

**FARKLI NANOPARTİKÜLLER KULLANILARAK
BAKTERİ TAYİNİNE YÖNELİK GRADIENT YÖNTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF GRADIENT METHOD
USING DIFFERENT NANOPARTICLES FOR BACTERIA
DETECTION**

DİDEM RODOPLU


Prof. Dr. İSMAİL HAKKI BOYACI
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2018

DİDEM RODOPLU'nun hazırladığı "FARKLI NANOPARTİKÜLLER KULLANILARAK BAKTERİ TAYİNİNE YÖNELİK GRADİENT YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

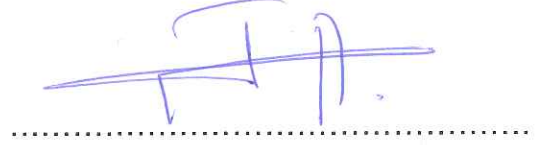
Prof. Dr. Necdet SAĞLAM
Başkan



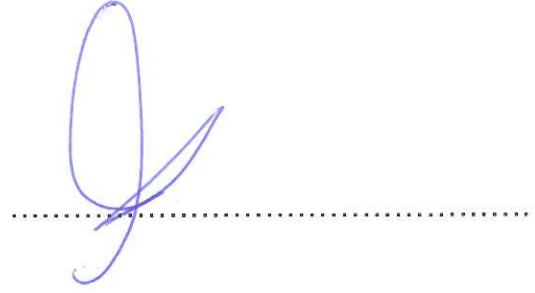
Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI
Danışman



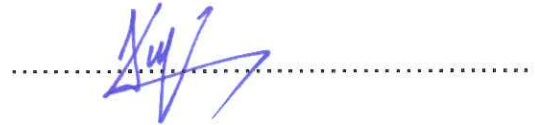
Prof. Dr. Uğur TAMER
Üye



Doç. Dr. Dilek ÇÖKELİLER
SERDAROĞLU
Üye



Dr. Öğr. Ü. F. Ceyda DUDAK ŞEKER
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



"Hayat ne kadar zor görünürse görünsün, daima yapabileceğiniz ve başaracağınız bir şey vardır. Önemli olan vazgeçmemeniz."

Stephen Hawking

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin / raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “ **Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren Ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

05/09/2018

Didem RODOPLU

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. Şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü ve fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7. 2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak belirttiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

05.09.2018



Didem Rodoplu

ÖZET

FARKLI NANOPARTİKÜLLER KULLANILARAK BAKTERİ TAYİNİNE YÖNELİK GRADİENT YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

Didem RODOPLU

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

Eylül 2018, 144 Sayfa

Günümüzde etiketsiz, kolay uygulanabilen, düşük maliyetli ve kısa sürede sonuç veren analiz yöntemlerinin geliştirilmesi büyük önem kazanmıştır. Bu çalışmada patojenik bakteri tayinine yönelik olarak, kolay uygulanabilir ve düşük maliyetli olan nanopartikül temelli yoğunluk gradient yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, immünolojik etkileşim sonrası bağlanmayan bakteriler, bakteri yakalayan nanopartiküller ve bakteriye bağlanmadan kalan nanopartikül-antibadi çiftleri yoğunluklarına ve boyutlarına bağlı olarak yoğunluk gradienti içerisinde farklı fazlarda toplanmıştır. Fazların optik yoğunluk değişimlerin takibi için basit ve düşük maliyetli bir optik düzenek kullanılmış, veriler MatLab yazılımı ile grafiksel olarak bilgisayarda işlenmiştir.

Biyoanaliz yöntemlerinde sıklıkla kullanılan nanopartiküllerden; altın nanopartiküller, manyetik nanopartiküller, kuantum noktalar ve karbon nanokürelerin kullanımıyla sükröz gradientinde bakteri-partikül bandı oluşumu ve bant değişimlerinin detaylı olarak anlaşılması için ön çalışmalar yapılmıştır. Nanopartikül ve bakteri-nanopartikül fazlarının incelenmesi için bölgesel santrifüj prensibinin kullanılması uygun bulunmuştur. Partikül hacmi, tek faz ve iki faz gradient etkisi, çözelti konsantrasyonları ve hacmi, tampon çözeltinin etkisi gibi band oluşumunu etkileyen gradient parametreleri ayrı ayrı incelenmiştir.

Nanopartiküllerin karakterizasyonu için TEM ve UV-Vis spektroskopisi kullanılmıştır. Ayrıca kuantum noktaların karakterizasyonu için floresans spektroskopisi, karbon nanokürelerin yüzey karakterizasyonu için FTIR-ATR kullanılmıştır. Gradientteki bantlardan çekilen örneklerden katı besiyerinde koloni sayımı yapılmış, partiküllerin hedefe özgü olan ve olmayan etkileşimlerde bakteri bağlama verimlilikleri hesaplanmıştır.

Hedefe özgü olmayan etkileşimlerde bakteri miktarına bağlı olarak, kuantum nokta bantlarının göç mesafeleri ve CNP bantlarının alt sınır değerlerinin değişimi takip edilmiştir. Hedefe özgü etkileşimlerde ise bakteri-NP fazlarının ortalama optik yoğunluk değerinde bakteri miktarıyla orantılı değişim görülmüştür. Sistem CNPler ile kalibre edildikten sonra gerçek örneklerde analiz için hazır hale gelmiştir. Geliştirilen yöntem ile sütte *Escherichia coli* tayini yapılmıştır. Yöntemin tespit limiti ve tayin limiti sırasıyla 8 ve 28 kob/ml olarak belirlenmiştir. *Enterobacter aerogenes* çalışmalarıyla yönteminin seçiciliği ispatlanmıştır.

Sonuç olarak, hemen her laboratuvarında kolaylıkla bulunan santrifüj cihazı ve cep telefonu kamerası kullanılarak basit bir düzencele, hızlı ve hassas bakteri teşhisi yapılabileceği gösterilmiştir. Patojenik bakteri teşhisi için bakteri-NP faz takibine dayanan bu yöntem literatürdeki santrifüj çalışmalarına da yenilikçi bir yaklaşım getirmiştir. Geliştirilen bu yöntem; düşük maliyetli oluşu, kolay uygulanabilmesi, işlem basamaklarını azaltarak kısa sürede sonuç verebilmesi nedeniyle literatürdeki yöntemlere alternatif oluşturmuştur.

Anahtar Kelimeler: Yoğunluk gradient, santrifüj, *E. coli*, uygun maliyetli, bakteri tayini, nanopartikül

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF GRADIENT METHOD USING DIFFERENT NANOPARTICLES FOR BACTERIA DETECTION

Didem RODOPLU

Ph.D., Division of Nanotechnology and Nanomedicine

Supervisor: Prof. Dr. Ismail Hakki BOYACI

September 2018, 144 Pages

Nowadays, development of label-free, easy handling, cost-effective and fast responsive analysis methods have gained great importance. In this study, it was aimed to develop an easy handling and cost-effective nanoparticle based density gradient method intended for the pathogenic bacteria detection. To this end, unbound bacteria, bacteria captured nanoparticles and unbound nanoparticle-antibody conjugates after immunological interaction were collected depending on their density and size through the sucrose density gradient. A simple and low-cost optical system was used to measure optic density variation of the phases, and the data was processed graphically on the computer with MatLab software.

Gold nanoparticles, magnetic nanoparticles, semiconductor quantum dots and CNP, which are commonly used nanoparticles in bioassays, were utilized in the preliminary studies of density gradient centrifugation to understand the formation and shift of bacteria-particle bands in detail. Utilizing the principle of rate-zonal centrifugation was found eligible for the investigation of nanoparticle and bacteria-nanoparticle phases. The gradient parameters affecting the bacteria-particle band formation such as volume of particle solution, effect of single phase and two phase gradient, concentrations and volumes of sucrose solutions, effect of buffer solutions were investigated respectively. TEM and UV-Vis spectroscopy were

used for the characterization of the nanoparticles. Fluorescence spectroscopy was used for characterization of quantum dots and FTIR-ATR was used for surface characterization of CNP. In solid media, single colonies were counted from the samples taken from gradient bands, and bacterial binding efficiencies were calculated for particle-specific and non-target interactions.

It was seen that the migration distance of quantum dot bands and dispersion of carbon sphere phases displayed differences with respect to the change in bacteria amount in the sucrose gradient. This system was calibrated with CNPs to be prepared for real sample analysis. The detection and quantification of *Escherichia coli* in skimmed milk were examined by the developed method. The limit of determination and limit of quantitation was determined as 8 and 28 cfu/ml, respectively. The selectivity of the method has been proven with *Enterobacter aerogenes* studies.

As a result, it was demonstrated that rapid and sensitive bacteriological diagnosis can be performed with an easy set-up using a centrifuge and a mobile phone camera, which are easily found in almost every laboratory. The developed method that based on bacteria-NP phases for the pathogenic bacteria detection has also provided an innovative approach to centrifugation studies in the literature. In addition to this, due to cost-effective, easy handling, and having shortest response time by reducing the steps of the process; this method has become an alternative to the analysis methods in the literature.

Keywords: Density gradient, centrifugation, *E. coli*, cost-effective, bacteria detection, nanoparticle

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım süresince her an beni dinleyen ve yardımlarını esirgemeyen, laboratuvar imkânlarını sonuna kadar sunan, gerek akademik kariyerimde gerekse iş hayatımda başarılı olabilmem için bilgi ve deneyimlerini samimiyetle aktaran, çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı'ya,

Tezimin ilerlemesinde ve tamamlanmasında bilgi birikimi ve tecrübeleriyle bana her konuda destek olan, akademik kariyerim için beni teşvik eden değerli hocalarım, tez izleme komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Necdet Sağlam ve Sayın Prof. Dr. Uğur Tamer'e,

Nanopartikül ve bakteri karakterizasyonu için TEM ölçümleriyle tezime katkı sağlayan Gazi Üniversitesi öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Zekiye Suludere ve Sayın Prof. Dr. Demet Çetin'e,

Karbon nanopartiküllerin sentezi ile çalışmama katkı sağlayan Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi öğretim üyesi Prof Dr. Nurettin Şahiner'e,

Laboratuvar çalışmalarım için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, bakteriler konusunda bilgi ve tecrübeleri ile yanımda olan değerli arkadaşlarım Yük. Müh. Kübra Tayyarcan, Şefika Evran ve Dr. Esra Acar Soykut'a,

Tezimin başlangıç aşamasında her konuda destek olan, altın ve manyetik nanopartiküllerin sentezi ile katkı sağlayan Doç. Dr. Haslet Ekşi Koçak'a,

Tez süresince laboratuvarın gece ve haftasonu nöbetinde beni yalnız bırakmayan, bilgi birikimi ve içtenliğiyle bana destek olan Yük. Müh. Tuğba Tezcan'a,

Doktora çalışmalarım süresince gerek bilimsel bilgi birikimleriyle, gerekse samimi sohbetleriyle yanımda olan değerli arkadaşlarım Dr. Hüseyin Efe Geniş, Dr. Akif Göktuğ Bozkurt ve Dr. Burcu Güven'e,

Bana kattıkları değerler için ve tez süresince yanımda oldukları için; babam Kerim Rodoplu, annem Zehra Şenel Rodoplu, kardeşim Bahadır Rodoplu, kedim Suzi ve emeği geçen herkese en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Santrifüjle Partikülleri Çöktürme Prensipleri.....	3
2.1.1. Partiküllere Etki Eden Kuvvetler	3
2.1.2. Svedberg Katsayısının Hesaplanması	4
2.1.3. Partiküllerin Fiziksel Kararlılığı ve Çökme Özellikleri.....	7
2.1.4. Santrifüjde Kullanılan Rotor Çeşitleri ve RCF Hesaplaması.....	10
2.2. Santrifüjle Ayırma Teknikleri	12
2.2.1. Diferansiyel Santrifüjleme Tekniği	12
2.2.1.1. Zamana Bağlı Diferansiyel Santrifüjleme Tekniği	12
2.2.1.2. Diferansiyel Hız Santrifüjleme Tekniği	12
2.2.2. Yoğunluk Gradient Santrifüjleme Tekniği	13
2.2.2.1. Bölgesel Santrifüj Tekniği	13
2.2.2.2. Eş-Yoğunluk Santrifüj Tekniği.....	14
2.2.2.3. Kompakt Disk Santrifüj Tekniği	15
2.2.2.4. Yoğunluk Gradient için Kullanılan Kimyasallar	16
2.2.3. Karşıt-Akım Santrifüj Tekniği.....	17
2.3. Nanopartiküller ve Biyolojik Uygulamaları.....	18
2.3.1. Altın Nanopartiküller	18
2.3.2. Manyetik Nanopartiküller	19
2.3.3. Kuantum Noktalar.....	20
2.3.4. Karbon Nanopartiküller.....	21
2.4. Biyomolekül Takibi için Floresans Etiketleme	22
2.5. Hedefe Özgü Biyokimyasal Etkileşimler.....	22
2.6. Koliform Bakteriler ve Teşhis Yöntemleri	23

2.6.1. Mikroorganizma Sayım Yöntemleri.....	24
2.6.1.1. En Mükemmel Sayı Yöntemi	24
2.6.1.2. Katı Besiyeri Yöntemleri	24
2.6.1.3. Membran Filtrasyon Yöntemi.....	25
2.6.1.4. Hızlı Sayım Yöntemleri	25
3. MATERYAL VE METOT.....	28
3.1. Kimyasal Malzemelerin Hazırlanması	29
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	29
3.1.2. Tampon Çözeltilerin ve Stok Çözeltilerin Hazırlanması	29
3.1.2.1. MES Tamponu.....	30
3.1.2.2. Fosfat Tamponu	30
3.1.2.3. Fosfat-Tween 20 Tamponu.....	30
3.1.2.4. Asetat Tamponu	30
3.1.2.5. Floreskamin Stok Çözeltisinin Hazırlanması.....	30
3.2. Nanopartiküllerin Hazırlanması	30
3.2.1. Altın Nanopartiküllerin Hazırlanması	30
3.2.2. Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi.....	31
3.2.3. Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	31
3.2.4. Kitosan Kaplı CdTe Kuantum Noktaların Hazırlanması.....	32
3.2.5. Karbon Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	33
3.3. Partiküllerin Modifikasyon Basamakları	34
3.3.1. Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Floreskamin ile Modifikasyonu	34
3.3.2. Karboksil Gruplu Yüzeylerin Kimyasal Aktivasyonu	35
3.3.3. Bakteri-Nanopartikül Fazı Hazırlık Aşamaları.....	35
3.4. Bakteri Hazırlık ve Sayım Yöntemleri.....	37
3.4.1. Besiyerlerinin Hazırlanması.....	37
3.4.2. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması	37
3.4.3. Katı Besiyerinde Bakteri Sayımı	37
3.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Yöntemleri	38
3.5.1. UV-Vis Spektrofotometre ile NPLerin Karakterizasyonu.....	38
3.5.2. FTIR-ATR Spektrometresi ile CNP Yüzeyindeki Fonksiyonel Grupların Karakterizasyonu.....	38

3.5.3. Floresans Spektrofotometresi ile Kuantum Noktaların Karakterizasyonu	39
3.5.4. İşlemsiz ve Bakteri Yakalayan NPLerin TEM ile Görüntülenmesi.....	39
3.6. Yoğunluk Gradient Santrifüj İşleminin Hazırlıkları	39
3.6.1. Sükroz Gradientin Hazırlanması	39
3.6.2. Santrifüj İşlem Parametrelerinin Belirlenmesi	40
3.6.2.1. Açılı Rotor ile Yapılan Ön Çalışmalar.....	40
3.6.2.2. Yatay Rotor ile Yapılan Ön Çalışmalar	40
3.7. Yoğunluk Gradient Parametrelerinin İncelenmesi	42
3.7.1. Çözelti Ortamlarının NP Fazına Etkisi	42
3.7.2. Örnek Hacimlerinin NP Fazına Etkisi	42
3.7.3. PEG-Sükroz Tek ve Çift Fazlı Gradient Karşılaştırılması	42
3.8. Gradientte Bakteri-Partikül Fazının İncelenmesi.....	43
3.9. Optik Ölçüm Düzeneğinin Kurulumu ve Faz Analizi.....	44
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR	48
4.1. Partiküllerin Karakterizasyon Sonuçları	48
4.1.1. NPLerin UV-Vis Spektroskopisi ile Karakterizasyon Sonuçları	48
4.1.2. CNP Fonksiyonel Yüzeylerinin FTIR-ATR ile Karakterizasyon Sonuçları.....	52
4.1.3. Kuantum Noktaların Floresans Spektroskopisi Sonuçları.....	53
4.1.4. İşlemsiz ve Bakteri Yakalayan NPLerin TEM Sonuçları	57
4.1.4.1. Gümüş Nanopartiküllerin TEM Görüntüleri	57
4.1.4.2. Altın Nanopartiküllerin TEM Görüntüleri	58
4.1.4.3. Manyetik Nanopartiküllerin TEM Görüntüleri	58
4.1.4.4. Kuantum Noktaların TEM Görüntüleri.....	59
4.1.4.5. Karbon Nanopartiküllerin TEM görüntüleri.....	62
4.2. Gradient Santrifüj Parametrelerinin Optimizasyonu	65
4.2.1. Gradient Santrifüj ile Partikül Fazının İncelenmesi	66
4.2.2. Açılı Rotor ile Zamana Bağlı Santrifüj Sonuçları	67
4.2.3. Yatay Rotor ile Gradientte Partikül Fazının İncelenmesi	69
4.2.3.1. Altın Nanopartiküller ile Elde Edilen Sonuçlar.....	69
4.2.3.2. Gümüş Nanopartiküller ile Elde Edilen Sonuçlar	72
4.2.3.3. Manyetik Nanopartiküller ile Elde Edilen Sonuçlar	74

