enfeksiyona sebep olan diğer bakterilere cevap vermemiştir.

E. coli (*EC*) için 37,3312 (± 3,2752) $\%\Delta R_s$,

Bacillus clausii (*BC*) için -0,2944 (± 0,9840) $\%\Delta R_s$,

Proteus mirabilis (*PM*) için -1,6675 (± 6,8444) $\%\Delta R_s$,

Klebsiella pneumoniae (*KP*) için 1,2737 (± 1,0803) $\%\Delta R_s$ değişim göstermiştir.

3.2.1.3. Kararlılık

Biyosensörlerde önemli olan parametrelerden bir tanesi de üretilen biyosensörün kararlılığıdır. Sensörün kararlı (stabil) bir şekilde çalıştığını göstermek için çalışmalar yürütüldü. Bunun için 10 adet kontrol ve 10 adet test deneyleri yapıldı.

Kontrol solüsyonunda 150 µL içerisinde 10^6 CFU/mL konsantrasyonda aşağıdaki bakteriler hazır edildi.

Proteus mirabilis *P.M.*

Klebsiella pneumoniae *K.P.*

Alkalihalobacillus clausii *B.C.*

Test solüsyonunda 150 µL içerisinde 10^6 CFU/mL konsantrasyonda aşağıdaki bakteriler hazır edildi.

E. Coli *E.C.*

Proteus mirabilis *P.M.*

Klebsiella pneumoniae *K.P.*

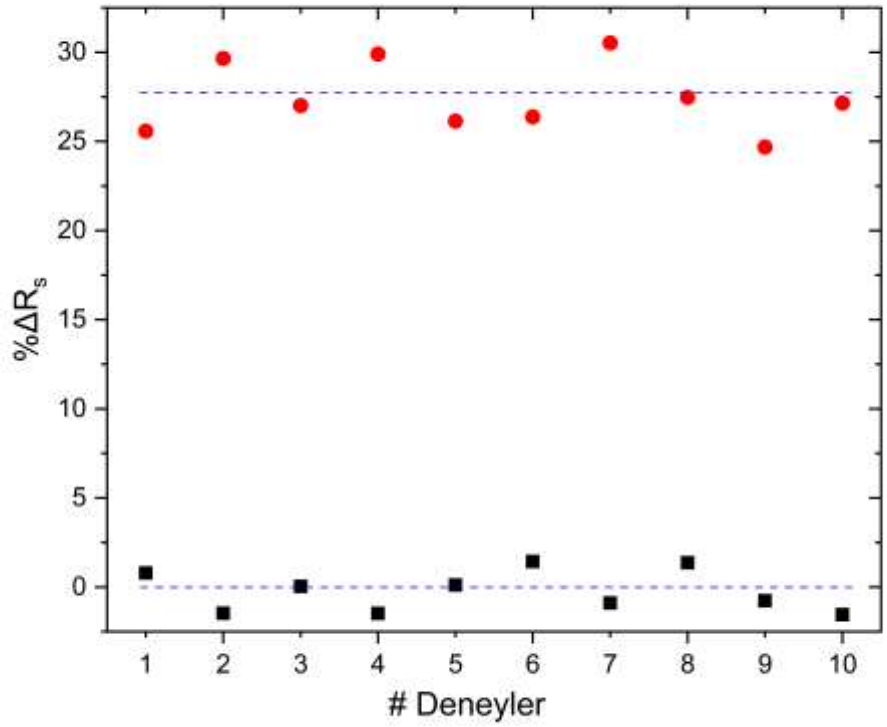
Alkalihalobacillus clausii *B.C.*

5mg MQD'ler kullanılarak yapılan deneylerde

Kontrol deneyleri için -0,2422 (± 0,58) $\%\Delta R_s$,

Test deneyleri için 27,4529 (± 0,9823) $\%\Delta R_s$ elde edildi.

Bu veriler ve kararlılık çalışması kırmızı noktalar test deneylerini, siyah kutucuklar kontrol deneylerini simgeleyecek biçimde Şekil 3.9.'da yer almaktadır.



Şekil 3.9. Kararlılık testi [106]

Şekil 3.8.'deki doz-cevap grafiğine bakıldığında, 10^6 CFU/mL konsantrasyondaki değişimin 37,3312 (±3,2752) $\%\Delta R_s$ olduğu görülmektedir. Ancak Şekil 3.9.'daki kararlılık testinde değişim 27,4529 (±0,9823) $\%\Delta R_s$ olmuştur. Yani değişimde yaklaşık %27'lik bir azalma söz konusudur. Bunun nedeni, tespit ortamında benzer özelliklere sahip bakterilerin bulunması ve bu bakterilerin birbirleriyle etkileşime girmesidir [106].

3.2.1.4. Optik Optimizasyonu

Bakteri tespiti için yeni bir yol başlatmak ve kuantum noktasının yüzeyindeki bakterilerin elle tutulur bir şekilde algılanmasını sağlamak için manyetik kuantum noktası numunelerinde zamanla ilişkili tek foton sayımı ölçümleri kullanılmıştır.

Bir fotonun gelişi ile uyarıcı darbenin zamanlaması arasındaki farkı çok hassas bir şekilde ölçmeye dayanan bu yöntem dört aşamada gerçekleşmektedir. İlk olarak uyarma işlemi gerçekleştirilir. Genellikle lazer darbesi (femtosaniye veya pikosaniye darbeler) ile

uyarılır. Bu uyarma ile moleküller elektronik olarak uyarılmış hale gelir. İkinci adım floresans emisyonu olarak isimlendirilmektedir. Lazer darbesiyle uyarılmış moleküller, belirli bir süre sonra temel haline dönerken floresan fotonu yayarlar. Bu fotonun yayılması rastlantısaldır ve molekülün karakteristiğine bağlıdır. Üçüncü aşamada zaman ölçümü yapılır. Her bir lazer darbesiyle birlikte bir başlatıcı (start) sinyal verilir. İlgili floresan fotonun dedektöre ulaşmasıyla bir bitirici (stop) sinyal elde edilir. Bu iki sinyal arasındaki süre, pikosaniye çözünürlükle ölçülür. Bu süre, bir olay olarak kaydedilir. Dördüncü aşamada tek foton sayımı yapılmaktadır. Aynı koşullar altında binlerce (hatta milyonlarca) foton ölçülür. Bu zaman aralıklarının histogramı çıkarılır. Bu histogram, floresan bozunma eğrisini verir.

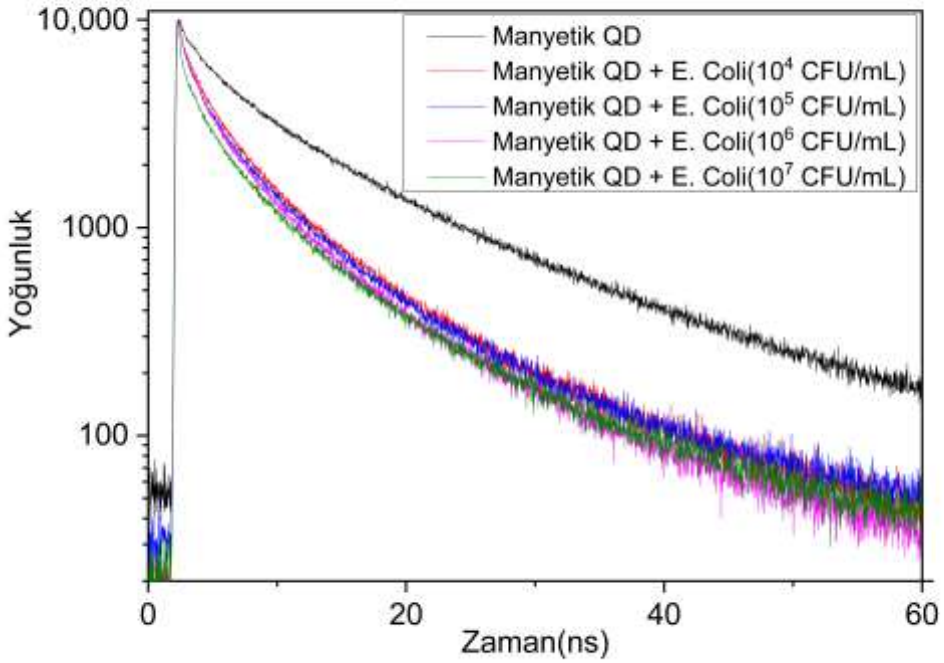
$$I(\mathrm{t}) = I_0 e^{-t/\tau}$$

Burada;

$I(t)$: Zaman t'deki foton sayısını,

τ : Floresan ömrünü (lifetime) vermektedir.

MQD'ler ve bakteriler arasındaki eksitonik etkileşimler tarafından kolaylaştırılan MQD üzerindeki bakteri konsantrasyonunu düzenleyerek, numunelerde hızlandırılmış emisyon bozunmalarını metodik olarak ayırt edilmiştir. Bu ivme, aşırı düşük bakteri konsantrasyonlarında bile ayırt edilebilen etkileşimin kapsamını göstermektedir.



Şekil 3.10. Üzerlerine farklı konsantrasyonlarda *E. coli* bağlı kuantum noktalarının ortalama ömrü [106]

Şekil 3.10., MQD kompleksinin zamanla ilişkili tek foton sayımı bozunmalarını göstermektedir. Burada, empedans ölçümlerinde aynı hiyerarşik prosedür kullanılmıştır.

Sekil 3.10.'da yoğunluk ekseni, zamanla ilişkili tek foton sayma ölçümlerinde her bir zaman aralığında kaydedilen floresan fotonların sayısını ifade etmektedir. Logaritmik eksen kullanılması düşük ve yüksek foton sayılarındaki değişimleri daha net görebilmemizi sağlamaktadır. Bu veriler uyarımdan sonra moleküllerin ne kadar süreyle floresan yaydığına dair istatistiksel bir dağılım sunmaktadır.

Şekil 3.10.'da en üstteki siyah eğri (Manyetik QD), floresan ömrünün en uzun olduğu durumu göstermektedir. Çünkü yoğunluk zamanla daha yavaş azalmaktadır. *E. coli* konsantrasyonu arttıkça (kırmızıdan yeşile doğru) QD'lerin ortam özelliklerinin bozulması sonucu söndürmenin (quenching) artmasıyla, bu eğrilerin daha hızlı düştüğü görülmektedir. Bu durum floresan ömrünün azaldığını göstermektedir.

Yüzeyde herhangi bir bağlı *E. coli* ölçülmeden önce kuantum noktalarının çıplak ömrü 8,59 ns olarak ölçülmüştür. Manyetik kuantum noktalarının ömürleri, sensör yüzeyine bırakılan 10^7, 10^6, 10^5 ve 10^4 CFU/mL *E. coli* konsantrasyonlarında sırasıyla 3,37; 3,72; 3,92 ve 4,66 ns olarak çıkarılmıştır. *E. coli* konsantrasyonu 10^4'ten 10^7 CFU/mL'ye sabit bir şekilde arttıkça, kuantum noktalarının ortalama ömrü 3,37 ns'ye düşerek %60'ın üzerinde ömür azalması göstermiştir [106].

Standart A4 kâğıt, 8B kalem ve oje ile çok uygun maliyetli, basit, hızlı, taşınabilir, hassas, spesifik, kararlı ve doğru ölçümler sağlayan bir biyosensör elde edilmiştir. Fe_2O_3 manyetik kabuklu, amin gruplarıyla yüzey modifiye edilmiş CdSe/ZnS kuantum noktaları, grafit kaplı kâğıt biyosensörlerin yüzeyindeki tespit noktasına tutturulmuş *E. coli* bakterilerini tanıyan antikorlar bir mıknatıs yardımıyla hareketsizleştirilmiştir ve hem elektrokimyasal hem de optik sensör elde edilmiştir. Bu şekilde, bir elektrokimyasal biyosensörden ve bir optik biyosensörden elde edilmesi istenen tüm avantajlar birleştirilmiştir [122-124].

Herhangi bir ek harici çapraz kontrol deneyi yürütülmese de, geliştirilen hibrit biyosensör, çift modlu tespit yaklaşımı (elektrokimyasal empedans ve optik floresan ömrü), *E. coli* dışı bakterilere karşı özgüllük testi ve tekrarlanan kararlılık analizleri yoluyla doğrulanmıştır. Bu bağımsız testler boyunca sonuçların tutarlılığı, yöntemin doğruluğunun sağlam bir şekilde doğrulanmasını sağlamıştır. Ayrıca, sensörün duyarlılık, tespit sınırı ve özgüllük gibi performans ölçütleri, daha önce bildirilen çalışmalarla uyumludur ve sonuçların geçerliliğini daha da doğrulamıştır. Bu doğrulamalar hibrit biyosensörün *E. coli*'nin doğru tespiti için güvenilir bir araç olduğunu göstermektedir.

