

**ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜZEYSEL SULARDAKİ FOSFATIN TESPİTİ İÇİN BİYOSENSÖR TASARIMI**



**ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SALIHA GÖL**

**ARALIK 2019**

**ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜZEYSEL SULARDAKİ FOSFATIN TESPİTİ İÇİN BİYOSENSÖR TASARIMI**

**ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Saliha GÖL**

**DANIŞMAN: Prof. Dr. Şeyda KORKUT**

**ZONGULDAK**

**Aralık 2019**

**KABUL:**

Saliha GÖL tarafından hazırlanan “Yüzeysel Sulardaki Fosfatın Tespiti İçin Biyosensör Tasarımı” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir. 23/12/2019

**Danışman:** Prof. Dr. Şeyda KORKUT

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü

**Üye** : Dr. Öğr. Üyesi Muhammet Samet KILIÇ

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü

**Üye** : Dr. Öğr. Üyesi Murat SOLAK

Düzce Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü

---

**ONAY:**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. ....../....../2019



Prof. Dr. Ahmet ÖZARSLAN  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”*



Saliha GÖL

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### YÜZEYSEL SULARDAKİ FOSFATIN TESPİTİ İÇİN BİYOSENSÖR TASARIMI

Saliha GÖL

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şeyda KORKUT

Aralık 2019, 61 sayfa

Bu tez çalışması kapsamında kantitatif fosfat tayini için iletken Poli (pirol-ko-pirol-2-karboksilik asit) [Poli (Py-ko-PyCOOH)] kopolimer film kaplı altın elektrot bazlı bir fosfat biyosensörü geliştirilmiştir. Pirüvat oksidaz enzimi, kopolimerin fonksiyonel karboksil gruplarına kimyasal olarak immobilize edilmiştir. Hassas fosfat tespiti için fosfat biyosensörü çalışmalarının eksikliği olan uygulanacak potansiyel, diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak netleştirilmiştir. Biyosensörün algılama kabiliyetinin performansı, kofaktör/ kosubstrat konsantrasyonlarını, polimerik film yoğunluğunu ve pH'ı optimize ederek geliştirilmiştir. Tasarlanan biyosensör, -0.15 V'da, fosfat iyonunu 5 mM konsantrasyona kadar % 101 doğruluk ile ölçülmüştür. Art arda yapılan 7 ayrı ölçümde, ölçümler arası relatif standart sapma (RSD) değerinin % 0.07 olduğu belirlenmiştir. Biyosensörün tespit limiti (LOD) 13.3 µM ve ölçüm hassasiyeti 5.4 µA/mM.cm<sup>2</sup> olarak bulunmuştur.

Zonguldak İli Kozlu ve Üzülmöz derelerinin fosfat iyon konsantrasyonları tasarlanan biyosensörle ölçülmüştür. Sonuçlara göre biyosensör dere suyu örneklerindeki fosfat

## **ÖZET (devam ediyor)**

konsantrasyonunu % 91 doğruluk oranıyla belirleyebilmiştir. Biyosensörün, 30 günlük kullanım süresince ilk günkü sinyalinin %50'sini koruduğu anlaşılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Biyosensör, diferansiyel puls voltametri, akarsu, fosfat tespiti

**Bilim Kodu:** 615.02.01



## **ABSTRACT**

**M. Sc. Thesis**

### **BIOSENSOR DESIGN FOR DETECTION OF PHOSPHATE IN SURFACE WATER**

**Saliha GÖL**

**Zonguldak Bülent Ecevit University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Environmental Engineering**

**Thesis Advisor: Prof. Dr. Şeyda KORKUT**

**December 2019, 61 pages**

A biosensor based on conductive poly(pyrrole-co-pyrrole-2-carboxylic acid) [Poly(Py-co-PyCOOH)] copolymer film coated gold electrode was developed for the quantitative phosphate determination. Enzyme pyruvate oxidase was immobilized chemically via the functional carboxylated groups of the copolymer. The potential to be applied which is deficiency of phosphate biosensor studies for precise phosphate detection was clarified by using differential pulse voltammetry technique. Performance of the sensing ability of the biosensor was improved by optimizing cofactor/cosubstrate concentrations, polymeric film density and pH. The biosensor showed a linearity up to phosphate concentration of 5 mM, operational stability with a relative standard deviation (RSD) of 0.07 % (n=7) and accuracy of 101 % at -0.15 V (vs. Ag/AgCl). Detection limit (LOD) and sensitivity were calculated to be 13.3  $\mu\text{M}$  and 5.4  $\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ , respectively by preserving 50 % of its initial response at the end of 30 days. It's performance was tested to determine phosphate concentrations in two streams of Zonguldak City in Turkey. Accuracy of phosphate measurement in stream water was found to be 91 %.

## **ABSTRACT (continued)**

**Keywords:** Biosensor, differential pulse voltammetry, stream water, phosphate detection.

**Science Code:** 615.02.01





## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışması, tezinin hazırlanması, tezin yönlendirilmesi ve oluşumunda bilgi ve tecrübesini paylaşmaktan çekinmeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Şeyda KORKUT'a teşekkür ederim.

Tez süresince çalışmalarımı izleyerek fikir ve tecrübeleri ile beni yönlendiren Dr. Öğretim Üyesi Muhammet Samet KILIÇ'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

“Yüzeysel Sulardaki Fosfatın Tespiti İçin Biyosensör Tasarımı” adlı tez çalışmamı finanse eden 2018-77047330-3 numaralı BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri)'a teşekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL .....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
BÖLÜM 1 GİRİŞ .....	1
BÖLÜM 2 FOSFAT VE TÜRLERİ .....	3
2.1 FOSFAT KAYNAKLARI VE KULLANIM ALANLARI.....	3
2.2 FOSFATIN SULARDAKİ SINIR DEĞERLERİ .....	4
2.3 FOSFORUN ÇEVRESEL ÖNEMİ .....	6
2.3.1 Ötrofikasyon .....	7
2.4 FOSFAT ÖLÇÜMÜNDE STANDART METOTLAR.....	8
2.4.1 Ortofosfat Tayini.....	8
2.4.1.1 Gravimetrik Yöntem .....	8
2.4.1.2 Volumetrik Yöntem.....	8
2.4.1.3 Kolorimetrik Yöntem .....	8
2.4.2 Polifosfatların Tayini .....	9
2.4.3 Organik Fosfor Tayini.....	9
BÖLÜM 3 BİYOSENSÖRLER.....	11
3.1 BİYOSENSÖR ÇEŞİTLERİ .....	12
3.2 AMPEROMETRİK BİYOSENSÖRLERİN PERFORMANS KRİTERLERİ .....	14

## İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
3.2.1 Kalibrasyon Eğrisinin Doğrusallığı .....	14
3.2.2 Cevap Süresi .....	14
3.2.3 Ölçüm Hassasiyeti .....	14
3.2.4 Tespit Limiti.....	15
3.2.5 Kararlılık .....	15
3.3 ÇEVRESEL İZLEME TEKNİKLERİNDE BİYOSENSÖRLER.....	15
3.4 FOSFAT BİYOSENSÖRLERİ .....	18
BÖLÜM 4 MATERYAL METOT .....	23
4.1 KİMYASAL VE EKİPMANLAR.....	23
4.2 BİYOSENSÖR PROBUNUN HAZIRLANIŞI.....	24
4.2.1 Elektrot Temizleme Prosedürü .....	24
4.2.2 Elektrot Yüzeyinin Polimerik Filmle Kaplanması ve Enzim İmmobilizasyonu .....	24
4.3 ELEKTROKİMYASAL ÖLÇÜMLER.....	24
4.4 STANDART FOSFAT ÖLÇÜM METODU .....	26
BÖLÜM 5 BULGULAR VE TARTIŞMA .....	27
5.1 POLİ (PİROL-KO-PİROL-2-KARBOKSİLİK ASİT) FİLMİNİN KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI.....	27
5.2 VOLTAJIN BELİRLENMESİ.....	31
5.3 ÖLÇÜM ORTAMINDAKİ MADDELERİN UYGUN KONSANTRASYONLARININ BELİRLENMESİ .....	37
5.3.1 TPP Konsantrasyonu.....	37
5.3.2 FAD Konsantrasyonu.....	38
5.3.3 Magnezyum İyonu Konsantrasyonu .....	39
5.3.4 Pirüvat Konsantrasyonu .....	40
5.4 pH'IN BİYOSENSÖR SİNYALİNE ETKİSİ.....	41
5.5 OPTİMUM POLİMERİK FİLM YOĞUNLUĞUNUN BELİRLENMESİ.....	42
5.6 BİYOSENSÖR ANALİTİK PARAMETRELERİ.....	43
5.6.1 Doğrusal Ölçüm Aralığının Hesaplanması .....	44

## İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
5.6.2 Ölçüm Hassasiyetinin Hesaplanması .....	45
5.6.3 Tespit Limitinin Hesaplanması (LOD) .....	45
5.6.4 İşletme Kararlılığı .....	45
5.6.5 Ölçüm Doğruluğu .....	46
5.6.6. Depo Kararlılığının Belirlenmesi .....	47
5.7 ZONGULDAK İLİ ÜZÜLMEZ VE KOZLU DERELERİNDE FOSFAT ÖLÇÜMÜ .	47
BÖLÜM 6 SONUÇLAR.....	51
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ .....	61



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Ötrofikasyon Olayı.....	7
Şekil 3.1 Bir biyosensörün şematik gösterimi.....	11
Şekil 4.1 Elektrokimyasal ölçüm ortamı.....	25
Şekil 5.1 Altın yüzeyinde Py-COOH ve Py'nin elektrokopolimerizasyonuna ait dönüşümlü voltametri grafiği (Ag <sup>0</sup> /Ag <sup>+</sup> ). .....	27
Şekil 5.2 Poli (Py-ko-PyCOOH) film kaplı altın elektrot yüzeyinin SEM mikrografı (x20000). .....	28
Şekil 5.3 Poli (Py-ko-PyCOOH) film kaplı altın elektrot yüzeyinin SEM mikrografı (x400000). .....	29
Şekil 5.4 Poli (Py-ko-PyCOOH) film kaplı altın yüzeyde EDX analizi. ....	30
Şekil 5.5 Çalışma elektrodu yüzeyinde gerçekleşen elektrokimyasal reaksiyonlar.....	32
Şekil 5.6 375 µM ile 2000 µM arasında değişen çeşitli fosfat konsantrasyonları içeren sitrat tamponunda kaydedilen DPV grafiği.....	34
Şekil 5.7 Artan fosfat konsantrasyonlarına amperometrik cevap.....	34
Şekil 5.8 Biyosensörün 500 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve 500 µM fosfat çözeltilerinden elde edilen DPV grafikleri.....	35
Şekil 5.9 Kofaktörleri ve piruvatı içeren tampon çözeltilerde biyosensörden elde edilen DPV grafiği.....	36
Şekil 5.10 TPP konsantrasyonunun biyosensörün fosfat sinyali üzerine etkisi.....	38
Şekil 5.11 FAD konsantrasyonunun biyosensörün fosfat sinyali üzerine etkisi.....	39
Şekil 5.12 Mg <sup>+2</sup> konsantrasyonunun biyosensörün fosfat sinyali üzerine etkisi.....	40
Şekil 5.13 Pirüvat konsantrasyonunun biyosensörün fosfat sinyali üzerine etkisi.....	41
Şekil 5.14 pH'ın, biyosensörün fosfat sinyali üzerine etkisi.....	42
Şekil 5.15 Yüzeydeki film yoğunluğunun biyosensör yanıtı üzerine etkisi.....	43
Şekil 5.16 Artan fosfat konsantrasyonlarından elde edilen biyosensör sinyalleri.....	44
Şekil 5.17 Biyosensörden elde edilen fosfat kalibrasyon eğrisi.....	45
Şekil 5.18 Standart Kalay Klorür metodu ile hazırlanan fosfat kalibrasyon eğrisi.....	49





## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 İçme suyu elde edilen veya elde edilmesi planlanan yüzeysel suların kalitesine dair yönetmeliği kategorilere göre kalite standartları.....	4
Çizelge 2.2 Yerüstü su kalitesi yönetmeliği: kıta içi yerüstü su kaynaklarının genel kimyasal ve fizikokimyasal parametreler açısından sınıflarına göre kalite kriterleri. ....	4
Çizelge 2.3 Yerüstü su kalitesi yönetmeliği: göl, gölet ve baraj göllerinde trofik sınıflandırma sistemi sınır değerleri. ....	5
Çizelge 2.4 Yerüstü su kalitesi yönetmeliği: Marmara, Karadeniz, Ege ve Akdeniz kıyı suları ötrofikasyon kriterleri. ....	5
Çizelge 2.5 Gıda sanayi (büyükbaş, küçükbaş hayvan besiciliği ve tavukhaneler) alıcı ortama deşarj standartları. ....	5
Çizelge 2.6 Kimya sanayii azot ve diğer nütrientleri içeren kompoze gübre üretimi ve fosforik asit ve/veya fosfatlı kayadan fosfatlı gübre üretim tesisi alıcı ortama deşarj standartı.....	6
Çizelge 2.7 Kimya sanayii deterjan üretimi tesisi alıcı ortama deşarj standartı.....	6
Çizelge 2.8 Atıksuların atıksu altyapı tesislerine deşarjında öngörülen atıksu standartları. ....	6
Çizelge 5.1 Önceki fosfat biyosensörlerinin analitik parametreleri. ....	46



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER

mg	: Miligram
mL	: Mililitre
$\mu$ L	: Mikrolitre
$\mu$ A	: Mikroamper
mA	: Miliamper
$\mu$ M	: Mikromolar
$\mu$ m	: Mikrometre
nm	: Nanometre
nA	: Nanoamper
mM	: Milimolar
mV	: Milivolt
V	: Volt
$\emptyset$	: Çap
M	: Molar

### KISALTMALAR

<b>CDH</b>	: Sellobiyoz Dehidrojenaz
<b>CNTs</b>	: Karbon Nanotüpler
<b>CoPC-SPCE</b>	: Kobalt Ftalosiyaniyle Modifiye Ekran Baskılı Karbon Elektrot
<b>CV</b>	: Dönüşümlü Voltametri
<b>DNA</b>	: Dietilaminoetil Dextran
<b>DPV</b>	: Diferansiyel Puls Voltametri
<b>EDC</b>	: Endokrin Bozucu Kimyasal
<b>EDC</b>	: [N-(3-Dimetilaminopropil)-N-(Etilkarbodiimid hidroklorit)]
<b>EDX</b>	: Enerji Yayılımlı X Işını
<b>EPA</b>	: Çevre Koruma Kurumu

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

<b>FAD</b>	: Flavın Adenin Dinükleotid
<b>FET</b>	: Alan Etkili Transistör
<b>FIA</b>	: Akış Enjeksiyon Analizi
<b>GC</b>	: Camsı Karbon
<b>GDH</b>	: Kinoprotein Bağımlı Glikoz
<b>GLA</b>	: Gluteraldehit
<b>LC-MS</b>	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Kromatografisi
<b>LOD</b>	: Tespit Limiti
<b>MWCNT</b>	: Modifiye Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
<b>NHS</b>	: N-Hidroksisüksinimid
<b>OX-SWCNT</b>	: Okside Edilmiş Tek Duvarlı Karbon Nanotüp
<b>NHS</b>	: N-Hidroksisüksinimid
<b>PBS</b>	: Fosfat Tampon Çözeltisi
<b>PGE</b>	: Kalem Grafit Elektrot
<b>Poli (Py-ko-PyCOOH)</b>	: Poli(Pirol-ko-Pirol-2-karboksiliyasit)
<b>PPy</b>	: Polipirol
<b>Py</b>	: Pirol
<b>PyCOOH</b>	: Pirolkarboksiliyasit
<b>RGO</b>	: Azaltılmış Grafen Oksit
<b>RSD</b>	: Relatif Standart Sapma
<b>SBR</b>	: Ardışık Kesikli Reaktör
<b>SEM</b>	: Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>TBAFB</b>	: Tetrabütil Amonyum Tetrafloroborat
<b>TiN</b>	: Titanyum Nitrit
<b>TPP</b>	: Tiamin Pirofosfat
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>UV-VIS</b>	: Ultraviyole-Görünür Spektroskopi
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>WWTP</b>	: Atıksu Arıtma Tesisi

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Yeraltı suları ve yüzey sularında fosfor türevleri olan orto ve polifosfatlar yaygın olarak bulunur. Fosfat ekolojik dengeyi ve yaşam kalitesini etkileyebilecek çevresel ve klinik açıdan birçok doğal ve antropojenik kaynaktan oluşmaktadır. Su bitkileri büyümek için düşük fosfat konsantrasyonuna (0,025-0,1 mg/L) ihtiyaç duyar [1-2]. Artan fosfat konsantrasyonu göller, rezervuarlar, barajlar gibi doğal su kaynaklarında ötrofikasyona (aşırı alg üremesi) yol açar. Bu kaynakların çözünmüş oksijen konsantrasyonları, ötrofikasyon ile düşer, balık ve diğer su hayvanlarının ölümüne bağlı olarak doğal sudaki yaşam kalitesi azalır [3-4].

Atık sularda ve endüstriyel kaynaklarda bulunan fosfatlar ve diğer maddeler çevreye yayılmadan önce arıtılır ve dünyadaki bu arıtma işlemlerine milyonlarca dolar harcanır [5]. Bu nedenle, doğal suların kirlenmesini en aza indirmek ve daha sonra doğal kaynakların kalitesini korumak için fosfat konsantrasyonunun izlenmesi oldukça önemlidir.

Gravimetrik, volumetrik, kromatografik ve spektrofotometrik ölçümler gibi geleneksel ve enstrümental analitik teknikler fosfat konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılır [5]. Bu yöntemlerin toksik atık üretme, yorucu, zaman alıcı, pahalı enstrümantasyon ve uzmanlık gerektirmesi gibi dezavantajları vardır [5-6]. Ek olarak, molibden gibi kanserojen kimyasalları içeren bu teknikler sağlığı tehlikeye sokar [2].

Biyosensör, doğrudan fosfat konsantrasyonunu ölçmek için alternatif bir yöntemdir. Yüksek seçicilik, basitlik, hızlı ölçüm ve minyatürleştirme gibi avantajlar sağlar. Enzimatik bir biyosensör ile fosfat tayini, fosfatın substrat ve inhibitör olarak görev yaptığı çoklu / mono-enzimatik reaksiyonlara dayanır [7]. *Piruvat oksidaz ve maltoz fosforilaz* [8-9], *alkalin fosfataz ve glukoz oksidaz* [10], *purin nükleosit fosforilaz ve ksantin oksidaz* [11-12], *mutarotaz ve glukoz oksidaz* [13], *fosfoglukomutaz ve glikoz-6-fosfat dehidrogenaz* [14] gibi birkaç enzim çifti bu amaç için kullanılmıştır [3]. Çoklu enzim sistemlerinde, genellikle, ilk

enzimatik tepkimenin ürünü, ikincisinin substratıdır. Bu kombinasyon biyosensörün sinyal performansını düşürebilir çünkü biyokatalitik reaksiyonlar birbirine bağımlıdır ve bu reaksiyonlardan birinin etkilenmesi diğeri de etkiler. Ek olarak, çalışma ortamının her iki enzime uyacak şekilde ayarlanmasının zor olduğu söylenebilir. Bu, sistemi kararsız, karmaşık ve daha pahalı hale getirir [7]. Mono-enzim yaklaşımı fosfat biyosensörleri için daha etkili, basit ve uygun maliyetlidir [15] ve örnek bileşenlerden gelen girişimleri azaltır [16].

Bir fosfat biyosensörü, kofaktörler flavin adenin dinükleotit (FAD), tiamin pirofosfat (TPP) ve magnezyum ( $Mg^{+2}$ ) gerektiren bir tetramerik flavoenzim olan *piruvat oksidaz* enzimini immobilize ederek tasarlanabilir [17]. Ne yazık ki, fosfat anyonunun hassas ve seçici ölçümü için bir biyosensör tasarlamak hala güçtür. Enzimatik reaksiyon için gerekli olan kofaktörler ve enzimin birincil substratı olan piruvat, elektrot yüzeyinde elektroaktivite sergileyerek, fosfat ölçümünün gerçekleştirileceği voltajda üretilen sinyale girişim yapmamalıdır. Ölçüm ortamında birçok madde bulunduğundan, ortam karmaşıktır ve sonuç olarak elektrot yüzeyinde sınırlı substrat difüzyonu gözlemlenebilir. Ayrıca, amperometrik fosfat biyosensörlerinin en eksik yönlerinden biri, uygulanacak potansiyelin belirsiz olmasıdır (bu potansiyellerin neden seçildiğine açıklık getirilmeden farklı potansiyel değerlerin kullanılması). Bu durum, fosfat ölçümünün doğru olup olmadığından şüphe uyandırır. Bu çalışmada, *piruvat oksidaz* bazlı bir biyosensör, DPV tekniği kullanılarak fosfat iyonunun tespiti için bu sorunların üstesinden gelecek şekilde tasarlanmış ve performansı akarsularda test edilmiştir.

## BÖLÜM 2

### FOSFAT VE TÜRLERİ

Atom ağırlığı ve atom numarası sırasıyla 30.97 ve 15 olan fosfor, oksijene duyarlı bir elementtir. Canlı hayatı için önemli bir yapı elementidir [18]. Fosfor oksijene olan büyük ilgisinden dolayı doğada serbest halde bulunmaz, bileşikler halinde bulunur [19]. Fosfor toprağa, kayaların aşınması sonucu fosfat halinde geçer ve bitkilere ulaşır. Fosfor mikroorganizmaların gelişiminde sınırlayıcı elementtir. Mikroorganizmaların aşırı büyümesini durdurabilmek için fosforun kontrol altında olması gerekmektedir [18].

Fosfor sulu ortamda organik fosfat, polifosfat ve ortofosfat olmak üzere 3 formda bulunmaktadır. Ortofosfatlar suda  $PO_4^{3-}$  (Fosfat),  $HPO_4^{2-}$  (Hidrojen Fosfat),  $H_2PO_4^-$  (Dihidrojen Fosfat),  $H_3PO_4$  (Fosforik Asit) şeklinde bulunmaktadır. Ortofosfatlar biyolojik mikroorganizmada doğrudan kullanılabilir. Polifosfatlar ise ortofosfatlarla birlikte iki ve daha fazla oksijen, hidrojen ve fosfor atomlarıyla birleşip tek ve kompleks bir molekül oluşturabilmektedir. Polifosfatlar, ortofosfatlara sulu ortamda hidroliz ile dönüşmektedir [20].

#### 2.1 FOSFAT KAYNAKLARI VE KULLANIM ALANLARI

Fosfatın %17'si magmatik mineraller, %75'i deniz kökenli tortul yatakları ve geri kalanı da guana atıkları ve deniz kuşları gibi vb. yerlerden üretilmektedir [21]. Fosfatın birçok kullanım alanı vardır. Başlıca kullanıldığı alanlar % 90 gübre sanayii ve % 10 kimya endüstrisidir. % 90 gübre sanayii kullanımının % 60'ını süperfosfat, % 10'unu komple gübrelerin kullanılışı, % 10'unu ise fosforik asit oluşturmaktadır. Kimya endüstrisinde en fazla kullanım alanı ise deterjan ve temizlik maddelerinin yapımıdır. Bunların dışında hayvan yemlerinde katkı maddesi olarak, dişçilik maddelerinin yapımında, tekstil boyalarında, fotoğraf filmlerinde, kibrit yapımı, diş macunu ve tıraş kremi yapımında, ilaç yapımında vb. kullanılmaktadır [19]. Fosfatın kullanımı sonucu oluşan atık sular deniz, akarsu ve göl gibi yüzeysel sulara karışmaktadır. Alıcı ortama ulaşan fosforun % 9'u tarımsal faaliyetlerden, % 91'i ise endüstriyel ve evsel atık sulardan

kaynaklanmaktadır. Evsel atık sulardaki fosforun yarısı deterjan ve temizlik malzemelerinden yarısı ise diğer evsel atıklardan kaynaklanmaktadır [21].

## 2.2 FOSFATIN SULARDAKİ SINIR DEĞERLERİ

İçme suyu elde edilecek veya edilmesi planlanan sularda fosforun sınır değerleri vardır. Sınır değerler içme suyunun arıtımını yapacak tesisin arıtım kapasitesine göre değişmektedir. Bu sınır değerler Çizelge 2.1 [22] 'de verilmiştir;

**Çizelge 2.1** İçme suyu elde edilen veya elde edilmesi planlanan yüzeysel suların kalitesine dair yönetmeliği kategorilere göre kalite standartları.