4.2.3.4. Nanopartiküllerin Hidrodinamik Davranışlarının Karşılaştırılması.....	74
4.2.3.4. Kuantum Noktalar ile Ön Çalışma Sonuçları	77
4.2.3.5. CNPler ile Ön Çalışma Sonuçları	78
4.3. Gradient Parametrelerinin Optimizasyonu	79
4.3.1. Altın Kaplı Demiroksit Nanopartiküller ile Gradient Parametrelerinin Belirlenmesi	79
4.3.1.1. Farklı Kütledeki Manyetik Çekirdek ile Elde Edilen Sonuçlar.....	79
4.3.1.2. Farklı Çözelti Ortamlarındaki Manyetik NPlerle Elde Edilen Sonuçlar	80
4.3.1.3. Tek ve Çift Fazlı Gradientlerle Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması.....	82
4.3.1.4. Gradient Hacminin Belirlenmesi için Elde Edilen Sonuçlar	85
4.4. Gradientte Bakteri-Partikül Fazlarının İncelenmesi.....	85
4.4.1. Manyetik NP ile Elde Edilen Bakteri-NP Fazları	85
4.4.2. Farklı Tampon Çözeltilerin Bakteri-NP Fazlarına Etkisi.....	86
4.4.3. Floresans Etiketli Nanopartikül ile Elde Edilen Bakteri-NP Fazları	90
4.4.3. Kuantum Noktalar ile Elde Edilen Bakteri-NP Fazları.....	94
4.4.4. CNPler ile Elde Edilen Bakteri-CNP Fazları	97
4.4.4.1. Bakteri-CNP Fazının Süreye Bağlı İlerlemesi	98
4.4.4.2. Fazlarının Tekrar Kullanılabilirlik Sonuçları.....	98
4.4.4.3. Faz Farkı için Uygun Parametrelerin Belirlenmesi.....	98
4.4.4.4. Her İşlem Basamağından Sonra Bakteri-NP Fazlarındaki Değişim	99
4.5. Bakteri-NP Fazının Optik Ölçümü	101
4.6. Katı Besiyerinde Koloni Sayım Sonuçları	103
4.7. Yağsız Sütte <i>E.coli</i> K-12 Teşhisi	106
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	108
6. KAYNAKLAR.....	113

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1. Santrifüj tüplerinin dönme eksenine göre sınıflandırılan rotorların görselleri ve açıklamaları	10
Çizelge 2. Farklı konsantrasyondaki sükröz çözeltilerin yoğunluk karşılaştırma tablosu	16
Çizelge 3. Farklı kütleli manyetik çekirdeklerin gradientte zamana bağlı ilerlemesi	79
Çizelge 4. Farklı çözeltilerin bakteri-NP fazına etkisi.....	86
Çizelge 5. NP ve bakteri-NP fazlarının zamana bağlı karşılaştırılması	87
Çizelge 6. 1000 g ile zamana bağlı bakteri-Fe ₃ O ₄ @Au faz ilerlemesi	88
Çizelge 7. 2000 g ile zamana bağlı bakteri-Fe ₃ O ₄ @Au faz ilerlemesi	89
Çizelge 8. Gradientin farklı bölgelerinden alınan bakteri sayım sonuçları	104
Çizelge 9. Bakteri teşhisi ve sayımına yönelik hareketli alan santrifüjde kullanılan farklı NPler ile elde edilen başarı tablosu	109

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.	Santrifüj sırasında koloidal partiküle etki eden kuvvetlerin şematik gösterimi.....	3
Şekil 2.	Boncuklarla modellenen küresel partiküllerin Sv katsayıları	5
Şekil 3.	Santrifüjde sınır bölge ölçüm şeması a) schlieren piki b) temsili fotoğraf görüntüsü c) optik ölçüm	6
Şekil 4.	Diferansiyel santrifüjde zamana bağlı olarak sınır bölge ilerlemesinin temsili gösterimi	6
Şekil 5.	Negatif yüklü kolloidin etrafındaki yük dağılımı, stern tabakası, zeta potansiyeli ve izoelektrik noktanın gösterimi	8
Şekil 6.	Süspansiyonun katı konsantrasyonu ve kümeleşme derecesine göre farklı fazları	9
Şekil 7.	Farklı büyüklük ve yoğunluktaki partiküllerin diferansiyel santrifüj ile kendi fazında ayrılmasının şematik gösterimi	13
Şekil 8.	Üç fazlı gradiente AuNPLerin bölgesel santrifüjle fazlara ayrılması ve AuNP fazların TEM görüntüleri.....	14
Şekil 9.	Eş-yoğunluk gradient yöntemiyle yeşil alglerin ve siyanobakterilerin hidrodinamik yoğunluklarının karşılaştırılması	15
Şekil 10.	Kloroaurik asit ile indirgenerek hazırlanan AuNPLerin sentez şeması.....	31
Şekil 11.	Yüzeyi merkaptopropiyonik asit modifiyeli CdTe Qdotların sentez şeması.....	33
Şekil 12.	Hidrotermal karbonizasyon yöntemiyle karbon kürelerin sentez şeması.....	34
Şekil 13.	Nanopartiküllerin kimyasal aktivasyondan sonra model protein ve floresans boyar madde ile etkileşiminin şematik gösterimi	35
Şekil 14.	NPLerin gradient santrifüj işleminden önce bakteri yakalamak için geçirdikleri hazırlık basamaklarının şeması	36
Şekil 15.	Kameranın yerleşimi ve ekrandaki tüplerin görünümü.....	44
Şekil 16.	Bant görüntüleme için deney düzeneği.....	45
Şekil 17.	Gümüş nanopartiküllerinin su ortamında UV-Vis spektrumu	48
Şekil 18.	Altın nanopartiküllerinin su ortamında UV-Vis spektrumu.....	49

Şekil 19. Diferansiyel santrifüj ile kendi fazında kümeleşme özelliğine göre ayrılan a) süpernatant b) çökelti c) işlemsiz AuNP fazlarının UV-Vis spektrumları.....	49
Şekil 20. Su ve etanol içerisinde hazırlanan AuNP fazlarının UV-Vis spektrumları.....	50
Şekil 21. MES tampon ve etanol içerisindeki MUA kaplı AuNPlerin UV-Vis spektrumları.....	51
Şekil 22. 50 mM pH 6.5 MES tampon ortamındaki işlemsiz ve avidin bağlanan 11-MUA kaplı AuNPlerin UV-Vis spektrumları	51
Şekil 23. 5 mg çekirdek kullanılarak, 700 µl 1 M NaOH indirgemesiyle hazırlanan Fe ₃ O ₄ @Au NPlerin su ortamında UV-Vis spektrumu.....	52
Şekil 24. Yüzeyinde karboksilik asit grupları bulunan CNPnin FTIR-ATR spektrumu.....	53
Şekil 25. Yüzeyi MPA ve AC ile modifiyeli Qdotların a) işlemsiz b) E.coli K-12 yakaladıktan sonra floresans spektrumları	54
Şekil 26. pH 4 ve pH 5'te kitosan kaplanan Qdotların floresans spektrumları.....	55
Şekil 27. pH 3 ve pH 7'de kitosan kaplanan CdTE/AC Qdotların floresans spektrumları.....	55
Şekil 28. CdTe/AC Qdotların a) işlemsiz b) kimyasal aktivasyondan sonra c) <i>E.coli</i> etkileşimi sonrası floresans spektrumları	56
Şekil 29. CdTe/MPA@ch Qdotların a) işlemsiz b) kimyasal aktivasyondan sonra c) <i>E.coli</i> etkileşimi sonrası floresans spektrumları	57
Şekil 30. AgNPlerin a) 100000x b) 250000x büyütme ile TEM görüntüleri.....	57
Şekil 31. İşlemsiz AuNP fazının a) yıkama öncesi b) yıkama sonrası 300000x büyütme ile TEM görüntüleri.....	58
Şekil 32. Çökelti fazındaki AuNPlerin a) 250000x b) 300000x büyütme ile TEM görüntüleri.....	58
Şekil 33. Fe ₃ O ₄ @Au NPlerin 300000x büyütme ile TEM görüntüsü.....	59
Şekil 34. İşlemsiz CdTE/MPA@ch-EDC NPlerin a) 300000x b) 500000x büyütme ile TEM görüntüleri	59
Şekil 35. Gradientten çekilmiş Qdotların a) 300000x b) 500000x büyütme ile TEM görüntüleri	60

Şekil 36.	Gradientten çekilmiş <i>E.coli</i> yakalayan Qdotların a) 25000x b) 60000x büyütme ile TEM görüntüleri	60
Şekil 37.	<i>E.coli</i> yakalayan CdTE/MPA@ch NPlerinin 150000x büyütme ile TEM görüntüsü	61
Şekil 38.	Gradientin CdTE/MPA@ch- <i>E.coli</i> fazından çekilen 40000x büyütme ile TEM görüntüsü.....	62
Şekil 39.	PBS içerisindeki işlemsiz CNPlerin a) 100000x b) 150000x büyütme ile elde edilen TEM görüntüleri	62
Şekil 40.	Gradientin partikül fazından çekilip yıkama işlemlerine tabi tutulan CNPlerin a) 100000x b) 250000x büyütme ile TEM görüntüleri	63
Şekil 41.	Hedefe özgü olmadan <i>E.coli</i> yakalayan CNPlerine) 40000x b) 80000x büyütme ile TEM görüntüleri	63
Şekil 42.	Gradientin hedefe özgü bakteri-NP fazından çekilen CNPlerin a-c) 60000x d) 100000x büyütme ile TEM görüntüleri	64
Şekil 43.	Gradientin bakteri-NP fazından çekilen CNPlerin 20000x büyütme ile TEM görüntüsü.....	65
Şekil 44.	Gradientte AuNP bandının zamana bağlı ilerlemesi ve optik ölçümü a) t=5 dk b) t=10 dk c) t=20 dk	66
Şekil 45.	AuNPLerin 17968 g ile t=0-20 dk-40 dk santrifüj sürelerinde %60 a/h süzkroz bariyerinden ilerlemesi	68
Şekil 46.	AuNPLerin 17968 g ile t=0-20-40 dk santrifüj sürelerinde % 32 a/h süzkroz bariyerinden ilerlemesi	68
Şekil 47.	Diferansiyel santrifüjle ayrılan AuNP fazları a) çökelti b) işlemsiz c) süpernatant.....	68
Şekil 48.	AuNP a) seyreltik b) derişik stoktan 200 µl örnekle, gradientte 4149 g ile t1=0, t2=45 dk santrifüjden sonra ve t3=15 saat bekledikten sonra optik faz ölçümü	69
Şekil 49.	Etanolde yıkanan a) seyreltik b) derişik AuNP bant görüntüsü t1=0, t2=45 dk santrifüjden sonra, t3=15 saat bekledikten sonra	70
Şekil 50.	Farklı ortamlar içerisindeki AuNPLerin % 30-% 35 -% 40 -% 60 a/h süzkroz gradientinde RCF=4149 g, t=45 dk ile karşılaştırılması	71

Şekil 51. Kimyasal aktivasyondan sonra a) işlemsiz b) avidin bağlı AuNPLerin % 30-% 35 -% 40 -% 60 a/h süzkroz gradientinde 4149 g 45 dk ile faz karşılaştırması	72
Şekil 52. a) seyreltik b) derişik AgNP stoktan % 30-% 35 -% 40 -% 60 a/h süzkroz gradientinde faz oluşumu t1=0, t2=45 dk, RCF=4149 g ile santrifüjden sonra, t3=15 saat bekledikten sonra	73
Şekil 53. a) seyreltik b) derişik AuNP-AgNP karışımının % 30-% 35 -% 40 -% 60 a/h süzkroz gradientinde faz oluşumu t1=0, t2=45 dk santrifüjden, t3=15 saat bekledikten sonra	73
Şekil 54. Fe ₃ O ₄ nanopartikülün süzkroz gradientte 5 dk santirüj ile ilerlemesi	74
Şekil 55. % 10-% 15 -% 20 -% 30-% 40-% 80 a/h süzkroz gradientinde RCF=4149 g ile farklı NPLerin bant ilerlemelerinin karşılaştırılması a) AuNP b) Fe ₃ O ₄ c) Au-Fe ₃ O ₄ d) Fe ₃ O ₄ @Au NP.....	75
Şekil 56. Farklı NPLerin % 30-% 35 -% 40 -% 60 a/h süzkroz gradientinde RCF=4149 g ile hareketli alan santrifüj uygulanarak göç mesafelerinin karşılaştırılması	76
Şekil 57. Partikül fazlarının % 10-% 15 -% 20 -% 30-% 40-% 80 a/h süzkroz gradientinde RCF=4149 g ile zamana bağlı ilerlemesi a) AuNP b) Fe ₃ O ₄ c) Au-Fe ₃ O ₄ d)Fe ₃ O ₄ @Au NP	76
Şekil 58. Sırasıyla pH 5.5-pH 5.0-pH 4.0 de hazırlanan CdTe/MPA@ch Qdotlarının a) beyaz ışıktta b) 350 nm UV ışıktta görünümü.....	78
Şekil 59. 5 mg ve 10 mg çekirdek ile sentezlenen manyetik NPLerin süzkroz gradientte a) 10 dk b) 15 dk c) 45 dk santrifüjle zamana bağlı faz ilerlemesi	80
Şekil 60. % 0.8 a/h NaCl ortamındaki manyetik NPLerin A ve B grubu gradientte t ₁ =2 dk, t ₂ =10 dk, t ₃ =45 dk santrifüjle zamana bağlı incelenmesi	81
Şekil 61. 20 mM pH 7.4 PBS ortamındaki manyetik NPLerin A ve B grubu gradientte t ₁ =2dk, t ₂ =10 dk, t ₃ =45 dk santrifüjle zamana bağlı incelenmesi	81
Şekil 62. 10 mM pH 7.4 PBS ortamındaki manyetik NPLerin A ve B grubu gradientte t ₁ =2dk, t ₂ =10 dk, t ₃ =45 dk santrifüjle zamana bağlı incelenmesi	82

Şekil 63.	10 mM pH 7.4 PBS içindeki Fe ₃ O ₄ @Au NPlerin B grubu gradientte 1000 g ile 45 dk santrifüjden sonra bant yapısının gösterimi.....	82
Şekil 64.	Fe ₃ O ₄ @Au NP fazının % 10-% 12-% 16- % 20 a/h PEG ile hazırlanan gradientte RCF=1000 g ile 2-10 dk santrifüjden sonra zamana bağlı karşılaştırılması.....	83
Şekil 65.	Fe ₃ O ₄ @Au NP fazının sükroz gradientte 3000 g ile t ₁ =10 sn, t ₂ =2 dk, t ₃ =10 dk santrifüjle zamana bağlı incelenmesi	84
Şekil 66.	Fe ₃ O ₄ @Au NP fazının PEG-sükroz çift fazlı gradientte 3000 g ile t ₁ =10 sn, t ₂ =2 dk, t ₃ =10 dk santrifüjle zamana bağlı incelenmesi	84
Şekil 67.	Sükroz gradientindeki a) işlemsiz b) <i>E.coli</i> yakalayan Fe ₃ O ₄ @Au NP fazlarının optik ölçümü.....	86
Şekil 68.	Gradientte Fe ₃ O ₄ @Au ve <i>E.coli</i> - Fe ₃ O ₄ @Au fazlarının zamana bağlı optik ölçümü.....	88
Şekil 69.	10 ⁵ -10 ⁸ kob/ml <i>E.coli</i> K-12 miktarına bağlı a-b) 10 dk c-d) 45 dk santrifüjden sonra Fe ₃ O ₄ @Au NP faz oluşumu	90
Şekil 70.	Hacimce 1:1 oranında karışan floreskamin ile faz görüntüsü	91
Şekil 71.	Farklı oranlarda karışan floreskamin-bakteri ile oluşan faz görüntüsü	91
Şekil 72.	Dioxan ve DMSO ile floreskamin stok çözeltilerin beyaz ve UV ışıkta görünümü.....	92
Şekil 73.	Siyah ışıkta <i>E.coli</i> miktarına bağlı bakteri-floreskamin ışınması	92
Şekil 74.	0.3 mg/ml floreskamin stok ile karıştırılan a) 3.2 mg/ml b) 0.8 mg/ml albumin çözeltilerinin siyah ışıkta ışınması	93
Şekil 75.	Floreskamin etiketli a) işlemsiz b) 10 ⁸ kob/ml <i>E.coli</i> K-12 yakalayan Fe ₃ O ₄ @Au NPlerin 2000 g ile 10 dk santrifüjden sonra faz görünümü	93
Şekil 76.	10 ⁶ kob/ml <i>E.coli</i> K-12 yakalayan <i>E.coli</i> - Qdot fazının süreye bağlı ilerlemesi ve optik ölçüm sonucu	95
Şekil 77.	10 ⁶ -10 ⁸ kob/ml <i>E.coli</i> yakalayan <i>E.coli</i> -Qdot fazlarının optik karşılaştırması	96
Şekil 78.	% 40-% 50-% 60-% 70-% 80 a/h sükroz ile hazırlanan gradientte sırasıyla 10 ⁸ -10 ⁷ -10 ⁶ -10 ⁵ kob/ml <i>E.coli</i> K-12 yakalayan <i>E.coli</i> -	

	Qdot fazlarının 500 g ile 3 dk santrifüjden sonra UV ışık altında elde edilen bant ilerlemesi	96
Şekil 79.	<i>E.coli</i> K-12 yakalayan Qdot ile % 40-% 50-% 60-% 70-% 80 a/h sükröz gradientte elde edilen kalibrasyon grafiği	97
Şekil 80.	Hedefe özgü olmayan etkileşimle soldan sağa 10^1 - 10^8 kob/ml <i>E.coli</i> K-12 yakalayan CNPlerin gradientte 500 g ile 4 dk santrifüjden sonra elde edilen bant dağılımı	99
Şekil 81.	Bakteri etkileşimi olmaksızın antikor bağlı NPlerin sükröz gradientte 500 g ile 12 dk santrifüjden sonra fazlarına ayrılması.....	100
Şekil 82.	% 50-% 60-% 65-% 70-% 80 a/h sükröz ile hazırlanan gradientte 10^1 - 10^5 kob/ml <i>E.coli</i> K-12 yakalayan CNP fazlarının optik sinyali	101
Şekil 83.	% 50-% 60-% 65-% 70-% 80 a/h sükröz ile hazırlanan gradientte hedefe özgü olmayan etkileşimle <i>E.coli</i> yakalayan CNPlerin kalibrasyon eğrisi.....	102
Şekil 84.	% 60-% 65-% 70-% 75 a/h sükröz ile hazırlanan gradientte Anti- <i>E.coli</i> bağlı CNP fazında ortalama optik yoğunluk ölçümüyle elde edilen kalibrasyon eğrisi	103
Şekil 85.	<i>E.coli</i> K-12 stoğundan katı besiyerinde bakteri sayımı	104
Şekil 86.	% 50-% 60-% 65-% 70-% 80 a/h sükröz ile hazırlanan gradientin bakteri-NP fazından a) üst faz b) alt faz <i>E.coli</i> K-12 sayım sonucu ...	105
Şekil 87.	% 60-% 65-% 70-% 75 a/h sükröz ile hazırlanan gradientin RCF=500 g, t=6 dk santrifüj sonrası bakteri-NP fazından <i>E. aerogenes</i> sayımı	105
Şekil 88.	Sütte bakteri sayımı için % 60-% 65-% 70-% 75 a/h sükröz ile hazırlanan gradientte bakteri miktarına bağlı olarak <i>E.coli</i> -CNP fazının optik yolla karşılaştırılması.....	106
Şekil 89.	Sütte <i>E.coli</i> tayini için % 60-% 65-% 70-% 75 a/h sükröz ile hazırlanan gradientte 6-10-12 dk santrifüj sürelerinde elde edilen kalibrasyon eğrileri.....	107