3.2.2. Kâğıt Sensörle Araştırılabilir İdrar İçerisinde *E. coli* Tespiti

El yapımı ve özgün tasarımla üretilen kâğıt biyosensör kullanılarak yapay idrar içerisinde bakteri tespitine yönelik yapılan çalışmalarda, doz-tepki analizi, tespit limiti, kararlılık ve seçicilik testlerinden olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu doğrultuda, *E. coli* bakterisinin yalnızca yapay idrarda değil, farklı bir ortamda da tespit edilebilirliği incelenmek istenmiştir. Bu amaçla, laboratuvar ortamında kullanılabilir ve toksik olarak negatif olan insan idrarı temin edilmiştir.

Temin edilen bu insan idrarı örneği, seri üretime uygun olarak geliştirilecek sensörlerde kullanılmadan önce, doğruluğundan emin olunan mevcut kâğıt biyosensör ile test edilmiştir. Böylece, laboratuvar ortamında kullanılabilir toksik olarak negatif insan idrarının, sensör performansı üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

3.2.2.1. Deney Prosedürü

Kâğıt biyosensörde kuru yöntemle laboratuvar ortamında kullanılabilir toksik olarak negatif olan insan idrarının içerisinde bakteri tespit etmek için kullanılan deney prosedürü aşağıdadır.

1. Kâğıt sensör, mıknatıs üzerindeki platforma yerleştirildi.

2. 15 mg Sulfo-NHS, pyridine (5 mL) içinde çözüldü. Bu çözeltiye 0,25 mL kloroform içinde EDC (15 mg) eklendi. 40 mg nano partikül eklendi ve ardından karışım 2 saat çalkalandı. Oluşan amin reaktif NP'leri heksan eklenerek çöktürüldü, harici bir mıknatısla ayrıldı ve etanol ve saf su ile yıkandı [117]. Bu şekilde, sensör yüzeyi amin reaktif olarak işlevselleştirildi.

3. 5 mg amin grubu modifiye edilmiş nanopartikül (MQD) tartıldı ve 180 µL pH (7.4) sodyum fosfat tamponu eklendi ve parçacıkları dağıtmak için sonikasyona tabi tutuldu. Antikor modifikasyonu sağlamak için, hazırlanan bu çözeltiye 10^{15} konsantrasyonda 20 µL amin aktif *E. coli* antikoru eklendi. Bu karışım 30 dakika sonikasyona tabi tutuldu ve ardından reaksiyon 45 dakika boyunca bir orbital mikserde tamamlandı. Bakteriler, Şekil 2.4. Adım 4 ve 5'te gösterildiği gibi MQD'ler, EDC/Sulfo-NHS ve antikorlarla reaktif hale getirildi. Karışım, çökene kadar yaklaşık 1-2 dakika santrifüj edildi (Şekil 2.4. Adım 6). Amin aktif antikorlar, kararlı bir amid bağı yoluyla bağlandı. İşlemin sonunda, bağlanmamış antikorları uzaklaştırmak için bir fosfat tamponu ile 3 kez yıkama yapıldı.

4. Hazırlanan antikor bağlı NP'ler harici bir mıknatısla tutuldu, grafit kaplı (Şekil 2.4. Adım 7 ve 8) ve ojelenmiş kâğıt bazlı biyosensörün algılama yüzeyine 200 µL damlatıldı.

5. İnkübatör cihazında 40°C'de 15 dakika kurumaya bırakıldı (Şekil 2.4. Adım 9). Kurutma işleminden sonra sensörler empedans ve kuantum verimliliği ile analize hazır hale getirildi.

6. Üzerine 150 µL laboratuvar ortamında kullanılabilir toksik olarak negatif olan insan idrarı eklendi ve ilk ölçüm yalnızca antikor bağlandığında alındı.

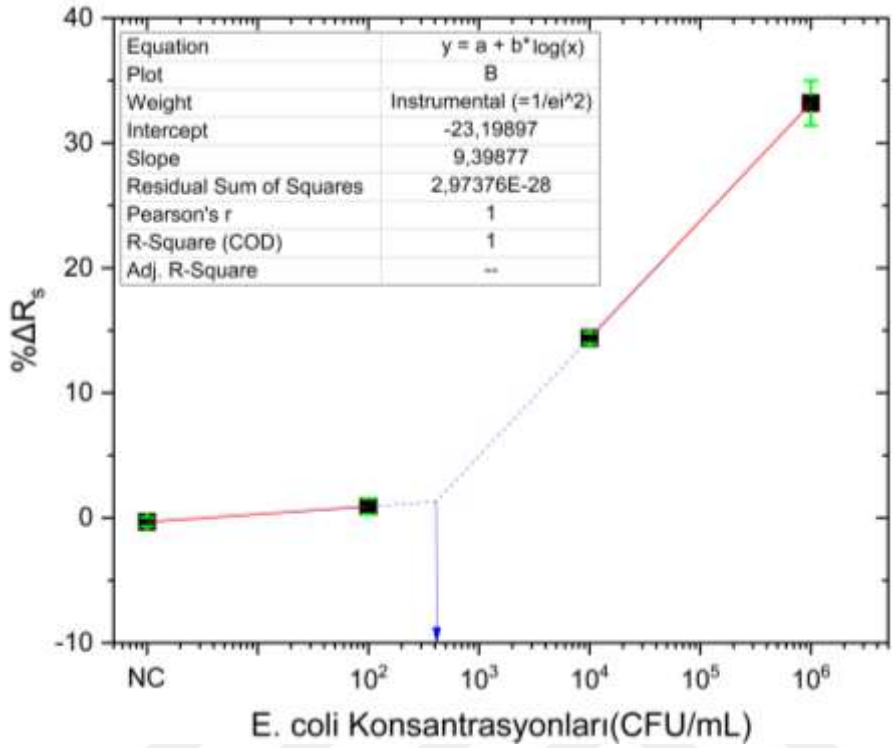
7. Sensör yüzeyindeki NP'lere zarar vermeden, sensör yüzeyindeki fazla sıvı çekildi.

8. 150 µL laboratuvar ortamında kullanılabilir toksik olarak negatif olan insan idrarı içerisinde uygun konsantrasyonlara *E. coli* bakterisi olacak şekilde solüsyon hazırlandı ve sensör yüzeyine uygulandı. Empedans ölçümleri sensör doyuma ulaşınca yani 30 dakika sonra yapıldı.

9. Sensör yüzeyi laboratuvar ortamında kullanılabilir toksik olarak negatif olan insan idrarı ile 3 defa yıkandı ve bağlanmamış bakteriler sensörden uzaklaştırıldı. Yıkama işleminin ardından sensör yüzeyinde 150 µL laboratuvar ortamında kullanılabilir toksik olarak negatif olan insan idrarı olduğunda tekrar empedans ölçümü alındı ve veriler kaydedildi.

3.2.2.2. Doz-Tepki Analizi ve Tespit Limitinin (LOD) Belirlenmesi

Doğruluğundan ve çalışmasından emin olunan kâğıt biyosensör prosedürde belirtilen yüzey modifikasyonları sağlandıktan sonra laboratuvar ortamında kullanılabilir toksik olarak negatif olan insan idrarı içerisinde negatif kontrol (NC), 10^2, 10^4 ve 10^6 CFU/mL *E.coli* bakterisi barındıran konsantrasyonlarda en az 3 tekrarlı deneyler yapılmıştır [117].



Şekil 3.11. Kâğıt biyosensörde araştırılabilir idrarla yapılan doz-tepki analizi

Negatif Control (NC) için -0,32302 (± 0,36338) $\%\Delta R_s$,

10^2 CFU/mL konsantrasyon için 0,91296 (± 0,626) $\%\Delta R_s$,

10^4 CFU/mL konsantrasyon için 14,39609 (± 0,42328) $\%\Delta R_s$,

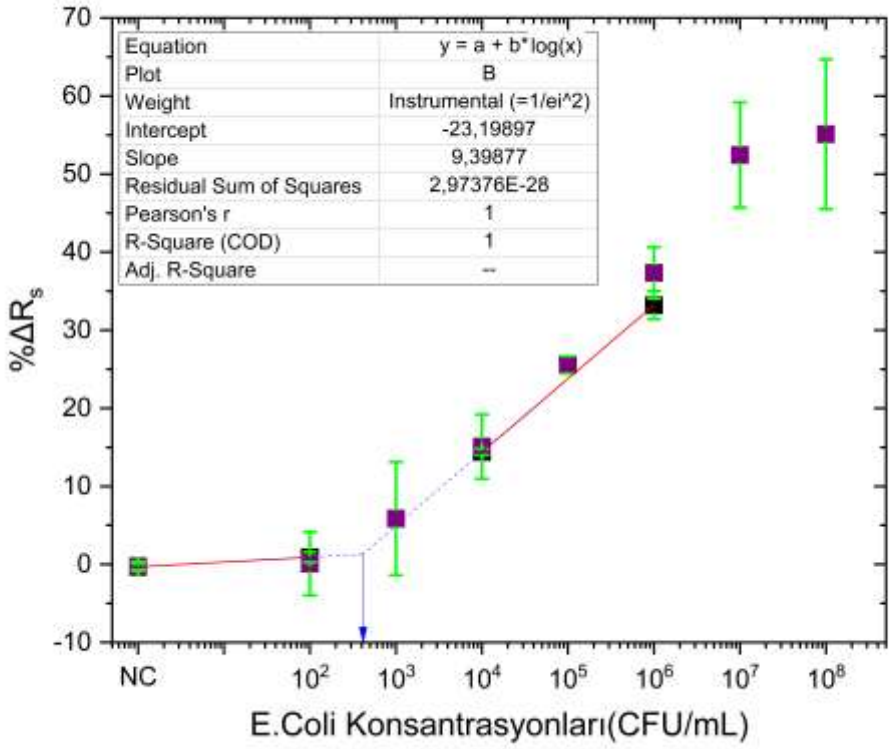
10^6 CFU/mL konsantrasyon için 33,19362 (± 1,79976) $\%\Delta R_s$, elde edilmiştir.

Şekil 3.11.'de gösterildiği üzere negatif kontrol (NC) ile 10^2 CFU/mL arasına eğri oturtuldu. 10^4 CFU/mL ile 10^6 CFU/mL arasına eğri oturtuldu. Bu iki eğrinin kesiştiği nokta LOD değerini vermektedir, mavi ok ile gösterilmiştir ve $2{,}61 \times 10^2$ CFU/mL olarak hesaplanmıştır.

3.2.2.3. Kâğıt Biyosensörde Yapay İdrar ve Araştırılabilir İdrarın Karşılaştırılması

Kâğıt biyosensörle, laboratuvar ortamında kullanılabilen toksik olarak negatif olan insan idrarıyla üretilen doz-tepki analizi verilerini (Şekil 3.11.), kâğıt biyosensörle, yapay idrarla üretilen doz-tepki analizini (Şekil 3.10.) Şekil 3.12.'de üst üste getirerek

kıyaslamak marifetiyle, kâğıt biyosensörle laboratuvar ortamında kullanılabilen toksik olarak negatif olan insan idrarı içerisinde *E. coli* bakterisi tespitinin doğruluğu araştırılmıştır.



Şekil 3.12. Kâğıt sensörle yapılan yapay idrarlı deneylerin ve araştırılabilir idrarlı deneylerin doz-tepki grafiklerinin kıyaslanması

Şekil 3.12.'de yapay idrar içerisinde *E. coli* bakterisi tespiti ile laboratuvar ortamında kullanıma uygun toksik olarak negatif olan insan idrarı içerisinde *E. coli* bakterisinin tespitinin hemen hemen aynı verilere sahip olması çalışmamızda doğru yönde ilerlediğimizi göstermiştir.

3.2.3. Seri Üretime Uygun Grafit Sensörle Araştırılabilir İdrar İçerisinde E. coli Tespiti

Grafit tozu, aseton ve sıvı silikon kullanılarak serigrafik yöntemle çelik kalıpta grafit sensörler üretilmiştir.