EK-I: KATEGORİLERE GÖRE SU KALİTE STANDARTLARI			
	A1	A2	A3
28 Ortofosfat (mg P/L)	0.4	0.7	

- A1: basit fiziksel arıtma ve dezenfeksiyon ile içilebilir suları,
- A2: fiziksel arıtma, kimyasal arıtma ve dezenfeksiyon ile içilebilir suları,
- A3: fiziksel ve kimyasal arıtma, ileri arıtma ve dezenfeksiyon ile içilebilir suları ifade eder.

Ülkemizde yerüstü suları kimyasal ve fizikokimyasal parametreler açısından değerlendirilerek çok iyi, iyi, orta ve zayıf kalite olarak 4'e ayrılmaktadır. Bu parametreler arasında fosforun 4 farklı sınır değeri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

**Çizelge 2.2** Yerüstü su kalitesi yönetmeliği: kıta içi yerüstü su kaynaklarının genel kimyasal ve fizikokimyasal parametreler açısından sınıflarına göre kalite kriterleri.

Su Kalite Parametreleri	Su Kalite Sınıfları <sup>(a)</sup>			
	I (çok iyi)	II (iyi)	III (orta)	IV (zayıf)
Orto fosfat fosforu (mg PO <sub>4</sub> -P/L)	< 0,05	0,16	0,65	> 0,65
Toplam fosfor (mg P/L)	< 0,08	0,2	0,8	> 0,8

(a) Kalite sınıflarına göre suların kullanım maksatları:

**I. Sınıf** - Yüksek kaliteli su

**II. Sınıf** - Az kirlenmiş su

**III. Sınıf** - Kirlenmiş su

**IV. Sınıf** - Çok kirlenmiş su



Göl, gölet ve baraj gölü gibi yerlerde 4 farklı trofik sınıf vardır. Trofik seviyesini belirleyen parametrelerin başında fosfor gelmektedir. Bu nedenle fosforun konsantrasyonu ortamın trofiklik seviyesini belirlemede önemlidir. 4 farklı trofik seviyeye göre toplam fosforun olması gereken konsantrasyonları Çizelge 2.3’de verilmiştir.

**Çizelge 2.3** Yerüstü su kalitesi yönetmeliği: göl, gölet ve baraj göllerinde trofik sınıflandırma sistemi sınır değerleri.

Trofik Seviye	Toplam P ( µg/L)
Oligotrofik	< 10
Mezotrofik	10-30
Ötrofik	31-100
Hipertrofik	>100

Suyun kalite sınıfına göre denizlerdeki ötrofikasyon sınır değerleri Çizelge 2.4’de verilmiştir.

**Çizelge 2.4** Yerüstü su kalitesi yönetmeliği: Marmara, Karadeniz, Ege ve Akdeniz kıyı suları ötrofikasyon kriterleri.

Su Kalitesi Sınıfı	Marmara Kıyı Suları Toplam P ( µg/L)	Karadeniz Kıyı Suları Toplam P ( µg/L)	Ege ve Akdeniz Kıyı Suları Toplam P ( µg/L)
Oligotrofik	< 14	<8	<5
Mezotrofik	21	12	7
Ötrofik	30	16	11
Hipertrofik	>30	>16	>11

Fosfatın en çok kullanıldığı alanlar gübre sanayii, kimya endüstrisi ve hayvan yemi katkı maddesi olduğundan bu gibi üretim yapan tesislerin atık sularını alıcı ortamlara deşarj standartları vardır ve bunlar Çizelge 2.5, 2.6 ve 2.7 ‘de verilmiştir.

**Çizelge 2.5** Gıda sanayi (büyükbaş, küçükbaş hayvan besiciliği ve tavukhaneler) alıcı ortama deşarj standartları.

Parametre	Birim	Kompozit Numune 2 Saatlik	Kompozit Numune 24 Saatlik
FOSFAT FOSFORU(PO <sub>4</sub> -P)	(mg/L)	3	2

**Çizelge 2.6** Kimya sanayii azot ve diğer nütrientleri içeren kompoze gübre üretimi ve fosforik asit ve/veya fosfatlı kayadan fosfatlı gübre üretim tesisi alıcı ortama deşarj standartı.

Parametre	Birim	Anlık Numune	Kompozit Numune 2 Saatlik
FOSFAT FOSFORU (PO <sub>4</sub> -P)	(mg/L)	-	35

**Çizelge 2.7** Kimya sanayii deterjan üretimi tesisi alıcı ortama deşarj standartı.

Parametre	Birim	Kompozit Numune 2 Saatlik	Kompozit Numune 24 Saatlik
Toplam Fosfor (P)	(mg/L)	2	1

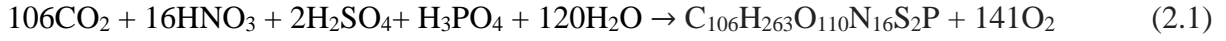
Atık suyunda fosfor içeren tesislerin bu atık suyu kanalizasyon sistemlerine deşarjında uyulması gereken sınır değerler Çizelge 2.8’de verilmiştir [23].

**Çizelge 2.8** Atıksuların atıksu altyapı tesislerine deşarjında öngörülen atıksu standartları.

Parametre	Birim	Kanalizasyon Sistemleri Tam Arıtma İle Sonuçlanan Atıksu Altyapı Tesislerinde	Kanalizasyon Sistemleri Derin Deniz Deşarjı İle Sonuçlanan Atıksu Altyapı Tesislerinde
Toplam Fosfor (P)	(mg/L)	-	10

## 2.3 FOSFORUN ÇEVRESEL ÖNEMİ

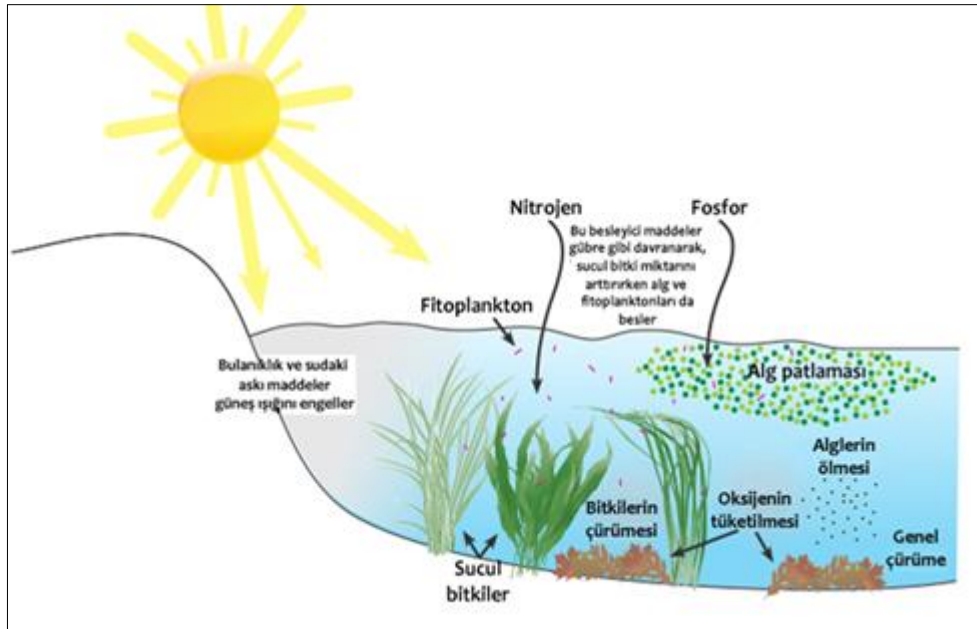
Fosfor doğada oksijene olan ilgisinden dolayı gaz halde bulunmaz. Bu nedenle atmosferde elementel fosfor bulunmamaktadır. Fosforun elektron dizilimindeki 3s ve 3p orbitallerindeki elektronların, 3d orbitaline geçebilmesi fosfora, reaktiflik ve kimyasal esneklik kazandırmaktadır. Bu özelliğinden dolayı ekosistemde farklı görev ve yapılar da bulunabilmektedir. Yaşayan tüm canlıların hava, besin ve su maddelerine mutlaka ihtiyaçları vardır. Toprakta yaşayan bitkilerinde besin maddelerine ihtiyacı vardır. Bu besin maddelerinin en önemlilerinden biri de fosfordur. Fosfor doğada, hayvan ve bitkilerin hücre ve dokularında bulunan bir elementtir, su ekosisteminde ise kimyasal ve biyokimyasal dengenin en önemli elemanlarından biridir [24]. Fosfor atmosferik karbon dioksitin organik maddeye dönüşümünde düzenleyici ve sınırlayıcıdır. Bu özelliğinden dolayı fosfor döngüsü, karbon, demir, azot ve sülfür döngüleri ile ilişkilidir. Fosfatın karbon ve oksijen ile etkileşimi sonucu gerçekleşen fotosentez reaksiyonu eşitlik 2.1’de verilmiştir [25];



$\text{C}_{106}\text{H}_{263}\text{O}_{110}\text{N}_{16}\text{S}_2\text{P}$  fotosentetik bir organizma olan alg hücresidir ve oluşumu için C/N/P oranının 106/16/1 olması gereklidir. Bu durumda alg oluşumunda fosforun sınırlayıcı olduğu açıktır.

### 2.3.1 Ötrofikasyon

Ötrofikasyon göl, akarsu ve deniz gibi herhangi bir su ekosisteminde, karalardan gelenler başta olmak üzere besin maddelerinin sucul ortamda fazla miktarda artması sonucu alg ve planktonların aşırı üremesidir. Bu aşırı üreme sonucu su ortamının yüzeyi alglerle kaplanır ve güneş ışığı su ortamına giremez. Böylece suyun oksijen emilimi azalır ve bir süre sonra sudaki çözülmüş oksijen miktarı azalır ve bunun sonucunda suda canlı hayatı tehlikeye girer [26]. Şekil 2.1'de ötrofikasyon olayının şematik gösterimi verilmiştir [27]. Fosfor su ortamına iki şekilde ulaşır. Birincisi su ortamının etrafındaki karalardan gelen ve canlı artıkları içeren topraktan, ikincisi ise insanlar tarafından su ortamına kanalizasyon, gübre ve temizlik maddelerinin boşaltılmasıyla [26].



Şekil 2.1 Ötrofikasyon Olayı.

## 2.4 FOSFAT ÖLÇÜMÜNDE STANDART METOTLAR

Sudaki toplam fosfor organik ve inorganik fosfor olmak üzere iki çeşittir. İnorganik fosfor ise ortofosfat ve polifosfat olarak ikiye ayrılır. Sulardaki organik fosfor, polifosfatlar ve ortofosfatların miktarı çeşitli tayin yöntemleri ile tespit edilmektedir. Fosfat formlarının tayini yapılırken organik ve polifosfatlar öncelikle ortofosfat haline dönüştürülür. Sonrasında ortofosfat ölçülerek tayin gerçekleştirilir [28].

### 2.4.1 Ortofosfat Tayini

Ortofosfatların tayininde gravimetrik, volumetrik ve kolorimetrik analiz gibi birçok standart tayin yöntemi vardır [29]. Bu yöntemler aşağıda özetle açıklanmıştır;

#### 2.4.1.1 Gravimetrik Yöntem

Bu yöntem suda çok fazla miktarda fosfat konsantrasyonu beklenen durumlarda kullanılır.

#### 2.4.1.2 Volumetrik Yöntem

Bu yöntem fosfat konsantrasyonunun 50 mg/L'yi aştığı durumlarda kullanılmaya uygundur. Bu kadar yüksek fosfat konsantrasyonlarına kazan suları ve çamur çürütücü üst sıvılarında rastlanır. Bunlar haricinde sık rastlanmaz. Volumetrik yöntemin esasında çökelek oluşturma, çökeleğin filtrasyonu, çökeleğin sulandırılması ve titrasyon gibi temel adımlar uygulanır [28].

#### 2.4.1.3 Kolorimetrik Yöntem

Bu yöntem, fosfat konsantrasyonunun 0.01-20 mg P/L arasında olduğu durumlarda kullanıma uygundur. 3 tane kolorimetrik metot vardır. Bunlar;

**Vanadomolibdofosforik Asit Yöntemi:** Bu yöntem 1- 20 mg P/ L aralığında iyi sonuçlar verir. Yöntemin esasında seyreltilmiş bir ortofosfat çözeltisi ile amonyum molibdat asidik koşullar altında molibdofosforik asit oluşturmak üzere reaksiyona girer. Reaksiyon sonucu oluşan ortamda vanadyum varlığında sarı renkli vanadomolibdofosforik asit oluşur. Oluşan sarı

rengin yoğunluğu fosfat konsantrasyonuyla orantılıdır. Oluşan sarı renk 490 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutulularak ortofosfat tayini tamamlanmış olur [30].

**Kalay Klorür Yöntemi:** Bu yöntem 0.01-6 mg P/ L aralığında iyi sonuçlar verir. Yöntemin esasında alınan numune öncelikle süzülür. Fosfat kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için potasyum dihidrojen fosfattan içinde 50 mg/L  $PO_4-P$  içerecek şekilde standart fosfat stoğu hazırlanır. Stoktan 50, 100, 150, 200 ve 250 mg/L olmak üzere fosfat çözeltileri hazırlanıp, bu çözeltilere karıştırma altında öncelikle fenolftalein indikatör çözeltisi damlatılır. Sonrasında karıştırma altındaki çözeltilere 4 mL amonyum molibdat ve 500  $\mu$ L kalay klorür çözeltisinden eklenerek çözeltilerde renk oluşumu sağlanır. Eklemelerden sonra 10-12 dakika arası beklenip spektrofotometrede 690 nm'de absorban değerleri okunarak kalibrasyon eğrisi çıkarılır. Çıkarılan kalibrasyon eğrisinden sonra numunenin absorban değeri ölçülür ve hazırlanmış kalibrasyondan numunenin fosfat konsantrasyonuna geçiş yapılır [30].

**Askorbik Asit Yöntemi:** Bu yöntem 0.01-6 mg P/ L aralığında iyi sonuçlar verir. Yöntemin esasında amonyum molibdat ve potasyum antimonil tartrat, asidik ortamda ortofosfat ile reaksiyona girerek askorbik asit tarafından yoğun renklendirilmiş molibden mavisine indirgenen bir heteropol asit oluşturur. Oluşan mavi renk 880 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutulularak ortofosfat tayini tamamlanmış olur [30].

#### **2.4.2 Polifosfatların Tayini**

Polifosfat tayininde, numuneye derişik sülfirik asit ilave edilir ve 90 dakika kaynatılır. Kaynama sonunda polifosfatlar ortofosfatlara dönüştürülmüş olur. Sonrasında oluşan ortofosfat herhangi bir ortofosfat tayin yöntemi ile ölçülür. Burada ölçülen toplam inorganik fosfordur. Toplam inorganik fosfordan, ortofosfatlar çıkarıldığında ise numunedeki polifosfat ölçülmüş olmaktadır [28].

#### **2.4.3 Organik Fosfor Tayini**

Fosfor organik madde ile kombine bir şekilde bulunabileceğinden toplam fosforu belirlemek için organik maddeyi parçalamak gerekmektedir. Organik maddenin parçalanmasını sağlayan 3 yöntem vardır. Bunlar; perklorik asit, nitrik asit-sülfirik asit ve persülfat oksidasyon tekniğidir. Bunlardan perklorik asit tekniği en sert ve zaman alıcı yöntemdir. Yalnızca

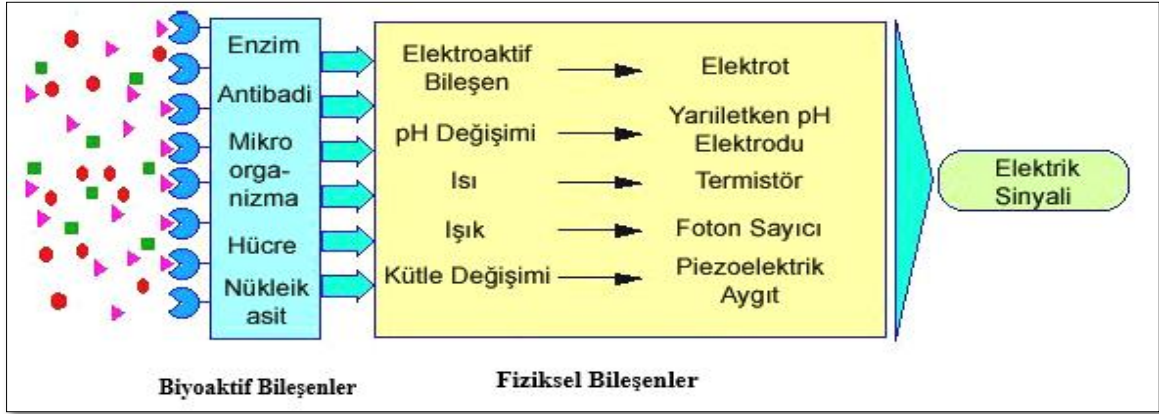
sedimanlar gibi zor örnekler için kullanılır. Çoğu örnek için nitrik asit-sülfirik asit tekniği önerilmektedir. Şimdiye kadar kullanılan en basit yöntem ise persülfat oksidasyon tekniğidir [30].Organik maddenin parçalanma işlemi bittikten sonra açığa çıkan ortofosfatların tayininde, ortofosfat için kullanılan herhangi bir ölçüm yöntemi kullanılabilir. Burada bulunan değer toplam fosforu vereceğinden, bu değerden inorganik fosforlar çıktığında geriye sadece organik fosfor miktarı kalmaktadır [28].

Fosfatın geleneksel yöntemlerle tayininin bazı dezavantajları vardır. Bunlar; geleneksel yöntemlerin maliyetli oluşu, toksik kimyasalların kullanımı, ön arıtım ve hazırlık sürelerinin uzun olması, analizlerin uzun zaman alması gibi dezavantajlardır [29]. Bu sıkıntıların önüne geçmek, hızlı, güvenilir ve hassas ölçümler yapabilmek için biyosensörler geliştirilmekte ve bu analitik cihazlar sayesinde yerinde ve sürekli izleme de sağlanabilmektedir.

## BÖLÜM 3

### BIYOSENSÖRLER

Biyosensörler ölçümü yapılacak bileşen (analit) ile bir biyoaktif bileşen arasındaki etkileşimin dönüştürücüler vasıtasıyla elektrik sinyaline dönüştürüldüğü ve oluşan bu elektrik sinyalinin bir ölçüm sistemi aracılığıyla analit konsantrasyonu cinsinden ifade edildiği cihazlardır [31]. Biyosensörler biyoaktif bileşen, fiziksel bileşen ve ölçüm sistemi olmak üzere 3 kısımdan oluşur. Biyosensörlerde biyoaktif bileşen olarak enzimler, mikroorganizmalar, hücre ve doku kesitleri, reseptörler, lipidler, hücre organelleri, nükleik asitler ve antikolar kullanılabilir [32]. Biyosensörlerde fiziksel bileşenler, analizi yapılacak olan analit ile biyoaktif bileşen arasındaki etkileşim sonucu meydana gelen değişime bağlı olarak elde edilmek istenen sinyalin türüne göre elektrokimyasal, kütle, ısı ve optik olmak üzere sınıflandırılabilirler. Şekil 3.1’de bir biyosensörün şematik olarak gösterimi verilmiştir [33];



Şekil 3.1 Bir biyosensörün şematik gösterimi.

Biyosensör teknolojisi 1950 yılının ortalarında L.C. Clark'ın bir ameliyat esnasında kanın oksijen gazı miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlamıştır. Clark ve Lyons 1962 yılında, *glukoz oksidaz* enzimini bir oksijen elektrodu ile birleştirerek kanın glukoz düzeyini ölçmüşlerdir [34]. İlk ticari biyosensör ise Spring Instruments tarafından 1975 yılında piyasaya sürülmüştür [35].

Biyosensörler tıp, çevre kirliliği, savunma sanayi, tarım, eczacılık, gıda ve birçok endüstriyel alanda önemli rol oynar. Bugüne kadar farklı maddeler için hazırlanmış 180'den fazla biyosensör çalışması vardır ancak bunların sadece 25 kadarı ticari olarak üretilmiştir [36].

### 3.1 BİYOSENSÖR ÇEŞİTLERİ

Biyosensörler dönüştürücünün cinsine bağlı olarak;

- ❖ Optik Biyosensörler
- ❖ Kalorimetrik Biyosensörler
- ❖ Piezoelektrik Biyosensörler
- ❖ Elektrokimyasal Biyosensörler

olmak üzere 4 sınıfa ayrılır [37].

Optik biyosensörler, analizi yapılacak madde ile biyolojik tanı materyali arasındaki etkileşim sonucu açığa çıkan türlerin lüminesans, yansıma, UV-VIS (Ultraviyole-Görünür Spektroskopisi) absorpsiyonu, floresans/fosforesans ve ışık saçılması gibi metodlarla ölçülmesini sağlar [38].

Kalorimetrik biyosensörler, analizi yapılacak madde ile biyolojik tanı materyali arasındaki biyokimyasal reaksiyon sonucu oluşan ısı değişiminin ölçümüne dayanır [37]. Piezoelektrik biyosensörlerde, biyolojik tanı materyali bir piezoelektrik kristali yüzeyine immobilize edilir ve analizi yapılacak madde ile etkileşimi sonucu kristalde meydana gelen titreşimin ölçülmesi ile tayin yapılır [38].

Elektrokimyasal biyosensörler, analizi yapılacak madde ile biyolojik tanı materyali arasındaki biyoetkileşim esnasında üretilen veya salınan elektron gibi elektrokimyasal türlerin meydana getirdiği sinyalin ölçülmesi esasına dayanırlar. Elektrokimyasal biyosensörler;

- ❖ Potansiyometrik Biyosensörler
- ❖ Kondüktometrik Biyosensörler
- ❖ Amperometrik Biyosensörler

olmak üzere 3'e ayrılır [37].



Potansiyometrik biyosensörler, bir çalışma elektrodu ve bir referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas alırlar. Tespit edilen elektrot potansiyeli direk olarak analit konsantrasyonunu tanımlamaktadır. Bu tip biyosensörlerin ölçüm hassasiyetinin düşük olması ve cihazdan kaynaklanan sinyallerin alınması gibi problemleri vardır [39].

Kondüktometrik biyosensörler, biyolojik tanıma olayı ile iletkenlik arasındaki ilişkiyi kullanarak biyokimyasal reaksiyon sonucunda çözeltide veya ortamda açığa çıkan iyonik türlerin konsantrasyonundaki değişim ile oluşan elektriksel iletkenlikteki azalma veya artmayı tayin etmekte kullanılmaktadırlar. Burada ölçülen parametre tayini yapılacak çözeltilerin elektriksel direncidir [40].

Amperometrik biyosensörler, genel olarak belirli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçülmesini esas almaktadır. Bu tip biyosensörlerde ikili veya üçlü elektrot sistemleri kullanılmaktadır. İki elektrotlu sistemler referans ve çalışma elektrotlarından oluşmaktadır. Üç elektrotlu sistem ise referans, karşıt ve çalışma elektrotlarından oluşmaktadır. Bu tip sensörlerde tayini yapılacak analitin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak sinyal elde edilmektedir. Bu tip enzim elektrotlarında enzimatik tepkimenin ürünü veya substrat elektrot yüzeyinde indirgenbilir veya yükseltgenbilir olmalıdır [35]. Amperometrik sensörler referans elektrot ile çalışma elektrodu arasında denge potansiyelinden farklı potansiyel verildiğinde, ortamda meydana gelen akım değişikliğinin çalışma elektrodunda indirgenen veya yükseltgenen türlerin konsantrasyonunda gerçekleşen değişime dayanmaktadır. Bu yükseltgenen veya indirgenen maddeler anyon, kation ve yüksüz bir bileşik olabilmektedir [33]. Bu türlerin indirgenmesi ve yükseltgenmesi çalışma elektrodu yüzeyinde gerçekleşmektedir [41].

Amperometrik biyosensörlerde biyolojik tanı materyali olarak yaygınca enzimler kullanılmaktadır. Örneğin, bir enzimatik reaksiyon sırasında tüketilen oksijen ve üretilen hidrojen peroksit değişimleri takip edilerek konsantrasyonu tespit edilecek maddenin tayini yapılabilmektedir [33].

## **3.2 AMPEROMETRİK BİYOSENSÖRLERİN PERFORMANS KRİTERLERİ**

### **3.2.1 Kalibrasyon Eğrisinin Doğrusallığı**

Ölçüm ortamına artan konsantrasyonda analit eklemeleri yapılarak elde edilen akımlar konsantrasyona karşı grafiğe geçirilir. Konsantrasyon arttıkça enzimin aktivitesinin azalması, ölçüm ortamının stabilitesinin bozulması ve elektrot yüzeyinin bazı radikallerle dolması gibi nedenlerden dolayı bir süre sonra elde edilen akımlar azalır ve ilaveler devam ettikçe bir süre sonra akım değişimi gözlenmez. Ölçümlerin doğru yapılabilmesi için akım değişimlerinin doğrusallık gösterdiği doğrusal aralığı tespit etmek gerekmektedir. Biyosensörler için doğru ölçüm aralığı tespit edilen bu doğrusal aralıktır. Biyosensör için yapılacak analitik hesaplamalar tespit edilen bu doğrusal aralıkta yapılır. Doğrusal aralığın geniş olması biyosensör için avantajdır [31].