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

D	: diffüzyon katsayısı
F	: kuvvet
f	: sürtünme katsayısı
g	: yerçekimi ivmesi
N	: Avogadro sayısı
R	: ideal gaz sabiti
Sv	: Svedberg katsayısı
T	: mutlak sıcaklık
t	: süre
V	: hacim
v	: partikül hacmi
η	: viskozite
ρ	: yoğunluk
ρ_m	: ortamın yoğunluğu
ρ_p	: partikülün hidrodinamik yoğunluğu
ω	: açısal hız

Kısaltmalar

a/h	: ağırlık/hacim
AC	: Asetilsistein
AgNP	: Gümüş nanopartikül
AuNP	: Altın nanopartikül
CdTe	: Kadmiyum tellürid
CdTe/MPA@ch	: Yüzeyinde MPA grupları bulunan kitosan kaplı CdTe Qdot
CNP	: Karbon nanopartikül
dk	: dakika
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EDC	: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
Em slit	: Emisyon yarığı
Ex slit	: Uyarılma yarığı
Fe ₃ O ₄ @Au	: Altın kaplı manyetit

FTIR	: Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopisi
g	: gram
h/h	: hacim/hacim
kDA	: kilodalton
LAMP	: İlimiğe dayalı izotermal amplifikasyon
LOD	: Tespit sınırı
LOQ	: Tayin sınırı
MALDI-TOF-MS	: Matriks destekli lazer desorpsiyon / iyonizasyon-uçuş zamanı- kütle spektrometrisi
MES	: N-morfolinoetan sülfonik asit tamponu
ml	: mililitre
mM	: milimolar
µm	: mikrometre
MP	: megapiksel
MPA	: Merkaptopropiyonik asit
MUA	: Merkaptoundekanoik asit
MUG	: 4-methylumbelliferyl-β-d-glucuronide
MΩ	: megaohm
NHS	: N-hidroksisüksinimid
nm	: nanometre
NP	: Nanopartikül
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
PBST	: Fosfat-Tween 20 tampon çözeltisi
PEG	: Polietilen glikol
PVA	: Polivinil alkol
PVC	: Polivinil klorür
Qdot	: Kuantum nokta
RCF	: Rölatif santrifüj kuvveti
RGB	: Kırmızı-Yeşil-Mavi
rpm	: dakikadaki devir sayısı
SERS	: Yüzey zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi
sn	: saniye
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
UV	: Ultra viole (Mor ötesi)

1. GİRİŞ

Patojenik kirlenmeye maruz kalan gıdaların tüketilmesinin insan sağlığı üzerinde ciddi olumsuz etkileri olmaktadır. Günüümüzde *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella* gibi gıda kaynaklı hastalıklara sebep olan patojenik bakterilerin hızlı ve hassas bir şekilde tayin edilmesi önem taşımaktadır. Genellikle patojenik bakteri tayini için kullanılan yöntemler; geleneksel sayım yöntemleri, ATP biyoluminesans, immünomanyetik ayırma yöntemleri, mikroskopik yöntemler, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), nükleik asit prob yöntemi, elektronik gürültü teknikleri ve matriks destekli lazer desorpsiyon / iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi (MALDI-TOF-MS) olarak sayılmaktadır [1-3]. Bu yöntemlerin pek çoğunun bakteri analizi için gereken işlem süresinin uzun olması, zaman alıcı ve karmaşık işlem basamakları gerektirmeleri, pahalı araç-gereç ve cihaz kullanımı gibi dezavantajları olmaktadır. Özellikle immünomanyetik ayırmada işlem basamaklarının ve yıkama işlemlerinin fazla ve zaman alıcı olması nedeniyle etiketleme basamağını ortadan kaldıran yeni hızlı yöntemlerin geliştirilmesi önem kazanmıştır.

Son on yılda geleneksel bakteri teşhis yöntemlerinin yerine aynı işlevi yerine getirecek, yeni, ucuz, taşınabilir, kolay uygulanabilir ve hızlı yanıt veren yöntemler araştırılmaktadır. Bu doğrultuda işlem basamaklarını en aza indirecek etiketsiz biyoanaliz yöntemleri araştırılmakta; elektriksel akım, bulanıklılık, manyetik durulma zamanı, renk değişimi gibi farklı fiziksel temellere dayanan biyosensörler geliştirilmeye devam edilmektedir [4-7]. Varolan yöntemlere alternatif oluşturan, maliyeti düşüren, kolay erişilebilir, yenilikçi tasarımlar çalışmalarımıza ışık tutmaktadır.

Yapılan tez çalışmasının amacı; herkesin laboratuvarında kolaylıkla erişebileceği santrifüj cihazı ile, yeni ve kolay uygulanabilir bir yöntem geliştirerek immünomanyetik ayırmada karşılaştığımız güçlükleri ortadan kaldıracak, düşük maliyet ile daha basit, hızlı, güvenilir ve tekrar edilebilir sonuçlar veren bir bakteri teşhis yöntemi geliştirmektir.

Yoğunluk gradient santrifüj yöntemi protein saflaştırmada ve biyomoleküler analizlerde sıklıkla kullanılan ayırma yöntemlerden biridir. Santrifüj; temelde

merkezkaç kuvvetine bağlı olarak hücreleri veya partikülleri boyut, Şekil ve yoğunluğuna göre ayırmada kullanılan güvenilir bir yöntemdir. Bu çalışmada yeni bir yaklaşım ile; nanopartikül kullanımıyla bakteri - partikül fazlarının yoğunluk - gradient içerisinde takibi hedeflenmiştir. Bu amaçla sentezlenen farklı nanopartiküllerin gradientteki hidrodinamik davranıŐları incelenerek uygun parametreler saptanmıŐtır. Bakteri miktarına bağlı olarak bakteri-partikül bandının doğrusal değişim gösterdiği ispatlanmıŐ, yeni bir bakteri teşhis ve miktar tayini metodu literatüre kazandırılmıştır.

Tez kapsamında geliştirilen nanopartikül temelli yoğunluk gradient yöntemi; d Őuk maliyetli, kolay uygulanabilir, kısa sürede sonuç alınan ve güvenilir sonuçlar veren bir yöntem olması literatüre kazandırılmıştır. Bu yöntemin sütte *E.coli* tayini için kullanılması ile gerçek örneklerde bakteri sayımı için uygulanabilir olduğu ispat edilmiştir. Bu tez çalışması en az maliyet ile geliŐtirilecek yenilikçi tasarımlara ilham verecektir.

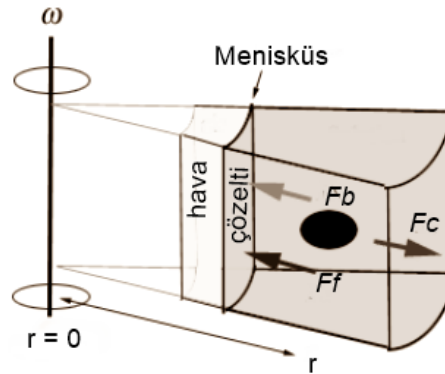
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Santrifüjle Partikülleri Çöktürme Prensipleri

Santrifüj cihazı ile elektrikli bir motor yardımıyla rotora sabit eksenli dairesel dönme hareketi yaptırılmaktadır. Bu sayede, süspansiyon halindeki numunelerin yerçekimi ivmesinden daha büyük kuvvetlerle ayrılması sağlanmaktadır. Partiküllerin çökme hızı; uygulanan rotor hızına, partikülün şekline, yoğunluğuna ve ortamın viskozitesine bağlı olarak değişmektedir. Bu bölümde; santrifüj işlem parametreleri ve partikül parametrelerinin partikülün çökme karakteristiğine etkisi detaylı olarak incelenmiştir.

2.1.1. Partiküllere Etki Eden Kuvvetler

Santrifüjle ayırma tekniğinde Şekil 1'de görüldüğü gibi partiküle etki eden dört temel kuvvet bulunmaktadır. Merkezkaç kuvveti, yerçekimi kuvveti, kaldırma kuvveti ve yerçekimi kuvveti olmak üzere etki eden bu temel kuvvetler detaylı olarak aşağıda bağıntılarıyla sunulmuştur.



Şekil 1. Santrifüj sırasında koloidal partiküle etki eden kuvvetlerin şematik gösterimi

Partikülün kütlesi (m_p), açısal hızın karesi (ω) ve partikülün merkezden uzaklığı (r) ile doğru orantılı olan merkezkaç kuvveti; $F_c = m_p \omega^2 r$ bağıntısıyla tanımlanmaktadır. Küresel partikülün kütlesi ($m_p = \pi d^3 \rho_p / 6$), molar kütle (M) ve Avogadro sayısı (N) eşitlikte yerine yazıldığında; $F_c = M/N \cdot (\omega^2 r)$ eşitliği elde edilmektedir.

Yerçekimi ivmesi $g = 9.81 \text{ m/s}^2$ olmak üzere; yerçekimi kuvveti $F_g = mg$ bağıntısıyla tanımlanmaktadır. Santrifüjde partiküle etki eden merkezkaç kuvvetine kıyasla yerçekimi kuvveti çok küçük olduğu için genellikle ihmal edilmektedir.

Sıvı içerisinde partiküle etki eden kaldırma kuvveti $F_b = -m_m \omega^2 r$ bağıntısıyla verilmektedir. Burada partikül ve ortam yoğunluğu (ρ_p ve ρ_m) eşitlikte yerine

yazıldığında kaldırma kuvveti $F_b = -m_p \omega^2 r \rho_m / \rho_p$ bağıntısıyla tanımlanmaktadır. Partikülün kısmi hacmi ($v = 1/\rho_p$) eşitlikte yerine yazıldığında partiküle etki eden kaldırma kuvveti; $F_b = -m_p \cdot v \cdot \rho_m \cdot \omega^2 r = -M/N \cdot v \cdot \rho_m \cdot \omega^2 r$ eşitliği ile tanımlanmaktadır.

Partiküle sıvı içerisindeki hareketinin tersi yönde etki eden sürtünme kuvveti (F_f); sürtünme katsayısı (f) ve partikülün hızı (v) ile doğru orantılı olarak; $F_f = -fv$ bağıntısıyla tanımlanmaktadır. Küresel partikül için sürtünme katsayısı $f = 3\pi\eta d$ bağıntısı ile bilinmektedir.

Partikül, merkezkaç kuvveti ile tüpün altına doğru ilerlerken tersi yönde sürtünme kuvveti ve kaldırma kuvvetinin etkisinde hareket etmektedir. Partikülün tüpün içerisinde katettiği yol, Şekil 1'de görülen çözeltinin menisküs çizgisinden itibaren ölçülmektedir. Kuvvet dengesi sağlandığında; partikül sabit çökme hızıyla hareket etmektedir. Bu durumda şimdiye kadar tanımlanan kuvvetler denkleme yazıldığında elde edilen eşitlikle Svedberg katsayısı verilmektedir.

$$\begin{aligned} F_c + F_b + F_f &= 0 \\ M/N \cdot \omega^2 r - M/N \cdot v \cdot \rho_m \cdot \omega^2 r - 3\pi\eta d \cdot v &= 0 \\ M (1 - v \cdot \rho_s) / Nf &= u / \omega^2 r \end{aligned} \quad (1)$$

2.1.2. Svedberg Katsayısının Hesaplanması

Santrifüj sırasında bir dış alan altındaki nanopartiküller, Svedberg katsayısı ile belirlenen farklı çöktürme hızları (sedimentation velocity) ile brownian hareketi yapmaktadır. Bu hız farkı kullanılarak farklı şekil ve boyuttaki partiküllerin ayrılması ve saflaştırılması yapılmaktadır [8]. Svedberg katsayısı;

$$Sv = [(\rho_p - \rho_m) \cdot d^2 \cdot \omega^2 \cdot r] / 18\eta \quad (2)$$

eşitliği ile hesaplanmaktadır. Bu eşitlikte kullanılan kısaltmaların açıklamaları şu şekildedir:

ρ_p : partikülün hidrodinamik yoğunluğu (bouyant density)

ρ_m : ortamın yoğunluğu

d : partikül boyutu

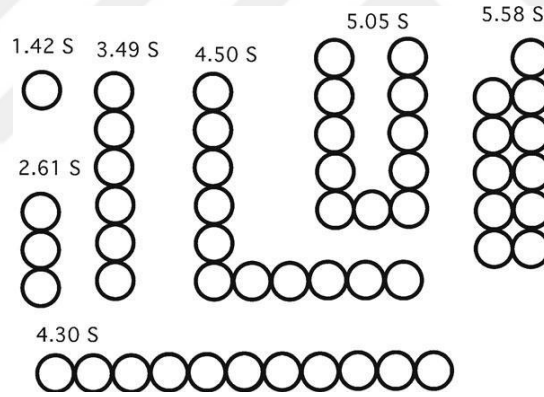
ω : açısal hız

r : yarıçap

η : ortamın viskozitesi

Zaman boyutunda olan çöktürme katsayısının birimi Svedberg (Sv) olarak adlandırılmıştır. Bir Svedberg 10^{-13} sn olarak tanımlanmıştır. Eşitlikten görüldüğü

gibi partiküllerin çökme hızları sadece partikül kütlesi ve yoğunluğuna bağlı olmamaktadır. Santrifüj ortamında partiküle etki eden sürtünme kuvveti neticesinde ortamın viskozitesi, yoğunluğu, partikülün şekli ve yüzey alanı da çökme hızına etki etmektedir. Bunun yanısıra süspansiyonda kümeleşme olduğunda agregatın hızı ayırık partiküllerin hızından farklı olmaktadır. İki partikül birbirine bağlandığında agregatın çöktürme katsayısı için Svedberg katsayılarını toplamak doğru sonuç vermemektedir. Agregatın toplam yüzey alanı azalacağı için, kümeleşen partikülün Svedberg katsayısı ayrı ayrı katsayılar toplamından küçük olmaktadır. Şekil 2'de modellenen yapıların Kirkwood/Bloomfield hesaplamaları ile Svedberg katsayıları karşılaştırılmıştır [9]. Boncuk şeklindeki her bir domain 10 kDa ve 1.42 Sv olarak hesaplanmıştır. Yanyana dizilen 11 adet boncuğun Svedberg katsayısı 4.30 Sv iken domainler U şeklinde dizildiklerinde çökme katsayısı 5.05 Sv olarak hesaplanmıştır. Dolayısıyla aynı kütledeki fakat farklı şekillerdeki partiküller yüzey alanındaki değişim nedeniyle farklı çökme hızlarına sahip olmaktadır.

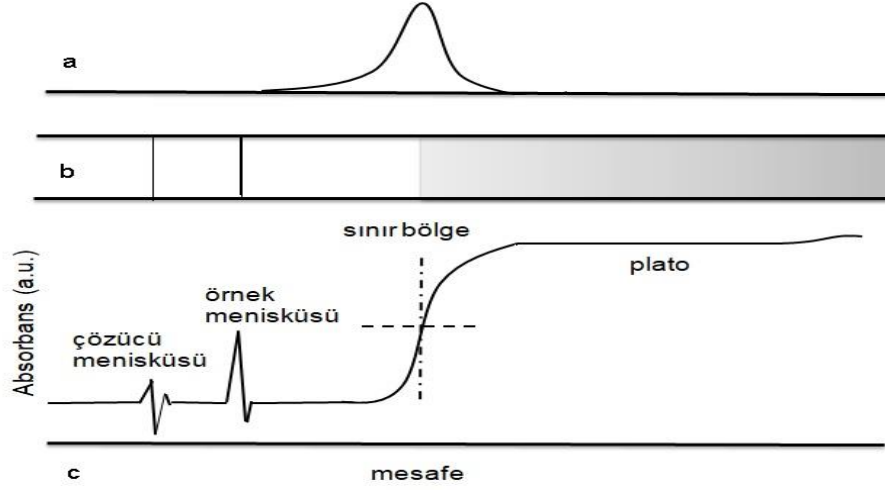


Şekil 2. Boncuklarla modellenen küresel partiküllerin Sv katsayıları [9]

Çöktürme katsayısının diffüzyon katsayısına oranı partikülün moleküler ağırlığını vermektedir. Santrifüj yöntemi kullanılarak proteinlerin moleküler ağırlığı hesaplanmaktadır. Sürtünme katsayısı; difüzyon katsayısı bulunarak hesaplanmaktadır, proteinin boyut ve şekline bağlı olmaktadır. Çöktürme katsayısı ise; anatlilik ultrasantrifüj ile sınır çökme hızı (boundary sedimentation velocity) ölçülerek bulunmaktadır.

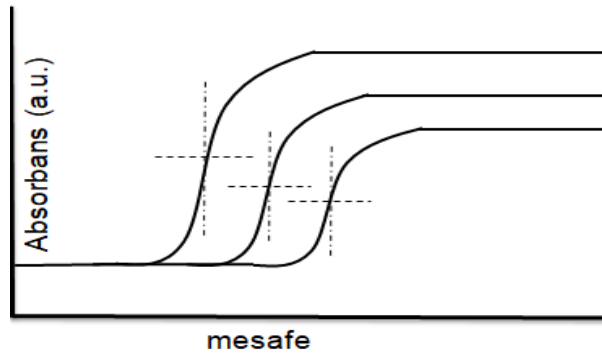
Çökme hız ölçümü iki farklı şekilde yapılmaktadır. İlk yöntemde; proteinin terkettiği çözücü ortamı ile protein konsantrasyonunun yüksek olduğu, ayırmanın gerçekleştiği sınır bölgenin ilerleme hızı takip edilerek çökme katsayısı

hesaplanmaktadır (Şekil 3). Schlieren optik sisteminde ortamın kırılma indisi değişimine bağlı ölçüm yapılmaktadır. Dolayısıyla faz değişiminin görüldüğü sınır bölgesinde (boundary) optik yoğunluk değişimi pik ile takip edilmektedir (Şekil 3.a). Şekil 3.b'de tüpün temsili fotoğraf görüntüsü, Şekil 3.c'de ise çözücü menisküsü, örnek menisküsü ve sınır bölge optik geçişleri absorbans grafiğinde görülmektedir.



Şekil 3. Santrifüjde sınır bölge ölçüm şeması a) schlieren piki b) temsili fotoğraf görüntüsü c) optik ölçüm

Şekil 3c'de görülen sınır bölge ölçümü için; absorbans değişiminin yarısını veren değer yani eğrinin orta noktası alınmaktadır. Sınır bölge ilerlemesi zamana göre optik sistemle görüntülenirse Şekil 4'teki gibi sınır değişim kaydedilmekte, bu değişim partiküllerin çökme hızının ve moleküler ağırlığının hesaplanmasında kullanılmaktadır.