Şekil 3.13. Seri üretime uygun üretilen grafit sensörler

Kalıptan çıkarılmış sensörler, ojeleme işlemi yapılan sensörler ve MQDs + EDC/s-NHS + *E. coli* antikor solüsyonu damlatılan sensörler Şekil 3.13.'te görülmektedir [107, 125, 126]. Bu biyosensörle yapılan deneylerin sonuçları istenilen şekilde çıkmamıştır. Bu olumsuz duruma üretilen sensörlerin kalınlığının sebep olduğu düşünülmüştür. Ayrıca sensörler, deneylerin yürütüm anında, hatta kalıptan çıkarılması anında dahi ayak kısımlarından kırılmıştır. Bu durumda mekanik olarak daha dayanıklı ve daha ince yapıda yeni tasarımlı grafit sensörlerin üretilmesi planlanmıştır.

3.2.4. Seri Üretime Uygun Yeni Tasarımlı Grafit Sensörle Araştırılabilir İdrar İçerisinde *E. coli* Tespiti

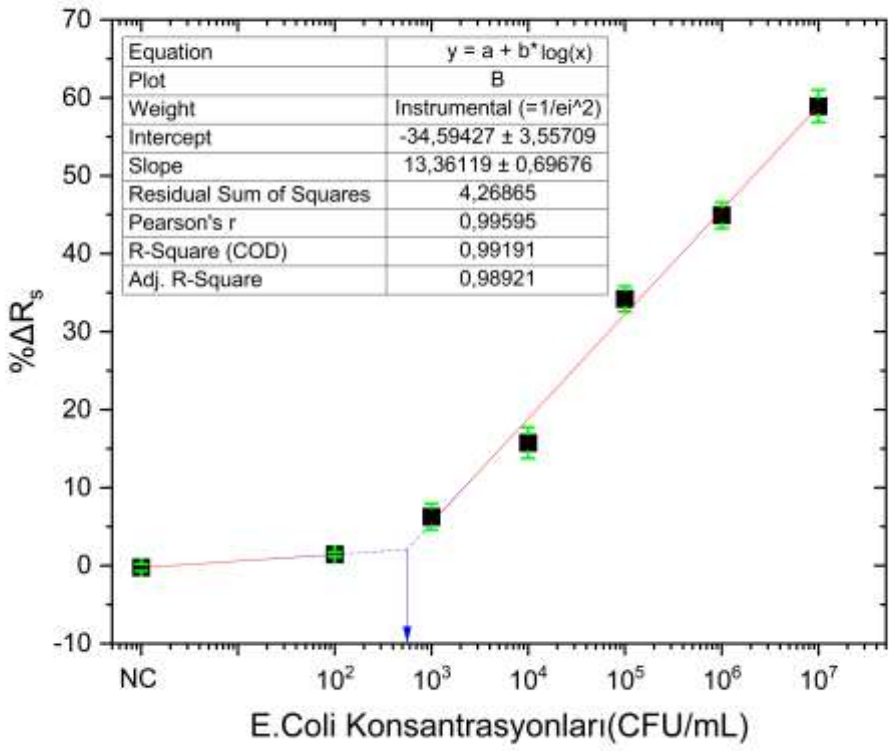
Şekil 2.8.'de gösterilen tasarım değişikliği yapılmıştır. Şekil 3.14.'te yeni tasarımla üretilen grafit sensörlerin üretim aşamaları ve EİS ölçümü anındaki sensör gösterilmiştir.



Şekil 3.14. Yeni tasarıma sahip grafit sensörlerin üretim aşamaları

3.2.4.1. Doz-Tepki Analizi ve Tespit Limitinin (LOD) Belirlenmesi

Güncel tasarımla ürettiğimiz grafit sensörlerle laboratuvar ortamında kullanıma uygun toksik olarak negatif olan insan idrar içerisinde farklı konsantrasyonlarda *E. coli* bakterisiyle en az üç tekrarlı olmak üzere doz-tepki analizi çalışmaları yapıldı. Bu deneylerin doz-tepki analizi Şekil 3.15.'de bulunmaktadır [117].



Şekil 3.15. Yeni tasarımlı grafit sensörlerde laboratuvar ortamında kullanılabilen idrar içerisinde *E. coli* tespitinin doz-tepki analizi

Şekil 3.15.'de;

Negatif kontrol (NC) için -0,25347 (± 0,44365) $\%\Delta R_s$,

10^2 CFU/mL konsantrasyon için 1,43307 (± 0,28501) $\%\Delta R_s$,

10^3 CFU/mL konsantrasyon için 6,25803 (± 1,68937) $\%\Delta R_s$,

10^4 CFU/mL konsantrasyon için 15,74065 (± 1,99705) $\%\Delta R_s$,

10^5 CFU/mL konsantrasyon için 34,20026 (± 1,63131) $\%\Delta R_s$,

10^6 CFU/mL konsantrasyon için 44,9254 (± 1,66836) $\%\Delta R_s$,

10^7 CFU/mL konsantrasyon için 58,91593 (± 2,07424) $\%\Delta R_s$, elde edildi.

Şekil 3.15.'de gösterildiği üzere negatif kontrol (NC) ile 10^2 CFU/mL arasına eğri oturtuldu. 10^3 CFU/mL ile 10^7 CFU/mL arasına eğri oturtuldu. Bu iki eğrinin kesiştiği nokta LOD değerini vermektedir, mavi ok ile gösterilmiştir ve $2{,}74 \times 10^2$ CFU/mL olarak hesaplanmıştır. Lineer aralığı ise 10^3-10^7 CFU/mL aralığındadır.

3.2.4.2. Seçicilik

Yeni tasarımlı grafit sensörün yüzeyi sadece *E. coli* bakterisinin antijenini tespit edebilmesi için işlevselleştirildiği için başka bakterilerin antijeni ile tepki vermesi istenmeyen bir durumdur. Sensör yüzeyinde bulunan *E. coli* antikorlarının *E. coli* antijeni ile etkileşim kurması yani affinite olması amaçlanmaktadır. Bunun için ortamda başka bakterilerin de olduğu durumda sensörün nasıl davrandığının testi yapılmıştır[118-121].

E. coli gibi çoğunlukla Gram-negatif olan ve idrar yolları enfeksiyonuna sebep olan aşağıdaki bakteriler kullanılmıştır.

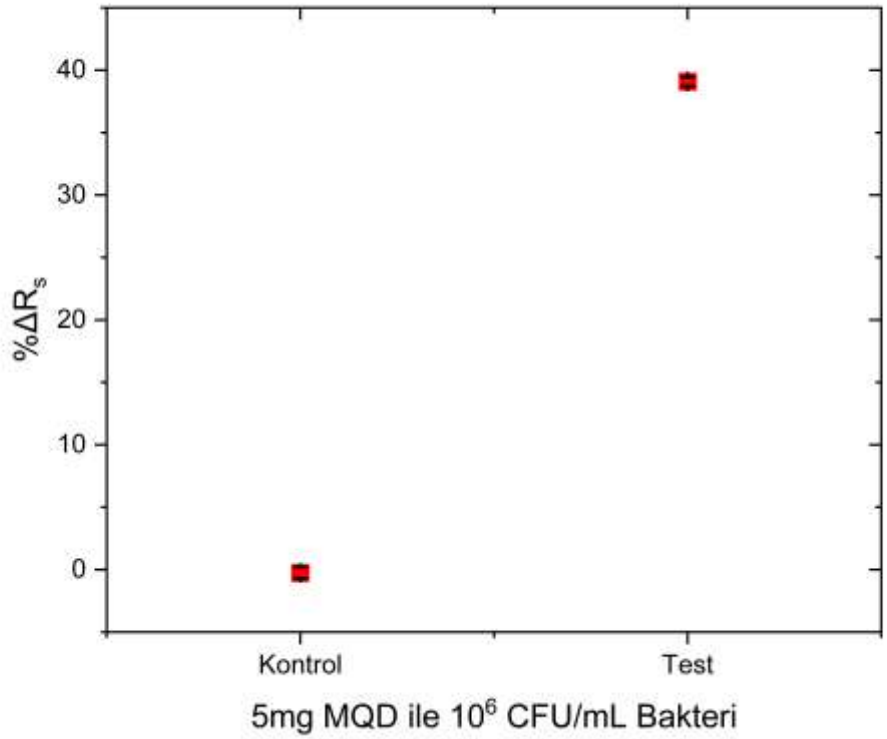
Proteus mirabilis *P.M.* (Gram-negatif)

Klebsiella pneumoniae *K.P.* (Gram-negatif)

Alkalihalobacillus clausii *B.C.* (Gram-pozitif)

Şekil 3.16.'da gösterildiği üzere, sensor *E. coli* haricinde başka bakterilerle etkileşime girmemiş ve *E. coli* antijenine olan spesifikliğini göstermiştir.

Yeni tasarımlı grafit sensörde laboratuvar ortamında kullanılabilen idrarla en az 3 tekrarlı olacak biçimde kontrol ve test solüsyonlarıyla spesifisite çalışmaları yürütülmüştür.



Şekil 3.16. Yeni tasarımlı grafit biyosensörün laboratuvar ortamında kullanılabilen idrar içerisinde bakterilere olan seçiciliği

Kontrol solüsyonunda 150 µL içerisinde 10^6 CFU/mL konsantrasyonda aşağıdaki bakteriler hazır edildi.

Proteus mirabilis *P.M.*

Klebsiella pneumoniae *K.P.*

Alkalihalobacillus clausii *B.C.*

Test solüsyonunda 150 µL içerisinde 10^6 CFU/mL konsantrasyonda aşağıdaki bakteriler hazır edildi.

E. coli *E.C.*

Proteus mirabilis *P.M.*

Klebsiella pneumoniae *K.P.*

Alkalihalobacillus clausii *B.C.*

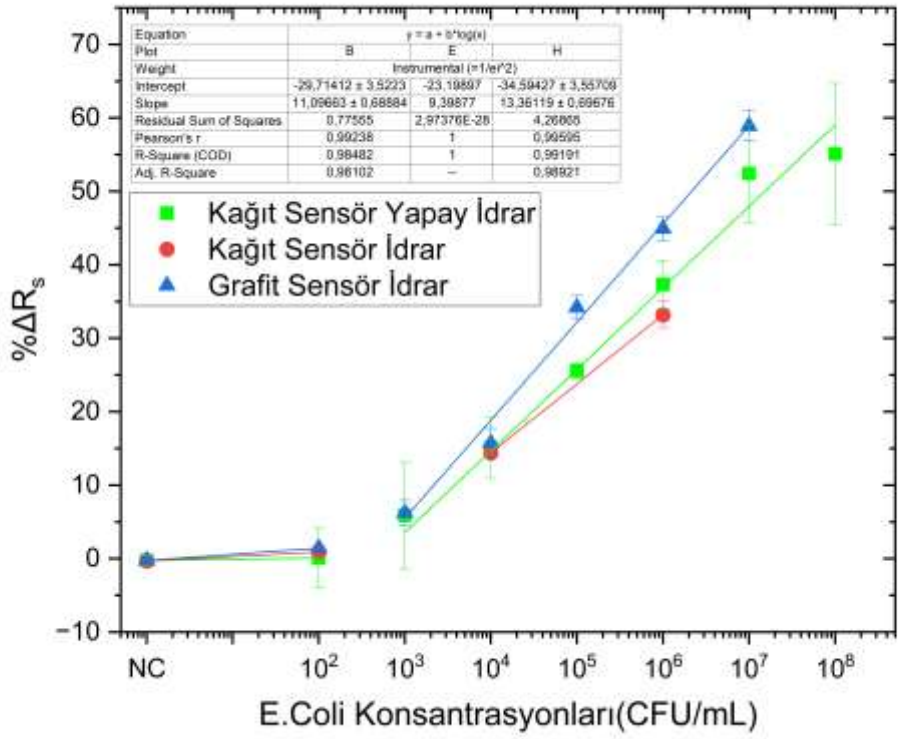
5mg MQD'ler kullanılarak yapılan deneylerde

Kontrol deneyleri için -0,25347 (± 0,44365) $\%\Delta R_s$,

Test deneyleri için 39,08955 (± 0,36671) $\%\Delta R_s$ elde edilmiştir.