### **3.2.2 Cevap Süresi**

Cevap süresi, analizi yapılacak maddenin ölçüm yapılacak ortama eklendiği andan itibaren ölçüm sonucunun okunduğu zamana kadar geçen süre olarak tanımlanmaktadır. Biyosensörlerin hızla yaygınlaşmasının nedenlerinden biri de kısa bir zaman içerisinde sonuç verebilmesi olmuştur. Cevap süresi genellikle birkaç saniye ile dakika arasında değişmektedir. Cevap süresi 5 dakikaya kadar olan süreler kabul edilirken, on dakika gibi süreler uzun sayılmaktadır [34].

### **3.2.3 Ölçüm Hassasiyeti**

Hassasiyet, biyosensörden elde edilen kalibrasyon eğrisinin eğimi olarak tanımlanmaktadır. Kalibrasyon eğrisinin eğimi sinyal değişimi/analit konsantrasyonudur. Eğim arttıkça hassasiyette de artış gözlenir. Sensörün büyük olması ve ölçüm ortamına kimyasal türlerin aktarım hızı gibi nedenler hassasiyeti etkileyebilmektedirler [42].

### 3.2.4 Tespit Limiti

Tespit limiti, biyosensörün sinyal verebildiği en düşük konsantrasyon değeridir [41]. Tespit limiti belirlenirken analitin ortamdaki konsantrasyonu ve girişim yapabilecek maddelerin olup olmadığı önemlidir. Ayrıca pH ve sıcaklık gibi parametrelerde tespit limitini değiştirebilmektedir [43].

### 3.2.5 Kararlılık

Kararlılık; enzim elektrodunun diğer tüm parametrelerde gerekli şartlar sağlandıktan sonra pratik bir şekilde kullanılabilirliğinin bir göstergesidir. Kararlılık, biyosensörün ömrüyle ilgili bilgi verir. Biyosensörlerin ömrü, çalışma koşullarına ve saklanma koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Hibrit yapıları nedeniyle enzim biyosensörlerinin kararlılığını, hem enzim kararlılığı hem de sensör kararlılığına bakılarak değerlendirmek gerekmektedir. Enzim kararlılığına bakılırken enzimin fiziksel dayanıklılığı, saflığı, kaynağı ve immobilize edilirken kullanılan polimerin fiziksel veya kimyasal karakterli oluşuna bakılmalıdır. Ayrıca ortamın oksijen derişimi, pH, nem ve ısı gibi özellikleri de enzimin kararlılığını etkilemektedir. Enzimin saflık düzeyi arttıkça doğal ortamından uzaklaştığı için kararlılığında azalma olmaktadır. Enzim immobilizasyonunda kimyasal yöntemlerin kullanılmasının fiziksel yöntemlere göre sensörün ömrünü uzattığı belirtilmiştir [40].

## 3.3 ÇEVRESEL İZLEME TEKNİKLERİNDE BİYOSENSÖRLER

Çevresel parametrelerin standart metotlar ile tayininde yaşanan sıkıntılardan dolayı biyosensörler tercih edilmeye başlanmıştır. Bu kısımda fosfat dışında fenol, nitrit, nitrat, EDC (Endokrin Bozucu Kimyasal)'ler gibi parametrelerin biyosensör ile ölçüm çalışmaları irdelenmiştir;

Karim ve arkadaşları, yaptığı çalışmada altın nanopartikül ile modifiye edilmiş ekran baskılı karbon elektrotları üzerinde *tirozinazın* kovalent immobilizasyonuna dayalı amperometrik fenol biyosensörü tasarlamışlardır. Fenol tespiti için *tirozinaz* tabanlı biyosensörün elektrokatalitik cevapları, hem dönüşümlü voltametri (CV) hem de kare dalga voltametri kullanılarak ölçülmüştür. Elektrot yüzeyinde hareketsiz hale getirilen *tirozinaz* miktarı ve sıcaklık, pH gibi parametreler fenolün tespiti için optimize edilmiştir. Tasarlanan

biyosensörün doğrusal ölçüm aralığı 47 ppb-15 ppm, LOD'si 47 ppb ve hassasiyeti 15.7  $\mu\text{A/ppm}$ 'dir [44].

Çevik ve arkadaşları yaptığı çalışmada fenol türevlerinin belirlenmesi için bir amperometrik fenol biyosensörü tasarlamıştır. Trimetoksisilil terminal grubuna sahip poli (glisidil metakrilat) telomeri, glisidil metakrilatın telomerizasyonu ile sentezlenmiş ve demir oksit nanoparçacıkları, enzim immobilizasyon platformunu elde etmek için poli (glisidil metakrilat) telomeri ile kaplanmıştır. Demir oksit katkılanmış poli (glisidil metakrilat) film altın elektrot yüzeyine *horseradish peroksidaz* enziminin immobilizasyonu yapılmıştır. Fenol konsantrasyonu pH değeri 7.5 olan fosfat tamponunda -0.5 V'luk (Ag/AgCl) sabit bir potansiyelde, substrat konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak ölçülmüştür. Fenolün tespiti için tasarlanan biyosensörün doğrusal ölçüm aralığı 0.5-15 mM arasında, LOD'si 0.5 mM ve hassasiyeti  $0.42 \mu\text{A/mM.cm}^2$  olarak bulunmuştur [45].

Dempsey ve arkadaşları yaptığı çalışmada endokrin bozucu türevlerin tespiti için poli (tiyoin) içine hapsolmuş *tirozinaz* bazlı bir biyosensör geliştirmişlerdir. Tasarlanan biyosensör bir dizi sentetik östrojen ve fenolik bileşik kullanılarak test edilmiştir. Geliştirilen sensörün endokrin bozucu faktörler için doğrusal ölçüm aralığı 0.08-0.8 mM ve LOD'si 1-23  $\mu\text{M}$  arasında değişmektedir [46].

Boussema ve arkadaşları yaptığı çalışmada nitrit iyonlarının indirgenmesinde katalizör olarak Polioksometalatı  $[\text{PMo}_{11}\text{O}_{39}]^{7-}$  sentezleyip kullanmışlardır.  $\text{PMo}_{11}$  olarak belirtilen bu mono-lacunary keggin anyonu, elektron transferlerini geliştirmek için camı karbon (GC) elektrotları üzerinde ya okside edilmiş tek duvarlı karbon nanotüplerin (ox-SWCNT'ler) ya da azaltılmış grafen oksidin (rGO) bir matrisi içinde sınırlandırılmıştır. Beş farklı dizilim, CV tekniği kullanılarak karakterize edilmiş ve farklı bileşenlerin miktarının optimize edildiği nitrit tespiti için amperometrik sensör kurulumunda değerlendirilmiştir. Çalışma elektrodu üzerinde sadece ox-SWCNT'ler ve  $\text{PMo}_{11}$  kullanılarak yapılan çalışmada  $44.41 \text{ mA/L.mol'e}$  kadar iyi bir hassasiyet ve tatmin edici bir tekrarlanabilirlik (RSD: dört özdeş elektrot için %2,64) gösterilmiştir. Ayrıca tasarlanan biyosensör,  $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  ile  $1.6 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$  arasında doğrusal ölçüm aralığına ve  $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  sahiptir [47].

Nistor ve arkadaşları yaptığı çalışmada *sellobiyoz dehidrojenaz* (CDH) ve *kinoprotein bağımlı glikoz dehidrojenaz* (GDH) enzimlerine dayalı iki amperometrik biyosensörü, atık su arıtma

sürecinin farklı aşamalarında toplanan ve böylece iki atık su arıtma tesisinin (WWTP) farklı temizlik seviyelerini temsil eden su numunelerindeki fenolik içeriğin izlenmesi için tasarlanmıştır. Biyosensör ölçümleri sahada yapılmış, sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS) ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Potansiyel olarak etkileşime giren birkaç bileşiğin, sensör tepkisi üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Çalışmanın genel amacı olarak, biyosensörlerin potansiyel kullanımını fenol analizi için nicel araçlar olarak değil, belli bir eğilimi gösteren tarama araçları olarak, yani mevcut veya mevcut olmayan bileşikleri ve numunenin toksisitesi ile potansiyel etkileşimin değerlendirilmesi belirtilmiştir. Çalışmadan biyosensörler ve LC-MS sonuçlarının nicel olarak karşılaştırılabilir olmadığı, ancak her iki sensörden de sulardaki fenol konsantrasyonunun düşüşünün takip edilebildiği bulunmuştur [48].

Xuejiang ve arkadaşları yaptığı çalışmada sudaki nitratın tayini için oldukça hassas, hızlı ve kararlı bir enzim biyosensörü tasarlamışlardır. Biyosensör elektrodu glutaraldehit ile çapraz bağlanarak *aspergillus niger*'den elde edilen *nitrat redüktaz* enzimi ve metil viologen ile modifiye edilmiştir. Enzim elektrotunun imalatı için işlem parametreleri ve pH gibi çeşitli deneysel değişkenler, glutaraldehit buharında enzim yükleme ve immobilizasyon süresi, hassasiyet, tespit limiti, dinamik aralık, işletme ve depolama kararlılığı üzerindeki etkileri bakımından incelenmiştir. Tasarlanan sensör 0.005 mM nitrat tespit limiti ile 0.02 ve 0.25 mM aralığında doğrusal ölçüm aralığına sahiptir. 4 °C'de 5 mM fosfat tamponunda (pH 7,5) depolandığında, sensör 2 hafta boyunca iyi bir kararlılık göstermiştir [49].

Can ve arkadaşları yaptığı çalışmada Polipirol (PPy) / Karbon nanotüpleri (CNTs) filmine dayanan bir amperometrik nitrat biyosensörünün yapısı ve karakterizasyonunu açıklamışlardır. *Nitrat redüktaz* hem sentezlenen polipirol filmine hapsedilmiş hem de karbon nanotüplerin karboksil grupları vasıtasıyla CNT/PPy film elektroduna kimyasal olarak immobilize edilmiştir. Nitrat için optimum amperometrik yanıt, 0.1 M fosfat tampon çözeltisi (PBS), 0.1 M lityum klorür içeren pH 7.5 ve 0.13 V (vs. Ag/AgCl, 3 M NaCl) uygulama potansiyeli olan 7 mM potasyum ferrisiyanür içinde elde edilmiştir. Ölçüm hassasiyeti, 0.97'lik bir regresyon katsayısı ile 300 nA/mM ve doğrusal ölçüm aralığı 0.44–1.45 mM'lik olarak bulunmuştur. Tasarlanan biyosensörün RSD'si (n=7) % 5.4 ve LOD'si 0.17 mM'dır [50].

Haldorai ve arkadaşları yaptığı çalışmada titanyum nitrid (TiN) nanoparçacıkları ile modifiye edilmiş çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT'ler) nanokompozit olarak iki aşamalı bir işlemle üretilmiştir. Bu iki aşama, MWCNT yüzeyine titanyum dioksit nanoparçacıklarının kaplanmasını ve ardından termal nitridasyonu içermiştir. Nitrit algılaması için camsı bir karbon elektrodu üzerinde modifiye edilen MWCNT'ler-TiN kompozitine sabitlenen sitokrom c'nin doğrudan elektrokimyası ve elektrokatalizi araştırılmıştır. Tasarlanan biyosensörün, hassasiyeti  $121,5 \mu\text{A}/\mu\text{M}\cdot\text{cm}^2$ , LOD'si  $0,0014 \mu\text{M}$  ve doğrusal ölçüm aralığı  $1 \mu\text{M}$  ile  $2000 \mu\text{M}$  arasındadır [51].

Dağcı ve arkadaşları yaptığı çalışmada Pironin Y'nin kalem grafit elektrot (PGE) üzerinde elektropolimerizasyonunu, potansiyodinamik ve potansiyostatik teknikler kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. Elektrooksidasyon potansiyelinin, pH'ın ve monomer çözeltisinin konsantrasyonunun, polimerik film yapısı üzerindeki etkisini de incelemişlerdir. Hazırlanan Poli (Pironin Y)/ PGE'nin elektrokatalitik özellikleri nitritin amperometrik tespiti için incelenmiştir. Tasarlanan sensörün LOD'si  $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  ve doğrusal ölçüm aralığı  $1 \cdot 10^{-6}$  ile  $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  arasındadır. Tasarlanan sensör ile gıda numunelerindeki nitrit konsantrasyonu test edilmiş ve standart spektrofotometrik yöntemler ile tutarlılık sağladığı raporlanmıştır [52].

### 3.4 FOSFAT BİYOSENSÖRLERİ

Fosfat ve türevlerinin tayini için geliştirilen amperometrik biyosensörlerde en çok tercih edilen enzim *pirüvat oksidaz* enzimidir. Fosfatın tayini için bu biyosensörlerde kesikli ve sürekli ölçüm sistemi olmak üzere iki tip ölçüm sistemi kullanılmaktadır. Bu bölümde enzim kullanılarak tasarlanmış fosfat biyosensörü ile yapılan fosfat tayin çalışmaları özetlenmiştir;

Gavalas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gözenekli iletken karbon elektrot yüzeyine enzim stabilize edici polielektrolit olarak dietilaminoetil-dextran veya DNA kullanılmıştır. DNA polielektroliti üzerine *pirüvat oksidaz* enzimi immobilize edilmiştir. Enzim bağlı bu çalışma elektrodu fosfatın tayininde kullanılmıştır. Fosfat için doğrusal ölçüm aralığı  $0.05-1.25 \text{ mM}$ , ölçüm hassasiyeti  $10.3 \mu\text{A}/\text{mM}$  ve LOD'si  $4.8 \mu\text{M}$ 'dir [15].

Gilbert ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada su ve idrar analizi için bir fosfat biyosensörü tasarlanmıştır. Çalışma elektrodu kobalt ftalosiyoninle modifiye edilmiş ekran baskılı karbon elektrodudur. *Pirüvat oksidaz* enzimi bu çalışma elektroduna selüloz asetat / selüloz nitrat

membranları ve çapraz bağlama ajanı, gluteraldehit (GLA) kullanılarak immobilize edilmiştir. Enzim bağlı bu çalışma elektrodu fosfatın tespitinde kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmada biyosensörün doğrusal ölçüm aralığı 2.5-130  $\mu\text{M}$  ve LOD'si 2  $\mu\text{M}$ 'dır [29].

Kwan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan tükürüğünün fosfat konsantrasyonunu belirlemek için bir amperometrik biyosensör tasarlanmıştır. Biyosensör, ekran baskılı bir elektrot üzerinde *piruvat oksidazın* immobilize edilmesiyle oluşturulmuştur. Sensör, numune eklendikten sonra 2 sn içinde yanıt vermektedir. Tasarlanan biyosensörün doğrusal ölçüm aralığı 7.5-625  $\mu\text{M}$  ve LOD'si 3.6  $\mu\text{M}$ 'dır [53].

Ogabiela ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada potansiyometrik bir fosfat biyosensörü tasarlanmıştır. Çalışma elektrodu olarak platin elektrot kullanılmış olup *pirüvat oksidaz* enziminin immobilizasyonu için polipirol film kullanılmıştır. Tasarlanan biyosensörün doğrusal ölçüm aralığı 15-400  $\mu\text{M}$  ve LOD'si 3  $\mu\text{M}$ 'dır [6].

Rahman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bir amperometrik fosfat biyosensörü tasarlanmıştır. *Pirüvat oksidaz* enzimi poli (tertiyofen-3-karboksilik asit) kaplı camı karbon elektrot üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Enzim bağlanmış bu çalışma elektrodu insan serumundaki fosfat konsantrasyonunun tayininde kullanılmıştır. Fosfat iyonunun tespiti için tasarlanan biyosensörün doğrusal ölçüm aralığı 1.0  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$  ve LOD'si 0.3  $\mu\text{M}$ 'dır [4].

Ikebukuro ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada fosfatın tespiti için oldukça hassas bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Bu biyosensör sistemi *piruvat oksidaz* reaksiyonuna ve ardından bir luminol kemilüminesans reaksiyonuna dayanmaktadır. *Piruvat oksidazın* ürettiği hidrojen peroksit, immobilize edilmiş bir peroksidaz tarafından katalize edilen luminol ile reaksiyona girmektedir. Elde edilen kemilüminesans, bir fotomultiplier tarafından tespit edilmektedir. Bu sistem, ölçüm için yaklaşık 3 dakika süren hızlı fosfat tayini ile sonuçlanan bir sürekli akış enjeksiyon sistemini kullanmaktadır. Tasarlanan sensörün LOD'si 74 nM iken, 0.37-7.4  $\mu\text{M}$  arasında bir doğrusal ölçüm aralığı göstermektedir. Bu duyarlılık, Japonya'nın doğal sularının izin verilen maksimum fosfat konsantrasyonunu belirlemek için yeterli olmaktadır [54].

Ogabiela ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada fosfatın tespiti için *pirüvat oksidaz* enzimi yüksek dereceli altın nano teller dizisi entegrasyonuna dayanan bir ultra hassas fosfat amperometrik nano biyosensörü tasarlanmıştır. *Pirüvat oksidaz* ve kofaktörlerinin, sığır serum albümini ve glutaraldehit (GLA) ile çapraz bağlanma yoluyla altın nanoteller üzerine başarılı bir şekilde entegrasyonu, CV ve amperometri ile sağlanmıştır. Tasarlanan nano biyosensör, 12.5-1000  $\mu\text{M}$  arasında doğrusal ölçüm aralığına, 0.1  $\mu\text{M}$ 'lık LOD'ye ve 140.3  $\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$  hassasiyete sahiptir [55].

Cui ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada fosfatın tespiti için Pt/Au alaşım nano tel dizilimlerine dayalı elektrokimyasal bir biyosensör tasarlanmıştır. *Piruvat oksidaz*, çapraz bağlama yaklaşımı ile kofaktörlerle birlikte nanotelin yüzeyine immobilize edilmiştir. Tasarlanan fosfat biyosensörü 248-1456  $\mu\text{M}$  arasında doğrusal ölçüm aralığına ve 50.5  $\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$  hassasiyete sahiptir. Biyosensörün, fosfat tespiti uygulamalarında iyi bir seçicilik ve stabilite sergilediği belirtilmiştir [3].

Mousty ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada fosfatın tespiti için üçlü enzim sistemi kullanılmıştır. Bu enzim sistemi inorganik bir laponit kil içine hapsolmuş bir *maltoz fosforilaz*, *mutarotaz* ve *glikoz oksidaz* karışımından oluşmaktadır. Biyosensörlerin fosfat ve glikoz ilavelerine tepkisi, enzimatik olarak üretilen hidrojen peroksitin elektrot yüzeyinde 0.6 V'da (Ag/AgCl) oksitlenmesiyle ölçülmüştür. Biyosensörün fosfat tespiti için biyoelektrokimyasal tepkisi, enzimlerin kil karışımındaki her bir enzimin miktarından kuvvetli bir şekilde etkilenmiştir. Biyosensörün optimum pH'ı 6.5 ve sıcaklığı 40 °C'dir. Bu optimum koşullar altında, fosfat hassasiyeti ve doğrusal ölçüm aralığı sırasıyla 52.4  $\text{mA}/\text{M}\cdot\text{cm}^2$  ve 1 - 50  $\mu\text{M}$ 'dir [13].

Gajovic ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada oksijensiz numunelerde piruvat ve fosfat tayini için redoks polimer ile modifiye edilmiş, çok katmanlı bir amperometrik fosfat biyosensörü geliştirilmiştir. Kullanılan enzim *pirüvat oksidaz* enzimi olup kullanılan elektrot cam karbon elektrodudur. Tasarlanan amperometrik biyosensörün doğrusal ölçüm aralığı, LOD ve hassasiyeti sırasıyla 0.02-0.3 mM, 20  $\mu\text{M}$  ve 5  $\mu\text{A}/\text{mM}$ 'dir [56].

Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada üç katmanlı *maltoz fosforilaz* kompozit filmlere dayanan bir kondüktometrik fosfat biyosensörü geliştirilmiştir. Tasarlanan biyosensör



su örneklerinde fosfatın tayini için kullanılmıştır. Tasarlanan biyosensörün doğrusal ölçüm aralığı 1-20  $\mu\text{M}$  ve LOD ise 1  $\mu\text{M}$ 'dır [7].

Lawal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada potansiyometrik bir fosfat biyosensörü tasarlanmıştır. Enzim olarak *purin nükleosid fosforilaz* ve *ksantin oksidaz* kullanılmıştır. Enzim immobilizasyonu için polipirol kullanılmıştır. Tasarlanan sensörün doğrusal ölçüm aralığı 5-25  $\mu\text{M}$  ve LOD'si ise 1  $\mu\text{M}$ 'dır [57].

Bu çalışmaların yanı sıra fosfat tayini için Akış Enjeksiyon Analizi (FIA) kullanılmıştır. Tahıl örneklerinde ortofosfat, fitat ve toplam fosfor tayini için enzimatik hidroliz ile akış enjeksiyonlu spektrofotometrik bir prosedür geliştirilmiştir. Fitat, bir enzimatik reaktöre paketlenip katı bir faza bağlanmış enzim *fitaz* ile hidrolize edilmiş ve elde edilen hidrolize ortofosfat 650 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür. [58]. Bu sistemde, spektrofotometrik fosfat tespiti yüksek sıcaklık ve ayrıca hidroliz aşaması gerektirmiştir. Serumdaki inorganik fosfatın saptanmasında akış enjeksiyon analizine dayalı otomatik bir yöntem kullanılmıştır [59]. Bu sistem çoklu enzim immobilizasyonuna dayanmaktadır.

Başka bir raporda, ardışık kesikli reaktör (SBR) sisteminde fosfatın izlenmesi için hidrojellere immobilize edilmiş *piruvat oksidaz* bazlı, kalın film tabanlı bir biyosensör geliştirilmiştir. Sensörün stabilitesini ve tekrar üretilebilirliğini izlemek için bir FIA sistemi kullanılmıştır. 280 adet fosfat ölçümü yapılmış, 250 ölçümden sonra elde edilen sinyallerin gücü yarı yarıya azalmıştır [60]. FIA sistemlerde kofaktörlerin birbirine karışması, kabarcıkların oluşmasıyla analizin bloklanması gibi durumların yaşanması söz konusudur ve bu durumlar biyosensörlerde ciddi analitik hatalara yol açmaktadır [16].



## BÖLÜM 4

### MATERYAL METOT

#### 4.1 KİMYASAL VE EKİPMANLAR

Deneyisel çalışmada kullanılan kimyasallardan, *Piruvat oksidaz*, *Aerococcus sp.* (liyofilize toz,  $\geq 35$  U/mg protein), sodyum hidroksit (NaOH), pirol-2-karboksilik asit (Py-COOH, 99%), pirol (Py, 98%), [N-(3-Dimetilaminopropil)-N-(Etilkarbodiimid hidroklorit)](EDC), N-Hidroksisüksinimid (NHS), lityum perklorat (LiClO<sub>4</sub>, 99%), magnezyum klorür hekza hidrat (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O,  $\geq 99\%$ ), sodyum pirüvat (CH<sub>3</sub>COCOONa,  $\geq 99\%$ ), flavin adenin dinükleotit disodyum tuzu (FAD,  $\geq 95\%$ ), hidroklorik asit (HCl, 36.5-38%) ve potasyum hidroksit (KOH,  $\geq 85\%$ ) Sigma-Aldrich'dan, sitrik asit monohidrat, sülfirik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, %25), tetrabütülamonyum tetrafloroborat (TBAFB), asetonitril ( $\geq 99\%$  GC grade), disodyum hidrojen fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  $\geq 99.0\%$ ), amonyum molibdat ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O), potasyum dihidrojen fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), gliserol ve kalay klorür Merck'ten, fenolftalein indikatörü HACH firmasından, tiamin pirofosfat klorür (TPP,  $> 98\%$ ) Tokyo Kimya Endüstrisi'nden (TCI) temin edilmiştir.