Şekil 4. Diferansiyel santrifüjde zamana bağlı olarak sınır bölge ilerlemesinin temsili gösterimi

Çökme hız ölçümü için ikinci yöntemde ise; sükröz yoğunluk gradienti içerisinde bölgesel ilerleyen proteinin bölgesel çökme hızı (zonal sedimentation velocity) ölçülmektedir [10].

Diffüzyon katsayısı; $D=RT/NF_f$ bağıntısı ile verilmektedir.

R : ideal gaz sabiti

T : mutlak sıcaklık

N : avogadro sayısı

F_f : sürtünme kuvveti olmak üzere;

Moleküler ağırlık; $M=Sv. RT / (D. (1- v. \rho_s))$ bağıntısı ile hesaplanmaktadır.

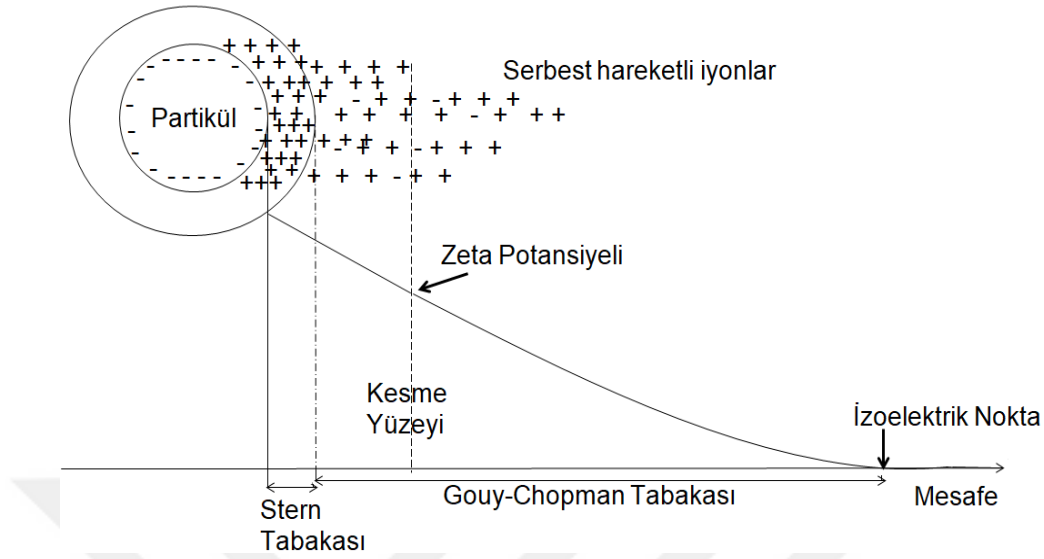
2.1.3. Partiküllerin Fiziksel Kararlılığı ve Çökme Özellikleri

Kolloidal dispersiyonlardaki partiküller 1 nm ve 1 μ m arasında boyutlara sahip olmaktadır. Dispersiyonun fiziksel kararlılığına yani görünüşüne ve çökme hızına; partiküllerin şekil ve büyüklüklerinin etkisi olmaktadır. Bunun yanısıra kolloidal haldeki partiküllerin kararlılığı yüzey yüklerine bağlı olarak değişmektedir.

Sıvı dispersiyonda partiküllerin yük kazanabilmesi; fonksiyonel grupların iyonizasyonuna, ortamın pH'ına ve ortam ile partikülün dielektrik sabiti farkına bağlı olmaktadır. İyonizasyon bir atom ya da molekülün elektron kaybetmesiyle iki zıt yüklü iyon oluşmasıdır. İyonizasyon derecesi ise; gaz ya da sıvı içerisindeki nötr parçacıkların yüklü parçacıklara iyonize olma oranına denilmektedir. Yük iyonizasyon derecesine bağlı olarak proteinlerde bulunan karboksilik asit veya serbest amin grupları iyonize olmaktadır. Ortamın pH değerine bağlı olarak biyomoleküller düşük pH değerlerinde pozitif, yüksek pH'larda negatif yüklerle yüklenmektedirler. Dolayısıyla net elektriksel yükün sıfır olduğu pH değeri; biyomolekülün izoelektrik noktası olarak bilinmektedir.

Sulu ortamda OH^- iyonlarını adsorbe ederek kolloidal partiküller negatif yük kazanmaktadır. Dispersiyon ortamındaki çözünmüş katyon ve anyonlarla etkileşen kolloidal partikül yüzeylerinde iyon bulutu oluşmaktadır. Bu iyon bulutuna sabit tabaka ya da stern tabakası denilmektedir. Partikülün stern tabakası ve çevresindeki serbest hareketli iyonlar Şekil 5'te verilmiştir. Görüldüğü gibi partikül yüzeyinin elektriksel yüküne bağlı olarak partikül çevresinde zıt yüklü iyonlarla çevrili stern tabakası oluşmaktadır. Tanecik yüzeyinden uzaklaştıkça elektriksel alan azaldığı için zıt yüklü iyonların sayısı da azalmaktadır. Tanecikten belirli bir

mesafe sonra ise elektriksel potansiyel tamamen sıfırlanmaktadır. Elektriksel potansiyelin sıfırlandığı pH değeri izoelektrik nokta olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 5. Negatif yüklü kolloidin etrafındaki yük dağılımı, stern tabakası, zeta potansiyeli ve izoelektrik noktanın gösterimi

Kolloidin Stern tabakası ile izoelektrik noktası arasındaki tabakaya; diffüze tabaka (Gouy-Ghopman Tabakası) denilmektedir. Partikül ile birlikte hareket eden sınır düzlemine ise; kesme yüzeyi denilmektedir. Bu mesafe partikülün hidrodinamik çapı olarak hesaplanmaktadır. İzoelektrik nokta ile partikülün hidrodinamik çapı (kesme düzlemi) arasındaki elektriksel potansiyel farkına zeta potansiyeli denilmektedir.

Süspansiyonun çökme davranışı, katının kümeleşme özelliğine göre; ayrık partiküller, flokülasyon, bölge yerleşimi ve kek sıkıştırma olarak dört kategoride incelenmektedir (Şekil 6). Partikülün zeta potansiyeli yüksek olup partiküller arası itme kuvveti fazla olursa, derişik süspansiyonda kümeleşme görülmemektedir. Partiküller ayrık olarak kolloidal süspansiyon yapısını korumaktadırlar. Ayrık partiküller çökme için aşağıdaki bağıntı 3 ile verilen Stoke's yasasına uyarlar. İdeal seyreltik bir süspansiyonda küresel partiküllerin birbiri ile etkileşiminin olmadığı varsayımı ile V_{so} ; partikülün yerleşim hızı olarak tanımlansın. d =partikülün çapı, ρ_s =partikülün yoğunluğu, ρ_L =sıvının yoğunluğu, η =sıvının viskozitesi ve g =yerçekimi ivmesi olmak üzere;

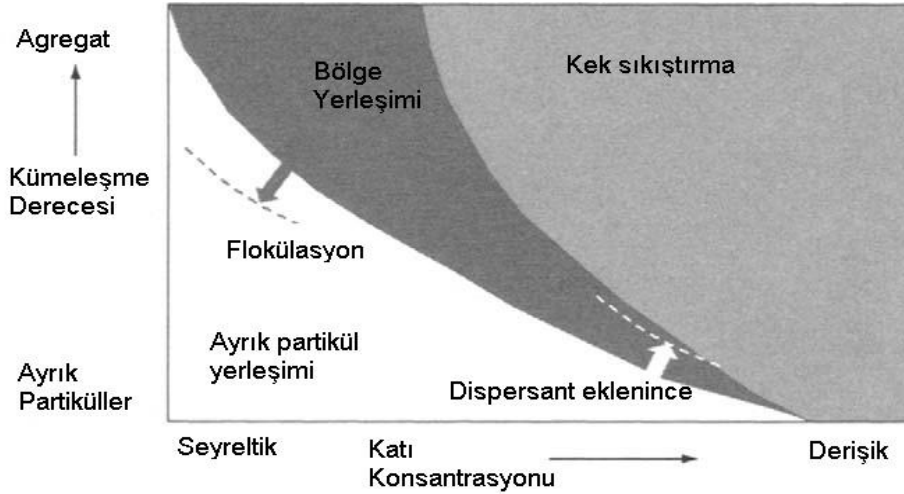
$$v_{so} = [(\rho_s - \rho_L) \cdot g \cdot d^2] / 18\eta \quad (3)$$

Eğer süspansiyon santrifüj ile yüksek hızda dönme hareketi yaparsa, bağıntı 3'teki g ivmesi yerine eşitlik 4'de santrifüj ivmesi G yazılır.

$$v_{so} = [(\rho_s - \rho_L) \cdot G \cdot d^2] / 18\eta \quad (4)$$

Eşitlik 4'e bakıldığında partikül çapı, santrifüjle uygulanan kuvvet, ortamın yoğunluğu ve viskozitesi arttığında partikülün çökme hızının düşeceği çok açık görülmektedir. Süspansiyondaki katı madde konsantrasyonu arttığı zaman, yani derişik süspansiyondaki partiküller çevre partiküllerden hidrodinamik olarak daha fazla etkilenmekte ve daha hızlı çökmektedir. Bu şartlar altında partiküllerin çökme hızı Stokes hızından yüksek ya da düşük olabilmektedir [11].

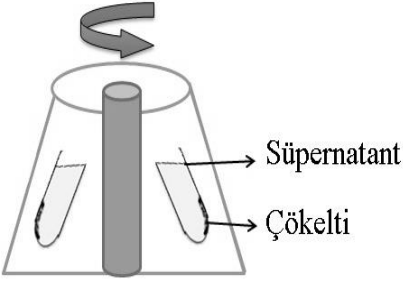
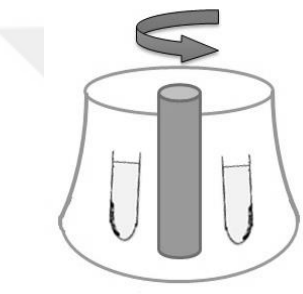
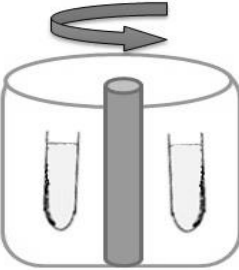
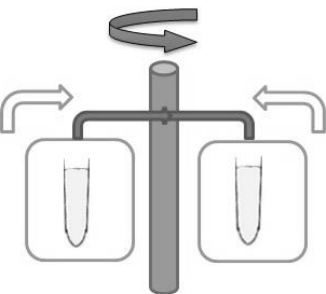
Verilen bir konsantrasyonda, partiküller arasında zayıf elektriksel çekim kuvvetleri neticesinde kümeleşme oluyorsa partiküller flokülasyon nedeniyle önce küçük kümeler, daha sonra birleşerek daha büyük flokül oluşturmakta ve aynı hızda ilerlemektedirler. Bu durumda partiküllerin ayrı ayrı hızlarından değil, oluşan flokül yapının hızından bahsedilmektedir. Bu duruma bölge yerleşimi (zone settling) denilmektedir. Şekil 6'da görüldüğü gibi ayırık partikül yerleşimi olan durumda ortama koagülant eklenirse kümeleşme olacağı için bölge yerleşimine geçilir. Kek sıkıştırma (cake compaction) durumundaki ortama dispersant eklenirse bölge yerleşimine geçilir [12].



Şekil 6. Süspansiyonun katı konsantrasyonu ve kümeleşme derecesine göre farklı fazları [12]

2.1.4. Santrifüjde Kullanılan Rotor Çeşitleri ve RCF Hesaplaması

Çizelge 1. Santrifüj tüplerinin dönme eksenine göre sınıflandırılan rotorların görselleri ve açıklamaları

Rotor Görseli	Açıklamalar
	<p><u>Sabit Açılı (Fixed Angle) Rotor</u></p> <p>Bu rotor türü genellikle çöktürme için kullanılmaktadır. Tüp ile dönme ekseninde 30° açı bulunmaktadır.</p>
	<p><u>Yarı Açılı (Neoangle) Rotor</u></p> <p>Tüp ile dönme ekseninde 10° açı bulunmaktadır. Açılı rotora göre daha kısa sürede çöktürme gerçekleştirilmektedir.</p>
	<p><u>Dik Rotor</u></p> <p>Tüpler dönme eksenine paralel pozisyonda olmaktadır. Çökeltme mesafesi daha kısa olduğu için daha hızlı ayırma gerçekleştirilmektedir.</p>
	<p><u>Yatay (swing-salınimli) Rotor</u></p> <p>Rotor dönmeye başlayınca tüp hazneleri dönme eksenine dik olacak şekilde, zemine paralel pozisyona geçmektedir. Bu konumda tüplerin dönme eksenine olan uzaklığı arttığı için, birden fazla partikül olan sistemlerin yoğunluk gradient yöntemi ile ayrılması istenildiğinde bu rotor daha kullanışlı olmaktadır.</p>

Çizelge 1'de görüldüğü gibi santrifüjde kullanılan rotor çeşitleri tüpün dönme eksenine göre yaptığı açıya bağlı olarak; sabit açılı, yarı açılı, dik ve yatay rotor dört

başlıkta sınıflandırılmaktadır. Hızlı çöktürme için dik rotor, yoğunluk gradient çalışmalarında ise yatay rotor tercih edilmektedir. Rotorların çapları farklı ise numunenin dönme eksenine olan uzaklığı farklı olmaktadır. Bu nedenle rotorlar aynı rotasyonel hızda çalışsalar bile numuneleri farklı ivmelendirmektedirler. Dolayısıyla santrifüj yönteminde rpm (dakikadaki devir sayısı) ile verilen rotasyonel hız yerine, rölatif santrifüj kuvveti (RCF) ile tanımlanan örneğe uygulanan ivmenin büyüklüğü daha önemli olmaktadır.

Rölatif santrifüj kuvvetinin hesaplanması

Rotor ile partiküle uygulanan g ivmesinin değeri eşitlik 5'te verildiği gibi; açısal hızın karesi ve partikülün konumundan rotorun dönme eksenine olan dik mesafeye bağlı olarak belirlenmektedir.

$$g = \omega^2 r \quad (5)$$

Rotorun kendi eksenini etrafındaki bir tur dönüşü 2π radyana eşit olduğu için rotorun açısal hızı radyan/sn olarak verilmektedir. Rotor hızı eşitlik 6'da gösterildiği şekilde rpm cinsinden hesaplanmaktadır.

$$\omega = 2\pi \cdot \text{rpm} / 60 \quad (6)$$

Santrifüj kuvveti (g) 'nin rpm 'den yararlanılarak hesaplanması için 6 numaralı eşitlik 5 numaralı eşitlikteki ω^2 yerine konular ve 7 numaralı eşitlik elde edilmektedir.

$$g = 4\pi^2 \cdot \text{rpm}^2 r / 3600 \quad (7)$$

Parçacığın santrifüj kuvveti etkisindeki ağırlığının, aynı parçacığın sadece yerçekimi etkisiyle oluşan ağırlığına oranına rölatif santrifüj kuvveti (RCF) adı verilmektedir. $\text{RCF} = F_{\text{santrifüj}} / F_{\text{yerçekimi}}$

$$m \cdot G / m \cdot g = G / g = \omega^2 r / g \quad (8)$$

5 numaralı eşitlik 7 numaralı bağıntıda yerine yazıldığında alttaki bağıntı 9 elde edilmektedir.

$$\text{RCF} = 4\pi^2 \cdot \text{rpm}^2 r / 3600 \times 981 \quad (9)$$

(8) numaralı eşitlik aşağıda olduğu gibi kısaltılarak son halini almaktadır.

$$\text{RCF} = 1.118 \times 10^{-5} \times r \times (\text{rpm})^2 \quad (10)$$

Eşitlik 10 kullanılarak farklı rotorlarda uygulanan açısal hız, rölatif santrifüj kuvvetine çevrilerek karşılaştırılabilmektedir. Böylece, çalışmanın devamında kullanılan santrifüj cihazı ve rotoru farklı olsa da tüpe etki eden g kuvveti sabit tutularak deneylerin tekrarı sağlanabilmektedir.

2.2. Santrifüjle Ayırma Teknikleri

Santrifüjle ayırma teknikleri temelde diferansiyel ve yoğunluk gradient olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Ancak mikro akışkan sistemlerle entegre olan karşıt-akım santrifüj yöntemi de üçüncü teknik olarak burada incelenmiştir. Yöntemler uygulama farklılıklarına göre kendi içlerinde alt gruplara ayrılmış, detaylı olarak sunulmuştur.

2.2.1. Diferansiyel Santrifüjleme Tekniği

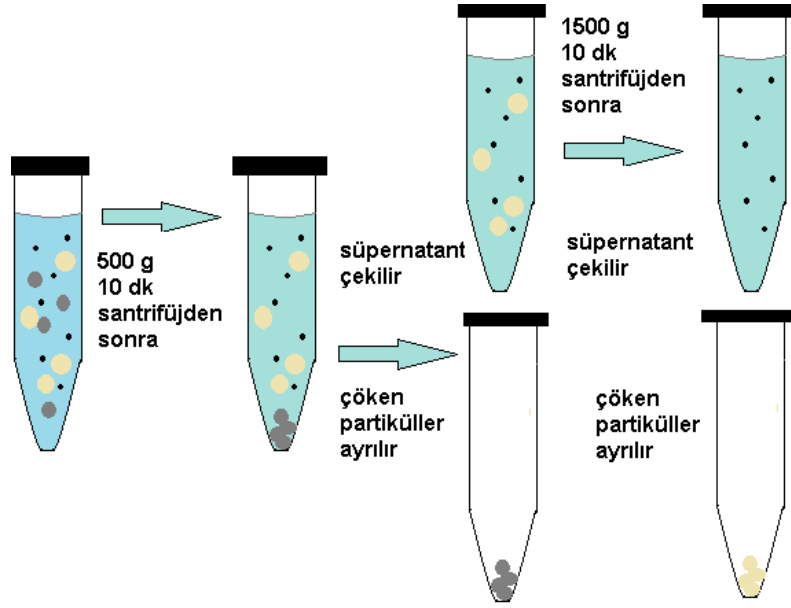
Bu teknikte gradient hazırlanmadan, örneğin kendi fazı ile aynı yoğunluk ortamında çalışılmaktadır. Partikülleri boyutlarına şekillerine ve yoğunluklarına göre ayırmada çökme oranındaki değişim temel alınmaktadır. Bu yöntemlerde her işlemten sonra süpernatant çekilip tekrar santrifüje alınarak farklı partiküller ayrılmakta, dolayısıyla işlem zaman alıcı olmaktadır (Şekil 7).