3.2.4.3. Bütün Doz-Tepki Analizlerinin Karşılaştırılması

Kâğıt sensör kullanılarak yapay idrar (PBS) içerisindeki *E. coli* bakterisinin farklı konsantrasyonlarını tespit eden çalışmanın doz-tepki analizi çalışması, kâğıt sensör kullanılarak laboratuvar ortamında kullanıma uygun toksik olarak negatif olan insan idrarı içerisinde *E. coli* bakterisinin farklı konsantrasyonlarını tespit eden çalışmanın doz-tepki analizi çalışması ve yeni tasarımlı grafit sensörle laboratuvar ortamında kullanıma uygun toksik olarak negatif olan insan idrarı içerisinde *E. coli* bakterisinin farklı konsantrasyonlarını tespit eden çalışmanın doz-tepki analizi çalışması bir doz-tepki analizi grafiği üzerinde çakıştırılmıştır. Şekil 3.17.'de gösterilmektedir.



Şekil 3.17. Doz-Tepki analizlerinin kıyaslanması

Şekil 3.17.'de yeşil kare simge kâğıt sensör kullanılarak yapay idrar (PBS) içerisindeki *E. coli* bakterisinin farklı konsantrasyonlarını tespit eden çalışmanın doz-tepki analizi çalışmasını, kırmızı yuvarlak simge kâğıt sensör kullanılarak laboratuvar ortamında kullanıma uygun toksik olarak negatif olan insan idrarı içerisinde *E. coli* bakterisinin farklı konsantrasyonlarını tespit eden çalışmanın doz-tepki analizi çalışmasını ve mavi üçgen simge yeni tasarımlı grafit sensörle laboratuvar ortamında kullanıma uygun toksik olarak negatif olan insan idrarı içerisinde *E. coli* bakterisinin farklı konsantrasyonlarını tespit eden çalışmanın doz-tepki analizi çalışmasını göstermektedir.

Şekil 3.17.'deki sonuçların benzer çıkması yapılan çalışmaların doğru sonuçlar ürettiğini ifade etmektedir. Kâğıt biyosensör oluşturulmasında MNP, MQD seçiminden başlayan yapay idrar içerisinde *E. coli* bakterisini tespit etmeyi hedefleyen süreç seri üretime uygun grafit sensör üretilerek laboratuvar ortamında kullanıma uygun toksik olarak negatif olan insan idrarı içerisinde *E. coli* bakterisinin farklı konsantrasyonlarını özgül olarak 2,74 ×

10^2 CFU/mL LOD değeriyle 10^3-10^7 CFU/mL lineer aralığında bulunmasıyla tamamlanmıştır.

3.3. İstatistikî Analiz Sonuçları

Yapılan tez çalışmasında sensörün kararlılık çalışmaları kapsamında sıralı olarak 10 adet kontrol ve 10 adet test grubu deneyleri yürütülmüştür. Bu verilerin temel tanımlayıcı istatistikleri;

Tablo 3.2. Temel tanımlayıcı istatistikler

Metrik	Kontrol Grubu	Test Grubu
Ortalama	-0,24	24,45
Medyan	-0,36	27,08
Standart Sapma	1,16	1,96
Varyans	1,35	3,86
Min Değer	-1,55	24,69
Max Değer	1,43	30,53
IQR (Çeyrekler arası açıklık)	1,95	2,92
MAD (Medyan Mutlak Sapma)	1,11	1,22

Dağılım analizi için Normallik testi yürütülmüştür. Bunun için Shapiro-Wilk testi yapılmıştır. Buna göre;

Tablo 3.3. Normallik Testi Shapiro-Wilk

Grup	**p**
Kontrol Grubu	0,181
Test Grubu	0,418

Shapiro-Wilk testinde kontrol ve test grubu için p değerleri $p > 0,05$ olduğu için her iki grubunda normal dağılıma uyduğu görülmektedir.

Grup karşılaştırmaları olarak, T-test, Mann-Whitney U testi ve Levene testi yürütülmüştür.

Bağımsız örneklem T testine göre p değeri $4,54 \times 10^{-16}$ yani çok küçük bir değer çıkmıştır. Burada p değeri 0,05'ten çok küçük olduğu için kontrol grubu ile test grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır.

Mann-Whitney U testinde p değeri 0,00018 çıkmaktadır. $P < 0,05$ olduğundan kontrol ve test grupları birbirinden önemli derecede farklıdır. Yani iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır.

Levene testinde p değeri 0,252 çıkmaktadır. Burada $p < 0,05$ olduğundan grupların varyansları eşit kabul edilebilir.

Bu sonuçlara göre;

Test grubu, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek değerlere sahiptir.

Her iki grup da normal dağılıma uymaktadır.

Varyanslar arasında anlamlı bir fark yoktur. Yani veriler benzer değişkenliğe sahiptir.

Son olarak biyosensörlerin tekrarlanabilirliğini gösteren bir istatistik olan Göreceli Standart Sapması hesaplandı. Burada % RSD = 3,5781 olarak elde edildi.

Bu sonuca göre; aynı koşullar altında, aynı sensör ile, aynı bakterinin ölçülmesinde alınan sonuçların birbirine oldukça yakın çıktığını ifade etmektedir.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1. Tartışma

Bakteriler yaşamın her alanında bulunmakla birlikte, patojenik suşlar; izleme ve sınıflandırma işlemlerinin doğru, hızlı, kolay, uygun maliyetli ve yerinde gerçekleştirilemediği durumlarda ciddi enfeksiyonlara, salgınlara ve ölümlere yol açabilmektedir. Bu enfeksiyonların en yaygın etkeni, bağırsak florasının doğal bir üyesi olan *E. coli* bakterisidir. *E. coli* dışında *K. pneumoniae* ve *P. mirabilis* gibi patojenler de İYE'ye neden olabilmektedir. Bu bakterilerin idrar yollarına tutunma, çoğalma ve konak savunma mekanizmalarından kaçma yetenekleri, enfeksiyonun gelişiminde belirleyici rol oynamaktadır. Bu bağlamda *E. coli*'nin etkin şekilde tespiti yalnızca bireysel hasta sağlığı açısından değil, aynı zamanda toplumsal halk sağlığının korunması bakımından da büyük önem taşımaktadır. Özellikle kadınlar, erkeklere kıyasla yaklaşık altı kat daha fazla risk altındadır. Kadınların yaklaşık %50'si yaşamları boyunca en az bir kez idrar yolu enfeksiyonu (İYE) geçirmekte; bu bireylerin %30'unda nüks görülmekte ve %20'sinde ise tekrarlayan enfeksiyon atakları meydana gelmektedir. Nadiren de olsa, bu enfeksiyonlar hematüri (idrarda kan) ile kendini gösterebilmektedir. İYE'lerin en yaygın etkeni *E. coli* bakterisidir.

E. coli'nin zamanında ve doğru biçimde tespit edilememesi, tedavi sürecinin uzamasına ve enfeksiyonların yayılımının artmasına neden olabilmektedir. Günümüzde kullanılan geleneksel tanı yöntemleri; kültür (plaklama ve koloni sayımı), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA) gibi teknikleri içermektedir. Ancak bu yöntemlerin çoğu zaman alıcı olması, olası bir salgın veya biyoterörizm durumunda hızlı müdahale edilmesini engellemektedir. Erken tanı, tedavi

sürecinin etkinliği açısından kritik bir faktördür. Hastalığın başlangıç aşamasında tanılanması; komplikasyonların önlenmesi veya ertelenmesi, hastalığın şiddetinin azaltılması ve hastanın yaşam kalitesinin artırılması gibi olumlu sonuçlar doğurabilmektedir. Aynı zamanda erken tanı, tedavi maliyetlerinin azaltılmasına da katkı sağlar. Bu nedenle, hızlı, ekonomik, özgül ve hassas bir sensör aracılığıyla *E. coli* bakterisinin tespiti, mevcut tanı yöntemlerine önemli bir alternatif sunabilir.

Bu tez çalışmasına başlandığında kâğıt, grafit kalem, oje ile çok uygun maliyetli, basit, hızlı, taşınabilir, hassas, spesifik, kararlı ve doğru ölçümler elde edilen impedimetrik bir elektrokimyasal biyosensör elde edilerek yapay idrar içerisinde en az klinik tespit değerinde *E. coli* tespiti yapabilen bu biyosensörü seri üretime uygun bir hale getirmek amaçlanmıştır. Bu amaç için çalışmalar yapılırken tez çalışması geliştirilmiştir. Ve literatürde, kısa sürede yüksek hassasiyetle ölçüm yapabilen, sensör hazırlanması uzun sürmeyen, optik ve elektrokimyasal ölçüm yöntemlerine olanak sağlayabilen ve tüm bunları düşük maliyetle yapabilen bir biyosensörden hâlâ yoksun olduğu görülmüştür. Bu nedenle, yukarıda belirtilen dönüştürücü engellerini hızlı ve özgül algılama yeteneği, düşük maliyeti ve yüksek hassasiyeti ile aşmak için hibrit biyosensör üretmek amaçlanmıştır. Kâğıt tabanlı bir elektrokimyasal biyosensörü ve manyetik kuantum noktalarını (MQD'ler) yeni bir yaklaşımla birleştirmenin prosedürü çalışılmıştır. Nihai olarak elde edilen biyosensörün aşağıda yer alan dikkate değer avantajları vardır: (i) algılama sistemi 30 dakikada yüksek hassasiyetle ölçüm alabilmektedir, (ii) sensör 90 dakika içinde stok manyetik kuantum noktaları kullanılarak elde edilebilmektedir, (iii) sistem kâğıt ve kalem gibi düşük maliyetli malzemeler kullanmaktadır, (iv) sistem eş zamanlı elektrokimyasal ve optik algılama ile çoklu algılama yapabilmektedir.

Standart A4 kâğıt, grafit tozu, aseton, sıvı silikon ve oje ile çok uygun maliyetli, basit, hızlı, taşınabilir, hassas, spesifik, kararlı ve doğru ölçümler elde edilen bir biyosensör elde edildi. Fe_2O_3 manyetik kabuklu, amin gruplarıyla yüzey modifiye edilmiş CdSe/ZnS kuantum noktaları, grafit kaplı kağıt biyosensörlerin yüzeyindeki tespit noktasına tutturulmuş *E. coli* bakterilerini tespit eden antikorlar bir mıknatıs yardımıyla hareketsizleştirildi ve hem elektrokimyasal hem de optik sensör elde edildi. Bu şekilde, bir elektrokimyasal biyosensörden ve bir optik biyosensörden elde edilmesi istenen tüm avantajlar birleştirildi.

Geliştirilen hibrit biyosensör, çift modlu tespit yaklaşımı (elektrokimyasal empedans ve optik floresan ömrü), *E. coli* dışı bakterilere karşı özgüllük testi ve tekrarlanan kararlılık analizleri yoluyla doğrulandı. Bu bağımsız testler boyunca sonuçların tutarlılığı, yöntemin doğruluğunun sağlam bir şekilde doğrulanmasını sağlar. Ayrıca, sensörün hassasiyet, tespit sınırı ve özgüllük gibi performans ölçütleri daha önce bildirilen çalışmalarla uyumludur ve sonuçların geçerliliğini daha da doğrulamaktadır. Bu doğrulamalar, hibrit biyosensörün doğru *E. coli* tespiti için güvenilir bir araç olduğunu göstermektedir.