Deneylerde kullanılan ekipmanlardan CHI1040B marka potansiyostat, cam hücreler, altın çalışma elektrodu ( $\varnothing=2$  mm), platin karşıt elektrodu, Ag<sup>0</sup>/Ag<sup>+</sup> susuz referans elektrot, Ag/AgCl referans elektrot ve elektrot temizleme kitleri CH Instruments firmasından temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan UV-spektrofotometre Shimadzu UV-1800, otomatik mikropipetler eppendorf marka, manyetik karıştırıcı DragonLab MS-H-S, hassas tartı cihazı Denver Instrument, pH metre Inolab pH 7110, ultra saf su cihazı Milipore Direct-Q 3 UV markadır.

## 4.2 BİYOSENSÖR PROBUNUN HAZIRLANIŞI

### 4.2.1 Elektrot Temizleme Prosedürü

Altın çalışma elektrodu 1, 0.3 ve 0.05 mikron boyutlarındaki alüminyum tozları ile zımparalandıktan sonra ultra saf su ile yıkanmıştır. Sonrasında %25'lik hidrojen peroksit ve 50 mM potasyum hidroksit 10 mL ultra saf suda karıştırılarak çözülmüştür. Zımparalardan geçirilmiş altın elektrot, hazırlanan çözelti içinde 10 dakika bekletilmiş [61] ve daha sonra ultra saf su ile yıkanmıştır. 50 mM potasyum hidroksit 10 mL saf su içinde karıştırılarak çözülmüş ve platin çubuk, sulu referans elektrot (Ag/AgCl) ve çalışma elektrodu cam hücre içine yerleştirilmiş ve çalışma elektrodunun temizliği için -0.2 V ile -1.2 V arasında 50 mV/s tarama hızında 2 dakika CV tekniğiyle temizleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında ultra saf sudan geçirilip elektrodun temizliği tamamlanmıştır.

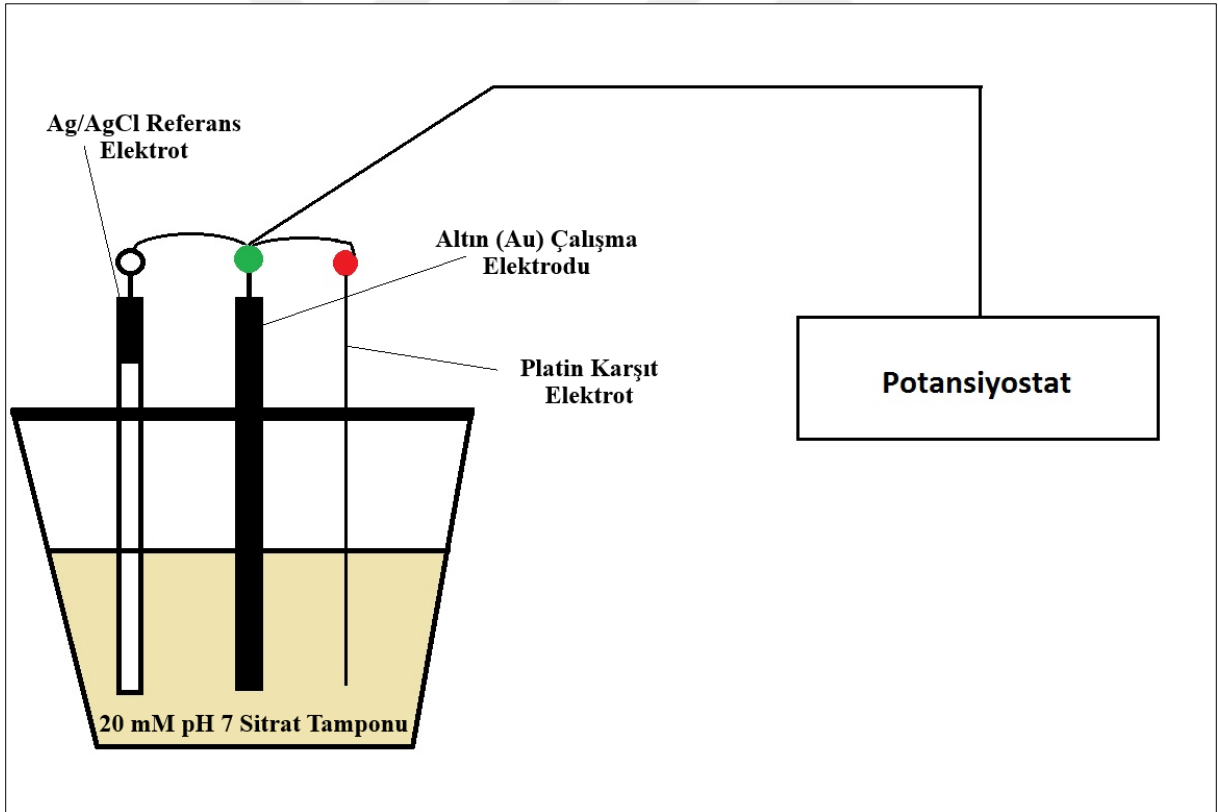
### 4.2.2 Elektrot Yüzeyinin Polimerik Filmle Kaplanması ve Enzim İmmobilizasyonu

Çalışma elektrotu kaplaması yapılırken 10 mM pirol-2-karboksilik asit, 5 mM pirol ve 20 mM TBAFB 10 mL asetonitril içinde karıştırılarak çözülmüştür. Altın çalışma elektrotu, platin karşıt elektrot ve susuz referans elektrot ( $Ag^0/Ag^+$ ) hazırlanan polimer çözeltisinin içerisine daldırılmıştır. CV tekniğiyle 100 mV/s tarama hızında -0.5 V ile +1 V arasında 20 döngülük bir elektropolimerizasyon sürecinde [Poli(Py-ko-PyCOOH)] kaplaması tamamlanmıştır. Kaplanan elektrot ultra saf sudan geçirilip, 5 mL ultra saf suda hazırlanmış 15 mM EDC ve 300 mM NHS, çözeltisinin içerisinde 3 saat 100 rpm'lik karıştırma altında bekletilmiştir. Yapılan bu işlem polimerin karboksilik gruplarını aktifleştirmek içindir. Sonrasında elektrot, sitrat tamponu ile yıkanıp enzim çözeltisinde 1 gece buzdolabında (+4°C) bekletilerek polimerin karboksilik grupları üzerinden kimyasal olarak enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Enzim çözeltisinden çıkarılan çalışma elektrodu, bağlanamamış enzimlerin yıkanması için ultra saf sudan geçirilmiştir.

## 4.3 ELEKTROKİMYASAL ÖLÇÜMLER

Hazırlanan biyosensör probu 0.7 mg/mL lityum perklorat ( $LiClO_4$ ), 1 mM  $Mg^{+2}$ , 0.5 mM pirüvat, 5  $\mu$ M FAD, 50  $\mu$ M TPP içeren pH 7, 20 mM sitrat tamponununun 10 mL'sine artan konsantrasyonlarda fosfat iyonu eklenerek hazırlanmış fosfat numunelerine daldırılarak

işletilmiştir. Her bir numuneyi içeren 10 mL cam hücreye üç dakika boyunca saf oksijen ilavesi yapılmıştır. Sonrasında enzim bağlanmış altın çalışma elektrodu, sulu referans elektrot (Ag/AgCl) ve platin karşıt elektrot cam hücre içine yerleştirilmiştir. Artan konsantrasyonlarda fosfat içeren tüm numunelerde DPV tekniğiyle fosfat ölçümleri yapılmıştır. DPV koşulları, 0.002 V'luk voltaj artışı, 0.1 V amplitüd, 0.02 s numune genişliği, 0.06 s puls genişliği, -1V/+1V potansiyel aralığı ve 0.75 sn'lik puls süresi şeklinde ayarlanmıştır. Ölçümlerde gerçekleşen reaksiyonlar sonucu açığa çıkan hidrojen peroksit, uygun voltajla birlikte elektrot yüzeyinde oksidasyona uğrayarak, sistemde elektronlar açığa çıkmıştır. Açığa çıkan elektronlar, karşıt elektrot tarafından sayılarak potansiyostat tarafından akım değerlerine dönüştürülmüştür. Fosfat konsantrasyonuna karşın ölçülen akım değerleri ile kalibrasyon eğrisi hazırlanmış ve bu eğri konsantrasyonu bilinmeyen numune örneklerinde fosfat konsantrasyonunun belirlenebilmesi için kullanılmıştır. Elektrokimyasal ölçüm ortamı Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Elektrokimyasal ölçüm ortamı.

#### 4.4 STANDART FOSFAT ÖLÇÜM METODU

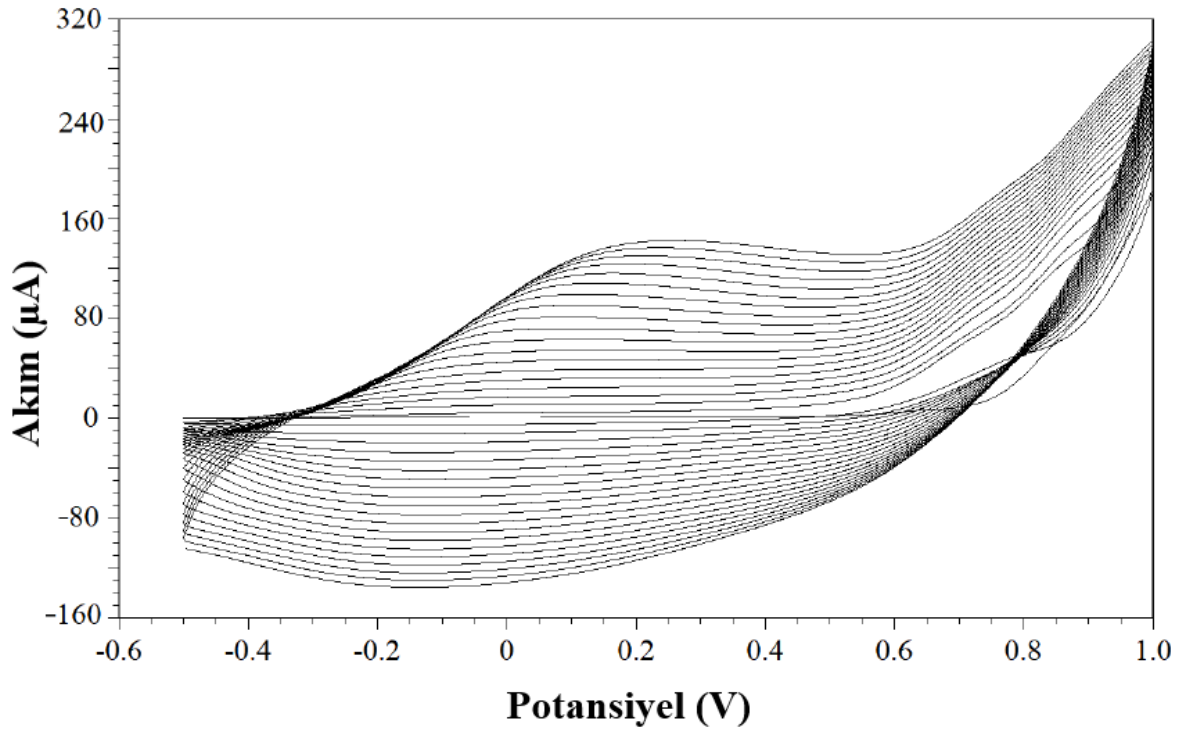
Yüzeysel su numunelerinin fosfat konsantrasyonunu biyosensör sonucu ile karşılaştırabilmek amacıyla standart metot olan Kalay Klorür yöntemiyle fosfat ölçümü yapılmıştır [30]. Kalay Klorür yönteminde öncelikle dere den alınan numuneler 0.45 µm whatman filtre içeren askıda katı madde seti ile süzölmüştür. Standart metot ile fosfat kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için potasyum dihidrojen fosfattan içinde 50 mg/L PO<sub>4</sub>-P içerecek şekilde standart fosfat stoğu hazırlanmıştır. Stoktan 50, 100, 150, 200 ve 250 mg/L olmak üzere fosfat çözeltileri hazırlanıp, bu çözeltilere karıştırma altında öncelikle fenolftalein indikatör çözeltisi damlatılmıştır. Sonrasında karıştırma altındaki çözeltiye 4 mL amonyum molibdat ve 500 µL kalay klorür çözeltilisinden eklenerek çözeltide renk oluşumu sağlanmıştır. Eklemelerden sonra 10-12 dakika arası beklenip spektrofotometrede 690 nm'de absorbans değeri okunarak kalibrasyon eğrisi çıkarılmıştır. Sonrasında içerisinde fosfat konsantrasyonu bilinmeyen süzölmüş dere suyu numunelerini kalibrasyon için yapılan aynı aşamalardan geçirek, numunelerin 690 nm'de spektrofotometrede absorbansları okunmuş ve kalibrasyon grafiğinde yerine konularak gerçek fosfat konsantrasyonları belirlenmiştir.

## BÖLÜM 5

### BULGULAR VE TARTIŞMA

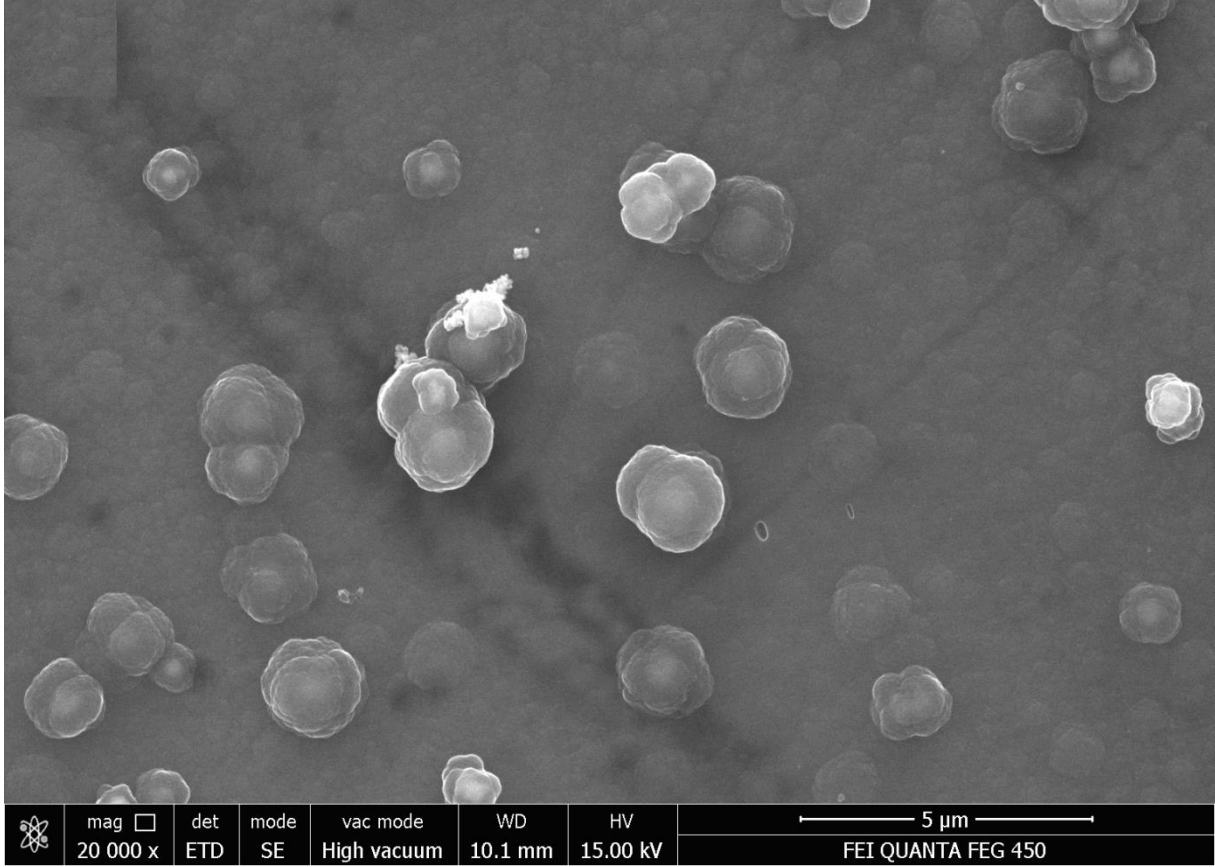
#### 5.1 POLİ (PİROL-KO-PİROL-2-KARBOKSİLİK ASİT) FİLMİNİN KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI

Poli (pirol-ko-pirol-2-karboksilik asit) kopolimerik filminin elektropolimerizasyonu “Elektrot Yüzeyinin Polimerik Filmle Kaplanması ve Enzim İmmobilizasyonu” bölümünde verilen prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Py-COOH monomerinin Py monomer ile kopolimerizasyonu, Şekil 5.1'de sunulan 20 döngülü CV ile açıkça gözlenmiştir. Asetonitrilde PyCOOH polimerizasyonunun tipik voltammogramı elde edilmiştir [62]. Döngü sayısının artmasıyla yüksek amper seviyesinde kademeli olarak artan akım yoğunluğu, altın yüzeyinde kopolimerik filmin başarıyla sentezlendiğini göstermiştir.



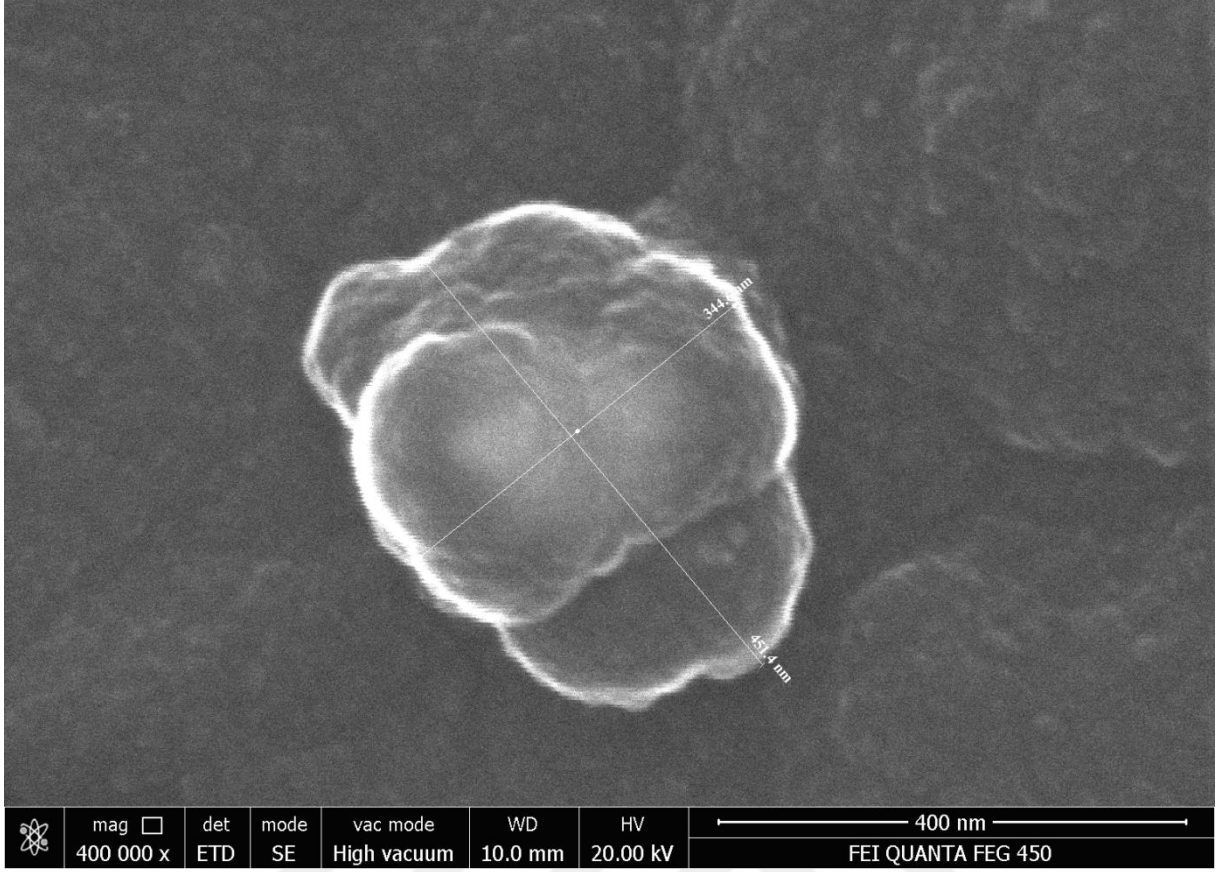
Şekil 5.1 Altın yüzeyinde Py-COOH ve Py'nin elektrokopolimerizasyonuna ait dönüşümlü voltametri grafiği ( $Ag^0/Ag^+$ ).

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü ve Quanta FEG 450 model cihazla alınan Poli (Py-ko-PyCOOH) film kaplı elektrodun enerji yayımlı X-ışını (EDX) karakterizasyonu, Şekil 5.2, 5.3 ve 5.4'de sunulmuştur.

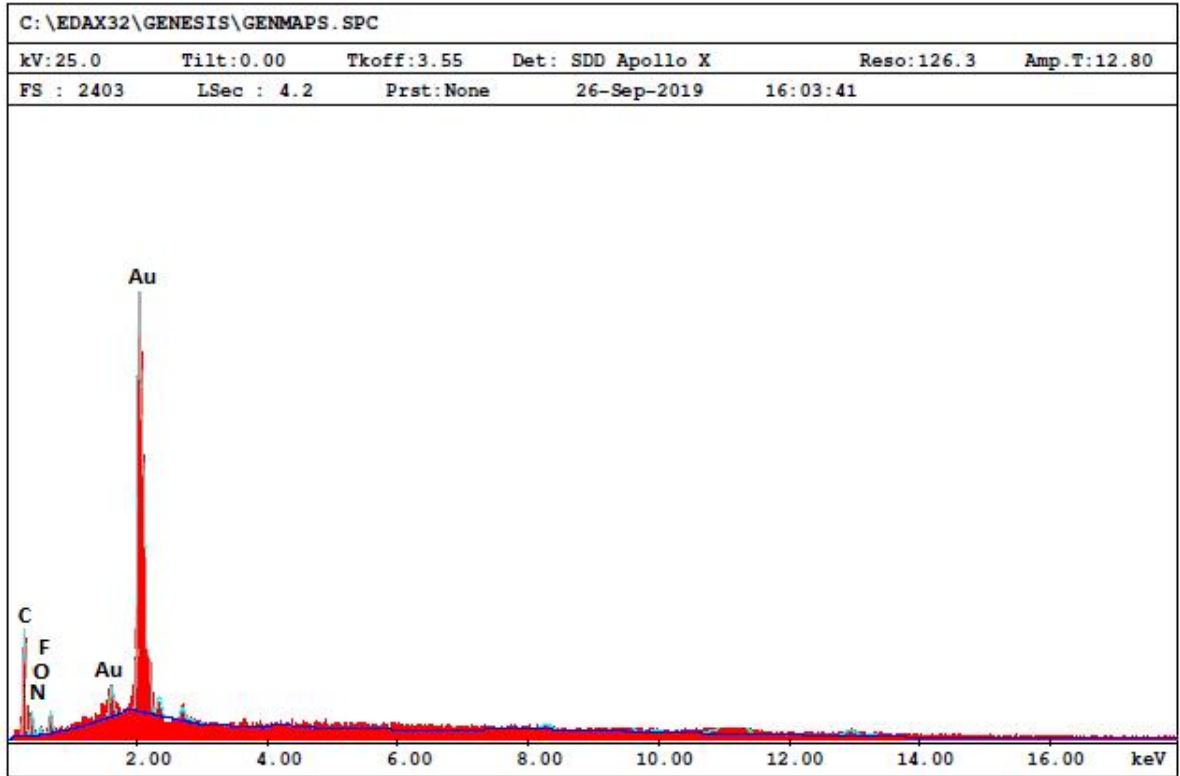
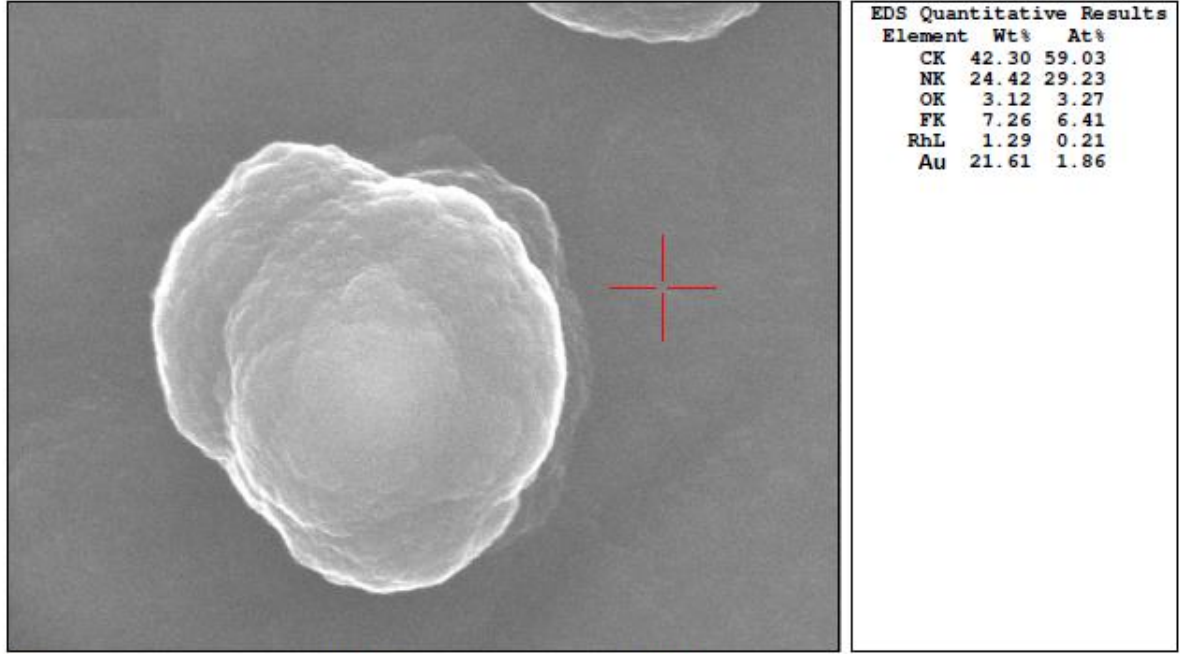


Şekil 5.2 Poli (Py-ko-PyCOOH) film kaplı altın elektrot yüzeyinin SEM mikrografı (x20000).