2.2.1.1. Zamana Bağlı Diferansiyel Santrifüjleme Tekniği

Bu yöntemle uygulanan rotor hızı sabit tutulup sadece santrifüj süresi değiştirilerek ayırma işlemi gerçekleştirilmektedir [13]. Böylece önce yoğunluğu ve boyutları büyük olan partiküller çöktürülerek ayrılmakta santrifüj süresi arttırıldıkça daha küçük partiküllerin de süpernatanttan ayrılması gerçekleştirilmektedir. İstenilen ayırma gerçekleşene kadar işlem devam etmektedir.

2.2.1.2. Diferansiyel Hız Santrifüjleme Tekniği

Bu yöntem uygulanırken Şekil 7'deki şemada görüldüğü gibi süre sabit tutulup sadece rotor hızı değiştirilmektedir. Yoğunlukları ve ağırlıkları farkı moleküller farklı hızlarda çöktükleri için diferansiyel hız tekniği ile istenilen ayırma gerçekleştirilene kadar işleme devam edilmektedir. Proteinlerin kısmi saflaştırmasında; hücrelerin parçalanması sonucu elde edilen birçok farklı molekül diferansiyel santrifüjleme tekniği ile farklı hızlarda çöktürülerek ilgili proteinin olduğu faz diğer fazlardan ayrılmaktadır. Santrifüjleme işlemi sırasında sürtünmeden dolayı açığa çıkacak ısının proteinlerin yapısını bozmaması için, işlemin soğutmalı santrifüjlerde +4°C'de yapılması gerekmektedir [14, 15].



Şekil 7. Farklı büyüklük ve yoğunluktaki partiküllerin diferansiyel santrifüj ile kendi fazında ayrılmasının şematik gösterimi

Choksawangkaru ve arkadaşları (2013), manyetit nanopartiküllerinin yüksek yoğunluk özelliğinden faydalanarak diferansiyel santrifüj yöntemi ile plasma membran parçalarının ayrılmasını geliştirmişlerdir [16]. Sousa ve arkadaşlarının 2015'te mikrometre boyutunun altındaki *Staphylococcus aureus* hücreleri ile yaptıkları çalışmada, bakteri-NP fazı ve NP fazı arasında belirgin hidrodinamik yoğunluk farkı olmadığı için koloidal kararlılık farklılıklarının etkin olduğu diferansiyel çöktürme yöntemi kullanılmıştır. Diferansiyel santrifüjle 700 nm boyutundaki bakteriler ve bakteri-NP fazı çökerken serbest NPler süpernatantta kalmış ve ayırma gerçekleştirilmiştir [17].

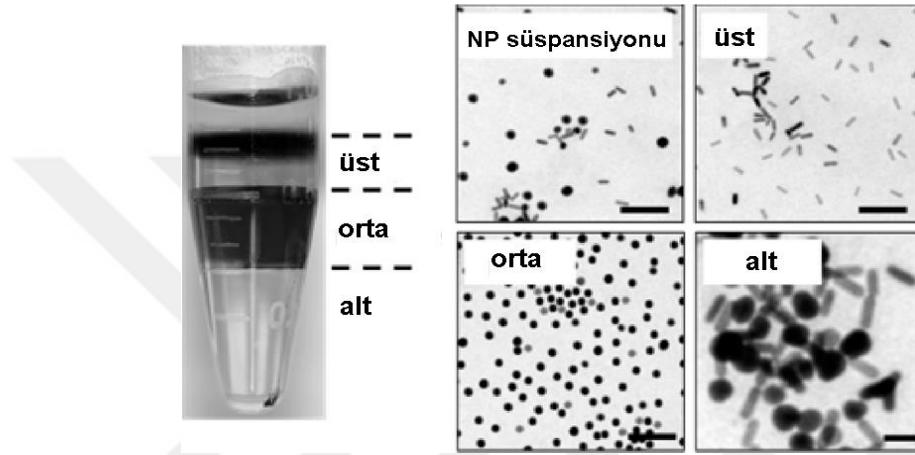
2.2.2. Yoğunluk Gradient Santrifüjleme Tekniği

Yoğunluk gradient santrifüjleme yönteminde; boyutlarına, şekillerine ve yoğunluklarına göre partikül ayrıştırması gerçekleştirilmektedir. Ayırma işlemi temel fiziksel prensiplerine göre bölgesel ve eş-yoğunluk olarak temelde iki farklı teknikle gerçekleştirilmektedir [18-20]. Ayırma amacına ve yöntemine uygun gradient yapısı ve kimyasal içeriği seçilmektedir.

2.2.2.1. Bölgesel Santrifüj Tekniği

Bölgesel (Hareketli Alan-Rate Zonal) santrifüj yönteminde partiküller boyutları, şekilleri ve kütlelerine göre ayrılmaktadır. Partiküllerin çökme hızı (sedimentation velocity), dolayısıyla ortamın yoğunluğu ve viskozitesi temel alınmaktadır [14, 19, 21]. Santrifüj süresi uzun tutulursa partiküller tamamen çökeceği için uygun rotor

hızı ve sürenin ayarlanması gerekmektedir. Literatürde bir tüp içerisinde sükröz, PEG, PVA, Ficoll, Percoll, Brij, PEOZ vb. kimyasalların kullanımı ile farklı yoğunluk ve viskozitedeki fazlar oluşturularak partiküllerin hareketli alan (rate-zonal) ayrılması gerçekleştirilmektedir [19, 22, 23]. Şekil 8'e bakıldığında Akbulut ve arkadaşların 2012'de Brij 35, PEOZ ve Ficoll ile hazırladıkları üç fazlı gradientin viskozite farkından yararlanarak 16000 g'de 10 dk santrifüj ile AuNPLeri fazlarına ayırdıkları görülmektedir. Elektron mikroskobu sonuçlarıyla da AuNPLerin boyut ve şekillerine bağlı ayrıldığı desteklenmiştir.

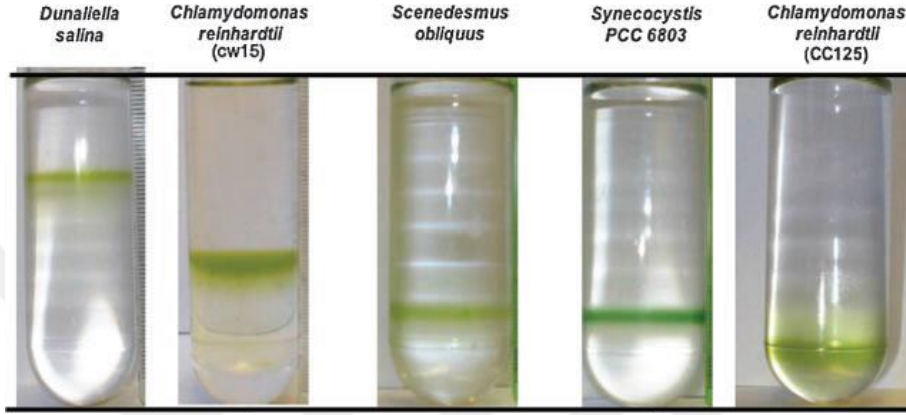


Şekil 8. Üç fazlı gradientte AuNPLerin bölgesel santrifüjle fazlara ayrılması ve AuNP fazlarının TEM görüntüleri [22]

2.2.2.2. Eş-Yoğunluk Santrifüj Tekniği

Eş-yoğunluk (denge-izopiknik) santrifüj yöntemi farklı hidrodinamik yoğunluktaki (buoyant density) partiküllerin ve mikroorganizmaların ayrıştırılmasında kullanılmaktadır [14, 24-26]. Diğer yöntemlerden farklı olarak, kullanılacak ortamın yoğunluğu partikülün hidrodinamik yoğunluğundan fazla olmaktadır. Böylece, santrifüj süresi uzun tutulduğunda, gradient bölgeleri birbiri içine diffuz etmediği sürece bantlar bozulmamakta ve partiküller dibe çökmemektedir. Partiküller ortam yoğunluğunun partikül yoğunluğuna eşit olduğu bölgeye kadar yol almakta, daha yoğun olan gradient tabakası üzerinde yüzmektedir. Dolayısıyla, partikülün hidrodinamik yoğunluğu partikülün ayrıştığı ortamın yoğunluğuna göre belirlenmektedir [15, 27]. Kullanılan doğrusal gradient ile ≈ 0.01 g/ml mertebesinde yoğunluk farkı algılanabilmektedir. Bu nedenle; Bonaccorso ve ekibi 2010'da farklı yüzey aktif madde kullanımı ile karbon nanotüplerin kümeleşme farklılıklarını eş-yoğunluk gradient tekniği ile detaylı incelemiştir [25]. Şekil 9'da Eroğlu ve Melis'in 2009'da yayınlanan çalışma sonucunda yeşil alglerin ve siyanobakterilerin

% 10-80 a/h sükroz gradientte karşılaştırmalı olarak 20000 g 30 dk santrifüj sonrası eş-yoğunluk ayırması görülmektedir [26]. Şekil 9.a-b'de hücre duvarı olmayan mikroorganizmaların daha az yoğun oldukları görülmektedir. Bu sonuç peptidoglikan ve polisakkaritlerden oluşan hücre duvarının (d=1.21 g/ml), lipid ve proteinlerden oluşan sitoplazmik membran parçalarından (d=1.13 g/ml) daha ağır olduğu bilgisi ile uyum göstermektedir. Parçalanmış hücrelerden hücre zarının ayrılması için de bu yöntem kullanılmaktadır.



Şekil 9. Eş-yoğunluk gradient yöntemiyle yeşil alglerin ve siyanobakterilerin hidrodinamik yoğunluklarının karşılaştırılması [26]

Bölgesel santrifüj ile çökme hızı (sedimentation velocity) temel alınırken, eş-yoğunluk tekniği ile çökme dengesi (sedimentation equilibrium) temel alınmaktadır. Dolayısıyla, bölgesel santrifüjde düşük hız ve düşük çalışma süresi kullanılarak faz ayırmasının gerçekleştiği parametre yakalanırken, eş-yoğunluk santrifüjde yüksek rotor hızı ve uzun çalışma süresi uygulanarak yoğunluğa bağlı ayırmanın gerçekleşmesi sağlanmaktadır.

2.2.2.3. Kompakt Disk Santrifüj Tekniği

Partiküllerin ve mikroorganizmaların boyut ve yoğunluk temelli ayrılması için alternatif oluşturan bu yöntem; partiküllerin gradiente yerleşme hızı (settling velocity) ve fotometrik tayine dayanmaktadır. Kompakt disk üzerinde yoğunluk gradienti bulunmakta, merkezden akışkan örnek yerleştirilmektedir. Santrifüj ile uygulanan kuvvet neticesinde partiküller boyutlarına bağlı olarak belirli mesafeye kadar ilerlemektedir. Yoğunluğu ve viskozitesi yüksek olan gradient bölgesinde partikülün yerleşme süresi yüksek olmaktadır. Yoğunluğu ve boyutu bilinen polivinil klorür (PVC) gibi standart partikül kullanılmakta, bu sayede gradientin viskozite bilgisi gerekmeden yoğunluk ve boyut tespiti yapılabilmektedir [28].

2.2.2.4. Yoğunluk Gradient için Kullanılan Kimyasallar

Yoğunluk gradient santrifüj tekniğinde doğrusal (linear), doğrusal olmayan ve basamak gradient kullanılmaktadır. Farklı yoğunluklarda hazırlanan sükroz çözeltilerinin üst üste eklenerek hazırlandığı gradient "basamak gradient" olarak adlandırılmaktadır. Bu yöntem yoğunluk ve viskozite farkı ile partiküllerin ayrılmasında kullanılmaktadır. Basamak şeklinde hazırlanan gradientin 6-12 saat bekletilerek sükroz katmanlarının birbirine diffüz etmesi sağlanmakta, böylece düşük yoğunluk farklarının da algılanabildiği doğrusal yoğunluk gradienti hazırlanmaktadır. Doğrusal olmayan gradient hazırlamak içinse; ağır tuzların kullanımı ile kendiliğinden düzenlenim gerçekleştirilmektedir [20, 25, 29].

Çizelge 2. Farklı konsantrasyondaki sükroz çözeltilerin yoğunluk karşılaştırma tablosu

Konsantrasyon % (a/h)	Yoğunluk (g/ml)	Kırılma İndisi
0	0.9982	1.3330
1	1.0021	1.3344
10	1.0381	1.3479
15	1.0592	1.3557
20	1.0810	1.3639
25	1.1036	1.3723
30	1.1270	1.3811
35	1.1513	1.3902
40	1.1764	1.3997
45	1.2025	1.4096
50	1.2296	1.4200
55	1.2575	1.4307
60	1.2865	1.4418
65	1.3163	1.4532

[William H. Heidcamp, Cell Biology Laboratory Manual]

Çizelge 2'de sükroz çözeltilerinin % 1-% 65 a/h konsantrasyon aralığında yoğunluk değerleri yer almaktadır. Yoğunluğu sükroz çözelti yoğunluğundan yüksek olan maddelerin eş-yoğunluk ayrıştırılmasında sezyum klorür (CsCl), sezyum sülfat (Cs₂SO₄) gibi yoğunluğu 1.9 g/ml'ye çıkan ağır tuzlar kullanılmaktadır [30]. Ancak ağır tuz kullanımı sükroz gradiente göre dezavantajlı olmaktadır. Hu ve Chen 2015'te yaptıkları çalışmada sükroz yerine CsCl₂ gradientinde çalıştıklarında, tuz

kullanımı kümeleştirmeyi arttırdığı ve nanopartikül yüzeylerinde CsCl₂ iyonlarının emilimi gerçekleştiği için ayırma işlemi başarısız olmuştur. Bu nedenle nanopartikül çalışmalarında daha ucuz ve partiküllerin yüzey kimyasını bozmayan sükröz gradient ile çalışılması tercih edilmektedir. Aynı zamanda sükröz, biyoyumluluğu ve iyonik olmayan yapısı nedeniyle canlı bakteri hücrelerini ayırmada kullanışlı olmaktadır. Santrifüjden sonra hücreler yıkama ile kolayca sükrözden arındırılmaktadır. Prokaryotik bakteri hücreleri sükröz çözeltisinin yüksek viskozite ve osmolaritesine kısa santrifüj periyotlarında dayanıklı olmaktadır. Fakat ökaryotik mikroorganizmalar yoğun sükröz gradientinde zarar gördüğü için formaldehit ya da glutraldehit gibi sabitleyici ajanlar ile işlemden sonra sükröz gradiente alınmalıdır. Bunun yanısıra ökaryotik mikroorganizmaları ayırmak için polisükröz ve kolloidal silika çözeltileri (Ludox) farklı yoğunluk gradient ortamı olarak da kullanılmış ve yüksek viskozite ve ozmotik özellikleri nedeniyle uygun olmamıştır [31, 32].

Kan ve kemik iliğinden lökosit ayırmada yoğunluk gradient santrifüj yöntemi kullanılmaktadır. Gradient ortamı olarak Ficoll-Hypaque ve Percoll tercih edilmektedir. Ticari kimyasallardan olan Ficoll, alyuvar (eritrosit) kümeleşmesini indükleyen bir dextran (glikoz) polimeridir. Çözeltinin osmolarite ve yoğunluğunu arttırmak için kullanılan ticari olarak bilinen iyotlu aromatik bileşiklerden hypaque, histopaque ve isopaque ile karıştırılarak gradientte kullanılmaktadır.

Polisakkarit ve sodyum diatizot karışımından oluşan, yoğunluğu 1.119 g/ml olarak ayarlanmış bir çözelti olan Histopaque-1119; kandaki akyuvarları plazma ve alyuvarlardan ayırmak için Histopaque-1077 ile birlikte yoğunluk gradientinde kullanılmaktadır. İyonik olmayan gradient ortamlarından iodixanol ise Nycodenz dimeridir. Sükroza kıyasla pahalı olmasına rağmen izotonik olduğu, düşük toksisite ve osmolariteye sahip olduğu için subsellüler membran keseciklerin ayrılmasında kullanılmaktadır [33].

2.2.3. Karşıt-Akım Santrifüj Tekniği

Karşıt akım (Counterflow centrifugal elutriation (CCE)) santrifüj yönteminde; mikro akışkan kanalların ve akışkan ortamın kullanımı ile disk santrifüj tekniği geliştirilerek kullanılmaktadır [34]. Partiküle etki eden sürücü kuvvetler akış hızı ve rotorun dönme hızı değiştirilerek kontrol edilmektedir [18]. Sabit akış halinde bir akışkana zıt yönde etki eden merkez kaç kuvvetinin etkisiyle mikro kanallarda partiküllerin alıkonması (retention) sağlanmaktadır. Böylece ilk etapta düşük

yoğunluklu akışkan kullanılarak düşük yoğunluklu ve küçük boyutlu partiküllerin ayrılması, çökme hızı yüksek olan partiküllerin ise mikro kanalda tutulması gerçekleştirilmektedir. Partiküller yüksek yoğunluklu bir akışkan ortamında ikinci kez ayırma işlemine tabi tutulmaktadır [18]. Bu yöntemle kemik iliği ya da kandan elde edilen hücrelerin çökme hızına bağlı olarak alt gruplarına ayrılması sağlanmaktadır [35]. Mikro akışkan kanal entegreli rotor ve akış pompası içeren bu yöntem standart santrifüj cihazlarına göre daha maliyetli olmaktadır.

2.3. Nanopartiküller ve Biyolojik Uygulamaları

Boyutları 100 nm'nin altında olduğu için üstün kuantum mekaniksel özellikler sergileyen nanopartiküllerin, fizikokimyasal özelliklerinin anlaşılması ve geliştirilmesi bugün pek çok endüstriyel alanda önem taşımaktadır. Özellikle demir oksit manyetik nanopartikülleri, altın ve gümüş metalik nanopartikülleri ve floresans özellikli kuantum noktalar biyoanalizlerde yaygın olarak kullanılan ve geliştirilmekte olan nanopartiküllerdir. Yüzeyi kimyasal olarak aktif hale gelen bu nanopartiküllere peptit, protein, antibadi, nükleik asit, lipid, karbonhidrat ve antibiyotik gibi farklı biyomoleküller bağlanmaktadır. Böylece nanopartiküllerin hücre ile etkileşimi incelenmektedir. Nanopartiküllerin biyoyumlu olması; antibiyotik direnci, kontrollü ilaç salınımı, gen taşınımı çalışmaları ve biyosensör uygulamaları için önem taşımaktadır [5, 36-39].