Maliyeti çok düşük ve sensör imalatı çok kolay ve hızlı olan biyosensör ile hem elektrokimyasal hem de optik ölçümler aynı anda gerçekleştirilebilmektedir. Bu, hassasiyeti ve doğruluğu artırmak için bir önlemdir. Bunun dışında çapı yaklaşık 13 nm olan nanopartiküller kullanmak, makul derecede yüksek bir aktif alana sahiptir, bakterilerle etkileşimde daha hızlı sonuçlar verir ve küçük konsantrasyonları bile tespit edebilen bir sensör oluşturur. Üretilen sensör ve MQD'ler ve yüzey modifikasyonları elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EİS) ve floresan zamanla ilişkili tek foton sayma yöntemi (TCSPC) ile doğrulanmıştır. Bu yaklaşımla, sensör üretim yöntemleri çok basittir, sensör 10 dakikada üretilir ve *E. coli*'yi tespit etmek için işlevselleştirilmiş manyetik kuantum noktaları 90 dakika içinde sensör yüzeyinde hazır hale getirilebilir. Ayrıca, *E. coli* tespiti, sensör yüzeyinde 30 dakika içinde elektrokimyasal ve optik tespit sistemleri ile yerinde ölçüm yapılmasına olanak tanır. Bu konuyla ilgili farklı çalışmalar incelenmiş ve karşılaştırmaları Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4.1. *E. coli* tespit yöntemine göre çalışmalarının karşılaştırılması [106]

Yöntem	**Sensör Hazırlama Süresi (dk.)**	**Tespit Yöntemi (Elektrokimyasal (EC)/Optik (O))**	**Tespit Limiti (CFU/mL)**	**Tespit Süresi (dk.)**	**Ref.**
3D DNA yürüyücüsü aracılığıyla çoklu amplifikasyonlu stratejisi	750	EC	7	-	[127]
İmmünosensör	180	EC	30	60	[128]
Üreaz katalizi amplifikasyon stratejisine dayalı aptasensör	120	EC	12	5	[129]
İmmünosensör	210	EC	2	2	[130]
Kişisel Glukometre (PGM) İmmünoassayı	4260	EC	$1,83 \times 10^2$	90	[131]
Enzimatik olmayan immünoassay	3600	EC	$4,5 \times 10^2$	40	[132]
Aptasensor	-	EC	10	5	[133]
pH duyarlı nanolif	-	EC	10^2	60	[134]
Sandviç tipi immünosensor	180	EC	3	120	[135]
SsDNA	180	EC	10^2	60	[136]
Aptamer	150	EC	80	30	[137]
Aptasensor	1790	EC	17	35	[138]
Aptasensor	-	EC	2	40	[139]
İmmünosensor	260	EC	4	60	[140]
Karbon Kuantum Noktası (CQD) - Etiketsiz Fluoresan	755	O	185	-	[141]
Floresan CQDs SsDNA	870	O	60	60	[142]
Bu çalışma	90	EC-O	$2,7 \times 10^2$	30	

Asemptomatik bireyler için UTI eşiği 10^5 CFU/mL ve semptomatik hastalar için 10^2 CFU/mL'dir ve yukarıdaki tablo incelendiğinde, önerilen hibrit biyosensörümüz 2,7 × 10^2 CFU/mL'lik bir tespit sınırıyla bu kadar düşük konsantrasyonları tespit etmede oldukça hassastır [9, 143, 144]. Ek olarak, biyosensörümüzün hassasiyeti, reseptörün doğru yönlendirilmesine izin veren rekombinant antikor teknolojisi [145, 146], sandviç tespit metodolojisi [147, 148] ve protein A ve protein G [107, 149] gibi yardımcı proteinler gibi yöntemlerle daha da artırılabilir.

Tabloda özetlenen çalışmalarda sensör hazırlama işlemi oldukça uzun sürmektedir. Çalışmamızda sensör 90 dakika gibi kısa bir sürede tespite hazır hale getirilmekte ve tespit sistemi iki farklı tespit platformu ile karşılıklı doğrulama yaparak ölçüm yapılmasına olanak sağlamaktadır. Çalışmamızdaki ikili ölçüm sisteminin bir diğer avantajı ise impedimetrik ölçüm ile doğru ve hassas kantitatif ölçüm yapmasıdır [150-152]. Ayrıca farklı suşlar ve bakteriler için farklı dalga boylarında yayın yapan MQD'ler belirlenebilir ve aynı anda farklı suşların ve bakterilerin tespitine olanak sağlayacak bir çözüm önerilebilir.

Bu çalışmanın yeniliği, çekirdek algılama elemanı olarak manyetik kuantum noktalarını (MQD'ler) kullanarak kâğıt tabanlı elektrokimyasal tespiti optik algılama ile birleştiren hızlı tespit süresiyle avantaj sağlayan bir hibrit biyosensörün geliştirilmesinde yatmaktadır. Literatürde yaygın olarak bildirilmeyen bu çift modlu yaklaşım, iki tamamlayıcı teknik kullanılarak eş zamanlı tespite izin vererek hem duyarlılığı hem de doğruluğu artırmaktadır. Fe_2O_3 manyetik kabuklu CdSe/ZnS kuantum noktalarından oluşan MQD'ler, etkili antikor immobilizasyonu için yüksek bir yüzey-hacim oranı ve çift manyetik/optik özellikler sağlar. Bu özellikler, hızlı sensör hazırlanmasını (90 dk.), 2,7 × 10^2 CFU/mL'lik düşük bir tespit limitini ve *E. coli*'yi diğer bakteri türlerinden ayırt etmede özgüllüğü mümkün kılar. Ayrıca, standart A4 kâğıt, kalem grafiti, grafit tozu, aseton, sıvı silikon ve oje gibi düşük maliyetli ve kolay erişilebilir malzemelerin kullanımı, bu sensörün bakım noktasındaki teşhis için pratikliğini vurgular. Bu çalışma, yüksek performanslı tespit sistemleri ile uygun maliyetli taşınabilir platformlar arasındaki boşluğu kapatarak, biyosensör teknolojilerinde önemli bir ilerlemeyi ortaya koymaktadır.

4.2. Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda birçok metodun kıyaslaması yapılarak adım adım ilerlenmiştir. İlk başlangıçta, MNP ve MQD seçimi yapılmıştır. Sonrasında MQD'lerin sensör yüzeyine ıslak veya kuru yöntemle nasıl yerleştirileceği araştırılmıştır. MQD ve kuru yöntem tercihinden sonra, kâğıt sensörün seri üretimine dair araştırmalar, tasarımlar yapılmıştır. Nihai olarak üretilen grafit sensörün yüzeyine kuru yöntemle, birtakım yüzey modifikasyonlarıyla antikor bağlanan MQD'ler, bağlanarak biyosensör elde edilmiştir. Bu biyosensöre yapay idrar (PBC) içerisinde bakteri uygulamak yerine daha gerçekçi bir senaryo gerçekleştirilerek laboratuvar ortamında kullanıma uygun toksik olarak negatif olan insan idrarı içerisinde verilen *E. coli* bakterileri uygulanarak klinik tespit değerinin altında muadillerinden çok daha kısa sürede ve çok daha az maliyetle bakteri tespiti gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda Fe_2O_3@CdSe/ZnS nanopartiküllerinden üretilen hem optik hem de manyetik özelliklere sahip kâğıt tabanlı bir elektrokimyasal biyosensör ve bir hibrit biyosensör, hızlı ve özgül tespit kabiliyeti, düşük maliyeti ve yüksek duyarlılığı nedeniyle bu tür çalışmalar için avantaj sağlayacaktır. Tasarlanan biyosensör, *E. coli* bakterisini özgül olarak tanımakta ve hızlı bir şekilde analiz etmektedir. Maliyeti oldukça düşük olan bu biyosensörün en önemli özelliklerinden biri, yerinde elektrokimyasal analiz yaparken aynı zamanda optik analiz de yapabiliyor olmasıdır. Bu çift yönlü analiz sayesinde biyosensörün analiz doğruluğu sağlanmaktadır. Biyosensör yüzeyinde kullanılan hem manyetik hem de optik özelliklere sahip malzemelerin, yüzey modifikasyonunun kolaylığı ile özgül hale gelmesi ve boyutlarının 13 nm civarında olması, daha aktif alanlar sağlamıştır. Böylece, düşük konsantrasyonlarda ($2{,}7 \times 10^2$ CFU/mL) bile, 10^3 CFU/mL ile 10^8 CFU/mL *E. coli* bakterilerinin geniş bir doğrusal dinamik aralığının hızlı tespiti (30 dk.) önemli avantajlar sağlamıştır. Her biri 10 tekrarlı olan stabilite çalışması sonucunda, sensörün bağıl standart sapma değeri (%RSD) 3,5781 olarak bulunmuştur. Bağımsız örneklem T testine göre p değeri $4{,}54 \times 10^{-16}$ yani çok küçük bir değer çıkmıştır. Mann-Whitney U testinde p değeri 0,00018 çıkmaktadır. *E. coli* bakterilerinin yüzeye özgül bağlanmasıyla manyetik kuantum noktalarının malzemelerinin ortalama ömürlerindeki değişim incelenmiştir. Yüzeye herhangi bir *E. coli* bağlanmadan önce kuantum noktalarının çıplak ömrü 8,59 ns olarak ölçülmüştür. *E. coli* konsantrasyonu

arttıkça (10^4'ten 10^7 CFU/mL'ye), kuantum noktalarının ortalama ömrü 3,37'ye düşmüştür ve %60'ın üzerinde bir ömür azalması göstermiştir.

Hızlı, hassas ve özgül algılama tabanına sahip optik olarak geliştirilmiş böyle bir elektrokimyasal sensörün kavram kanıtı gösteriminin, nanoteknoloji destekli bakteri algılama sistemleri ve biyoalgılama platformları için yeni olanaklara kapı açması beklenmektedir.

Bu çalışmanın sonuçları, optik ve elektrokimyasal tespit yöntemlerini tek bir platformda birleştirerek biyosensör teknolojisinde önemli ilerlemeler olduğunu göstermektedir. Manyetik kuantum noktaları (MQD'ler) tarafından kolaylaştırılan bu hibrit yaklaşım, literatürde bildirilen tek modlu sensörlerin sınırlamalarını ele alarak gelişmiş hassasiyet (tespit sınırı: $2,7 \times 10^2$ CFU/mL) ve özgüllük sağlar. Geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında, sensörümüz yüksek performansı korurken hazırlama ve tespit sürelerini azaltır. MQD'lerin kullanımı yalnızca sinyal yanıtlarını yükseltmekle kalmaz, aynı zamanda antikorların etkili ve kararlı bir şekilde hareketsizleştirilmesini sağlayarak karmaşık biyolojik matrislerde güvenilir tespite yol açar. Daha da önemlisi, kâğıt tabanlı tasarımın maliyet etkinliği ve taşınabilirliği, onu kaynak sınırlı ortamlar için uygun hale getirerek halk sağlığı ve çevresel izleme potansiyelini vurgular. Gelecekteki gelişmeler, kapsamlı teşhis çözümleri için çoklu tespit yeteneklerini birleştirerek bu ikili tespit yaklaşımını diğer patojenlere genişletebilir.

KAYNAKÇA

1. Dabhade, A. H., Verma, R. P., Paramasivan, B., Kumawat, A.Saha, B., 2023. Development of silver nanoparticles and aptamer conjugated biosensor for rapid detection of *E. coli* in a water sample. **3 Biotech**, **13**(7): 244.

2. Qazi, R. A., Aman, N., Ullah, N., Jamila, N.Bibi, N., 2024. Recent advancement for enhanced *E. coli* detection in electrochemical biosensors. **Microchemical Journal**, **196**: 109673.

3. Xu, M., Wang, R.,Li, Y., 2017. Electrochemical biosensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7. **Talanta**, **162**: 511-522.

4. Çelik, H., Caf, B. B.,Çebi, G., 2024. Innovative Biosensor Technologies in the Diagnosis of Urinary Tract Infections: A Comprehensive Literature Review. **Indian Journal of Microbiology**, **64**(3): 894-909.

5. Hwang, C., Lee, W.-J., Kim, S. D., Park, S.Kim, J. H., 2022. Recent advances in biosensor technologies for point-of-care urinalysis. **Biosensors**, **12**(11): 1020.

6. Aitekenov, S., Gaipov, A.,Bukasov, R., 2021. Detection and quantification of proteins in human urine. **Talanta**, **223**: 121718.

7. Çakır, A.,Acar, H., 2023. Acil serviste idrar yolu enfeksiyonu için başlanan ampirik antibiyotik ile kültür antibiyogram duyarlılığının karşılaştırılması. **Turkish Journal of Clinics and Laboratory**, **14**(2): 285-293.

8. Bilsen, M. P., Jongeneel, R. M., Schneeberger, C., Platteel, T. N., Van Nieuwkoop, C., Mody, L., Caterino, J. M., Geerlings, S. E., Köves, B.Wagenlehner, F. 2023. Definitions of urinary tract infection in current research: a systematic review. **Open forum infectious diseases.** Oxford University Press US.

9. Settu, K., Chen, C.-J., Liu, J.-T., Chen, C.-L.Tsai, J.-Z., 2015. Impedimetric method for measuring ultra-low *E. coli* concentrations in human urine. **Biosensors and Bioelectronics**, **66**: 244-250.

10. Schleifer, K. H., 2009. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. **Systematic and applied microbiology**, **32**(8): 533-542.

11. Sauer, S., Kliem, M., 2010. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. **Nature reviews microbiology**, **8**(1): 74-82.

12. Sneath, P. H., 1957. Some thoughts on bacterial classification. **Microbiology**, **17**(1): 184-200.

13. Contreras, J., Mostafapour, S., Popp, J.,Bocklitz, T., 2024. Siamese Networks for Clinically Relevant Bacteria Classification based on Raman Spectroscopy. **Molecules**, **29**(5): 1061.