**Şekil 5.3** Poli (Py-ko-PyCOOH) film kaplı altın elektrot yüzeyinin SEM mikrografi (x400000).



Şekil 5.4 Poli (Py-ko-PyCOOH) film kaplı altın yüzeyde EDX analizi.

Poli (Py-ko-PyCOOH) filminin SEM görüntüsü, karnabahar benzeri küresel parçacıkların yüzeyde oluştuğunu ve bu parçacıkların bazılarının topaklanmış gibi görüldüğünü göstermiştir (Şekil 5.2). Elektrokimyasal olarak sentezlenmiş pirol bazlı polimer parçacıklarının agregalarının çap olarak birkaç mikron olduğu ve küresel morfolojili daha

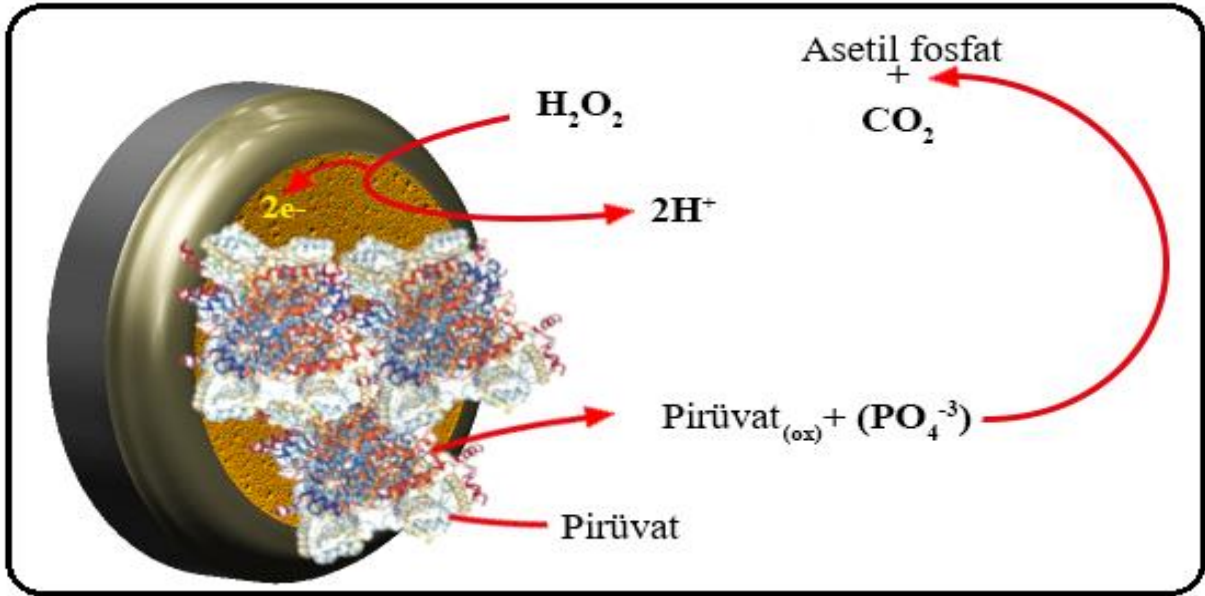
küçük parçacıklardan oluştuğu bilinmektedir [63]. Daha yüksek büyütme SEM görüntüsü, tahmini büyüklüğü 300-400 nm olan parçacıkları ortaya çıkarmıştır (Şekil 5.3). Parçacık büyüklüğü, polimerizasyon işleminde kullanılan dopant tipi ve monomer oranlarına bağlı olarak değişmektedir [64]. Yüzeydeki parçacıkların büyümesiyle, spesifik yüzey alanının azaldığı bilinmektedir [65]. Büyüklüğü 300-400 nm olan polimer parçacıkları küçük sayılır, bu da daha yüksek yüzey alanına yol açmıştır ve bu nedenle, substratın film yüzeyine adsorpsiyonunu arttırmak için daha fazla alan tedarik edilebildiği söylenebilir. Film kaplı elektrot yüzeyindeki karbonun yanı sıra azot atomlarının varlığı, EDX analizi (Şekil 5.4) ile tespit edilmiş ve yüzeyde karbon ve azot içeren polipirol film yapısının oluşturulduğu doğrulanmıştır.

## 5.2 VOLTAJIN BELİRLENMESİ

Çalışma elektrodu yüzeyinde gerçekleşen enzimatik ve elektrokimyasal reaksiyonlar aşağıda verilmiştir (Şekil 5.5);



Eşitlik 5.1'de verilen bu reaksiyon piruvatın asetilfosfata, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub>'ye dönüşümünü içerir. FAD ve TPP, inorganik fosfat ve oksijen varlığında piruvatın enzimatik dekarboksilasyonu için gerekli kofaktörlerdir. Her enzimatik inaktif piruvat oksidaz alt birimi bir TPP ve bir FAD'ı bağlar ve tüm oksidasyon reaksiyonlarında Mg<sup>+2</sup> varlığında her iki kofaktör (TPP ve FAD) ile kompleksler oluşturabilir. *Piruvat oksidazın* kofaktör bağımlı katalitik reaksiyonları, TPP'nin C<sub>2</sub>-H'sinin deprotonasyonu ile başlar ve daha sonra laktil-TPP, piruvatın 'enzim bağlı' TPP'nin C<sub>2</sub> atomuna bağlanmasıyla oluşturulur. Hidroksietil-TPP, laktil-TPP'nin dekarboksilasyonu ile oluşturulur. Hidroksietil-TPP, asetil-TPP ve FADH<sub>2</sub> oluşturmak için FAD ile oksitlenir ve daha sonra FADH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşturmak için O<sub>2</sub> ile yeniden okside edilir. Biyosensörün analitik cevabı, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin (eşitlik 5.2) elektrokatalitik oksidasyonundan üretilen sinyallere dayanır. Son aşamada, asetil-TPP, biyosensörün tekrarlayan biyokatalitik reaksiyonları için, asetil fosfat ve TPP C<sub>2</sub> karbaniyona ayrıştırır [29, 66].

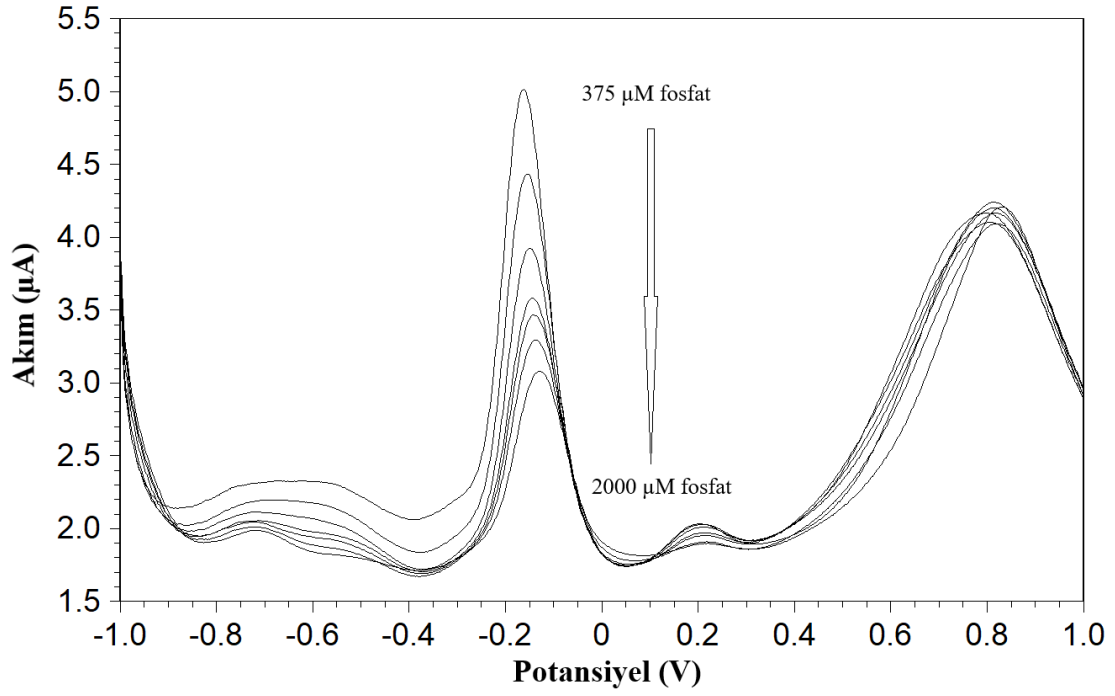


Şekil 5.5 Çalışma elektrodu yüzeyinde gerçekleşen elektrokimyasal reaksiyonlar.

Potansiyometrik fosfat biyosensörleri çalışmalarında,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin elektro-oksidasyonu ile üretilen  $\text{H}^+$  'nın potansiyel değişikliklere yol açtığı ve bu değişikliklerin fosfat iyonu konsantrasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmektedir [6,11]. Ancak, reaksiyon ortamına fosfat ilave edilir edilmez, anyon dengesinin değişmesi nedeniyle potansiyelde kayma meydana gelebilir. Bu açıdan bakıldığında potansiyeldeki değişimin yalnızca ilgili reaksiyonların sonunda üretilen  $\text{H}^+$  oluşumuna bağlı olmadığı söylenebilir. Sonuç olarak, bu belirsizlik fosfat ölçümünü güvenilir hale getirir. Amperometrik biyosensör çalışmalarında, fosfat tespiti için potansiyel değer tam olarak belirlenemediğinden tespit, farklı potansiyel aralıklarında yapılmıştır. Tek bir potansiyelde yapılan çalışmalarda ise niçin bu potansiyelin seçildiği açıklanmamıştır. Buna ek olarak, uygulanan tek bir potansiyel değerinin de her çalışmada farklı olduğu anlaşılmaktadır. Örneğin, stabiliteyi artırmak için genetik olarak tasarlanan *pirüvat oksidaz*, gözenekli karbon çubuğa immobilize edilmiştir. Yapılan çalışmada fosfat iyonundan kaynaklanan sinyallerin net voltajı +0.8 V olarak tespit edilmiştir [15]. *Pirüvat oksidaz* immobilize edilmiş kobalt ftalosiyanın tabanlı ekran baskılı karbon elektrot içeren biyosensör +0.3V [67] ve +0.4 V [29]'da çalıştırılmıştır. Başka bir raporda, fosfatın saptanması için çalışma tamponuna *pirüvat oksidaz* ilave edilmiş ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  +0.7 V'da tespit edilmiştir [10]. Nafion / *Pirüvat oksidaz* / Pt ekran baskılı elektroda +0.42 V uygulanmıştır. [53]. Md. Aminur Rahman ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada hidrojen peroksitin oksidasyon voltajı +0.4 V olarak rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmada 5,2: 5,2-tiyofen-3-karboksilik asit kaplı camı karbon elektrot kullanılmıştır [4]. Başka bir çalışmada Polipirol /

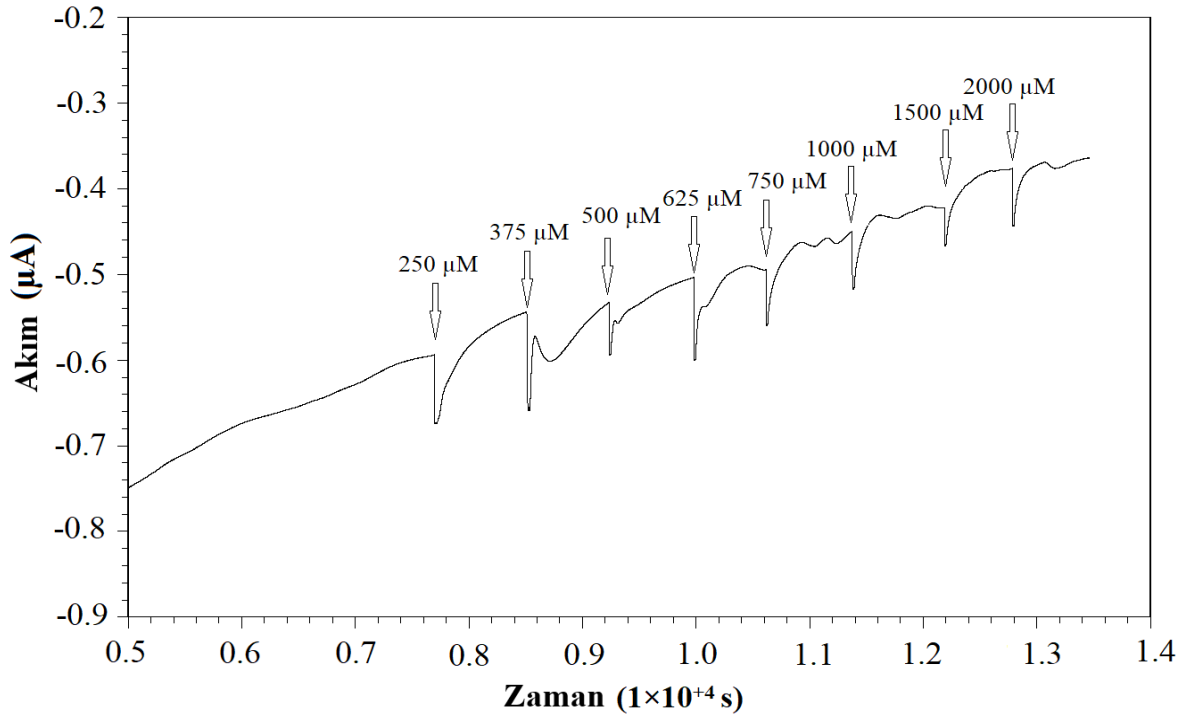
Nitrat ferrosiyandır film elektroduna +0.2 V uygulanmıştır [12]. Cui ve diğ. değişik potansiyelerde farklı katalitik özelliklerin gözlemlendiğini belirtmiştir. 0.5 ile 1.5 mM arasında değişen çeşitli konsantrasyonlardaki fosfat ile dönüşümlü voltametri tekniği kullanarak sabit bir potansiyel değerinde değil de -0.2 ile +0.1 V arasında değişen geniş bir potansiyel ölçekte akım üretildiği rapor edilmiştir [3]. Ogabiela ve diğ. -0.3 V ve 0 V aralığında veya +0.2 ve +0.6 V aralığında (farklı potansiyel aralıklarında) fosfat ölçümünü gerçekleştirmişlerdir [55]. Piruvat oksidaz-karbon nanotüp filmine dayanan bir akış enjeksiyon fosfat biyosensöründe, sürekli dönüşümlü voltametri kullanılarak fosfat tespiti yapılmıştır. Sinyaller +0.4 V'de ortaya çıkmış ve araştırmacılar akımın +0.4 V'da artmasını biyosensör yüzeyindeki fosfat iyonlarının oksidasyonu sırasında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretiminden kaynaklandığını iddia etmiştir [68]. Amperometrik fosfat tespiti için kullanılan nanoparçacık modifiye edilmiş iletken polimer kaplı camı karbon elektrot [4] ve bakır nanoparçacık fonksiyonelleştirilmiş altın elektrot için de benzer sonuçlar bildirilmiştir [69].

Çalışmamızda, fosfat ölçümünün yapılabildiği potansiyelin net belirlenebilmesi için artan genlikteki potansiyel puls serisini kullanan DPV tekniği ile detaylı deneyler yapılmıştır. Bu teknik, faradaik olmayan (şarj) akımın düşmesi için zaman yaratır ve sonuçta, yüzeye bağlı moleküllerin az miktarlarının bile izlenmesi sırasında ölçüm hassasiyeti önemli ölçüde artar [70,71]. Çalışmamızda, -1V ile +1V aralığındaki DPV tekniği ile ölçüm ortamına 375 µM-2000 µM aralığındaki artan konsantrasyonlarda fosfat ilave edildikten sonra biyosensörden alınan akımlar kaydedilmiştir (Şekil 5.6). +0.8V'da geniş pik akımları gözlenmiş, ancak bu akımların büyüklüğünün konsantrasyon artışı ile değişmediği anlaşılmıştır. Akımların, tam olarak -0.15 V'da artan fosfat konsantrasyonları ile orantılı olarak değiştiği belli olmaktadır.



**Şekil 5.6** 375  $\mu\text{M}$  ile 2000  $\mu\text{M}$  arasında değişen çeşitli fosfat konsantrasyonları içeren sitrat tamponunda kaydedilen DPV grafiği.

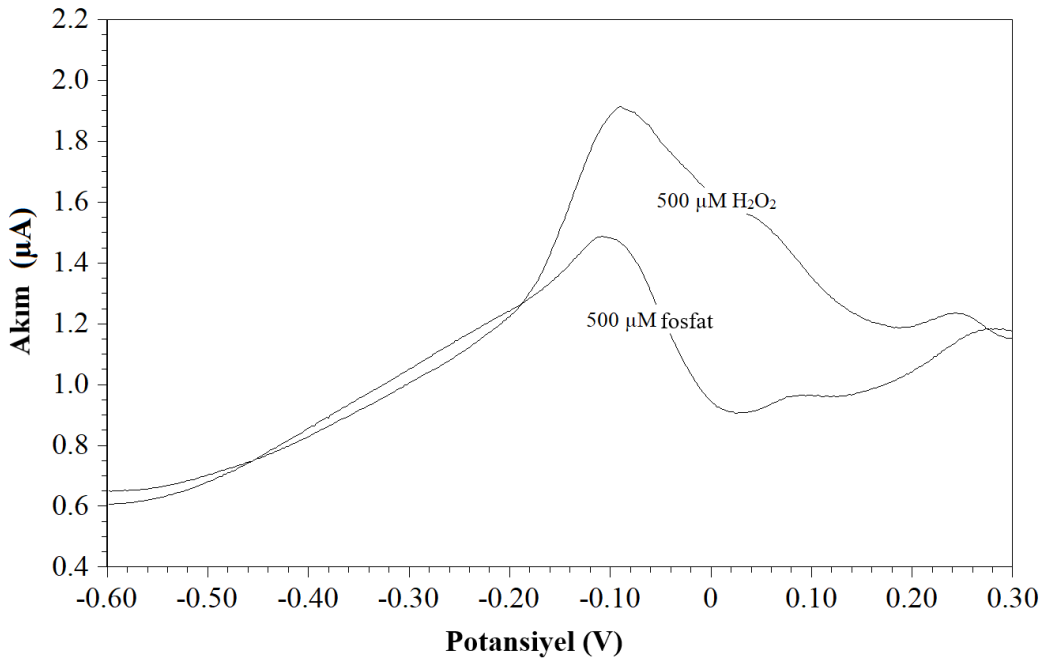
Bu sonuçtan emin olmak için, biyosensörün amperometrik akım-zaman tepkisi, -0.15 V'luk sabit potansiyelde, 250  $\mu\text{M}$ 'den 2000  $\mu\text{M}$ 'ye kadar artan fosfat konsantrasyonlarında incelenmiştir (Şekil 5.7).



**Şekil 5.7** Artan fosfat konsantrasyonlarına amperometrik cevap.

Şekil 5.7'den artan fosfat konsantrasyonlarına karşı -0.15 V'da orantılı olarak artan akım sinyallerinin üretildiği anlaşılmıştır. Ancak, akım değerlerinin büyüklüğüne bakıldığında, DPV tekniği ile aynı konsantrasyondaki fosfat için daha yüksek akımların üretildiği anlaşıldığından, sonraki deneyler DPV tekniğiyle yapılmıştır.

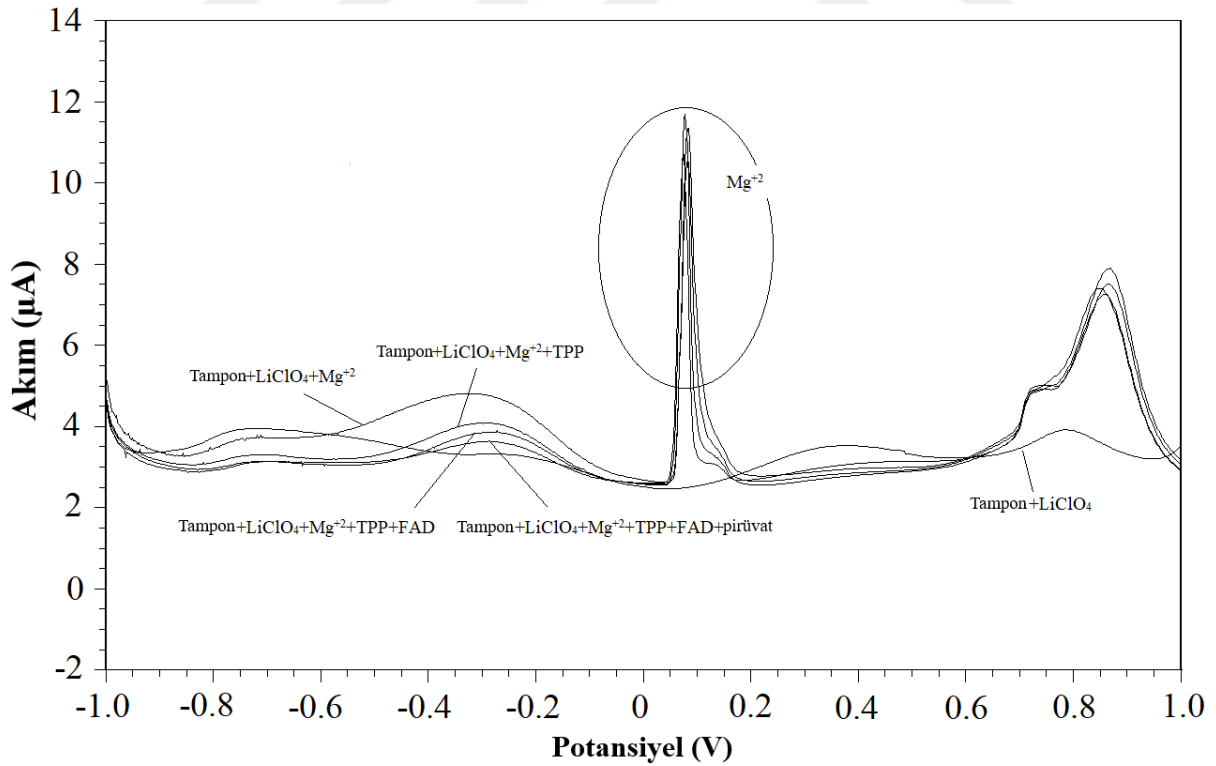
Biyosensör ayrıca, elektrokimyasal sinyallerin  $H_2O_2$  oksidasyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığını netleştirmek için yukarıda belirtilen DPV tekniğini kullanarak ayrı ayrı 20 mM pH 7 sitrat tamponuyla hazırlanmış 500  $\mu M$   $H_2O_2$  ve 500  $\mu M$  fosfat çözeltileri içinde test edilmiştir (Şekil 5.8).  $H_2O_2$  çözeltilisinden üretilen akım ve fosfat çözeltilisinden üretilen akım değerleri ve karakteristiği birbiriyle karşılaştırılmıştır. Şekil 5.8'den iki akım eğrisinin şeklinin benzer olduğu ve neredeyse aynı potansiyel değerinde benzer pik noktalarının gözlemlendiği açıkça görülmüştür. Detaylı açıklanacak olursa,  $H_2O_2$  çözeltilisinde yapılan deneyden,  $H_2O_2$ 'nin -0.15 V'a yakın bir potansiyel değerinde okside olduğu anlaşılmıştır. Fosfat çözeltilisinde yapılan deneyde ise aynı potansiyel değerinde bir oksidasyon dalgası gözlenmiş ve ayrıca akım grafiğinin,  $H_2O_2$  akım grafiğinin karakteristiği ile aynı çıktığı anlaşılmıştır. Bu durum, biyosensör probunun fosfat çözeltilisine daldırıldığında enzimatik reaksiyonla  $H_2O_2$  ürettiğine ve üretilen  $H_2O_2$ 'nin elektrot yüzeyinde -0.15 V'da okside edildiğini açıkça göstermiştir. Bu sonuç ile, kullanılan DPV tekniğinde biyosensörden alınan fosfat sinyallerinin  $H_2O_2$  oksidasyonundan -0.15 V'da üretildiği kanıtlanmıştır.