2.3.1. Altın Nanopartiküller

Altın nanopartikülleri kolay sentezlenme ve fonksiyonelleştirme özelliği ile yaygın olarak çalışılan nanopartiküllerdir. Ayrıca güçlü plazmonik özellikleri, biyoyumlu olma, toksik özellik göstermeme ve hücre ölümüne neden olmama (noncytotoxicity) özellikleri ile biyomedikal alanlarda; hedefe özgü ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde, Raman sinyalinin yükseltici etiket olarak biyosensörlerde ve kontrast ajan olarak görüntüleme kullanılmaktadırlar. 10-40 nm çaplarında sentezlenebilen altın nanopartiküller boyutlarındaki değişime göre farklı fiziko-kimyasal ve hidrodinamik davranışlar sergilemektedir. Bu nedenle sıklıkla kullanılan, pek çok önemli uygulaması olan altın nanopartiküllerin boyutlarına ve şekillerine göre yoğunluk gradient santrifüjde ayrılmaları da büyük önem taşımaktadır [8, 19, 22, 40-43].

2.3.2. Manyetik Nanopartiküller

Manyetik nanopartiküller boyutlarının küçük olması ve yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip olmaları nedeniyle manyetik işaretleyici ve manyetik rezonans görüntüleme ajanı olarak biyolojik maddelerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Bunun yanısıra immünomanyetik ayırım, ilaç taşınımı, hipertermi gibi pek çok biyomedikal uygulamada manyetik NP'ler kullanılmaktadır.

Genellikle geçiş metalleri ve metal oksitlerden oluşan manyetik NPlerin boyutları da 1-100 nm aralığında değişmektedir. Lakin geçiş metalleri oksitlenmeye çok açıktır ve toksik özellik göstermektedir. Bu nedenle ferrimanyetik demir oksitler, nispeten düşük mıknatıslanma özelliklerine rağmen, oksidatif olarak kararlı oldukları için tercih edilmektedirler. Manyetik çekirdek nanopartiküller genellikle kümeleşme eğilimlerinin fazla olması nedeniyle kullanıma uygun olmamaktadır. Ayrıca metal varlığında biyolojik moleküller kararlı halde kalamayıp, bozunma reaksiyonları gösterebilmektedir. Bu yüzden manyetik çekirdekler inorganik kabuk yapılarıyla kaplanarak biyolojik etmenlerle çalışmaya uygun hale getirilmektedirler.

Boyutları tek bir domain boyutundan daha küçük olduğu için superparamanyetik özellik gösteren nanopartiküller, üstün manyetik özelliklerinin yanısıra kolloidal özellikleri nedeniyle de biyolojik uygulamalarda tercih edilmektedir [44]. Antikor ile işaretlenmiş manyetik partiküller karışım içindeki hedeflenen antijene hedefe özgü olarak bağlanmaktadır. Manyetik NPlerin hücrelere bağlanması antijen sayısı ile orantılı olduğu için mikroorganizmaların miktar tayinlerinde partiküllerin bu özelliklerinden yararlanılmaktadır. Örneğin, El-Boubbou ve arkadaşlarının tarafından mannoz kaplı manyetik nanopartiküllerin 200 kat monomerik mannozdan daha yüksek afinite gösterdiği sunulmuştur. Ayrıca manyetik glikol nanopartiküllerin *E. coli*'nin teşhisinde kullanılıp ardından hedef bakterilerin buldukları matrisden taşındığını gösterilmiştir [45]. Lin ve grubunun çalışmasında ise biyofonksiyonel manyetik NP'ler kullanılarak bakteri yakalamak için, Gram pozitif bakterilerin hücre duvarlarında D-Ala-D-Ala parçalarına bağlanan bir antibiyotik olan vankomisin kullanılmıştır [38]. İzole edilmiş numuneler ayrıca matris destekli lazer desorpsiyon / iyonizasyon kütle spektrometresi (MALDI-MS) ile karakterize edilmiş, kütle spektrumlarındaki safsızlıkların etkisi manyetik ayırma işleminden sonra azaltılmıştır. *Staphylococcus aureus* için teşhis limiti 7.10^4 kob/ml olarak bulunmuştur. Benzer yaklaşımla vankomisin kaplı manyetik NPler bakteri

yakalamak için kullanılıp floresein amin bağlanarak floresans mikroskopunda analiz edilmiştir. Kan örneklerinde yapılan çalışmada analiz süresi 2 saat, teşhis limiti 10 kob/ml olarak bildirilmiştir.

2.3.3. Kuantum Noktalar

Boyutları 2-10 nm arasında değişen yarı iletken nanokristal yapılar kuantum noktalar (Qdot) olarak adlandırılmaktadır. Periyodik cetvelin II-VI ve III-V grubu bileşikleri yani bütün yarı iletken-metal bileşiklerinden kuantum nokta elde etmek mümkün olmaktadır. Çoğu yarı iletken için, bir eksitonun Bohr yarıçapının 1-10 nm aralığında olduğu bilinmektedir. Yarı iletken kristalin boyutları Bohr uyarım yarıçapından (exciton-Bohr radius) küçük olduğunda, kuantum sınırlama (quantum confinement effect) etkisi görülmekte ve enerji seviyeleri kesikli hale gelmektedir. Malzemedeki kuantum sınırlama tek boyutta ise “kuantum kuyusu”, iki boyutta ise “kuantum tel”, üç boyutta ise “kuantum nokta” olarak adlandırılmaktadır.

Yarı iletkenler dolu bir değerlik (valans) bandı ve boş iletim bandına sahip olmaktadır. Yarı iletken enerji aralığından (E_g) daha büyük bir enerji yollandığında 1 elektron değerlik bandından iletim bandına geçmektedir. Bu geçiş boyunca değerlik bandına 1 elektron yoksunluğu yani boşluk (hole) oluşmaktadır. Elektron oluşan boşluk boyunca hareket etmektedir. Boşluk pozitif yükü ve etkili kütlesi olan bir partikül olarak varsayılmaktadır. Birbirine elektriksel olarak bağlı olan bu yapı (elektron-boşluk çifti) eksiton olarak adlandırılmaktadır. Uyarılmış elektron enerji fazlasını iletim bandında kaybettiğinden değerlik bandına geri dönerken yaptığı ışımaya elektron-boşluk çiftinin (eksiton) birleşimi sayesinde olmaktadır. Eksiton, küçük boyutlu bir kristalde daha dar bir bölgede oluşacağı için eksitonu sınırlamak için daha fazla enerjiye ihtiyaç olmaktadır. Dolayısıyla yarı iletken nanokristalin enerji bant aralığı artmaktadır. Elektron-boşluk çifti birleşince yayınlanan ışın daha yüksek enerjili olan kısa dalgaboyunda oluşmaktadır. Bu nedenle, yarı iletken nanokristalin boyutu azaldıkça absorbe edilen ve yayınlanan ışının renginin maviye kaymasından söz edilmektedir.

Yarı iletken-metal nanokristallerin kuantum sınırlama etkileri nedeniyle optik, elektrik, manyetik ve kimyasal özellikleri değiştirilebilmektedir. Boyutlarının değiştirilmesi ile bant boşluğu değiştirilebildiği için kuantum noktalara görülebilir bütün frekanslarda ve kızıl ötesi frekanslarda ışımaya yaptırılabilir. Optik ve

elektrik özellikleri nedeniyle CdSe, PbS, PbSe, InAs, GaN ve ZnS gibi kuantum noktalar en çok üretilen Qdotlar olarak sayılmaktadır [46-53].

Kuantum noktaların mikrobiyolojideki ilk uygulamaları Kloepfer ve ekibi tarafından 2003'te sunulmuştur. Buğday tohumu agglutinin ve transferrin proteini ile bağlanan CdSe kuantum noktaların patojenik bakteri ve mantar etiketlemesi üzerine başarılı olmuştur. Daha sonra Zhu ve ekibi, iki su kaynaklı patojen olan *Cryptosporidium* ve *Giardia* için immunofloresan antikor prob çalışmıştır. Zhao ve ekibi 2009'da gıda kaynaklı bakterilerden *Salmonella typhimurium*, *Shigella exneri* ve *Escherichia coli* 'nin kuantum nokta ve manyetik nanopartikül etiketleri ile tayinini yayınlamıştır.

Kitosan gibi biyoyumlu malzemelerle Qdot yüzeyinin kaplanmasıyla kuantum noktalar pek çok in vivo ve in vitro biyogörüntüleme uygulamalarında yer almaktadır [49, 54]. Kitosan; kitin'in deasetilasyonu ile elde edilen lineer bir aminopolisakkarittir. Yengeç ve karides gibi kabuklu deniz hayvanlarının kabuklarında, böceklerin iskeletinde ve mantarların hücre duvarının yapısında bulunan kitin; doğal bir biyopolimerdir. Deasetilasyon ile kitinin üzerindeki asetilamino (-NH-CO-CH₃) gruplarının amino (-NH₂) gruplarına dönüştürülür ve bu yapı kitosan olarak adlandırılmaktadır [55].

Kuantum noktalar; fonksiyonel yüzeyleri nedeniyle biyomolekülle çok yönlü kovalent bağ yapabilir, gösterdikleri optik kararlılık (photostability) nedeniyle uzun uygulama sürelerinde çalışılabilir, sahip oldukları üstün parlaklık ve adapte edilebilir optik özellikleri nedeniyle iki ya da daha fazla analitin çoklu analizine (multiplexed detection) izin vermektedir. Tüm bu avantajları göz önünde bulundurulduğunda biyosensör uygulamalarında organik floresans boya yerine kuantum noktaların kullanılması tercih edilmektedir [49, 56].

2.3.4. Karbon Nanopartiküller

Karbonun amorf ve kristalin allotropları bulunmaktadır. Karbon nanopartiküllerin de nano-çubuk, tek ya da çift duvarlı nanotüp, nanoküre, nanofiber, fulleren ve kuantum nokta gibi farklı atomik dizilimleri mevcuttur. Farklı karbon düzenlenimleri ve küçük boyutları nedeniyle partiküller yüksek yüzey alanı, yüksek emilim kapasitesi ve düşük toksisite gibi üstün fizikokimyasal özellikler sergilemektedirler. Bu üstün özellikleri ile karbon nanopartiküller in-vivo ve in-vitro ilaç taşıma sistemlerinde moleküler taşıyıcı, absorbent ve katalizör olarak kullanılmaktadırlar.

Ayrıca karbon nanopartiküllerin yeni çeşiti sayılabilecek CNPler; düşük maliyeti ve yüksek biyouyumluluğu nedeniyle biyomedikal uygulamalar için potansiyel oluşturmaktadır [29, 57-64].

2.4. Biyomolekül Takibi için Floresans Etiketleme

Mor ötesi (ultra violet) UV ışın görünür ışıandan kısa, X ışınından uzun dalga boyuna sahip (yaklaşık 10-400 nm) bir elektromanyetik dalgadır. UV radyasyon, dalga boyuna göre; uzak-UV (extreme-UV, 10-200 nm) ve yakın-UV (near-UV, 200-380 nm) olarak ikiye ayrılabilir. Yakın-UV insan sağlığına ve çevreye etkileri göz önüne alınarak; UV-A (uzun UV), UV-B (orta UV) ve UV-C (kısa UV) olarak üç sınıfa ayrılmaktadır. Morötesi UV-A (darklight) ışınları; dalgaboyu 315-400 nm, foton enerjisi 3.10-3.94 eV olan, ozon tabakası tarafından absorbe edilmeyen ışınlardır. UV-A ışınları yüksek enerjisi nedeniyle yeşil, sarı, kırmızı tüm floresans boya ları uyarabilmektedir.

Biyolojik aktiviteleri moleküler seviyede görüntüleyebilmek için floresans takviyeli nanopartiküllerin kullanımı önem taşımaktadır. Literatürde protein ve nükleik asitleri etiketlemek için sıklıkla kullanılan amin reaktif floresans boya lar floreskamin, rodamin, tetrametil rodamin vb. sayılabilir. Floresans boya lar 400-500 nm arasında farklı dalgaboylarında ışığı absorplayıp, 400-700 nm arasındaki dalga boya larında ışığı yayarlar. Floreskamin boya r maddesi de 375-380 nm dalgaboyundaki ışınla uyarıldığında 470 nm dalgaboyunda ışın yaymaktadır. Floreskamin tek başına floresans ışına yapmayan, primer amin, peptid ve proteinler ile bağlandığında yüksek floresans özelliğe sahip florofor yapı oluşturan bir maddedir. Sekonder amin gruplarıyla bağlandığında ya da bağ yapısındaki farklılıklar nedeniyle floresans özellik göstermeyen ürünler de oluşturabilir. Floreskamin-protein yapısında serbest amino gruplarının varlığı floresans özellik ile doğru orantılı olmaktadır [65-67].

Floreskamin stok çözeltisi hazırlamak için çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO), dimetil sülfat (Me₂SO), aseton ve dietilen oksit (1,4-dioksan) kullanılabilir. Hazırlanan floreskamin stok çözeltileri istenilen protein çözeltileri ile belirli oranda karıştırılarak floresans spektroskopisinde kullanılmaktadır [65].

2.5. Hedefe Özgü Biyokimyasal Etkileşimler

Streptavidin ve avidinin, biotin ile arasındaki bağlanma bilinen en güçlü kovalent olmayan etkileşimdir (K_{d, str.}~ 10⁻¹⁴ mol/l, K_{d, avi.}~ 10⁻¹⁵ mol/l). Bu etkileşimler pek

çok biyosensör uygulamasında kullanılmaktadır. Bu hedefe özgü ve güçlü etkileşimin pH, sıcaklık, organik çözücüler ve yüzey aktif madde gibi koşullardan etkilenmemesi de tercih sebebidir. Protein yakalama, yüzeyde tutundurma, fonksiyonelleştirme ve moleküllere bağlama için biotin ile proteinlerin etiketlenmesi yapılmaktadır [68]. Antibadi ile etkileşim için Koo ve arkadaşları yaptıkları çalışmada oda sıcaklığında karıştırıcıda 1 saat, ya da buzdolabında +4°C 'de gece boyunca bekletmiştir [69]. Rastogi ve arkadaşları ise +4°C 'de 24 saat bekletmiştir [70].

Protein yapıdaki antikorlar, hedefe özgü bir antijenin tanınmasında yüksek spesifikliğe sahip oldukları için biyolojik tanıma için kullanılmaktadırlar. Antikor-antijen etkileşiminin kararlılığı biyomoleküler reaksiyon sırasında varolan hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimler gibi kuvvetlere bağlı olarak değişmektedir. Antikorda var olan dipoller antijenin dipolleriyle etkileşir ve bağlanma için uygun bir yönelmeyi sağlamak için ortak hareket ederler. Bu elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları moleküller arası kararlılık için birincil katkı sağlarken diğer güçler tamamlayıcı olarak görev yapmaktadır [71, 72].

2.6. Koliform Bakteriler ve Teşhis Yöntemleri

Koliform bakteriler fakültatif anaerobtur; yani oksijenli ortamda üreyebilmelerinin yanısıra alternatif solunum mekanizması ile oksijensiz ortamda da üreme yapabilmektedirler. Hem fermentatif hem de nonfermentatif metabolizmaları bulunmaktadır. Laktoz ve mannitolü fermente ederek asit ve gaz oluşturmakta, triptofandan indol üretmektedirler. Spor oluşturmayan, gram-negatif ve çubuk şeklindeki bakterilerdir. Koliform bakterilerden *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes* ve *Klebsiella pneumoniae*; *Enterobacteriaceae* üyeleridir. 1885 yılında çocuk dışkılarından izole edilen *Escherichia coli*; bugün yapısı en çok bilinen ve sıklıkla çalışılan bir koliform bakteridir. 37°C'de gelişen *E.coli* için optimal pH değeri 7.2 iken, minimal pH değeri 5'tir. *E.coli*'nin patojen olmayan suşları sıcakkanlı hayvanların normal bağırsak florasında bulunmaktadır. İnsanlar için patojenik özellik gösteren *E.coli* suşları; Enterotoksijenik *E.coli* (ETEC), Enteropatojenik *E.coli* (EPEC), Enteroaggregatif *E.coli* (EaggEC), Enteroinvaziv *E.coli* (EIEC), Enterohemorajik *E.coli* (EHEC) ve Diffuzadeziv *E.coli* (DAEC) olarak sayılmaktadır. Memeli hayvanların bağırsak ve dışkılarında

yaşayan *E.coli*'nin içme suyunda ya da gıdalarda tespit edilmesi o maddeye doğrudan ya da lağım suyu ile dışkı bulaştığını göstermektedir. Bunun yanısıra toprak ve bitki yoluyla da insan vücuduna giren koliform bakteriler ciddi sağlık problemlerine sebep olmaktadır.

Koliform sayımında kullanılan geleneksel yöntemler; EMS yöntemi, katı besiyerinde kullanılan yöntemler, membran filtrasyon yöntemi, hızlı sayım yöntemleri olarak dört gruba ayrılmaktadırlar. Bu bölümde geleneksel bakteri teşhis ve sayım yöntemleri açıklanmaktadır.

2.6.1. Mikroorganizma Sayım Yöntemleri

2.6.1.1. En Mükemmel Sayı Yöntemi

Fekal koliform bakteri sayımında sıklıkla kullanılan en mükemmel sayı (EMS) yöntemi aşamaları; koliform grup bakterilerin muhtemel sayısını belirlemek, koliformların kesin sayısını onaylamak, farklı besiyerlerinde koliformların sayısını belirlemek ve *E.coli* sayısını belirlemek olarak gerçekleştirilmektedir. Türk Standartları Enstitüsü (TSE) ve Uluslararası Standartlar Örgütü (ISO)'nün standart koliform grup analiz yöntemine göre; örnekten hazırlanan ardışık 5 dilüsyondan üçer adet Lauril Sülfat Triptoz Broth (LST) besiyerine ekim yapıp 37°C'de 24-48 saat ünkübasyondan sonra pozitif sonuç veren örnekler muhtemel koliform olarak değerlendirilmektedir. Muhtemel koliform sayısını doğrulamak için 2015'te yürürlüğe giren TS ISO 7251 detaylarında; LST besiyerinde pozitif sonuç veren tüplerden su banyosunda 44.5°C'de tutulan Broth besiyerlerine ekim yapıp gaz oluşumu için 24-48 saat inkübasyona bırakılmaktadır. Gaz oluşumu görülen tüpler fekal koliform olarak değerlendirilmektedir. Broth besiyerinde pozitif sonuç veren tüplerden 44.5°C'deki Tripton Water (TW) besiyerine ekim yapıp 48 saat inkübasyondan sonra indol testi ile pozitif reaksiyon veren tüpler *E. coli*, negatif reaksiyon verenler ise *E. coli* dışındaki diğer fekal koliformlar olarak tespit edilmektedir.