14. Pebdeni, A. B., Roshani, A., Mirsadoughi, E., Behzadifar, S.Hosseini, M., 2022. Recent advances in optical biosensors for specific detection of *E. coli* bacteria in food and water. **Food Control**, **135**: 108822.

15. Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P.,Wilkins, E., 1999. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. **Biosensors and Bioelectronics**, **14**(7): 599-624.

16. Nurliyana, M., Sahdan, M., Wibowo, K., Muslihati, A., Saim, H., Ahmad, S., Sari, Y.Mansor, Z., 2018. The detection method of *Escherichia coli* in water resources: A review, *Journal of Physics: Conference Series*. **IOP Publishing**.

17. Hesari, N., Alum, A., Elzein, M.,Abbaszadegan, M., 2016. A biosensor platform for rapid detection of *E. coli* in drinking water. **Enzyme and Microbial Technology**, **83**: 22-28.

18. Federhen, S., 2012. The NCBI taxonomy database. **Nucleic acids research**, **40**(D1): D136-D143.

19. Blattner, F. R., Plunkett III, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K.Mayhew, G. F., 1997. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. **Science**, **277**(5331): 1453-1462.

20. Blount, Z. D., 2015. The unexhausted potential of E. coli. **Elife**, **4**: e05826.

21. Robins-Browne, R. M.,Hartland, E. L., 2002. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. **Journal of gastroenterology and hepatology**, **17**(4): 467-475.

22. Mayer, C., Borges, A., Flament-Simon, S.-C.,Simões, M., 2023. Quorum sensing architecture network in *Escherichia coli* virulence and pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, **47**(4): fuad031.

23. Johnson, J. R.,Russo, T. A., 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*:"the other bad E coli". **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, **139**(3): 155-162.

24. Braz, V. S., Melchior, K.,Moreira, C. G., 2020. *Escherichia coli* as a multifaceted pathogenic and versatile bacterium. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, **10**: 548492.

25. Sauer, A.,Moraru, C. I., 2009. Inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Escherichia coli* O157: H7 in apple juice and apple cider, using pulsed light treatment. **Journal of Food Protection**, **72**(5): 937-944.

26. Hezam, A. M., Yousif, M. G.,Mohammed, G. J. 2023. Detection of Auxotroph's Methionine *Proteus Mirabilis* from Different Clinical Sources. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.** IOP Publishing.

27. Sharaha, U., Abu-Aqil, G., Suleiman, M., Riesenberg, K., Lapidot, I., Huleihel, M.Salman, A., 2023. Rapid determination of *Proteus mirabilis* susceptibility to antibiotics using infrared spectroscopy in tandem with random forest. **Journal of Biophotonics**, **16**(2): e202200198.

28. Armbruster, C. E., Smith, S. N., Johnson, A. O., DeOrnellas, V., Eaton, K. A., Yep, A., Mody, L., Wu, W.Mobley, H. L., 2017. The pathogenic potential of *Proteus mirabilis* is enhanced by other uropathogens during polymicrobial urinary tract infection. **Infection and immunity**, **85**(2): 10.1128/iai. 00808-16.

29. Schaffer, J. N., Norsworthy, A. N., Sun, T.-T.,Pearson, M. M., 2016. *Proteus mirabilis* fimbriae-and urease-dependent clusters assemble in an extracellular

niche to initiate bladder stone formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **113**(16): 4494-4499.

30. Pintavirooj, C., Vongmanee, N., Sukjee, W., Sangma, C.Visitsattapongse, S., 2022. Biosensors for *Klebsiella pneumoniae* with molecularly imprinted polymer (MIP) technique. **Sensors**, **22**(12): 4638.

31. Barani, M., Fathizadeh, H., Arkaban, H., Kalantar-Neyestanaki, D., Akbarizadeh, M. R., Turki Jalil, A.Akhavan-Sigari, R., 2022. Recent advances in nanotechnology for the management of *Klebsiella pneumoniae*–related infections. **Biosensors**, **12**(12): 1155.

32. Kim, H., Jang, J. H., Jung, I. Y.,Cho, J. H., 2022. A novel peptide as a specific and selective probe for *Klebsiella pneumoniae* detection. **Biosensors**, **12**(3): 153.

33. Martin, R. M., Cao, J., Brisse, S., Passet, V., Wu, W., Zhao, L., Malani, P. N., Rao, K.Bachman, M. A., 2016. Molecular epidemiology of colonizing and infecting isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **MSphere**, **1**(5): 10.1128/msphere. 00261-16.

34. Asha, A. B., Narain, R., Nanomaterials properties, **Polymer science and nanotechnology**. 2020, Elsevier. p. 343-359.

35. Erdoğan, A., 2018. Kanser Tanı ve Tedavisinde Manyetik Nanopartikülker. **Natural and Applied Sciences Journal**, **1**(1): 23-30.

36. Farzin, A., Etesami, S. A., Quint, J., Memic, A.Tamayol, A., 2020. Magnetic nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced healthcare materials**, **9**(9): 1901058.

37. Ferreira, M., Sousa, J., Pais, A.,Vitorino, C., 2020. The role of magnetic nanoparticles in cancer nanotheranostics. **Materials**, **13**(2): 266.

38. Cheng, H. W., Tsao, H. Y., Chiang, C. S.,Chen, S. Y., 2021. Advances in magnetic nanoparticle-mediated cancer immune-theranostics. **Advanced healthcare materials**, **10**(1): 2001451.

39. Fathi Karkan, S., Mohammadhosseini, M., Panahi, Y., Milani, M., Zarghami, N., Akbarzadeh, A., Abasi, E., Hosseini, A.Davaran, S., 2017. Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis and treatment: a review. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, **45**(1): 1-5.

40. Kasap, E. N., 2016. Manyetik Nanopartikül Ve Kuantum Noktacığı Kullanarak Mikroçip Tabanlı Bakteri Tayini. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 93 s.

41. Moro, L., Turemis, M., Marini, B., Ippodrino, R.Giardi, M. T., 2017. Better together: Strategies based on magnetic particles and quantum dots for improved biosensing. **Biotechnology advances**, **35**(1): 51-63.

42. Medintz, I. L., Mattoussi, H.,Clapp, A. R., 2008. Potential clinical applications of quantum dots. **International journal of nanomedicine**, **3**(2): 151-167.

43. Chung, S., Revia, R. A.,Zhang, M., 2021. Graphene quantum dots and their applications in bioimaging, biosensing, and therapy. **Advanced Materials**, **33**(22): 1904362.

44. Sun, F., Zhang, J., Yang, Q.,Wu, W., 2021. Quantum dot biosensor combined with antibody and aptamer for tracing food-borne pathogens. **Food Quality and Safety**, **5**: fyab019.

45. Şahin, S., Ünlü, C.,Trabzon, L., 2021. Affinity biosensors developed with quantum dots in microfluidic systems. **Emergent Materials**, **4**: 187-209.

46. Pandit, C., Alajangi, H. K., Singh, J., Khajuria, A., Sharma, A., Hassan, M. S., Parida, M., Semwal, A. D., Gopalan, N.Sharma, R. K., 2022. Development of magnetic nanoparticle assisted aptamer-quantum dot based biosensor for the detection of *Escherichia coli* in water samples. **Science of The Total Environment**, **831**: 154857.

47. Ding, R., Chen, Y., Wang, Q., Wu, Z., Zhang, X., Li, B.Lin, L., 2022. Recent advances in quantum dots-based biosensors for antibiotics detection. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, **12**(3): 355-364.

48. Tüylek, Z., 2021. Biyoteknolojide Biyosensör ve Biyoçip Uygulamaları. **International Journal of Life Sciences and Biotechnology**, **4**(3): 468-490.

49. Ibekwe, A.,Grieve, C., 2003. Detection and quantification of Escherichia coli O157: H7 in environmental samples by real-time PCR. **Journal of applied microbiology**, **94**(3): 421-431.

50. Liang, T., Long, H., Zhan, Z., Zhu, Y., Kuang, P., Mo, N., Wang, Y., Cui, S.Wu, X., 2022. Simultaneous detection of viable Salmonella spp., Escherichia coli, and Staphylococcus aureus in birds nest, donkey-hide gelatin, and wolfberry using PMA with multiplex real-time quantitative PCR. **Food Science & Nutrition**, **10**(9): 3165-3174.

51. Shen, Z., Hou, N., Jin, M., Qiu, Z., Wang, J., Zhang, B., Wang, X., Wang, J., Zhou, D.Li, J., 2014. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* O157: H7 using immunomagnetic and beacon gold nanoparticles. **Gut pathogens**, **6**: 1-8.

52. Muhammad-Tahir, Z.,Alocilja, E. C., 2003. Fabrication of a disposable biosensor for *Escherichia coli* O157: H7 detection. **IEEE sensors Journal**, **3**(4): 345-351.

53. Wang, Y., Ye, Z., Si, C.,Ying, Y., 2013. Monitoring of *Escherichia coli* O157: H7 in food samples using lectin based surface plasmon resonance biosensor. **Food chemistry**, **136**(3-4): 1303-1308.

54. Yu, X., Chen, F., Wang, R.,Li, Y., 2018. Whole-bacterium SELEX of DNA aptamers for rapid detection of *E. coli* O157: H7 using a QCM sensor. **Journal of biotechnology**, **266**: 39-49.

55. Nnachi, R. C., Sui, N., Ke, B., Luo, Z., Bhalla, N., He, D.Yang, Z., 2022. Biosensors for rapid detection of bacterial pathogens in water, food and environment. **Environment international**, **166**: 107357.

56. Kayal, S., Verma, S., Appikonda, S., Dutta, G.Basu, C., 2023. Qualitative and Quantitative Assay of Coliform Bacteria in Different Water Samples & Their Role

in Sustainable Development. **A Basic Overview of Environment and Sustainable Development [Volume: 2]**: 368.

57. Soysaldı, F., 2017. Model Tükürükte Qcm Sensör İle Sentetik Genetik Materyal Tespiti. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 128s.

58. Yim, J.-H., Seo, K.-H., Chon, J.-W., Jeong, D.Song, K.-Y., 2021. Status and prospects of PCR detection methods for diagnosing pathogenic Escherichia coli: A review. **Journal of Dairy Science and Biotechnology**, **39**(2): 51-62.

59. Tabatabaei, M. S., Islam, R.,Ahmed, M., 2021. Applications of gold nanoparticles in ELISA, PCR, and immuno-PCR assays: A review. **Analytica Chimica Acta**, **1143**: 250-266.

60. Özmen, P., Polat, M., Yalap, R.,Tezcan, T., 2022. Nevşehir ilindeki hemodiyaliz hastalarinda nazal metisilin dirençli staphylococcus aureus ve koagülaz negatif stafilokok taşiyiciliğinin çeşitli yöntemlerle araştirilmasi. **ANKEM Dergisi**, **36**(1): 23-29.

61. Hosbul, T., Sahiner, F., Gumral, R., Kaya, S., Bektore, B., Tekin, K.Yildiran, S. T., 2021. Maldi-tof ms analysis of long-term stored stock candida strains identified by molecular and conventional methods/molekuler ve geleneksel yontemlerle tanimlanarak uzun sure saklanmis stok candida kokenlerinin maldi-tof ms ile analizi. **Journal of Istanbul Faculty of Medicine**, **84**(1): 113-120.

62. Tarımeri, N., 2019. Tek Kullanımlık Bir Biyosensör: Yeni Silanlama Ajanı Ve Biyosensörlerde Kullanımının İncelenmesi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale, 58 s.

63. Akgün, M., 2019. ITO Temelli Tek Kullanımlık Malzemelerin Biyosensör Teknolojilerinin Geliştirilmesinde Kullanımı Ve Kanser Erken Teşhisine Yönelik Olarak Uygulanması. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale, 66 s.

64. Antiochia, R., 2020. Nanobiosensors as new diagnostic tools for SARS, MERS and COVID-19: from past to perspectives. **Microchimica Acta**, **187**(12): 639.

65. Prabowo, B. A., Cabral, P. D., Freitas, P.,Fernandes, E., 2021. The challenges of developing biosensors for clinical assessment: A review. **Chemosensors**, **9**(11): 299.

66. Wang, Q., Ren, Z.-H., Zhao, W.-M., Wang, L., Yan, X., Zhu, A.-s., Qiu, F.-m.Zhang, K.-K., 2022. Research advances on surface plasmon resonance biosensors. **Nanoscale**, **14**(3): 564-591.