**Şekil 5.8** Biyosensörün 500  $\mu M$   $H_2O_2$  ve 500  $\mu M$  fosfat çözeltilerinden elde edilen DPV grafikleri.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidasyonuna dayanan bazı amperometrik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biyosensör çalışmalarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin oksidasyonu için -0.25V, -0.3V ve -0.15V gibi potansiyel değerlerinin uygulanması gerektiği bildirilmiştir [72-74]. Literatür bilgisi deney sonucumuzu desteklemiştir.

*Piruvat oksidaz*, aktivitesinin artması için bazı kofaktörlere (FAD, TPP ve Mg<sup>+2</sup>) ve fosfatın katalizlenmesi için piruvat'a ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle biyosensör ölçüm ortamında bu maddelerin bulunması gerekmektedir. Literatürde bu maddelerin biyosensör seçiciliğini etkilemediği belirtilmiştir [15]. Ancak bu durum, bu metabolitler elektrot yüzeyinde elektroaktivite gösterebildikleri için, metabolitlerin fosfatın tespit edildiği potansiyeldeki sinyale girişim yapmayacağı anlamına gelmez. Bu maddelerin, elektrot yüzeyindeki aktivitelerinin belirlenmesi için, maddeler 0.7 mg/mL LiClO<sub>4</sub> içeren 20 mM pH 7 havalandırılmış sitrat tamponuna eklenerek -1V ve +1V aralığında DPV deneyleri yapılmıştır. İlk deneyde, tampona 1 mM Mg<sup>+2</sup> ilave edilmiş ve DPV grafiği kaydedilmiş, daha sonra aynı tampona sırasıyla 0.5 mM pirüvat, 50 µM TPP ve son olarak 5 µM FAD eklenmiştir. Her bir metabolitin eklenmesinden sonra DPV deneyi tekrarlanmıştır. DPV'ler üst üste yerleştirilerek Şekil 5.9'da gösterilmiştir.



Şekil 5.9 Kofaktörleri ve piruvatı içeren tampon çözeltilerde biyosensörden elde edilen DPV grafiği.

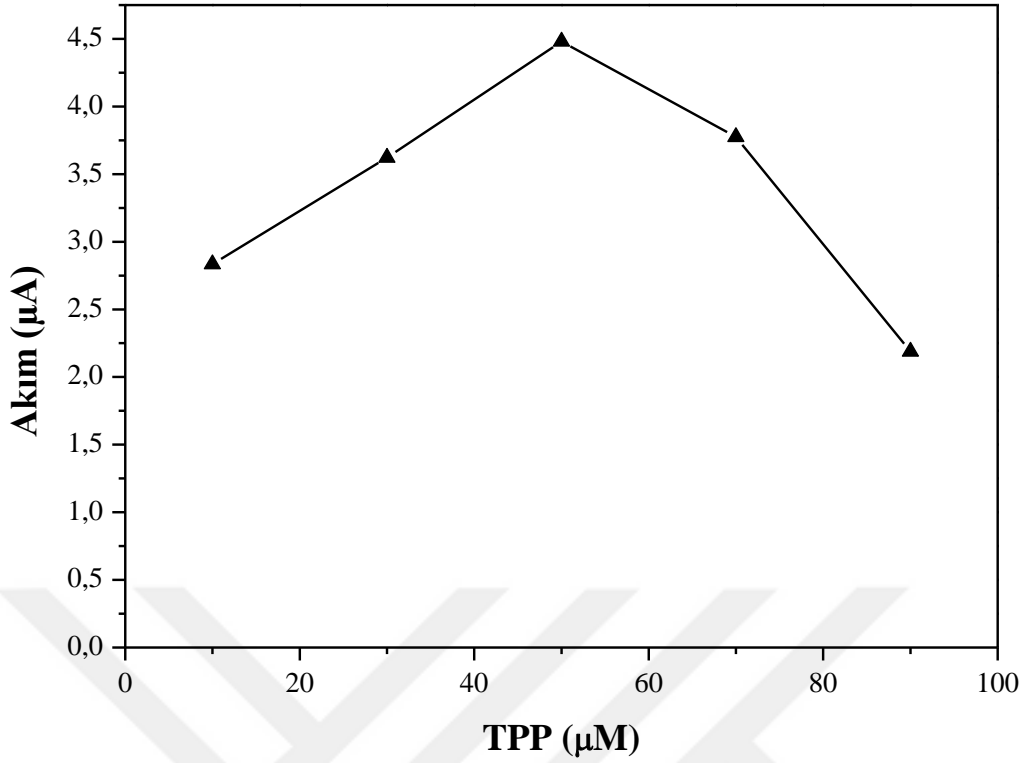


DPV grafiklerinden,  $Mg^{+2}$  pikinin +0.1 V'da net olarak gözlemlendiği anlaşılmıştır. Ortama eklenen her madde, +0.6 V'dan büyük potansiyelerde ve -0.35 V'da pik akımı oluşturmuştur. Kullanılan metabolitlerin hiçbiri, tasarlanan prob üzerinde, fosfat iyonunun algılandığı -0.15 V'luk potansiyelde bir pik akımı oluşturmamıştır. Bu sonuç, biyosensörün fosfatı ölçebildiği -0.15 V'luk potansiyel değerinde, ortamdaki diğer maddelerin ölçüme girişim yapmadığını açıkça göstermiştir.

### 5.3 ÖLÇÜM ORTAMINDAKİ MADDELERİN UYGUN KONSANTRASYONLARININ BELİRLENMESİ

#### 5.3.1 TPP Konsantrasyonu

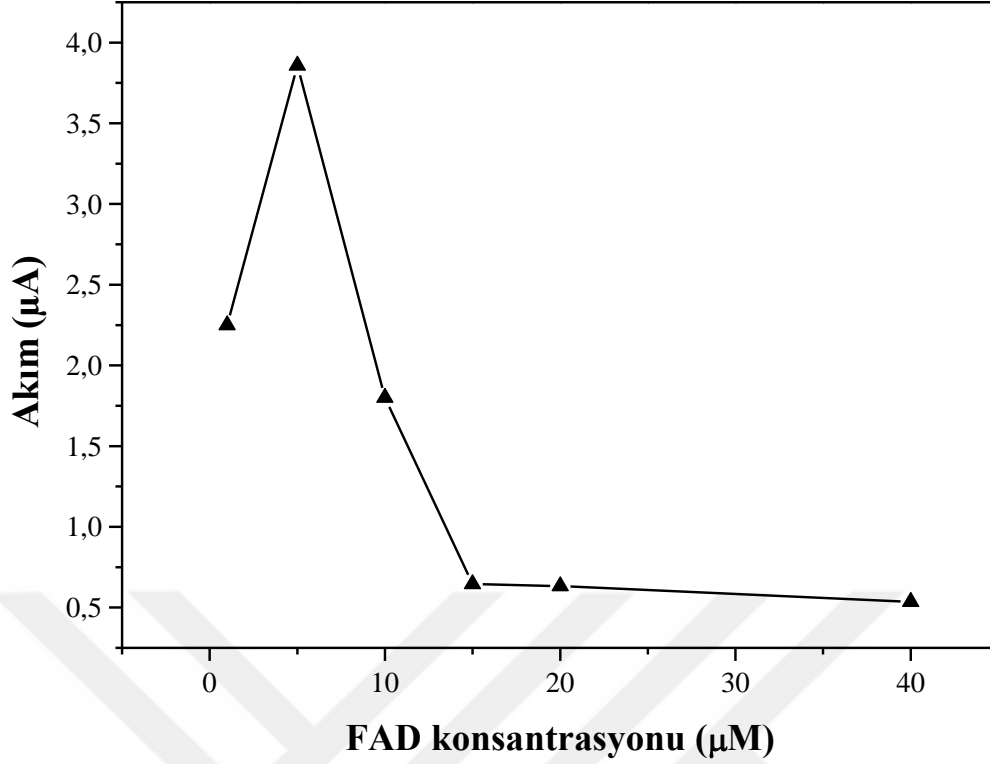
0.7 mg/mL lityum perklorat ( $LiClO_4$ ), 1 mM  $Mg^{+2}$ , 0.5 mM pirüvat, 5  $\mu M$  FAD ve 1 mM fosfat içeren 10 mL 20 mM pH 7 sitrat tamponuna sırasıyla 10,30,50,70 ve 90  $\mu M$  TPP eklenerek farklı TPP konsantrasyonlarında çalışma tamponu hazırlanmış ve her bir TPP konsantrasyonunda fosfat tespiti yapılmıştır. Ölçümlerden önce ölçüm ortamına 3 dakika boyunca saf oksijen verilmiştir ve sonuçlar Şekil 5.10'da gösterilmiştir. En yüksek akım değerine 50  $\mu M$ 'lık TPP konsantrasyonunda ulaşılmış, daha yüksek TPP konsantrasyonlarında akımın düştüğü gözlemlenmiştir. Rahman ve diğ. (2006), yüksek TPP konsantrasyonunun, fosfatın tespitinde elektrotun algılama kabiliyetini sınırladığını bildirmiştir [4]. Nenad Gajovic ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada pirol ve tiyofen kaplı cam karbon elektrot kullanılmıştır. Burada kofaktör olarak kullanılan TPP, 200  $\mu M$  konsantrasyonunda kullanılmıştır [56]. Rafiq Ahmad ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada bir alan etkili transistör (FET) biyosensörü tasarlanmıştır. Bu biyosensör  $SiO_2 / Si$  elektrodu üzerinde bağlı *piruvat oksidaz* ve fonksiyonelleştirilmiş ZnO nanoçubuklar dizisine dayanarak üretilmiştir. Burada kofaktör olarak kullanılan TPP 0.1 mM konsantrasyonunda kullanılmıştır [75]. Lucy ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, bir kobalt ftalosiyaniyle modifiye edilmiş ekran baskılı karbon elektrotu (CoPC-SPCE) temel alan, fosfat iyonu için bir amperometrik biyosensör tasarlanmıştır. Burada kullanılan TPP konsantrasyonu 200  $\mu M$ 'dır [67].



**Şekil 5.10** TPP konsantrasyonunun biyosensörün fosfat sinyali üzerine etkisi.

### 5.3.2 FAD Konsantrasyonu

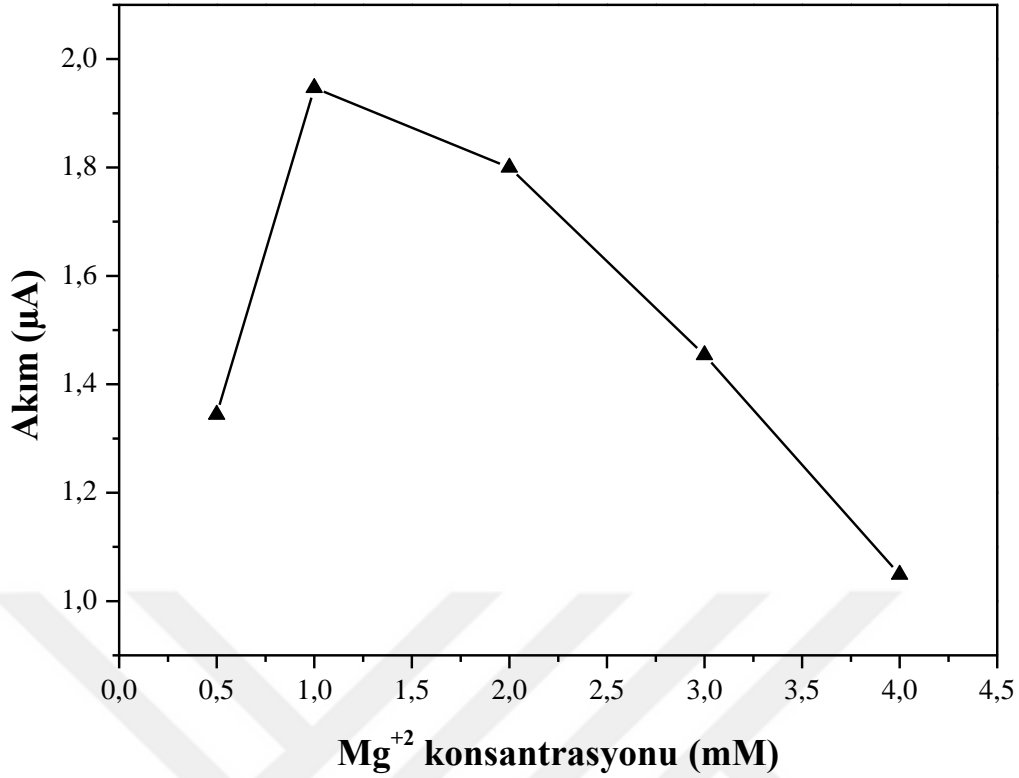
Enzimatik reaksiyonun gerçekleşebilmesi için kofaktörlerden biri olan FAD'ın uygun konsantrasyonu deneysel olarak belirlenirken bir önceki bölümde açıklanan ölçüm ortamında ayrı ayrı 1,5,10,15,20 ve 40  $\mu\text{M}$  FAD olacak şekilde çözeltiler hazırlanmış ve oksijenlendirilmiştir. -1V ve +1V aralığında DPV yöntemiyle deneyler yapılmış ve sonuçlar Şekil 5.11'de verilmiştir. 5  $\mu\text{M}$  FAD konsantrasyonu deneyler için en iyi optimim doz olarak belirlenmiştir. 5  $\mu\text{M}$  FAD kullanılarak maksimum akım gözlenirken, daha yüksek FAD konsantrasyonunda keskin bir akım düşüşü meydana gelmiştir. Lucy Gilbert ve arkadaşları tarafından yapılmış çalışmada FAD konsantrasyonu 20  $\mu\text{M}$  [67], Roger C.H. Kwan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada FAD konsantrasyonu 10  $\mu\text{M}$  [53], Edward Ogabiela ve arkadaşları tarafından yapılan potansiyometrik bir biyosensör çalışmasında yine FAD konsantrasyonu 10  $\mu\text{M}$  olarak kullanılmıştır [6]. Bu çalışmalara kıyasla çalışmamızda daha az FAD konsantrasyonuyla biyosensörden sinyal alındığı görülmüştür. FAD oldukça pahalı bir madde olduğundan, az kullanılması sistem ekonomikliği bakımından avantajlıdır.



Şekil 5.11 FAD konsantrasyonunun biyosensörün fosfat sinyali üzerine etkisi.

### 5.3.3 Magnezyum İyonu Konsantrasyonu

Bölüm 5.3.1’de açıklanan biyosensör ölçüm ortamına magnezyum iyonunun konsantrasyonu 0.5,1,2,3, ve 4 mM olacak şekilde eklemeler yapılarak 5 farklı ölçüm ortamı hazırlanmıştır. En yüksek akım değerine 1 mM’lık  $Mg^{+2}$  konsantrasyonu ile ulaşılmıştır (Şekil 5.12). Edward Ogabiela ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *pirüvat oksidaz* enzimi ile potansiyometrik olarak fosfat tayini yapılmıştır [6]. Bu çalışmada kullanılan magnezyum konsantrasyonu 3 mM’dır. Md. Aminur Rahman ve arkadaşları tarafından yapılan amperometrik fosfat tayini çalışmasında magnezyum konsantrasyonu 2 mM’dır [4]. Kazunori Ikebukuro ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada  $Mg^{+2}$  konsantrasyonu 5 mM’dır [54]. Deneysel sonuçlara göre tez çalışmasında dizayn edilen biyosensörün ölçüm ortamı, maksimum fosfat sinyalleri elde edebilmek için 1 mM  $Mg^{+2}$ , 5 μM FAD ve 50 μM TPP içerecek şekilde oluşturulmuştur.

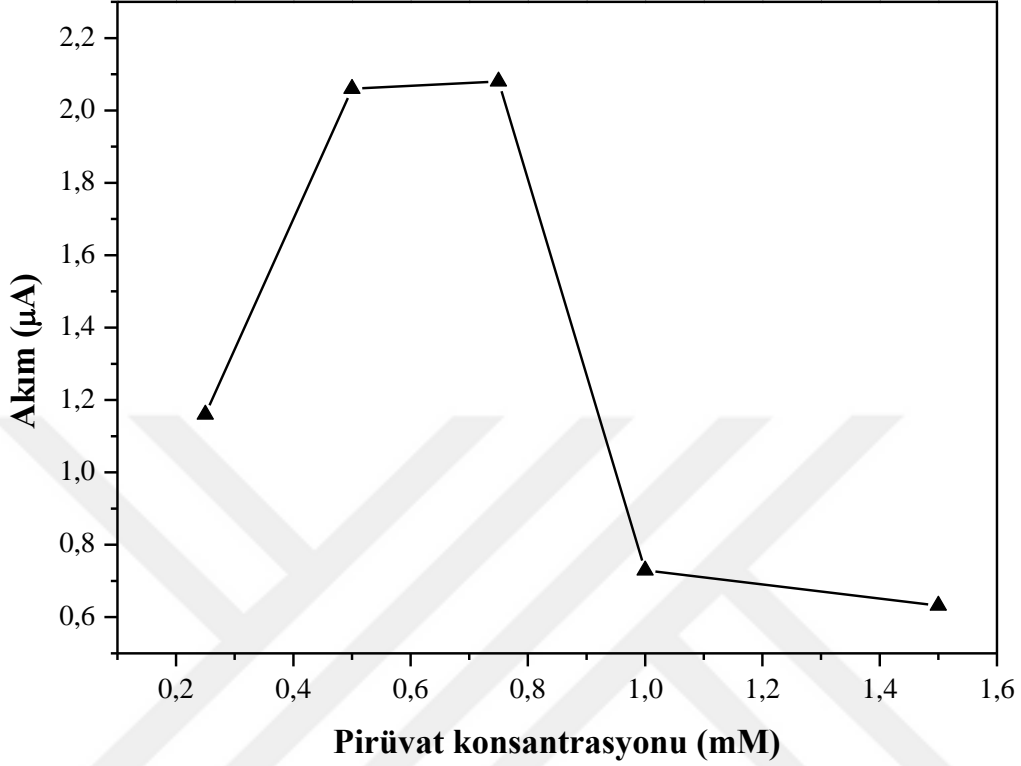


Şekil 5.12 Mg<sup>2+</sup> konsantrasyonunun biyosensörün fosfat sinyali üzerine etkisi.

#### 5.3.4 Pirüvat Konsantrasyonu

Pirüvat, *pirüvat oksidaz* enziminin kosubstratıdır ve enzimin fosfat katalize etmesi için reaksiyon ortamında mutlaka bulunmalıdır. Enzimin birincil substratı olduğundan, fosfat ile verdiği reaksiyon hızını doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle miktarı optimize edilmelidir. 0.7 mg/mL lityum perklorat (LiClO<sub>4</sub>), 1 mM Mg<sup>2+</sup>, 5 µM FAD, 50 µM TPP ve 1 mM fosfat içeren 10 mL pH 7 20 mM oksijenlendirilmiş ayrı ayrı sitrat tamponlarına 0.25 mM, 0.5 mM, 0.75 mM, 1 mM ve 1.5 mM pirüvat eklenmiştir -1V ve +1V aralığında DPV yöntemi ile sistem çalıştırılmış, biyosensörün fosfata tepkisi araştırılmış ve sonuçlar Şekil 5.13'da sunulmuştur. En yüksek akım değerine 0.5 mM pirüvat varlığında ulaşılmış, 0.75 mM pirüvat konsantrasyonu ile 0.5 mM pirüvat konsantrasyonu arasında akım değeri olarak çok bir fark olmadığı anlaşılmıştır. Fosfatın tespitinde kullanılmak üzere 0.5 mM pirüvat konsantrasyonu seçilmiştir. 0.75 mM pirüvat konsantrasyonundan sonraki pirüvat konsantrasyonu biyosensör tepkisi üzerinde olumsuz bir etkiye yol açmıştır. Bu eğilim, pirüvatın biyokatalitik aktivite üzerindeki substrat inhibisyon etkisine bağlanabilir. Edward Ogabiela ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada pirüvat konsantrasyonu 1.5 mM, Jiewu Cui ve arkadaşları

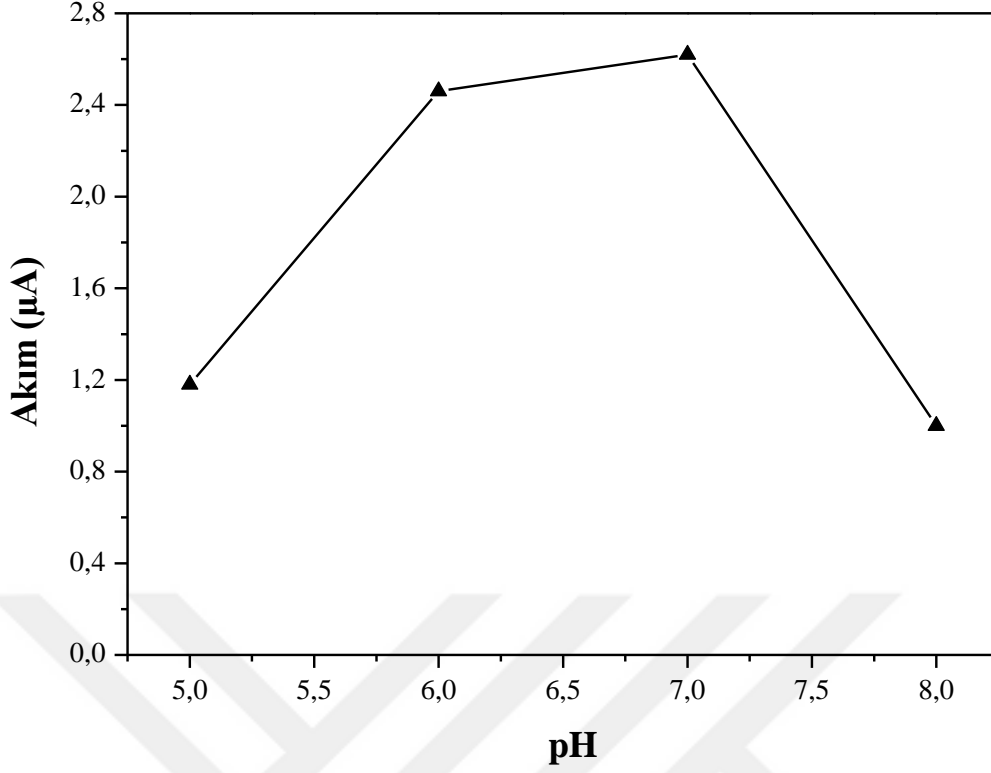
tarafından yapılan çalışmada pirüvat konsantrasyonu 0.5 mM, Vasilis G ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada pirüvat konsantrasyonu 1 mM olarak bulunmuştur [3,15,55].



Şekil 5.13 Pirüvat konsantrasyonunun biyosensörün fosfat sinyali üzerine etkisi.

#### 5.4 pH'IN BİYOSENSÖR SİNYALİNE ETKİSİ

Biyosensörün optimum pH'ı, enzimin üç boyutlu yapısının maksimum aktivitesini serbestçe gösterecek şekilde belirlenmelidir. Ortam pH'ı enzimatik reaksiyonun gerçekleşebilmesi için önemli parametrelerden biridir. Bu deneyde ölçüm ortamındaki tüm maddeler optimum dozda olacak şekilde ve 1 mM fosfat içeren 4 farklı pH değerine sahip (pH 5,6,7,8) ölçüm ortamı hazırlanmış (Bölüm 5.3.4) ve oksijenlendirilmiştir. Şekil 5.14'den akımın, pH 5-7 aralığında arttığı, pH 8'de azaldığı anlaşılmıştır. Maksimum akıma pH 7'de ulaşılmıştır. Bu sonuç, *piruvat oksidazın* tipik pH aktivite profili ile aynıdır. Daha önce yayınlanmış olan *piruvat oksidaz* bazlı çalışmalarda, bu enzim için uygun pH değerinin 6,5 ile 7,5 arasında olduğunu gösteren benzer sonuçlar bulunmuştur [4,14,15,29].