2.6.1.2. Katı Besiyeri Yöntemleri

İzolasyon amacıyla yapılan koliform sayımlarında en çok tercih edilen Violet Red Bile (VRB) Agar besiyerinin yanısıra, Enriched Lauryl Sulphate Aniline Blue Agar, XLD Agar, Fecal Coliform Agar, Pepton Tergitol Glucuronide Agar, Deoxycholate Agar, Endo Agar ve Brilliant Green Agar katı besiyerleri de kullanılmaktadır. Dökme, yayma ve damlatma yöntemleriyle koliform grup sayısı standart şekilde

hesaplanmakta, birimi kob/ml olarak verilmektedir. VRB Agar'da atipik koloni gelişimi olduğunda Brilliant Green Bile (BGB) Broth besiyerine aşılama yapılarak 32°C'de 24 saat sonra gaz oluşumu takip edilmektedir.

2.6.1.3. Membran Filtrasyon Yöntemi

Bu yöntem; mikroorganizma geçişine izin vermeyecek 0.45 µm por çapına sahip olan filtreden numunenin vakum yardımıyla süzülmesi temeline dayanmaktadır. Filtrasyondan sonra bakteri sayımı için filtre doğrudan mikroskopta incelenebileceği gibi, membran filtre katı besiyeri üzerine yerleştirilip inkübasyondan sonra sayım yapılabilir. Bu yöntemle 1 kob/ml'den daha az sayıda mikroorganizma içeren numunelerin analizi de gerçekleştirilebilmektedir. Yüksek hacimli örneklerde sayım yapmaya elverişli olmasının yanısıra klasik analizlere göre daha hızlı ve güvenilir sonuç vermektedir[73].

2.6.1.4. Hızlı Sayım Yöntemleri

4-methyleumbelliferyl-e-D-glucuronide (MUG) tekniği; besiyerine eklenen MUG adlı kimyasalın mikroorganizmada bulunan e-D-glucuronidase (MUGase, e-GUR) enzimi tarafından 366 nm UV ışık altında floresans ışımaya veren 4-methyleumbelliferone adlı ürüne dönüşmesi temeline dayanmaktadır [74, 75]. e-D-glucuronidase pozitif olan bakteriler içinde indol pozitif olan tek bakteri *E. coli*'dir. Bu nedenle *E. coli* dışında bazı e-D-glucuronidase pozitif bakterilerin neden olduğu reaksiyonlar indol testi ile belirlenebilmektedir. Ayrıca bazı *E. coli* suşları yoğun üremeye bağlı olarak aşırı miktarda asit oluşturmakta ve floresans ışımayı maskeleymektedir. Bu gibi durumlarda besiyerine NaOH eklenerek pH yükseltilerek floresans reaksiyonu gerçekleştirilmektedir. MUG, katı ve sıvı besiyerlerinin bileşimine kolaylıkla ilave edilebildiği için, EMS yöntemi, katı besiyeri ve membran filtrasyon yöntemi ile yapılan analizlerde kullanılabilir.

Optik ölçüm yöntemi; üreme ortamında optik yoğunluk ölçümü ve mikroorganizma gelişimi sonucu meydana gelen pH ve redoks değişimlerinin optik yolla ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Homojen hücre süspansiyonundan geçen ışığın turbidometri ile optik yoğunluğundaki düşüş ölçülmekteyken, nefelometri ile partiküle çarpan ışığın kırılma açısı ölçülmektedir. Fakat ortam koşullarının optimumdan sapması sonucu üreme ortamında bulunan poli-hidroksi bütirik asit (PHBA), volutin ve vakuol gibi hücre sayısına bağlı olmayan yapılar ışık kırılmasına sebep olmakta ve optik yoğunluk ölçüm sisteminde hataya sebep

olmaktadır. Mikroorganizma gelişimi sonucu gerçekleşen pH ve redoks değişiklikleri ise; besiyerinde bulunan (bromcresol purple) indikatör yardımıyla tespit edilmektedir. İndikatörün renk değişimi ile besiyerinden geçen ışık şiddetinde meydana gelen değişimler tespit edilmektedir. Bu amaçla üretilen ticari optik sistemlerde inkübasyon süresince optik okuyucu tarafından değişim kaydedilmektedir. Böylece 1-12 saat içerisinde *E. coli* sayımı gerçekleştirilebilmektedir.

Elektrokimyasal yöntemler; bakteri kültüründe oluşan moleküler hidrojenin ölçülmesi, bakteri kültürünün ortam direncin ölçülmesi ve elektrot yüzeyi ile ilişki kurulduğunda bakteri yüzeyleri ile arada oluşan elektron transferinin ölçülmesi temellerine dayanmaktadır. Wang ve Alocilja *E. coli* O157:H7 tayini için elektrokimyasal biyosensör ile AuNP kullanarak LOD değerini 10^1 kob/ml olarak geliştirmiştir [40].

Adenozintrifosfat (ATP) biyoluminesans yöntemi; ortamda ATP'nin kantitatif olarak belirlenmesi ile bakteri miktarının saptanması temeline dayanmaktadır. Canlı tüm hücreler metabolizma faaliyetleri sırasında ATP 'de depolanan yüksek enerjili fosfat bağları meydana getirmektedirler. Bakteri hücrelerinin ölümüyle ATP de ortamdaki kaybolmaktadır. ATP'nin lusiferin ile lusiferaz enzimi ve magnezyumun katalizörlüğü altında reaksiyona girmesi, bu reaksiyon sonucu meydana gelen lusiferil odenilat kompleksinin oksijen ile birleşerek oksilusiferin, CO₂, ATP ve ışık meydana getirmesi olayı biyoluminesans reaksiyonu olarak bilinmektedir. Bu reaksiyon sonucu ortaya çıkan ışık fotometrede 10^{-12} g ATP/litre duyarlıkla ölçülmektedir. Bir ATP molekülü bir foton meydana getirmektedir. Bakterilerin gelişme sürecinde hücre başına $4,7 \cdot 10^{10}$ µg ATP meydana gelmektedir. Dolayısıyla çok az miktardaki canlı hücreler bile bu sistemde ölçülebilmektedir. Cheng ve arkadaşları ATP-lüminesans yöntemi ile manyetik NPLeri kullanarak *E.coli* tayininde LOD değerini 20 kob/ml olarak hesaplamışlardır [2]. Öte yandan; bu yöntem oldukça yüksek bir maliyet gerektirmektedir. Ayrıca, ATP biyoluminesans yöntemi gıdalardaki bakteri sayılarının ölçümünde başarılı bir şekilde kullanılamamaktadır. Gıda ile çalışırken ortamda gıda maddesinin kendisinden gelen ATP'ler de bulunmaktadır. Bakterilerin yanısıra ortamda maya ve küf de varsa bu mikroorganizmalar bakterilere oranla hücre başına daha fazla ATP içermektedirler.

İmmünolojik analiz yöntemleri; antijen antibadi etkileşimleri temelinde dayanmaktadır. Bu yöntemde, küçük boyutları ve yüksek manyetik dipol momente sahip olmaları nedeniyle süperparamanyetik demir oksit NPLeri sıklıkla birincil etiket olarak kullanılmaktadır. Manyetik NPLer hedefe özgü antibadi ile bağlanarak hedef analit ortamına gönderilmektedir. Ortamda bulunan bakteri, virüs, enzim vb. tayin etmek istediğimiz biyomolekül ile etiket olarak hazırlanan nanopartiküller inkübasyona bırakılmaktadır. İnkübasyondan sonra ortamda biyomoleküle bağlanmayan nanopartiküller, etiket ile bağlanmayan ve bağlanan biyomoleküller bulunmaktadır. Mıknatıs ile manyetik ayırma gerçekleştirildiğinde bağlanmadan kalan manyetik nanopartiküller ve biyomoleküle tutunan manyetik NPLer ayrılabilir. Ancak bağlanan ve bağlanmayan manyetik NPLeri ayırmak için ikincil etiketleme (secondary label) yapılmaktadır. Böylelikle yeni bir antibadi-nanopartikül çifti ortamdaki hedef moleküllere tutunmakta ve tayin için ikincil etiketin takibi yapılmaktadır. Bu ikincil etiket biyomolekül tayininde kullanacağımız yöntemle ilgili olarak farklı özelliklerde seçilmektedir. Raman sinyali takibi için plazmonik özelliğinden dolayı altın nanoçubuklar, floresans takibi için kuantum noktalar ikincil etiket olarak kullanılmaktadır [44, 76-88]. Guven ve arkadaşlarının geliştirdiği yüzey zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi (SERS)-tabanlı sandviç yönteminde LOD 8 kob/ml ve LOQ değeri 24 kob/ml olarak verilmiştir [83]. Temur ve arkadaşlarının küresel AuNP ile yaptıkları çalışmada LOD 5 kob/ml olarak hesaplanmıştır [89]. Lin ve arkadaşları *E. coli O157:H7* tayini için kablosuz manyetoelastik algılayıcı geliştirerek kitosan modifiyeli ferrit NP kullanımıyla LOD değerini 10 kob/ml olarak belirlemişlerdir [90]. Mao ve arkadaşları *E. coli O157:H7* tayini için manyetik NPLerin yardımıyla geliştirdikleri kuvars kristal mikroterazi yöntemi ile LOD değerini $2.67 \cdot 10^2$ kob/ml olarak bulmuşlardır [3].

3. MATERYAL VE METOT

Patojenik bakterilerin tayini için geliştirilen nanopartikül temelli yoğunluk gradient santrifüj çalışmalarının temel basamakları şunlardır:

- Santrifüj yönteminde NP fazını takip edebilmek için farklı rotorlar (sabit açılı ve yatay rotor) kullanılmış, sentezlenen farklı nanopartiküller (altın, gümüş ve altın kaplı demiroksit nanopartikülleri) ile sükröz gradienti içerisindeki bant ilerlemeleri incelenmiş, Gaussyen bant ilerlemesi için uygun işlem parametreleri (süre, g kuvveti) ve gradient parametreleri (çözelti konsantrasyonu ve hacmi) belirlenmiştir.
- Avidin bağlanan ve hedefe özgü olmayan etkileşimle *E. coli* yakalayan nanopartiküllerin gradientte bant yapısındaki değişimleri incelenmiştir.
- Gradientte bakteri-NP bandının ilerlemesi için uygun tampon çözelti parametreleri belirlenmiştir. NP ve bakteri-NP fazlarının ayırt ediciliğinin artırılması için çift ve tek fazlı gradient sonuçları karşılaştırılmıştır. Optik ölçümde faz farkını arttırmak için floreskamin bağlanan manyetik NPLer ve CdTe kuantum noktaları ile çalışılmıştır.
- 10^5 - 10^8 kob/ml aralığında *E.coli* K-12 ile etkileştirilen CdTe Qdot arasında hedefe özgü olmayan ve hedefe özgü etkileşimler incelenmiş, uygun sükröz gradient santrifüj parametreleri belirlenmiş ve kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.
- Yöntemin seçiciliğinin ve hassasiyetinin geliştirilmesi için CNPLer ile 10^1 - 10^8 kob/ml aralığında *E.coli* K-12 etkileşimi çalışılmıştır. Tekrar edilebilir sonuçlar alınan parametrelerde sistem kalibre edilmiştir.
- Yöntemin seçiciliği *Enterobacter aerogenes* ile ispat edilmiştir.
- Hedefe özgü olmayan ve hedefe özgü olan etkileşimlerin *E.coli* bağlama verimliliğini hesaplamak için uygun fazlardan örnek alınarak katı besiyerinde bakteri sayımı yapılmıştır.
- Geliştirilen yöntemin gerçek örneklerde kullanılabileceğini göstermek için yağsız süt tozu kullanılarak *E. coli* K-12 analizi yapılmıştır.
- Çalışma boyunca kullanılan nanopartiküller uygun analiz yöntemleriyle karakterize edilmiştir.

3.1. Kimyasal Malzemelerin Hazırlanması

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Sükroz ($C_{12}H_{22}O_{11}$, MW 342.3 g/mol), sodyum hidroksit (NaOH), potasyum klorür (KCl), sodyum klorür (NaCl) ve potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) J.T. Baker Inc (Phillipsburg, New Jersey) firmasından temin edilmiştir. Tryptic Soy Broth (CASO Bouillon), chromocult coliform agar, sodyum dihidrojen fosfat (Na_2HPO_4), saf etanol ve gümüş nitrat ($AgNO_3$) Merck KGaA (Darmstadt, Almanya) firmasından, Tween 20 AppliChem, Biochemica (Darmstadt, Almanya) firmasından alınmıştır. Potasyum klorit (KCl), hekzadesiltrimetil-amonyum bromid (CTAB), tetrakloroaurik asit ($HAuCl_4$), perklorik asit ($HClO_4$), trisodyum sitrat dehidrat, demir(II) sülfat heptahidrat ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), demir (III) klorür ($FeCl_3$), hidroksilamin hidroklorür ($NH_2OH \cdot HCl$), albumin ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA) Sigma – Aldrich Inc. (Taufkirchen, Almanya) firmasından temin edilmiştir. N- (3- dimetilaminopropil)- N'- etilkarbodimid hidroklorid (EDC), 11-mercaptoundekanoik asit (11-MUA), 2-morfolinoetanesulfonik asit monohidrat (MES), etanolamin, 2- mercaptoetanol (2-ME) ve sodyum klorid Sigma-Aldrich Inc. (Steinheim, Almanya) firmasından satın alınmıştır. Avidin, N-Hidroksisüksinimid (NHS) Pierce (Rockford, Illinois), kitosan AcrosOrganics (Geel, Belçika) firmasından temin edilmiştir. Biotin işaretli *E. coli* antikoru Fitzgerald Industries International Inc. (Acton- MA, ABD), LB-Agar Laboratories Conda S.A. (Madrid, İspanya) firmasından temin edilmiştir.

Kullanılan tüm çözeltiler elektriksel direnci 18 MΩ.cm olan ultra saf su ile hazırlanmıştır.

3.1.2. Tampon Çözeltilerin ve Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Kuantum noktaların kitosan kaplama işlemi sırasında pH sabitlemek için asetat tamponu kullanılmıştır. Partikül yüzeyindeki karboksilat gruplarının aktivasyonu ve aktif hale getirilen karbonil gruplarına avidin bağlanması süreçlerinde MES tamponu, antikorların ve bakteri dilüsyonlarının hazırlanması ve partikül üzerine bağlanması aşamalarında fosfat (PBS) tamponu kullanılmıştır. Hazırlanan MES ve PBS tampon çözeltileri kullanılmadan önce 0.45 µm'lik filtreden geçirilerek ya da 121°C'de 15 dk otoklavlanarak steril hale getirilmiştir.

3.1.2.1. MES Tamponu

50 mM MES (2-morfolinoetanesulfonik asit monohidrat) tamponu hazırlamak için 533 mg MES 50 ml saf suda çözülmüştür. Derişik NaOH ile pH 6.5'e ayarlanmıştır.

3.1.2.2. Fosfat Tamponu

10 mM pH 7.4 fosfat (PBS) tamponu hazırlamak için 1 litre saf suya 1.44 g sodyum dihidrojen fosfat (Na_2HPO_4), 0.24 g potasyum dihidrojen fostat (KH_2PO_4) karıştırılmıştır. Üzerine 8 g NaCl ve 0.2 g KCl tuzları ilave edilmiştir. Derişik NaOH ile tampon pH 7.4 'e ayarlanmıştır.

3.1.2.3. Fosfat-Tween 20 Tamponu

Hacimce % 0.05'lik Fosfat-Tween 20 (PBST) çözeltilisini hazırlamak için; steril 10 mM pH 7.4 PBS tamponundan 10 ml steril balon jøjeye alınıp 5 µl Tween 20 ilave edildikten sonra iyice karıştırılmıştır.

3.1.2.4. Asetat Tamponu

1 M pH 5 tamponu hazırlamak için; 5.72 ml saf asetik asit, bir miktar su bulunan balon jøjeye alınmıştır. Derişik NaOH ile pH 5 'e çekilip üzeri su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.2.5. Floreskamin Stok Çözeltilisinin Hazırlanması

Bu çalışmada dioxan ve DMSO olmak üzere iki farklı çözücü ile 0.3 mg/ml floreskamin stok hazırlanmıştır. Floreskamin ışması çözücünün yapısına bağlı olduğu için dioxan ve DMSO içerisinde çözüldükten sonra pH 7.4 10 mM PBS ile seyreltilmiş, böylece bakteri-NP etkileşiminin bozulmaması hedeflenmiştir.

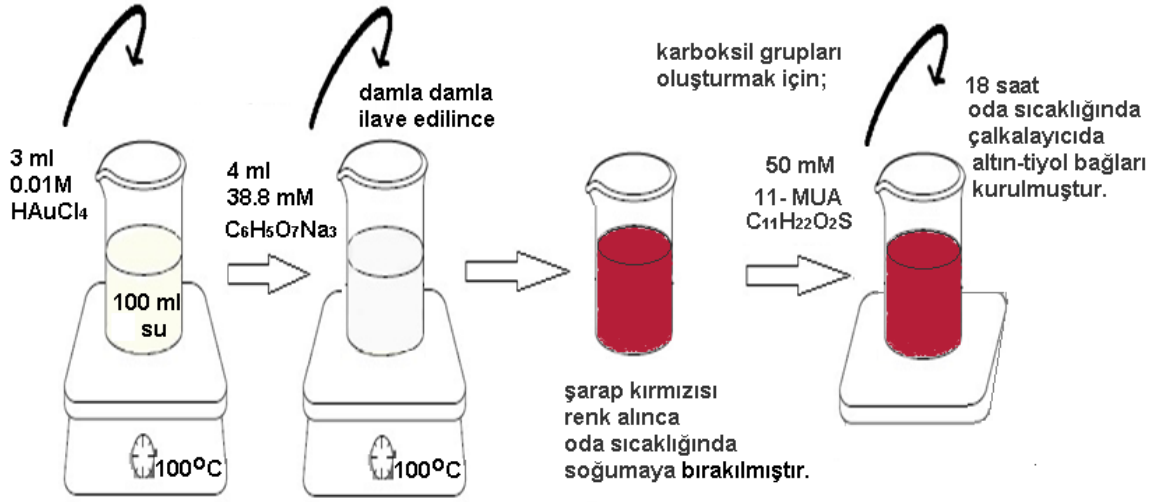
3.2. Nanopartiküllerin Hazırlanması

Bu bölümde NPlerin sentezi ve yüzeylerinde karboksil grupları oluşturmak için yapılan işlem basamakları sunulmuştur.