67. Sharma, A., Majdinasab, M., Khan, R., Li, Z., Hayat, A.Marty, J. L., 2021. Nanomaterials in fluorescence-based biosensors: Defining key roles. **Nano-Structures & Nano-Objects**, **27**: 100774.

68. Singh, A. K., Mittal, S., Das, M., Saharia, A.Tiwari, M., 2023. Optical biosensors: A decade in review. **Alexandria Engineering Journal**, **67**: 673-691.

69. Valkai, S., Petrovszki, D., Fáskerti, Z., Baumgärtner, M., Biczók, B., Dakos, K., Dósa, K., Kirner, B. B., Kocsis, A. E.Nagy, K., 2024. Optical interferometric device for rapid and specific detection of biological cells. **Biosensors**, **14**(9): 421.

70. Pohanka, M., 2021. Quartz crystal microbalance (QCM) sensing materials in biosensors development. **International Journal of Electrochemical Science**, **16**(12): 211220.

71. Huang, Y., Das, P. K.,Bhethanabotla, V. R., 2021. Surface acoustic waves in biosensing applications. **Sensors and Actuators Reports**, **3**: 100041.

72. Wang, J., Xu, B., Zhu, Y.,Zhao, J., 2023. Microcantilever sensors for biochemical detection. **Journal of Semiconductors**, **44**(2): 023105.

73. Brett, C. M., 2022. Electrochemical impedance spectroscopy in the characterisation and application of modified electrodes for electrochemical sensors and biosensors. **Molecules**, **27**(5): 1497.

74. Magar, H. S., Hassan, R. Y.,Mulchandani, A., 2021. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS): Principles, construction, and biosensing applications. **Sensors**, **21**(19): 6578.

75. Caratelli, V., Di Meo, E., Colozza, N., Fabiani, L., Fiore, L., Moscone, D.Arduini, F., 2022. Nanomaterials and paper-based electrochemical devices: merging strategies for fostering sustainable detection of biomarkers. **Journal of Materials Chemistry B**, **10**(44): 9021-9039.

76. Biswas, G. C., Choudhury, S., Rabbani, M. M.,Das, J., 2022. A review on potential electrochemical point-of-care tests targeting pandemic infectious disease detection: COVID-19 as a reference. **Chemosensors**, **10**(7): 269.

77. Boonkaew, S., Jang, I., Noviana, E., Siangproh, W., Chailapakul, O.Henry, C. S., 2021. Electrochemical paper-based analytical device for multiplexed, point-of-care detection of cardiovascular disease biomarkers. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **330**: 129336.

78. Cuhadaroğlu, A. D.,Kara, E., 2018. Grafit: Bir genel değerlendirme. **Teknik Bilimler Dergisi**, **8**(1): 14-33.

79. Zambrano-Intriago, L. A., Amorim, C. G., Araújo, A. N., Gritsok, D., Rodríguez-Díaz, J. M.Montenegro, M. C., 2023. Development of an inexpensive and rapidly preparable enzymatic pencil graphite biosensor for monitoring of glyphosate in waters. **Science of The Total Environment**, **855**: 158865.

80. Stozhko, N. Y., Khamzina, E. I., Bukharinova, M. A.,Tarasov, A. V., 2022. An electrochemical sensor based on carbon paper modified with graphite powder for sensitive determination of sunset yellow and tartrazine in drinks. **Sensors**, **22**(11): 4092.

81. Wang, X., Wei, Y., Zhou, H., Liu, Q.Zhu, L., 2021. Synthesis of graphene nanosheets by the electrical explosion of graphite powder confined in a tube. **Ceramics International**, **47**(15): 21934-21942.

82. Torrinha, Á., Amorim, C. G., Montenegro, M. C.,Araújo, A. N., 2018. Biosensing based on pencil graphite electrodes. **Talanta**, **190**: 235-247.

83. Samukaite-Bubniene, U., Valiūnienė, A., Bucinskas, V., Genys, P., Ratautaite, V., Ramanaviciene, A., Aksun, E., Tereshchenko, A., Zeybek, B.Ramanavicius, A., 2021. Towards supercapacitors: Cyclic voltammetry and fast Fourier transform electrochemical impedance spectroscopy based evaluation of polypyrrole electrochemically deposited on the pencil graphite electrode. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, **610**: 125750.

84. Gökçe, G., Aissa, S. B., Nemčeková, K., Catanante, G., Raouafi, N.Marty, J.-L., 2020. Aptamer-modified pencil graphite electrodes for the impedimetric determination of ochratoxin A. **Food Control**, **115**: 107271.

85. Arabali, V., Malekmohammadi, S.,Karimi, F., 2020. Surface amplification of pencil graphite electrode using CuO nanoparticle/polypyrrole nanocomposite; a powerful electrochemical strategy for determination of tramadol. **Microchemical Journal**, **158**: 105179.

86. David, I. G., Popa, D.-E.,Buleandra, M., 2017. Pencil graphite electrodes: a versatile tool in electroanalysis. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, **2017**(1): 1905968.

87. Chehreh Chelgani, S., Rudolph, M., Kratzsch, R., Sandmann, D.Gutzmer, J., 2016. A review of graphite beneficiation techniques. **Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review**, **37**(1): 58-68.

88. Karimi, A., Othman, A., Uzunoglu, A., Stanciu, L.Andreescu, S., 2015. Graphene based enzymatic bioelectrodes and biofuel cells. **Nanoscale**, **7**(16): 6909-6923.

89. Malekghasemi, S., 2015. Kâğıt-Tabanlı Biyosensör Tasarımı ve Geliştirilmesi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 103s.

90. Liu, X., Gao, X., Yang, L., Zhao, Y.Li, F., 2021. Metal–organic framework-functionalized paper-based electrochemical biosensor for ultrasensitive exosome assay. **Analytical chemistry**, **93**(34): 11792-11799.

91. Tang, R., Xie, M. Y., Li, M., Cao, L., Feng, S., Li, Z.Xu, F., 2022. Nitrocellulose membrane for paper-based biosensor. **Applied Materials Today**, **26**: 101305.

92. Huang, L., Xiao, W., Xu, T., Chen, H., Jin, Z., Zhang, Z., Song, Q.Tang, Y., 2021. Miniaturized paper-based smartphone biosensor for differential diagnosis of wild-type pseudorabies virus infection versus vaccination immunization. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **327**: 128893.

93. Cioffi, A., Mancini, M., Gioia, V.,Cinti, S., 2021. Office paper-based electrochemical strips for organophosphorus pesticide monitoring in agricultural soil. **Environmental Science & Technology**, **55**(13): 8859-8865.

94. Farshchi, F., Saadati, A., Fathi, N., Hasanzadeh, M.Samiei, M., 2021. Flexible paper-based label-free electrochemical biosensor for the monitoring of miRNA-21 using core–shell Ag@ Au/GQD nano-ink: a new platform for the accurate and rapid analysis by low cost lab-on-paper technology. **Analytical Methods**, **13**(10): 1286-1294.

95. Bouri, M., Zuaznabar-Gardona, J. C., Novell, M., Blondeau, P.Andrade, F. J., 2021. Paper-based Potentiometric Biosensor for Monitoring Galactose in Whole Blood. **Electroanalysis**, **33**(1): 81-89.

96. Ghorbanizamani, F., Moulahoum, H., Zihnioglu, F., Evran, S., Cicek, C., Sertoz, R., Arda, B., Goksel, T., Turhan, K.Timur, S., 2021. Quantitative paper-based dot blot assay for spike protein detection using fuchsine dye-loaded polymersomes. **Biosensors and Bioelectronics**, **192**: 113484.

97. Vaezi, Z., Azizi, M., Mohammadi, S. S., Hashemi, N.Naderi-Manesh, H., 2020. A novel iron quantum cluster confined in hemoglobin as fluorescent sensor for rapid detection of *Escherichia coli*. **Talanta**, **218**: 121137.

98. Wang, C., Mu, X., Huo, J., Zhang, B.Zhang, K., 2021. Highly-efficient SERS detection for *E. coli* using a microfluidic chip with integrated NaYF 4: Yb, Er@ SiO 2@ Au under near-infrared laser excitation. **Microsystem Technologies**, **27**: 3285-3291.

99. Sun, D., Fan, T., Liu, F., Wang, F., Gao, D.Lin, J.-M., 2022. A microfluidic chemiluminescence biosensor based on multiple signal amplification for rapid and sensitive detection of *E. coli* O157: H7. **Biosensors and Bioelectronics**, **212**: 114390.

100. Zeinhom, M. M. A., Wang, Y., Song, Y., Zhu, M.-J., Lin, Y.Du, D., 2018. A portable smart-phone device for rapid and sensitive detection of *E. coli* O157: H7 in Yoghurt and Egg. **Biosensors and Bioelectronics**, **99**: 479-485.

101. Cheng, N., Song, Y., Zeinhom, M. M., Chang, Y.-C., Sheng, L., Li, H., Du, D., Li, L., Zhu, M.-J.Luo, Y., 2017. Nanozyme-mediated dual immunoassay integrated with smartphone for use in simultaneous detection of pathogens. **ACS applied materials & interfaces**, **9**(46): 40671-40680.

102. Wang, S., Sun, C., Hu, Q., Li, S., Wang, C., Wang, P.Zhou, L., 2020. A homogeneous magnetic bead-based impedance immunosensor for highly sensitive detection of *Escherichia coli* O157: H7. **Biochemical Engineering Journal**, **156**: 107513.

103. Mo, X., Wu, Z., Huang, J., Zhao, G.Dou, W., 2019. A sensitive and regenerative electrochemical immunosensor for quantitative detection of *Escherichia coli* O157: H7 based on stable polyaniline coated screen-printed carbon electrode and rGO-NR-Au@ Pt. **Analytical Methods**, **11**(11): 1475-1482.

104. Castro, L. F., Silva-Neto, H. A., Sousa, L. R., de Araujo, W. R.Coltro, W. K., 2023. Silicone glue-based graphite ink incorporated on paper platform as an affordable approach to construct stable electrochemical sensors. **Talanta**, **251**: 123812.

105. Soysaldı, F.,Soylu, M. Ç., 2021. The Effect of (3-Mercaptopropyl) trimethoxysilane (MPS) Coating on the Genetic Detection Performance of Quartz Crystal

Microbalance-Dissipation (QCM-D) Biosensor: Novel Intact Double-Layered Surface Modification on QCM-D. **ChemistrySelect**, **6**(24): 6056-6062.

106. Soysaldı, F., Dincyurek Ekici, D., Soylu, M.Ç., Mutlugun, E., 2024. Electrochemical and optical multi-detection of *Escherichia coli* through magneto-optic nanoparticles: A pencil-on-paper biosensor. **Biosensors**, **14**(12): 603.

107. Icoz, K., Soylu, M. C., Canikara, Z.,Unal, E., 2018. Quartz-crystal microbalance measurements of CD19 antibody immobilization on gold surface and capturing B lymphoblast cells: effect of surface functionalization. **Electroanalysis**, **30**(5): 834-841.

108. Schrattenecker, J. D., Heer, R., Melnik, E., Maier, T., Fafilek, G.Hainberger, R., 2019. Hexaammineruthenium (II)/(III) as alternative redox-probe to Hexacyanoferrat (II)/(III) for stable impedimetric biosensing with gold electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, **127**: 25-30.

109. Karuppiah, S., Mishra, N. C., Tsai, W.-C., Liao, W.-S.Chou, C.-F., 2021. Ultrasensitive and low-cost paper-based graphene oxide nanobiosensor for monitoring water-borne bacterial contamination. **ACS sensors**, **6**(9): 3214-3223.

110. Ishankulov, A., Shamilov, R., Galyametdinov, Y. G.,Mukhamadiev, N. 2020. Modified hybrid CdSe/ZnS quantum dots and their size dependent unique characteristics. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.** IOP Publishing.

111. Mirzaei, A., Janghorban, K., Hashemi, B., Hosseini, S. R., Bonyani, M., Leonardi, S. G., Bonavita, A.Neri, G., 2016. Synthesis and characterization of mesoporous α-Fe2O3 nanoparticles and investigation of electrical properties of fabricated thick films. **Processing and Application of Ceramics**, **10**(4): 209-217.

112. Salazar, J., Amer, M.-À., Turó, A., Castro, N., Navarro, M., Soto, S., Gabasa, Y., López, Y.Chávez, J.-A., 2023. Real-time detection of the bacterial biofilm formation stages using QCM-based sensors. **Chemosensors**, **11**(1): 68.