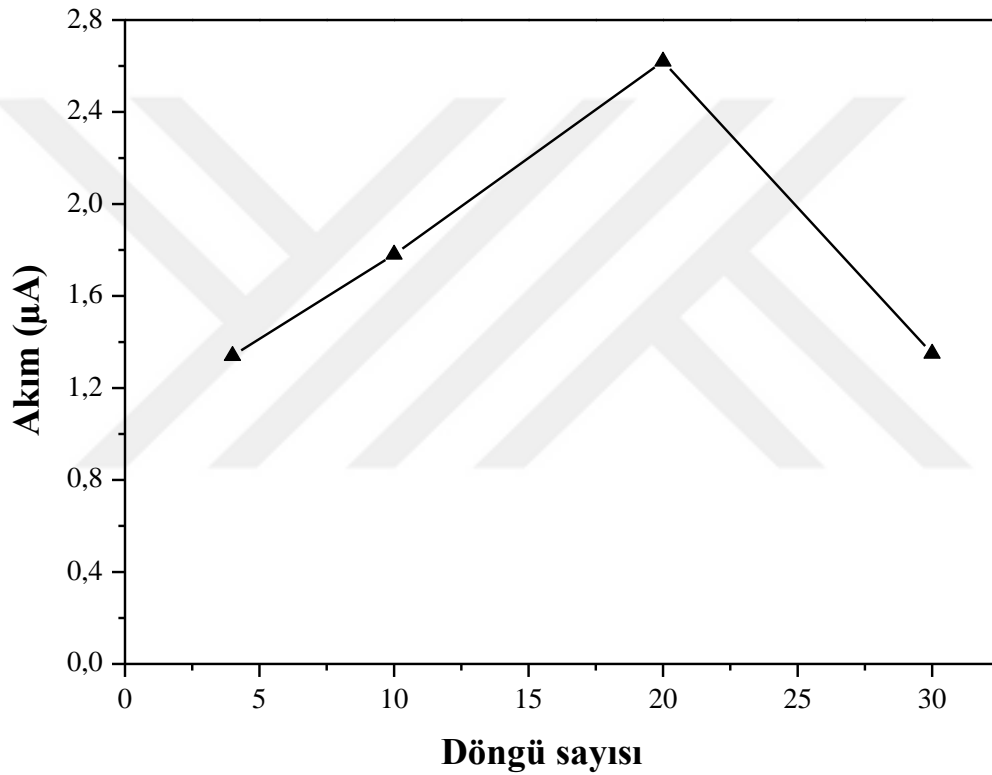
Şekil 5.14 pH'ın, biyosensörün fosfat sinyali üzerine etkisi.

## 5.5 OPTİMUM POLİMERİK FİLM YOĞUNLUĞUNUN BELİRLENMESİ

Elektrot yüzeyindeki iletken bir polimer filmin yoğunluğu, elektropolimerizasyon süresi değiştirilerek kolayca kontrol edilir. Elektropolimerizasyonun süresi, film stabilitesi, adsorpsiyon ve difüzyon kapasiteleri gibi polimerik film tabakasının kalitesine doğrudan etkiler. Örneğin, ince film tabakası analit etkileşimi için geniş bir özel alana sahip olması nedeniyle olumlu sonuçlar ortaya koyarken [76], yoğun tabaka elektron taşınması için güçlü bir elektrik direnci oluşturabilir [77]. Enzimin elektrot yüzeyinde immobilizasyonunu sağlayabilmek için elektrot yüzeyine polimer kaplaması yapılmaktadır.

Bu deneyde optimum polimerik film yoğunluğu belirlenirken 10 mM pirol-2-karboksilik asit, 5 mM pirol ve 20 mM TBAFB 10 mL asetonitril içinde karıştırılarak çözülmüştür. Altın çalışma elektrodu, platin karşıt elektrot ve susuz referans elektrot ( $Ag^0/Ag^+$ ), hazırlanan polimer çözeltisinin içerisine daldırılmıştır. Dönüşümlü voltametri tekniğiyle 100 mV/s tarama hızında -0.5 V ile +1 V arasında metod ayarlanmış olup döngü sayısı 4,10,20 ve 30 döngü olmak üzere 4 farklı elektrot kaplaması yapılmış 1 mM fosfat içeren metabolitli ortamda DPV tekniği ile deneyler gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.15, her bir elektrottan elde

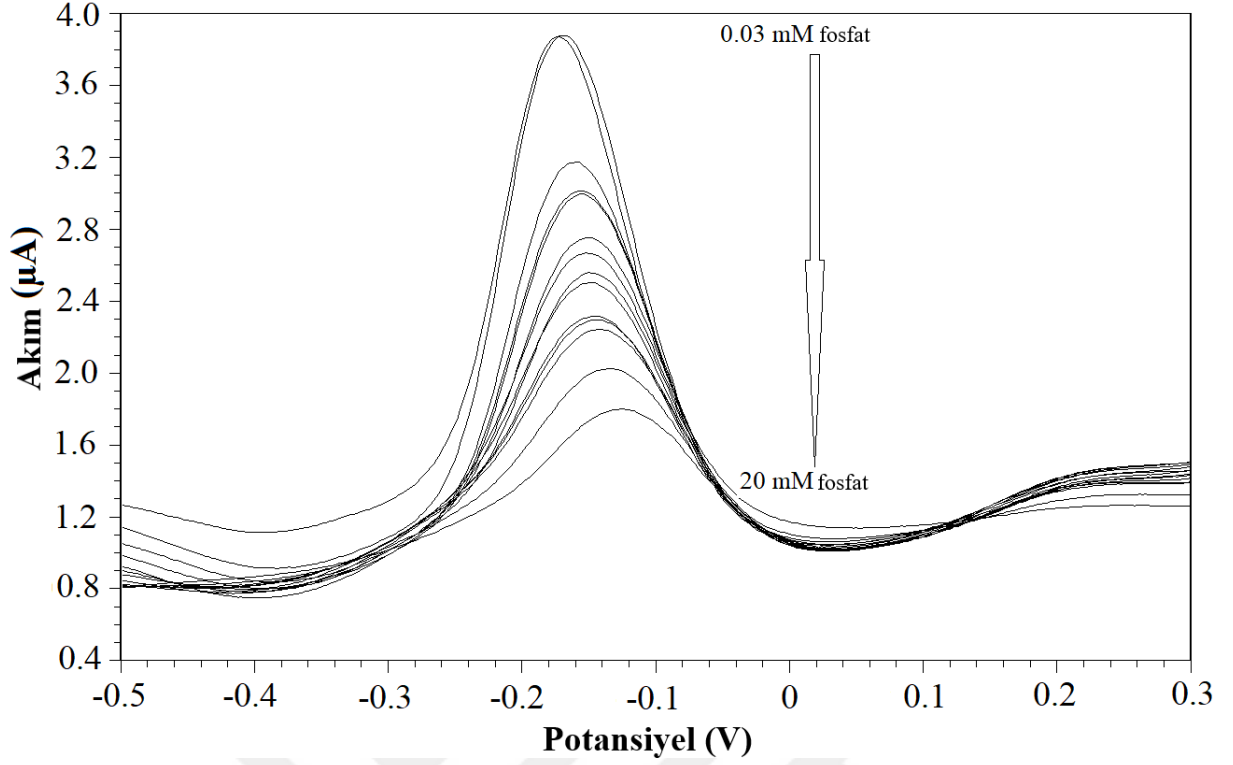
edilen fosfat sinyallerini göstermektedir. Şekil 5.15'e göre 20 döngü sayısına kadar akımın yükseldiği ve 30 döngüde düştüğü görülmüştür. 20 döngüye kadar artan akım, artan elektropolimerizasyon süresi ile yüzeyde yoğunlaşan kopolimerin artan karboksil gruplarına bağlanabilir, çünkü bu gruplar kimyasal enzim immobilizasyonu için daha fazla kapasite sağlar. 20 döngüden sonra akımın düşmesi, film yüzeyinin çok yoğun olduğunu ve bunun sonucunda, piruvat ve fosfat difüzyonlarının ve yüzeydeki elektron taşınmasının sınırlı olduğunu göstermiştir [78,79]. Elektropolimerizasyon için optimum döngü sayısı, fosfat ölçümleri için gelişmiş sinyallerin üretilmesi adına 20 olarak ayarlanmıştır.



Şekil 5.15 Yüzeydeki film yoğunluğunun biyosensör yanıtı üzerine etkisi.

## 5.6 BİYOSENSÖR ANALİTİK PARAMETRELERİ

Biyosensörün analitik performansı, -1 ve + 1 V arasında potansiyel bir tarama ile DPV tekniği kullanılarak 0.03-20 mM aralığında artan fosfat konsantrasyonları içeren havalandırılmış sitrat tamponlarında araştırılmıştır. Üst üste binen DPV grafikleri, Şekil 5.16'da (yakınlaştırılmış grafik) sunulmuştur. Artan fosfat konsantrasyonları ile orantılı akım değişiklikleri gözlemlenmiştir.

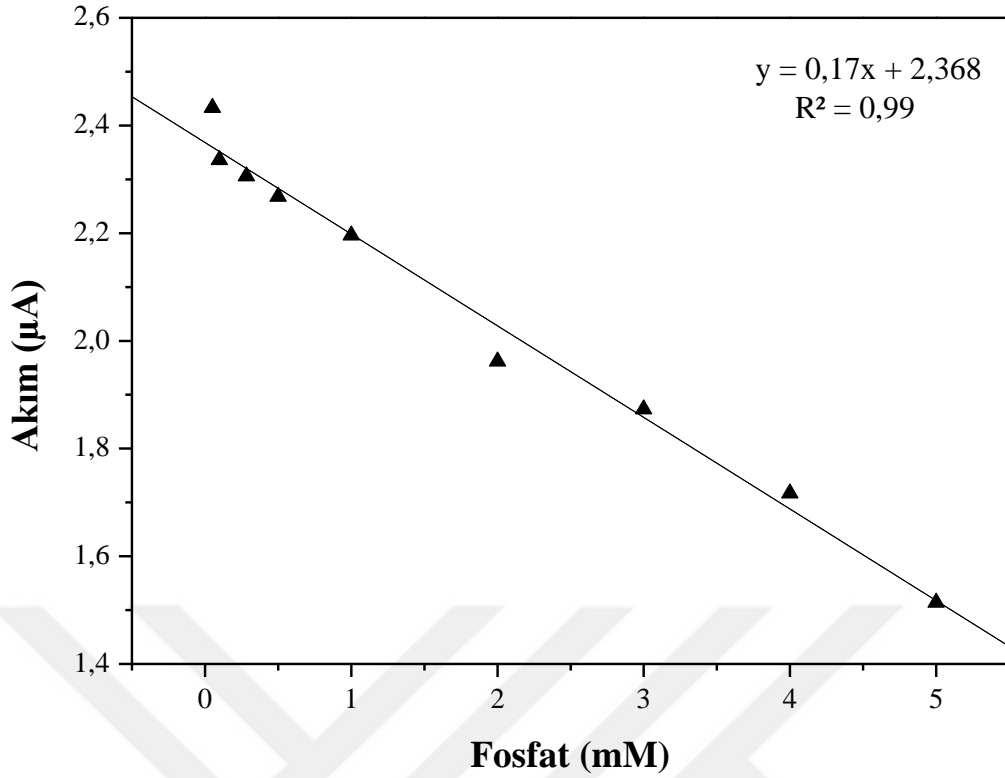


Şekil 5.16 Artan fosfat konsantrasyonlarından elde edilen biyosensör sinyalleri.

### 5.6.1 Doğrusal Ölçüm Aralığının Hesaplanması

Şekil 5.16'daki DPV'lerden elde edilen akım değerleri kullanılarak bir doğrusal kalibrasyon eğrisi Şekil 5.17'deki gibi elde edilmiştir ( $r^2=0.99$ ). Biyosensörün fosfatı ölçebildiği konsantrasyon aralığı 0.05 - 5 mM'dır. Biyosensör akımı, 5 mM fosfat konsantrasyonuna kadar doğrusallık göstermiş olup  $[y(\mu A) = 0.17x(mM) + 2.368]$  doğrusal aralığın, fosfat biyosensör çalışmalarının çoğundan daha geniş olduğu söylenebilir. Örneğin *pürin nükleosid fosforilaz* ve *ksantin oksidaz* immobilize edilmiş poliprol filmi bazlı potansiyometrik bir biyosensör için doğrusal aralığın 5-25  $\mu M$  [57], *piruvat oksidaz* immobilize nafion matrisi ve poli (karbamoil) sülfonat hidrojel kaplı elektrot için 7.5-625  $\mu M$  [53], *piruvat oksidaz* immobilize elektrot için 50-400  $\mu M$  [10] ve piruvat oksidaz immobilize edilmiş iletken redoks polimer bazlı amperometrik biyosensör için 20-500  $\mu M$  olduğu raporlanmıştır [56].





Şekil 5.17 Biyosensörden elde edilen fosfat kalibrasyon eğrisi

### 5.6.2 Ölçüm Hassasiyetinin Hesaplanması

Ölçüm hassasiyeti hazırlanan kalibrasyon eğrisinin eğimidir. Biyosensörün ölçüm hassasiyeti, birim elektrot alanı başına  $5.4 \mu\text{A} / \text{mM} \cdot \text{cm}^2$ 'dir.

### 5.6.3 Tespit Limitinin Hesaplanması (LOD)

Tespit limiti,  $(3 \times S_b / m)$  formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Burada  $S_b$ , aynı konsantrasyonda hazırlanmış farklı fosfat çözeltilerinden elde edilen akımlarının standart sapmasıdır.  $m$ , kalibrasyon grafiğinin eğimidir. Değerler formülde yerine konduğunda LOD  $13.3 \mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır.

### 5.6.4 İşletme Kararlılığı

1 mM'lık fosfat çözeltisinden farklı zamanlarda elde edilen akım değerlerinin (7 ölçüm yapılmıştır) relatif standart sapması (RSD) hesaplanarak biyosensörün ölçüm tekrarlanabilirliği araştırılmıştır. RSD değeri % 0.07 olarak bulunmuş ve bu sonuç tasarlanan

proben bir operasyonda tekrar tekrar aynı fosfat konsantrasyonunu aynı şekilde algıladığının göstergesidir. Fosfat iyonlarının seçici tayini için tasarlanmış bir akış enjeksiyonlu enzimatik biyosensörde, *piruvat oksidaz* ve çok duvarlı karbon nanotüpleri, nafion polimerik tabakası tarafından camı bir karbon elektrotun yüzeyinde immobilize edilmiş bu çalışmada RSD değerleri % 0.27 ile % 4.1 arasında çıkmıştır [68]. Fosfat tayini için bir *piruvat oksidaz* bazlı FIA'da RSD % 1.8-3.8 olarak hesaplanmıştır [80].

### 5.6.5 Ölçüm Doğruluğu

Biyosensörün ölçüm doğruluğunun tespiti aşağıdaki formülle hesaplanır;

$$\text{Doğruluk} = [(\text{ölçülen konsantrasyon} / \text{gerçek konsantrasyon}) \times 100]$$

Biyosensörün ölçüm doğruluğu standart fosfat çözeltileri için % 101 olarak hesaplanmıştır.

Çalışmada temel parametrelerin optimizasyonu ve tasarlanan biyosensörün DPV yöntemi ile doğru potansiyelinin belirlenmesi, fosfat tespit performansının artmasına katkıda bulunmuştur. Çizelge 5.1'da daha önce bildirilen bazı fosfat biyosensörlerinin analitik parametrelerini sunulmuştur. Çizelge 5.1'e bakıldığında, dizayn edilen biyosensörün doğrusal ölçüm aralığının, LOD değerinin ve ölçüm hassasiyetinin diğer çalışma sonuçlarına göre daha iyi olduğu anlaşılmaktadır.

**Çizelge 5.1** Önceki fosfat biyosensörlerinin analitik parametreleri.

Enzim	Çevirici	Doğrusal Ölçüm Aralığı (mM)	LOD (µM)	Hassasiyet (µA/mM)	Referanslar
<i>Pirüvat oksidaz</i>	Amperometrik	0.05-1.25	4.8	10.3	[15]
<i>Pirüvat oksidaz</i>	Amperometrik	0.363-1	100	0.0054	[67]
<i>Pirüvat oksidaz</i>	Amperometrik	0.02-0.3	20	5	[56]
<i>Alkalın fosfataz</i>	Kondüktometrik	0.5-50	50	-	[81]
<i>Pürin nükleosid ve ksantin oksidaz</i>	Potansiyometrik	0.04-0.12	20	-	[11]
<i>Pürin nükleosid ve ksantin oksidaz</i>	Potansiyometrik	0.02-0.2	20	-	[12]
<i>Pirüvat oksidaz</i>	Amperometrik	0.1-1	10	-	
<i>Pirüvat oksidaz</i>	Amperometrik	0.05-5	13.3	0.17	Mevcut Çalışma

### 5.6.6. Depo Kararlılığının Belirlenmesi

Biyosensörün depo kararlılığı 1, 10, 20 ve 30. günlerde 1 mM fosfat içeren ölçüm ortamından elde edilen amperometrik sinyalin izlenmesi ile test edilmiştir. Biyosensör, kullanılmadığında buzdolabında 20 mM pH 7 sitrat tamponunda bekletilmiştir. Sonuçlar, biyosensörün ilk sinyalinin % 50'sini 10. gün koruduğunu ve sinyalin 20. ve 30. günlerde sabit kaldığını göstermiştir.

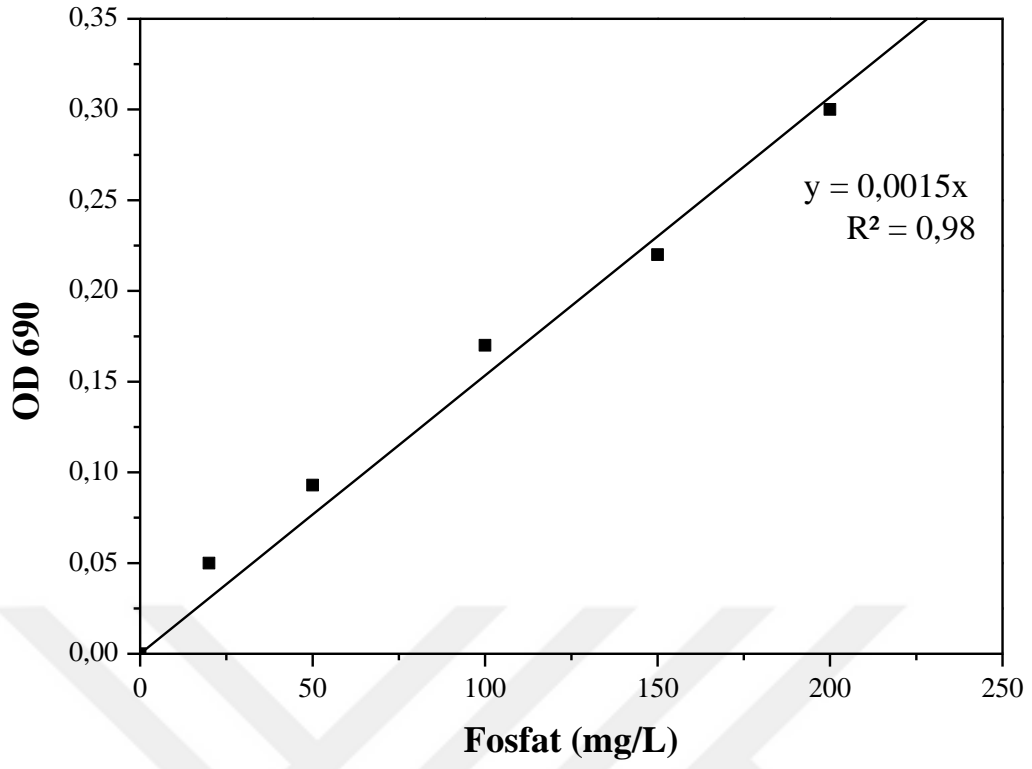
Literatürde, *piruvat oksidazın* aktivitesini hızla kaybetmesi sebebiyle fosfat biyosensörlerinin kararlılığının düşük olduğu bildirilmiştir [4,54]. Üç farklı *piruvat oksidaz* kolonuna dayanan bir fosfat analiz sisteminde, enzim kolonlarından birinde, enzim bir hafta içinde aktivitesini tamamen kaybederken, diğer kolonlar sadece 2 hafta kararlı kalabilmişlerdir [54]. Başka bir raporda, tasarlanan fosfat biyosensörünün duyarlılığının 2 hafta içinde başlangıç değerinin % 62'sine düştüğü belirlenmiştir [82]. *Pürin nükleosid fosforilaz* ve *ksantin oksidaz* immobilize edilmiş polipirol filmine dayanan çok enzimli bir sistemde, elektrotun eğer barbiton tamponunda saklanmazsa amperometrik tepkinin ilk kez hızlı bir şekilde azaldığı, duyarlılığının günde % 20'sinden fazlasının kaybedildiği rapor edilmiş, sinyalin 2. gün ve 8. günde başlangıç değerinin % 50'sine ulaştığı belirtilmiştir. Potansiyometrik ölçümlerde, yanıt azalması 4 hafta sonra %60 olmuştur [83]. Ardışık kesikli reaktör (SBR) sistemindeki fosfat konsantrasyonlarını izlemek için kullanılan immobilize *piruvat oksidaz* bazlı ekran baskılı bir fosfat biyosensörü, 12 saatlik çalışmadan sonra çalışma stabilitesinin %15'ini kaybetmiştir [16]. *Piruvat oksidazın* ve kofaktörlerinin, TPP ve FAD'ın, çok düzenli bir altın nanotel dizisi ile yakın bir entegrasyonuna dayanan bir biyosensör çalışmasında sığır serum albümini ve glutaraldehid ile nanotellere çapraz bağlanma yoluyla, enzim ve yardımcı faktörlerin başarılı bir şekilde entegrasyonu nedeniyle mükemmel bir depolama kararlılığı elde edilmiştir (iki haftadan fazla tekrar tekrar kullanılmıştır) [55]. Fosfat biyosensör çalışmaları hala sınırlı sayıdadır ve piyasada hala ticari fosfat biyosensör eksikliği bulunmaktadır [2]. Pratik uygulamalarda birçoğu düşük kullanım ömrüne ve kararlılığa sahipken, tespit limiti ve hassasiyet açısından hala geride kalmaktadırlar.

### 5.7 ZONGULDAK İLİ ÜZÜLMEZ VE KOZLU DERELERİNDE FOSFAT ÖLÇÜMÜ

Yüzeysel su kaynakları, Türkiye'deki kalitelerine göre dört sınıfa ayrılmaktadır ve her bir sınıftaki toplam fosfor sınır değerleri aşağıdaki gibidir: <0.05 mg L<sup>-1</sup> (1. kalite), 0.16 mg L<sup>-1</sup>

(2. kalite), 0.65 mg L<sup>-1</sup> (3. kalite) ve > 0.65 mg L<sup>-1</sup> (4. kalite) [23]. Çevre Koruma Ajansı (EPA) aşağıdaki tavsiyelerde bulunur: toplam fosfat bir nehrin, göle veya rezervuara girdiği bir noktada 0.05 mg / L'yi (fosfor olarak), göl veya rezervuarlarla sonlanmayan nehirlerde ise 0.1 mg / L'yi geçmemelidir [84]. Ek olarak, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), içme suyunda maksimum fosfat konsantrasyonunun 1 mg/L'yi geçmemesi gerektiğini önermektedir. Bu bakımdan, fosfat konsantrasyonu izin verilen seviyeyi aşmamalı ve ekolojik yaşam ve insanlar için düzenli olarak kontrol edilmelidir.