113. Yongabi, D., Khorshid, M., Korbas, C., Losada-Pèrez, P., Givanoudi, S., Jooken, S., Ahmed Sadiq, F., Bartic, C., Wübbenhorst, M.Heyndrickx, M., 2023. QCM-D Viscoelastic and Adhesion Monitoring Facilitate Label-Free and Strain-Selective Bacterial Discrimination. **physica status solidi (a)**, **220**(22): 2300310.

114. Acet, Ö.,Odabaşı, M., 2023. Detection of N-hexanoyl-L-homoserine lactone via MIP-based QCM sensor: preparation and characterization. **Polymer Bulletin**, **80**(6): 6657-6674.

115. Eshun, G. B., Crapo, H. A., Yazgan, I., Cronmiller, L.Sadik, O. A., 2023. Sugar–lectin interactions for direct and selective detection of *Escherichia coli* bacteria using QCM biosensor. **Biosensors**, **13**(3): 337.

116. Jaradat, H., Al-Hamry, A., Ibbini, M., Fourati, N.Kanoun, O., 2023. Novel sensitive electrochemical immunosensor development for the selective detection of HopQ *H. pylori* bacteria biomarker. **Biosensors**, **13**(5): 527.

117. Buck, R. P.,Lindner, E., 1994. Recommendations for nomenclature of ionselective electrodes (IUPAC Recommendations 1994). **Pure and Applied Chemistry**, **66**(12): 2527-2536.

118. Della Corte, D., van Beek, H. L., Syberg, F., Schallmey, M., Tobola, F., Cormann, K. U., Schlicker, C., Baumann, P. T., Krumbach, K.Sokolowsky, S., 2020. Engineering and application of a biosensor with focused ligand specificity. **Nature communications**, **11**(1): 4851.

119. Cai, Y., Zhu, K., Shen, L., Ma, J., Bao, L., Chen, D., Wei, L., Wei, N., Liu, B.Wu, Y., 2022. Evolved biosensor with high sensitivity and specificity for measuring cadmium in actual environmental samples. **Environmental Science & Technology**, **56**(14): 10062-10071.

120. Islam, M. A., Karim, A., Ethiraj, B., Raihan, T.Kadier, A., 2022. Antimicrobial peptides: Promising alternatives over conventional capture ligands for biosensor-based detection of pathogenic bacteria. **Biotechnology Advances**, **55**: 107901.

121. Gopal, A., Yan, L., Kashif, S., Munshi, T., Roy, V. A., Voelcker, N. H.Chen, X., 2022. Biosensors and point-of-care devices for bacterial detection: Rapid diagnostics informing antibiotic therapy. **Advanced Healthcare Materials**, **11**(3): 2101546.

122. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A.,Wilson, G. S., 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Analytical Letters**, **34**(5): 635-659.

123. Xu, W., Wang, D., Li, D.,Liu, C. C., 2019. Recent developments of electrochemical and optical biosensors for antibody detection. **International journal of molecular sciences**, **21**(1): 134.

124. Khan, M. A.,Mujahid, M., 2020. Recent advances in electrochemical and optical biosensors designed for detection of Interleukin 6. **Sensors**, **20**(3): 646.

125. Altintas, Y., Genc, S., Talpur, M. Y.,Mutlugun, E., 2016. CdSe/ZnS quantum dot films for high performance flexible lighting and display applications. **Nanotechnology**, **27**(29): 295604.

126. Ekici, D. D.,Mutlugun, E., 2022. Superior CdSe/ZnS@ Fe2O3 Yolk-Shell Nanoparticles as Optically Active MRI Contrast Agents. **ChemistrySelect**, **7**(25): e202104323.

127. Li, Y., Liu, H., Huang, H., Deng, J., Fang, L., Luo, J., Zhang, S., Huang, J., Liang, W.Zheng, J., 2020. A sensitive electrochemical strategy via multiple amplification reactions for the detection of *E. coli* O157: H7. **Biosensors and Bioelectronics**, **147**: 111752.

128. Cimafonte, M., Fulgione, A., Gaglione, R., Papaianni, M., Capparelli, R., Arciello, A., Bolletti Censi, S., Borriello, G., Velotta, R.Della Ventura, B., 2020. Screen printed based impedimetric immunosensor for rapid detection of *Escherichia coli* in drinking water. **Sensors**, **20**(1): 274.

129. Yao, L., Wang, L., Huang, F., Cai, G., Xi, X.Lin, J., 2018. A microfluidic impedance biosensor based on immunomagnetic separation and urease catalysis for

continuous-flow detection of *E. coli* O157: H7. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **259**: 1013-1021.

130. Gupta, A., Bhardwaj, S. K., Sharma, A. L., Kim, K.-H.Deep, A., 2019. Development of an advanced electrochemical biosensing platform for *E. coli* using hybrid metal-organic framework/polyaniline composite. **Environmental research**, **171**: 395-402.

131. Ye, L., Zhao, G.,Dou, W., 2018. An electrochemical immunoassay for *Escherichia coli* O157: H7 using double functionalized Au@ Pt/SiO2 nanocomposites and immune magnetic nanoparticles. **Talanta**, **182**: 354-362.

132. Zhu, F., Zhao, G.,Dou, W., 2018. A non-enzymatic electrochemical immunoassay for quantitative detection of *Escherichia coli* O157: H7 using Au@ Pt and graphene. **Analytical biochemistry**, **559**: 34-43.

133. Das, R., Chaterjee, B., Kapil, A.,Sharma, T. K., 2020. Aptamer-NanoZyme mediated sensing platform for the rapid detection of *Escherichia coli* in fruit juice. **Sensing and Bio-Sensing Research**, **27**: 100313.

134. Shaibani, P. M., Etayash, H., Jiang, K., Sohrabi, A., Hassanpourfard, M., Naicker, S., Sadrzadeh, M.Thundat, T., 2018. Portable nanofiber-light addressable potentiometric sensor for rapid *Escherichia coli* detection in orange juice. **ACS sensors**, **3**(4): 815-822.

135. Zhong, M., Yang, L., Yang, H., Cheng, C., Deng, W., Tan, Y., Xie, Q.Yao, S., 2019. An electrochemical immunobiosensor for ultrasensitive detection of *Escherichia coli* O157: H7 using CdS quantum dots-encapsulated metal-organic frameworks as signal-amplifying tags. **Biosensors and Bioelectronics**, **126**: 493-500.

136. Zhang, J., Wang, J., Zhang, X.,He, F., 2018. Rapid detection of *Escherichia coli* based on 16S rDNA nanogap network electrochemical biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, **118**: 9-15.

137. Wang, H., Zhao, Y., Bie, S., Suo, T., Jia, G., Liu, B., Ye, R.Li, Z., 2019. Development of an electrochemical biosensor for rapid and effective detection of pathogenic *Escherichia coli* in licorice extract. **Applied Sciences**, **9**(2): 295.

138. Housaindokht, M. R., Sheikhzadeh, E., Pordeli, P., Rouhbakhsh Zaeri, Z., Janati-Fard, F., Nosrati, M., Mashreghi, M., Nakhaeipour, A., Esmaeili, A.Solimani, S., 2018. A sensitive electrochemical aptasensor based on single wall carbon nanotube modified screen printed electrode for detection of *Escherichia coli* O157: H7. **Adv. Mater. Lett**, **9**(5): 369-374.

139. Shahrokhian, S.,Ranjbar, S., 2018. Aptamer immobilization on amino-functionalized metal–organic frameworks: An ultrasensitive platform for the electrochemical diagnostic of *Escherichia coli* O157: H7. **Analyst**, **143**(13): 3191-3201.

140. Razmi, N., Hasanzadeh, M., Willander, M.,Nur, O., 2020. Recent progress on the electrochemical biosensing of *Escherichia coli* O157: H7: Material and methods overview. **Biosensors**, **10**(5): 54.

141. Bai, X., Ga, L., Du, Y.,Ai, J., 2024. Carbon quantum dot-based label-free fluorescent biosensor to detect E. coli. **IEEE Sensors Journal**.

142. Bai, X., Ga, L.,Ai, J., 2023. A fluorescent biosensor based on carbon quantum dots and single-stranded DNA for the detection of *Escherichia coli*. **Analyst**, **148**(16): 3892-3898.

143. Michael, I., Kim, D., Gulenko, O., Kumar, S., Kumar, S., Clara, J., Ki, D. Y., Park, J., Jeong, H. Y.Kim, T. S., 2020. A fidget spinner for the point-of-care diagnosis of urinary tract infection. **Nature biomedical engineering**, **4**(6): 591-600.

144. Varshney, M.,Li, Y., 2007. Interdigitated array microelectrode based impedance biosensor coupled with magnetic nanoparticle–antibody conjugates for detection of *Escherichia coli* O157: H7 in food samples. **Biosensors and Bioelectronics**, **22**(11): 2408-2414.

145. González-González, R. B., Flores-Contreras, E. A., Gonzalez-Gonzalez, E., Torres Castillo, N. E., Parra-Saldivar, R.Iqbal, H. M., 2022. Biosensor constructs for the monitoring of persistent emerging pollutants in environmental matrices. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, **62**(11): 4503-4520.

146. Huang, Y., Su, Z., Li, W.,Ren, J., 2022. Recent progresses on biosensors for *Escherichia coli* detection. **Food Analytical Methods**: 1-29.

147. Dhehibi, A., Allaoui, A., Raouafi, A., Terrak, M., Bouhaouala-Zahar, B., Hammadi, M., Raouafi, N.Salhi, I., 2023. Nanobody-based sandwich immunoassay for pathogenic *Escherichia coli* F17 strain detection. **Biosensors**, **13**(2): 299.

148. Cossettini, A., Vidic, J., Maifreni, M., Marino, M., Pinamonti, D.Manzano, M., 2022. Rapid detection of Listeria monocytogenes, *Salmonella*, *Campylobacter spp*., and *Escherichia coli* in food using biosensors. **Food Control**, **137**: 108962.

149. Kim, S. G., Kim, J., Kim, M. Y., Park, J.-M., Jose, J.Park, M., 2023. Autodisplay of streptococcal protein G for construction of an orientation-controlled immunoaffinity layer. **Analyst**, **148**(4): 742-751.

150. Štukovnik, Z.,Bren, U., 2022. Recent developments in electrochemical-impedimetric biosensors for virus detection. **International Journal of Molecular Sciences**, **23**(24): 15922.

151. Wang, Y., Ye, Z.,Ying, Y., 2012. New trends in impedimetric biosensors for the detection of foodborne pathogenic bacteria. **Sensors**, **12**(3): 3449-3471.

152. Zeng, J., Duarte, P. A., Ma, Y., Savchenko, O., Shoute, L., Khaniani, Y., Babiuk, S., Zhuo, R., Abdelrasoul, G. N.Charlton, C., 2022. An impedimetric biosensor for COVID-19 serology test and modification of sensor performance via dielectrophoresis force. **Biosensors and Bioelectronics**, **213**: 114476.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Furkan SOYSALDI
Uyruğu: Türkiye (T.C)
Doğum Tarihi ve Yeri:
Medeni Durum:
e-mail:
Yazışma Adresi:

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Ana Bilim Dalı	
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Ana Bilim Dalı	2017
Lisans	Erciyes Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü	2013
Lise	Anadolu Lisesi, Nevşehir	2009

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2017-Halen	NEVÜ – Meslek Yüksekokulu – Biyomedikal Cihaz Teknolojisi	Öğretim Görevlisi
2016-2017	Ankara Özel Koru Hastanesi	Biyomedikal Müdürü
2014-2016	Nevşehir Devlet Hastanesi	Biyomedikal Mühendisi

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1. Soylu, M. Ç., Soysaldı, F., (2017). Genetic Detection in Simulated-Saliva using MPS coated QCM sensor without DNA Isolation and Amplification. 2nd International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC 2017) (pp.195). Adana, Turkey

2. Soysaldı, F., Soylu, M. Ç. (2021). The Effect of (3-Mercaptopropyl) trimethoxysilane (MPS) Coating on the Genetic Detection Performance of Quartz Crystal Microbalance-Dissipation (QCM-D) Biosensor: Novel Intact Double-Layered Surface Modification on QCM-D. ChemistrySelect, 6(24), 6056-6062.

3. Soysaldı, F., Dincyurek Ekici, D., Soylu, M. Ç., Mutlugun, E. (2024). Electrochemical and Optical Multi-Detection of *Escherichia coli* Through Magneto-Optic Nanoparticles: A Pencil-on-Paper Biosensor. Biosensors, 14(12), 603.