Zonguldak İlinin Üzülmez ve Kozlu derelerinde, dere örneklerinin fosfat iyonu konsantrasyonları, tasarlanan biyosensör ile art arda üçer defa ölçülmüş ve sonuçlar, standart metod sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Standart metoduyla elde edilen fosfat kalibrasyon eğrisi Şekil 5.18'de verilmiştir. Üzülmez deresinden alınan örneklerde biyosensör ile 3 defa fosfat analizi yapılarak bulunan konsantrasyonun 3 mg/L olduğu tespit edilmiştir. Üzülmez deresinin fosfat konsantrasyonu, standart metoduyla 3.3 mg/L bulunmuştur. Biyosensör, dere suyundaki fosfatı %91'lik bir ölçüm doğruluğuyla tespit edebilmiştir. Biyosensör ile Kozlu deresinde fosfat tespit edilememiştir. Bu sonuç şaşırtıcı değildir. Çünkü standart metod ile de Kozlu deresinin fosfat konsantrasyonu 0 bulunmuştur. Kozlu deresinin fosfat konsantrasyonunun, her iki ölçüm yönteminin de tespit edemediği konsantrasyon seviyesinin altında olduğu açıktır. Üzülmez deresi, Zonguldak il merkezinin Karadeniz kıyılarında, Kozlu Deresi ise şehir merkezine 10 km uzaklıktaki Kozlu ilçesinden akarak Kozlu sahilinde son bulur. Özellikle, Üzülmez deresi tarım alanlarından ve çoğunlukla şehir sokaklarından akarak ilerler, dereye bir bulanıklık vardır ve zaman zaman koku hissedilir. Kozlu deresi ise merkeze göre nispeten az nüfuslu ilçeden akar ve gözle görünür kirliliği yoktur. Akarsularda en yaygın fosfor bileşiğinin, yaşayan ve çürüyen bitki veya hayvan kalıntılarında, çökeltilerden, topraklardan, atık sudan, gübrelerden, deterjanlardan ve kayalardan salınan ortofosfat olduğu bilinmektedir [1,85-86]. Üzülmez deresindeki yüksek fosfat konsantrasyonunun sebebi olarak derenin, şehir merkezinin içinden akması ve şehir merkezindeki tüm antropojenik aktivitelere maruz kalması gösterilebilir.



**Şekil 5.18** Standart Kalay Klorür metodu ile hazırlanan fosfat kalibrasyon eğrisi.



## BÖLÜM 6

### SONUÇLAR

Bu tezde, ikili enzim kombinasyonu yerine sadece enzim *piruvat oksidaz* kullanılarak [Poli (Py-ko-PyCOOH)] kaplı altın elektrot bazlı bir biyosensör tasarlanmıştır. Biyosensörün algılama kabiliyetinin performansı, kofaktör/ kosubstrat konsantrasyonlarını, polimerik film yoğunluğunu ve pH'ı optimize ederek geliştirilmiştir. Biyosensör, DPV tekniği ile fosfat iyon konsantrasyonunu 5 mM konsantrasyona kadar kesin olarak -0.15 V'da ölçmüştür. Akımlar, -0.15 V'da artan fosfat konsantrasyonları ile orantılı olarak değişmiştir. Fosfat ölçümleri, pH 7'de 1 mM Mg<sup>+2</sup>, 50 µM TPP, 5 µM FAD ve 0.5 mM piruvat varlığı ile sağlıklı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Biyosensör başarılı bir şekilde, uygun analitik parametreler sergileyerek, 0.05 mM ile 5 mM arasında değişen geniş bir doğrusal ölçüm aralığına sahip olmuştur. Art arda yapılan 7 ayrı ölçümde, ölçümler arası relatif standart sapma (RSD) değerinin % 0.07 olduğu belirlenmiştir. Biyosensörün tespit limiti (LOD) 13.3 µM ve ölçüm hassasiyeti 5.4 µA/mM.cm<sup>2</sup> olarak bulunmuştur. Optimize edilmiş biyosensör performansı Zonguldak İlinde Üzülmez ve Kozlu derelerinden alınan su örnekleri ile test edilmiştir. Fosfat konsantrasyonu Üzülmez Deresi'nde 3 mg/L olarak ölçülürken, Kozlu Deresi'nde tasarlanan biyosensör ile fosfat tespit edilmemiştir. Alınan yüzeysel su örneklerinin fosfat konsantrasyonu standart fosfat ölçüm metodu olan Kalay Klorür yöntemiyle de ölçülmüştür. Kalay Klorür yönteminin sonuçlarına göre Üzülmez deresi fosfat konsantrasyonu 3.3 mg/L, Kozlu deresi fosfat konsantrasyonu ise 0 mg/L bulunmuştur. Sonuçlara göre biyosensör dere suyu örneklerindeki fosfat konsantrasyonunu % 91 doğruluk oranıyla belirleyebilmiştir. Ayrıca biyosensörün, 30 günlük kullanım süresince ilk günlük sinyalinin %50'sini koruduğu anlaşılmıştır. Tasarlanan biyosensörün, yüzeysel sulara fosfat konsantrasyonunun tespiti için kolay ve güvenilir bir şekilde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Deneysel sonuçlara göre, fosfatın enzimatik olarak etkileşimi sonucu üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin elektrot yüzeyindeki elektrokimyasal davranışı belirlenerek, fosfat biyosensörlerinin anlamlı sinyal verdiği net potansiyel değeri literatüre ilk kez kazandırılmıştır.





## KAYNAKLAR

- [1] **Fadiran A O, Dlamini S C and Mavuso A** (2008) A Comparative Study of The Phosphate Levels in Some Surface and Ground Water Bodies of Swaziland. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia* 22(2) : 197-206.
- [2] **Upadhyay L S B and Verma N** (2015) Recent Advances in Phosphate Biosensors. *Biotechnology Letters*, 37(7): 1335–1345.
- [3] **Cui J, Ogabiela E E, Hui J, Wang Y, Zhang Y, Tong L, Zhang J, Adeloju S B, Zhang X and Wu Y** (2015) Electrochemical Biosensor based on Pt/Au Alloy Nanowire Arrays for Phosphate Detection. *Journal of The Electrochemical Society*, 162(3): B62–B67.
- [4] **Rahman Md A, Park D S, Chang S C, McNeil C J and Shim Y B** (2006) The Biosensor based on The Pyruvate Oxidase Modified Conducting Polymer for Phosphate Ions Determinations. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(7): 1116–1124.
- [5] **Lawal A T and Adeloju S B** (2013b) Progress and Recent Advances In Phosphate Sensors: A Review. *Talanta*, 114: 191–203.
- [6] **Ogabiela E and Adeloju S B** (2014) A Potentiometric Phosphate Biosensor based on Entrapment of Pyruvate Oxidase in A Polypyrrole Film. *Analytical Methods*, 6(14): 5290–5297.
- [7] **Zhang Z, Jaffrezic-Renault N, Bessueille F, Leonard D, Xia S, Wang X, Chen L and Zhao J** (2008) Development of a Conductometric Phosphate Biosensor based on Trilayer Maltose Phosphorylase Composite Films. *Analytica Chimica Acta*, 615(1): 73–79.
- [8] **Kinoshita H, Yoshida D, Miki K, Usui Tand Ikeda T** (1995) An Amperometric-Enzymatic Method for Assays of Inorganic Phosphate and Adenosine Deaminase in Serum based on The Measurement of Uric Acid with a Dialysis Membrane-Covered Carbon Electrode. *Analytica Chimica Acta*, 303(2-3): 301–307.
- [9] **Kulys J, Higgins I J and Bannister J V** (1992) Amperometric Dertermination of Phosphate Ions by Biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 7: 187–191.
- [10] **T T NGO** (1986) Single-Enzyme-Based Amperometric Assay For Phosphate Ion. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 13(2): 127-131.
- [11] **Adeloju S B and Lawal A T** (2011) Fabrication of a Bilayer Potentiometric Phosphate Biosensor by Cross-Link Immobilization With Bovine Serum Albumin and Glutaraldehyde. *Analytica Chimica Acta*, 691(1-2), 89–94.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [12] **Lawal A T and Adeloju S B** (2013a) Polypyrrole Based Amperometric and Potentiometric phosphate Biosensors: A Comparative Study B. *Biosensors and Bioelectronics*, 40(1): 377–384.
- [13] **Mousty C, Cosnier S, Shan D and Mu S** (2001) Trienzymatic Biosensor for The Determination of İnorganic Phosphate. *Analytica Chimica Acta*, 443(201):1–8.
- [14] **Fernández J J, López J R, Correig X and Katakis I** (1998) Reagentless Carbon Paste Phosphate Biosensors: Preliminary Studies. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 47(1-3): 13–20.
- [15] **Gavalas V G and Chaniotakis N A** (2001) Phosphate Biosensor based on Polyelectrolytestabilized Pyruvate Oxidase. *Analytica Chimica Acta*, 427(2): 271–277.
- [16] **Kwan R C H, Leung H F, Hon P Y T, Cheung H C F, Hirota K and Renneberg R** (2005) A Screen-Printed Biosensor Using Pyruvate Oxidase for Rapid Determination of Phosphate in Synthetic Wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(4):377-383.
- [17] **Sedewitz B, Schleifer K H and Götz F** (1984) Purification and Biochemical Characterization of Pyruvate Oxidase From *Lactobacillus Plantarum*. *Journal of Bacteriology*, 160(1): 273–278.
- [18] **Halıcı Z** (2016) Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyon Yöntemiyle Fosfat Giderimi. *Yüksek Lisans Tezi*, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul, 126 s.
- [19] **Berker E** (2009) Fosfat Kimyası, Kullanılış Alanları ve Süperfosfat. *Bilimsel Madencilik Dergisi*, 11(4): 59-62.
- [20] **Yalvaç C M** (2002) Mikrofiltrasyonla Uçucu Kül Kullanılarak Atıksulardan Fosfat Giderimi. *Yüksek Lisans Tezi*, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Erzurum, 105 s.
- [21] **Solak M** (2013) Kesikli ve Sürekli Elektrokoagülasyon Prosesleri ile Atıksulardan Fosfat Giderimi ve Prosesin Optimizasyonu. *Doktora Tezi*, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Isparta, 191 s.
- [22] **URL-1** <<https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2019/07/20190706-8.htm>>, Ziyaret Tarihi: 19.10.2019.
- [23] **URL-2** <<https://www.mevzuat.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=7.5.7221&source%20XmlSearch=&MevzuatIliski=0>>, Ziyaret Tarihi: 20.10.2019.
- [24] **Çetin P** (2013) İçme Sularından Fosfor Giderimi İçin Yeni Bir Yöntem Geliştirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul, 79 s.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [25] **Yeşiltaş H K** (2015) Çift Katmanlı Hidroksitler ile Fosfor Gideriminin Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana, 119 s.
- [26] **URL-3** <<https://www.wikizero.com/tr/%C3%96trofikasyon>> Ziyaret Tarihi: 21.10.2019.
- [27] **URL-4** <<http://kaskolektiv.net/2018/07/otrofikasyon/>> Ziyaret Tarihi: 21.10.2019.
- [28] **URL-5** <<https://cevre.erciyes.edu.tr/upload/KLMJMW86-fosfor-2013.pdf>> Ziyaret Tarihi: 24.10.2019.
- [29] **Gilbert L, Jenkins A T A, Browning S and Hart J P** (2011) Development of an Amperometric, Screen-Printed, Single-Enzyme Phosphate İon Biosensor and its Application To The Analysis of Biomedical and Environmental Samples. *Sensors and Actuators B: Chemical* 160(1): 1322–1327.
- [30] **Baird R B and Eaton A D** (2017) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 23th edition, ISBN: 9780875532875, American Public Health Association, Washington DC, 1496.
- [31] **Yalvaç M M** (2010) Amperometrik Fenol Biyosensörlerinin Geliştirilmesi. *Doktora Tezi*, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul, 125 s.
- [32] **Yücel A** (2013) Çoklu Enzim Esaslı Biyosensör Geliştirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Edirne, 66 s.
- [33] **Baş S Z** (2011) Ksantin Tayini İçin Amperometrik Enzim Elektrotlarının Geliştirilmesi. *Doktora Tezi*, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Konya, 148 s.
- [34] **Yarar S** (2014) Lizin Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu. *Doktora Tezi*, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul, 78 s.
- [35] **Önay A** (2013) Nanopartikül Tabanlı Yeni Elektrot ve Elektrokimyasal Tayin Stratejilerinin Geliştirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 105 s.
- [36] **Aydın Y** (2012) İletken Polimerlerin İçerisinde Enzim Tutuklamasıyla Yapılan Biyosensörler. *Yüksek Lisans Tezi*, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Karaman, 80 s.
- [37] **Erdoğan Z Ö** (2013) Ürik Asit Tayini İçin Nanopartikül Temelli Biyosensörler Hazırlanması. *Yüksek Lisans Tezi*, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Konya, 70 s.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [38] **Erdem C** (2012) Glukoz Tayini İçin Nikel Oksit Modifiye Karbon Pasta Elektrotların Hazırlanması. *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 97 s.
- [39] **Yüce M** (2011) Bazı Ağır Metallerin Tayininde Kullanılmak Üzere Mikrobiyal Biyosensör Geliştirilmesi. *Doktora Tezi*, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara, 128 s.
- [40] **Tok M** (2014) Bazı Kinonik Yapıların Karbon Elektrot Yüzeylerin Modifikasyonunda Kullanılması ve Hazırlanan Modifiye Yüzeylerde Nanopartikül Etkisi ve Uygulama Alanlarının Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Konya, 101 s.
- [41] **Özöner Ş** (2010) Horseradish Peroxidase Enzimi Kullanılarak Amperometrik Fenol Biyosensörlerinin Geliştirilmesi. *Doktora Tezi*, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Gebze, 219 s.
- [42] **Gökdoğan Ö** (2011) Lisin Tayini İçin Yeni Amperometrik Biyosensörlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu. *Doktora Tezi*, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Konya, 135 s.
- [43] **Bağrıyanık D B** (2011) Potansiyometrik Esaslı Glutamin Biyosensörü Tasarlanması ve Karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul, 105 s.
- [44] **Lee H J and Karim M N** (2013) Amperometric Phenol Biosensor based on Covalent Immobilization of Tyrosinase on Au Nanoparticle Modified Screen Printed Carbon Electrodes. *Talanta*, 116(2013): 991–996.
- [45] **Çevik E, Şenel M, Baykal A ve Abasıyanık M F** (2012) A Novel Amperometric Phenol Biosensor based on Immobilized HRP on Poly(Glycidylmethacrylate)-Grafted Iron Oxide Nanoparticles for The Determination of Phenol Derivatives. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 173(2012): 396-405.
- [46] **Dempsey E, Diamond D and Collier A** (2004) Development of a Biosensor for Endocrine Disrupting Compounds based on Tyrosinase Entrapped Within a Poly (Thionine) Film. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(2004): 367–377.
- [47] **Boussema F, Haddad R, Ghandour Y, Belkhiria M S, Holzinger M, Maaref A and Cosnier S** (2016) Polyoxometalate [PMo<sub>11</sub>O<sub>39</sub>]<sup>7-</sup>/Carbon Nanocomposites for Sensitive Amperometric Detection of Nitrite. *Electrochimica Acta*, 222(2016):402–408.
- [48] **Nistor C, Rose A, Farre N, Stoica L, Wollenberger U, Ruzgas T, Pfeiffer D, Barcelo D, Gorton L and Emneus J** (2001) In-Field Monitoring of Cleaning Efficiency in Waste Water Treatment Plants Using Two Phenol-Sensitive Biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 456(2002):3–17.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [49] **Xuejiang W, Dzyadevych S V, Chovelon J M, Renault N F, Ling C, Siqing X and ianfu Z** (2005) Conductometric Nitrate Biosensor based on Methyl Viologen/Nafion/Nitrate Reductase Interdigitated Electrodes. *Talanta*, 69(2006):450–455.
- [50] **Can F, Ozoner S, Ergenekon P ve Erhan E** (2011) Amperometric Nitrate Biosensor based on Carbon Nanotube/Polypyrrole/Nitrate Reductase Biofilm Electrode. *Materials Science and Engineering C*, 32(2012):18–23.
- [51] **Haldorai Y, Hwang S K, Gopalan A I, Huh Y S, Han Y K, Voit W, Sai-Anand G and Lee K P** (2015) Direct Electrochemistry of Cytochrome C Immobilized on Titanium Nitride/Multi-Walled Carbon Nanotube Composite for Amperometric Nitrite Biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 79(2016):543–552.
- [52] **Dağcı K ve Alanyalıoğlu M** (2013) Electrochemical Preparation of Polymeric Films of Pyronin Y and Its Electrocatalytic Properties for Amperometric Detection of Nitrite. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 711(2013):17–24.
- [53] **Kwan R C H, Leung H F, Hon P Y T, Cheung H C F, Hirota K and Renneberg R** (2005) Amperometric Biosensor for Determining Human Salivary Phosphate. *Analytical Biochemistry*, 343(2): 263–267.
- [54] **Ikebukuro K, Nishida R, Yamamoto H, Arikawa Y, Nakamura H, Suzuki M, Kubo I, Takeuchi T and Karube I** (1996) A Novel Biosensor System for The Determination of Phosphate. *Journal of Biotechnology*, 48(1996):67–72.
- [55] **Ogabiela E, Adeloju S B, Cui J, Wu Y and Chen W** (2015). A Novel Ultrasensitive Phosphate Amperometric Nanobiosensor Based On The İntegration Of Pyruvate Oxidase With Highly Ordered Gold Nanowires Array. *Biosensors and Bioelectronics*,71(2015):278–285.
- [56] **Gajovic N, Habermüller K, Warsinke A, Schuhmann W and Scheller F W** (1999) A Pyruvate Oxidase Electrode Based on an Electrochemically Deposited Redox Polymer. *Electroanalysis*, 11(18):1377–1383.
- [57] **Lawal A T and Adeloju S B** (2010) Polypyrrole-based Potentiometric Phosphate Biosensor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63(2010):45–49.
- [58] **Vieira E C and Nogueira A R A** (2004) Orthophosphate, Phytate, and Total Phosphorus Determination in Cereals by Flow Injection Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7):1800-1803.
- [59] **Luque de Castro M D, Quiles R, Fernandez-Romero J M and Fernandez E** (1995) Continuous-Flow Assay With Immobilized Enzymes for Determining of Inorganic Phosphate in Serum. *Clinical Chemistry*, 41(1): 99-102.
- [60] **Mak W C, Chan C, Barford J and Renneberg R** (2003) Biosensor for rapid phosphate monitoring in a sequencing batch reactor (SBR) system *Biosensors and Bioelectronics*, 19(3):233-237.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [61] **Fischer L M, Tenje M, Heiskanen A R, Masuda N, Castillo J, Bentien A, Émneus J, Jakobsen M H and Boisen A** (2009) Gold Cleaning Methods for Electrochemical Detection Applications. *Microelectronic Engineering*, 86(4-6):1282–1285.
- [62] **Foschini M, Marletta A, Faria R C, Leonard D, Bessueille F, Jaffrezic-Renault N and Gonçalves D** (2013) Electrochemically Prepared Polypyrrole-2-Carboxylic Acid Films: Synthesis Protocols and Studies on Biosensors *Electroanalysis*, 25(3):741-749.
- [63] **Kausaite-Minkstimiene A, Ramanaviciene A, Simanaityte R, Gabrielaitis D, Glumbokaite L and Ramanavicius A** (2015) Evaluation of Poly(Pyrrole-2-Carboxylic Acid) Particles Synthesized By Enzymatic Catalysis. *RSC Advances*, 5(127):105475–105483.
- [64] **Lü Q-F, Li X-G and Huang M-R** (2010) Facile Preparation And Characterization Of Copolymer Nanoparticles From Pyrrole and Aniline-2-Sulfonic Acid. *Microchimica Acta*, , 171(3-4):341–347.
- [65] **Martins N C T, Moura e Silva T, Montemora M F, Fernandes J C S and Ferreira M G S** (2008) Electrodeposition and Characterization of Polypyrrole Films on Aluminium Alloy 6061-T6. *Electrochimica Acta*, 53(14):4754–4763.
- [66] **Tittmann K, Proske D, Spinka M, Ghisla S, Rudolph R, Hübner G and Kern G** (1998) Activation of Thiamin Diphosphate and FAD in the Phosphate dependent Pyruvate Oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Biological Chemistry*, 273:12929–12934.
- [67] **Gilbert L, Browning S, Jenkins A T A and Hart J P** (2010) Studies Towards An Amperometric Phosphate Ion Biosensor for Urine and Water Analysis. *Microchimica Acta*, 170(3-4):331–336.
- [68] **Norouzi P, Pirali-Hamedani M, Faridbod F and Ganjali M R** (2010) Flow Injection Phosphate Biosensor Based On Pyox-Mwcnts Film On A Glassy Carbon Electrode Using FFT Continuous Cyclic Voltammetry. *International Journal of Electrochemical Science*, 5(9):1225 - 1235.
- [69] **Karthikeyan R and Berchmans S** (2013) Inorganic-Organic Composite Matrix for the Enzymatic Detection of Phosphate in Food Samples. *Journal of the Electrochemical Society*, 160(6), B73–B77.
- [70] **Brown A P and Anson F C** (1977) Cyclic and Differential Pulse Voltammetric Behavior of Reactants Confined to The Electrode Surface. *Analytical Chemistry*, 49(11):1589–1595.
- [71] **Korkut S, Uzuncar S, Kilic M S ve Hazer B** (2019) Electrochemical Determination of Urea Using a Gold Nanoparticle-Copolymer Coated-Enzyme Modified Gold Electrode. *Instrumentation Science & Technology*. 47(1):1–18.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [72] **Chen C, Hong X, Xu T, Chen A, Lu L and Gao Y** (2016) Hydrogen Peroxide Biosensor based on The Immobilization of Horseradish Peroxidase Onto a Poly(Aniline-Co-Nmethylthionine) Film. *Synthetic Metals*, 212:123–130.
- [73] **Jia N, Xu J, Sun M and Jiang Z** (2005) A Mediatorless Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Horseradish Peroxidase Immobilized in Tin Oxide Sol- Gel Film. *Analytical Letters*, 38(8):1237–1248.
- [74] **Wang H-S, Pan Q-X and Wang G-X** (2005) A Biosensor based on Immobilization of Horseradish Peroxidase In Chitosan Matrix Cross-Linked With Glyoxal For Amperometric Determination of Hydrogen Peroxide. *Sensors* 5(4):266–276.
- [75] **Ahmad R, Ahn M S and Hahn Y B** (2017) ZnO Nanorods Array Based Field-Effect Transistor Biosensor for Phosphate. *Journal of Colloid and Interface Science*, 498(2017):292–297.
- [76] **Shin M-C, Yoon H C and Kim H-S** (1996) Experimental and Theoretical Analyses on Factors Affecting the Performance of Polypyrrole/Glucose Oxidase Biosensor: Permeability Aspect of Polypyrrole Film. *Analytical Sciences*, 12(4):597–604.
- [77] **Kilic M S, Korkut S and Hazer B** (2015) A Novel Poly(Propylene-Co-İmidazole) Based Biofuel Cell: System Optimization and Operation For Energy Generation. *Materials Science and Engineering: C*, 47(1):165–171.
- [78] **Kilic M S, Korkut S, Hazer B and Erhan E** (2014) Development and Operation of Gold and Cobalt Oxide Nanoparticles Containing Polypropylene Based Enzymatic Fuel Cell for Renewable Fuels. *Biosensors and Bioelectronics*, 61:500–505.
- [79] **Korkut S and Kilic, M.S** (2016) Power İmprovement Of Enzymatic Fuel Cells Used For Sustainable Energy Generation. *Environmental Progress Sustainable Energy* 35(3):859–866.
- [80] **Yaqoob M, Anwar M and Nabi A** (2005) Determination of Phosphate in Freshwaters by Flow Injection With Immobilized Enzyme and Chemiluminescence Detection. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 85(7):451-459.
- [81] **Upadhyay L S B and Verma N** (2015) Alkaline phosphatase inhibition based conductometric biosensor for phosphate estimation in biological fluids. *Biosensors and Bioelectronics*, 68:611–616.
- [82] **Ghica M E and Brett C M A** (2006) Development of Novel Glucose and Pyruvate Biosensors at Poly (Neutral Red) Modified Carbon Film Electrodes. Application to Natural Samples. *Electroanalysis*, 18(8):748–756.
- [83] **Lawal A T and Adeloju S B** (2012) Polipyrrole Based Amperometric and Potentiometric Phosphate Biosensors A: Comparative Study. *Journal of Applied Sciences*, 12(4):315-325.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [84] **URL-6** <<https://pubs.usgs.gov/circ/circ1136/circ1136.html>> Ziyaret Tarihi: 20.09.2019.
- [85] **Nolan B T and Stoner J D** (2000) Nutrients in Groundwaters of the Conterminous United States, 1992–1995. *Environmental Science & Technology*, 34(7):1156–1165.
- [86] **Manahan S E** (2009) *Environmental Chemistry*. 9th edition, ISBN: 1420059203 CRC Press, Florida, 783.





## ÖZGEÇMİŞ

Saliha GÖL, 1994 yılında ORDU ilinde doğdu. İlk ve orta öğretimini Hamdullah Suphi Tanrıöver İlköğretim okulunda tamamladı. 2008 yılında başladığı lise eğitimini 2012 yılında Ordu Lisesi'nde tamamladı. 2012-2017 yılları arasında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü'nde lisans eğitimini tamamladı. 2017 yılında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

### **İLETİŞİM BİLGİLERİ:**

E-posta: salihagll@hotmail.com