3.2.1. Altın Nanopartiküllerin Hazırlanması

Altın nanopartikül (AuNP) sentezi için Liu ve Lu'nun kullandığı yöntem uygulanmıştır (Şekil 10). 100 ml kaynayan saf suya 3 ml 0.01M kloroaurik asit (HAuCl_4) çözeltisi ilave edilmiş, çözelti sarı renk almıştır. 4 ml 38.8 mM sodyum sitrat çözeltisi damla damla ilave edildikten sonra, çözelti önce berraklaşmış sonra mordan kırmızıya renk değiştirmiştir. Renk şarap kırmızısı olana kadar kaynamaya devam edilmiş ve oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır [91].

Altın yüzeyler üzerinde etkin bir şekilde tek tabaka oluşturmak için, alkil zincirleri üzerinde fonksiyonel grupları bulunan ve altın ile dayanıklı bağ yapan 11-merkaptoundekanoik asit (11-MUA) ile çalışılmıştır. Altın kaplı nanopartiküller saf etanolde hazırlanan 50 mM 11-MUA ile etkileştirilmiş ve 18 saat çalkalayıcıda bekletilmiştir. Bu sayede altın-tiyol bağları kurularak nanopartiküllerin üzerinde karboksil grupları oluşturulmuştur.



Şekil 10. Kloroaurik asit ile indirgenerek hazırlanan AuNPLerin sentez şeması

3.2.2. Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi

Gümüş nanopartiküllerin (AgNP) sentezi için Lee ve Meisel'in 1982'de geliştirdikleri yöntem uygulanmıştır. 100 ml saf suya 17 mg gümüş nitrat (AgNO₃) eklenip kaynatılmıştır. 1 g trisodyum sitrat 100 ml suda çözülerek sitrat çözeltisi hazırlanmıştır. Manyetik karıştırıcıda kaynayan gümüş nitrat çözeltisine damla damla 5 ml sitrat çözeltisi eklenmiştir. Çözelti rengi sarı-gri renge döndükten sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır [92].

3.2.3. Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması

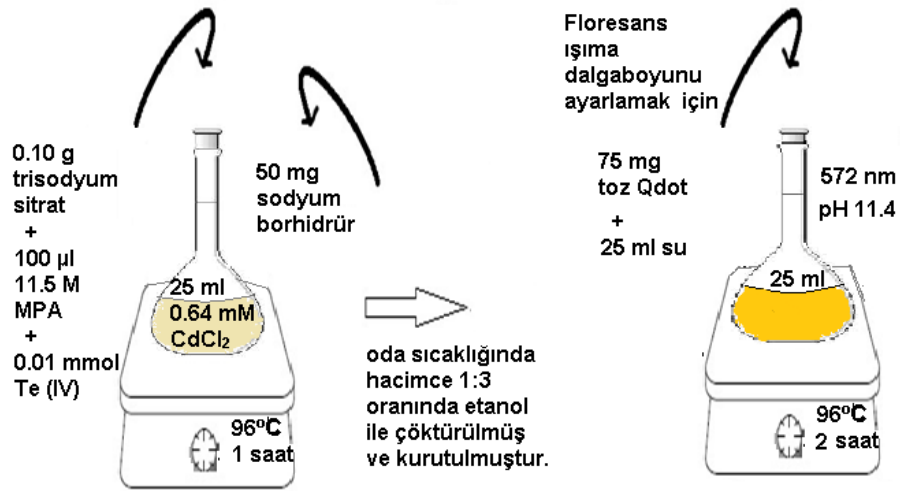
Manyetik nanopartiküllerin sentezi için; Tamer ve arkadaşları tarafından geliştirilen Fe⁺² ve Fe⁺³ iyonlarının birlikte çöktürülmesi yöntemi kullanılmıştır [93]. Sentez için 1.28 M demir (III) klorür (FeCl₃) ve 0.64 M demir (II) sülfat heptahidrat (FeSO₄·7H₂O) saf suda çözülmüş ve 100 ml 1 M NaOH çözeltisi hazırlanan bu demir çözeltisi içerisine eklenerek 40 dk karıştırılmıştır. Siyah çökelti manyetik olarak toplanmış, DI su ile üç kere 12500 rpm 10 dk santrifüj edilerek yıkanmıştır. Oksitlenmiş manyetik partikülleri elde etmek için demir tuzları 2 M perklorik asit

(HClO₄) ile 24 saat boyunca karıştırıcıda bekletilmiştir. Bu işlem ile oluşan asidik ortamı uzaklaştırmak için üç kere DI su ile yıkama yapılmıştır.

Altın manyetik NP (Fe₃O₄@Au NP) sentezi için Tamer ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem üzerinde küçük değişiklikler yapılmıştır. 10 mg ve 5 mg kütleli manyetik çekirdekler kullanılmış, indirgeyici 1 M NaOH'nin miktarı 300-500-700-900 µl hacimlerinde değiştirilerek uygun sentez parametreleri belirlenmiştir. 5 mg Fe₃O₄ çekirdek 5 ml saf suya eklenip sonikatörde karıştırılmıştır. 10 ml 1 M NaOH üzerine 1 g etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan bu iki çözelti 1:1 oranında karıştırılmıştır. 8000 rpm ile 10 dk santrifüj yapılmış ve üstte kalan sıvı uzaklaştırılmıştır. Kalan bölüme 7 ml 0.1 M setrimonyum bromür (CTAB), 0.01 M HAuCl₄'den 3 ml ve 700 µl 1 M NaOH eklenerek karışmaları sağlanmıştır. Her ekleme aşamasında çözelti sonikatörde karıştırılmıştır. Çözeltiye 150 mg hidroksil amonyum klorür (NH₂OH.HCl) ilave edilir edilmez çözelti rengi koyu kahverenginden kırmızıya dönmüştür.

3.2.4. Kitosan Kaplı CdTe Kuantum Noktaların Hazırlanması

CdTe kuantum noktası Doğan ve arkadaşları tarafından kullanılan yöntemle sentezlenmiştir [94]. Şekil 11'de görüldüğü gibi sentez için 0.64 mM kadmiyum klorür (CdCl₂) çözeltisinden 25 ml balon jöje içerisine alınıp manyetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılırken üzerine 0.10 g trisodyum sitrat, 100 µl 11.5 M MPA ve 0.01 mmol Te (IV) eklenmiştir. Daha sonra üzerine 50 mg sodyum borhidrür (NaBH₄) eklenmiştir. Çözelti 96°C'de 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Soğuduktan sonra kuantum noktalar hacimce 1:3 oranında ethanol ile çöktürülmüştür. Santrifüj edilip kurutulmuştur. Floresans ışımalarının daha uzun dalgaboylarında ayarlanması için, su içerisinde 75 mg toz halinde Qdot su içerisinde çözülmüş (pH 11.4), 96°C'de iki saat boyunca karıştırılmış ve 25 ml'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon sırasında çözelti içerisinde oluşan borik asit nedeniyle 2 saat sonra her seferinde absorban dalgaboyu 572 nm olamamaktadır. Dalgaboyunun 572 nm'ye gelmesi için karıştırma süresi uzayabilmektedir. Dolayısıyla elde edilen ürünün son pH'ı da her sentez sonrası pH 11.4 olmamaktadır. Bu nedenle kitosan kaplama sırasında pH ayarlaması için asetat tamponunun kullanılmasına karar verilmiştir.

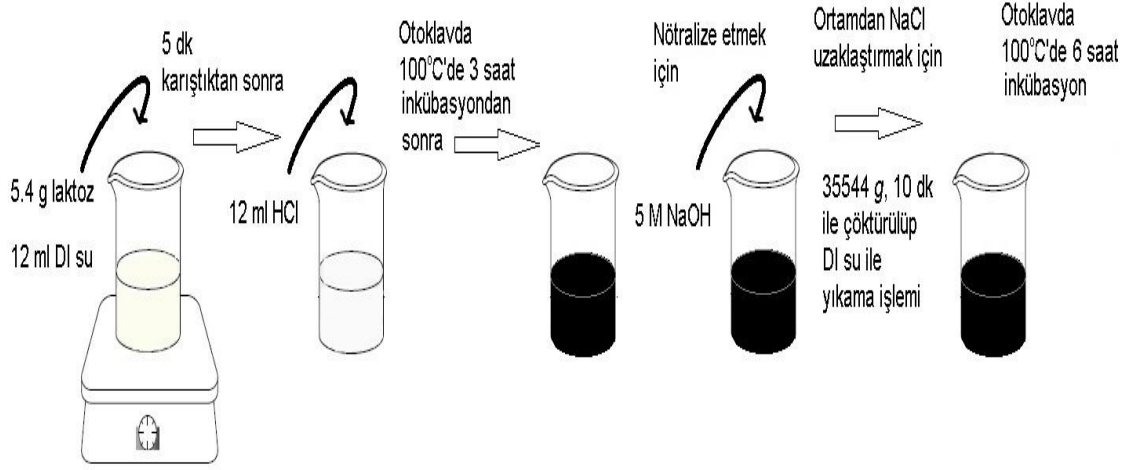


Şekil 11. Yüzeyi merkaptopropiyonik asit modifiyeli CdTe Qdotların sentez şeması

% 1 (h/h)'lik asetik asit içerisinde çözünerek hazırlanan % 1 (a/h)'lik kitosan çözeltisinden 20 µl alınıp 980 µl Qdot çözeltisi üzerine eklenecek şekilde stok Qdot-kitosan karışımı hazırlanmıştır. Kitosan kaplama işlemi için pH optimizasyonu yapılması hedeflenmiştir. pH 4.0-5.5 aralığında yapılan kaplama işlemleri sonrası uygun pH değeri belirlenmiştir.

3.2.5. Karbon Nanopartiküllerin Hazırlanması

Campos ve ekibinin karbon kuantum noktalar için tarif ettiği yöntem üzerinde küçük değişiklikler yapılarak karbon nanokürelere ait sentez yöntemi geliştirilmiştir [57]. Şekil 12'de gösterildiği gibi 5.4 g laktoz 12 ml deiyonize (DI) su ile çözüldürülmüştür. 5 dk karıştıktan sonra, 12 ml derişik (% 37 a/a) HCl eklenmiş ve süt beyazı renkteki karışım transparan renge dönüşmüştür. Hazırlanan karışım otoklavda 3 saat 100°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra karışımın rengi tamamen siyaha dönmüştür. Hazırlanan karbon nanopartiküller (CNP) 5 M NaOH ile nötralize edilip, 35544 g ile 10 dk santrifüj edilmiştir. Ortamdan NaCl uzaklaştırmak için, katı çökelek 6 kez santrifüj edilip DI su ile yıkanmıştır. Yıkanan nanopartiküller az miktarda DI su içerisinde dağıtılıp 100°C'de 6 saat inkübe edilmiştir.



Şekil 12. Hidrotermal karbonizasyon yöntemiyle karbon kürelerin sentez şeması

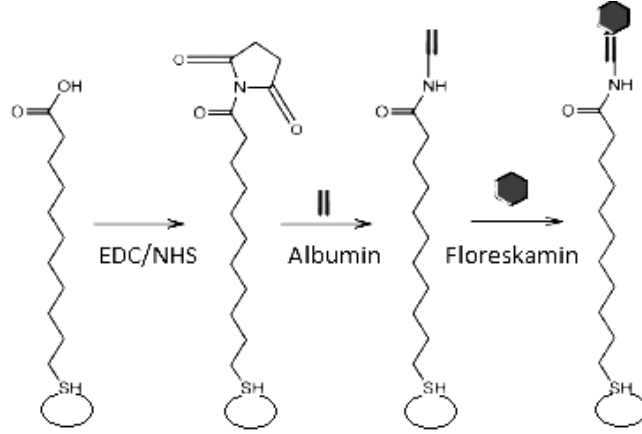
Yüzeyin karboksil grubu ile fonksiyonelleştirilmesi için hacimce 3:1 oranında hazırlanan sülfürik asit/nitrik asit çözeltisinden 250 ml alınıp, 0.5 g karbon NP ile 4 saat 20°C'de sonike edilmiştir [95]. Asit çözeltisi içeren NPler 35544 g 10 dk santrifüj parametrelerinde, pH 5 ayarlanacak şekilde defalarca DI su ile yıkanmıştır. Son olarak nanopartiküller etanol ile 2 kez yıkanmış ve 50°C'de fırın içerisinde kurutulmuştur. Elde edilen CNPler plastik torbalar içerisinde muhafaza edilmiştir.

3.3. Partiküllerin Modifikasyon Basamakları

Bu bölümde bakteri ile etkileşim öncesi nanopartiküllere uygulanan işlem basamakları detaylı olarak sunulmuştur.

3.3.1. Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Floreskamin ile Modifikasyonu

Ortamda partikül olmadan önce, albumin ve floreskamin moleküllerinin karışma oranı için uygun parametreler çalışılmıştır. 0.8 mg/ml ve 3.2 mg/ml derişimlerinde PBS içerisinde hazırlanan albumin çözeltisi ile 0.3 mg/ml floreskamin stok çözeltisi farklı oranlarda karıştırılmıştır. Hacimce 4:1 oranında karıştırıldığında yeterli UV ışıma alınmıştır. Bu nedenle albumin bağlı partiküller 4:1 oranında 0.3 mg/ml floreskamin (DMSO-PBS) stok ile karıştırılması uygun bulunmuştur.



Şekil 13. Nanopartiküllerin kimyasal aktivasyondan sonra model protein ve floresans boyar madde ile etkileşiminin şematik gösterimi

Şekil 13'te görüldüğü gibi EDC/NHS aktivasyon basamadığından sonra partiküller 0.8 mg/ml albumin çözeltisinde 40 dk karışmaya bırakılmıştır. Etkileşimden sonra bağlanmayan albuminlerin ortamdaki uzaklaştırılması için NPler 2 kez 10 mM pH 7.4 PBS tamponunda yıkanmıştır.

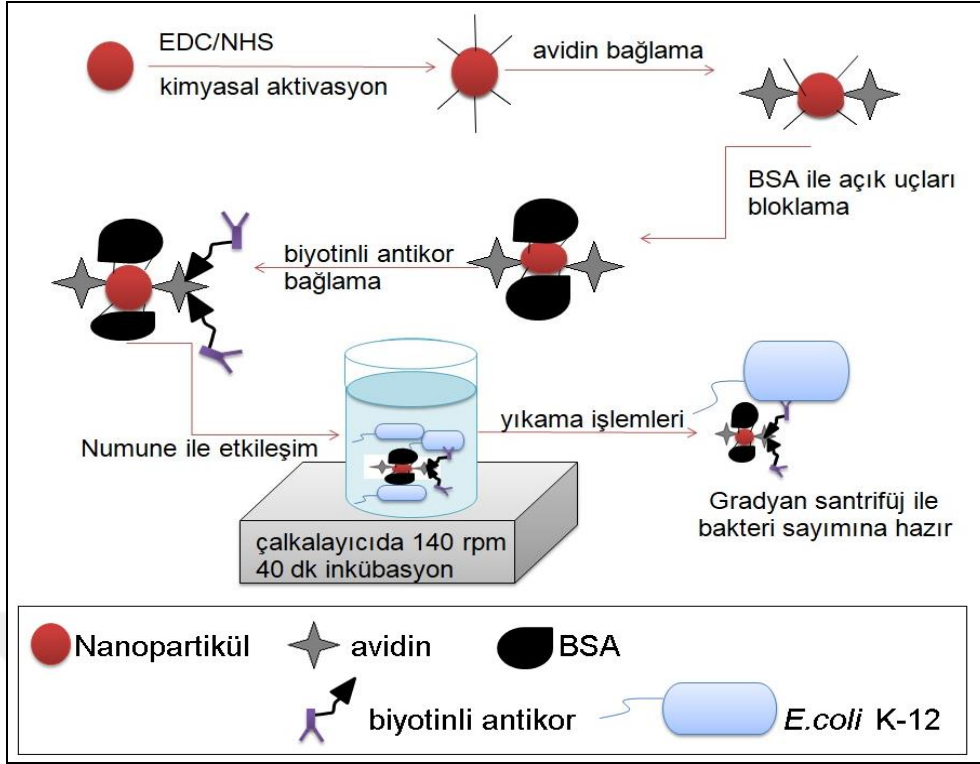
3.3.2. Karboksil Gruplu Yüzeylerin Kimyasal Aktivasyonu

Partiküllerin yüzeyindeki karboksil gruplarının aktivasyonu için pH 6.5 MES tamponu içerisinde hazırlanan 50 mM NHS ve 0.2 M EDC çözeltisi kullanılmıştır. NPler ile 30 dk karıştırıldıktan sonra yüzeyde amin reaktif NHS esterleri oluşturulmuştur. Ortamdaki EDC/NHS çözeltisini uzaklaştırmak için PBS tamponu ile üç kere yıkama yapılmıştır.

Kuantum noktaların 50 mM NHS 0.2 M EDC ile etkileşimi ve takiben santrifüj işleminden sonra partikül renginin kahverengine dönüp yapının bozulduğu görüldüğü için literatürde kullanılan standart EDC/NHS miktarı azaltılmıştır. Qdot ve CNP aktivasyonu için 1 ml NP çözeltisi üzerine 5 mg EDC eklenmiş, 5 dk karıştırılmıştır. Daha sonra üzerine 4 mg NHS eklenerek çalkalayıcıda 140 rpm ile 25 dk karışmaya bırakılmıştır. Yıkama işlemleri ile birlikte toplam 40 dk aktivasyon süresinden sonra NPlerin avidin ile etkileşimine geçilmiştir.

3.3.3. Bakteri-Nanopartikül Fazı Hazırlık Aşamaları

Bakteri teşhisi yapılacak numune ile etkileşimden önce yüzey aktif nanopartiküllerin geçirdikleri hazırlık aşamaları; avidin bağlanma, BSA ile bloklama ve biyotinli antikor bağlanma olarak sunulmuştur (Şekil 14).



Şekil 14. NPLerin gradient santrifüj işleminden önce bakteri yakalamak için geçirdikleri hazırlık basamaklarının şeması

Öncelikle, NP çözeltileri ile hacimce % 10 olacak şekilde 1 mg/ml avidin stok karıştırılmıştır. 50 dk inkübasyondan sonra bağlanmayan avidini ortandan uzaklaştırmak için 2 kez 50 g-4 dk parametrelerinde PBS ile yıkama yapılmıştır. Bu işlemden sonra nanopartikül yüzeyinde açık karboksil grupları varsa hedefe özgü olmayan etkileşimleri ortadan kaldırmak için açık uçların BSA ile doyurulması hedeflenmiştir. 1 mg/ml BSA ile hacimce % 7.5 oranında karıştırılarak 50 dk 140 rpmde inkübasyona bırakılmıştır. Ortamdan NPLere bağlanmayan BSA'yı uzaklaştırmak için RCF=50 g ve t=4 dk parametrelerinde PBS ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur.

Daha sonra, avidin-BSA kaplı NP yüzeyine antikor bağlanması için PBS içerisinde hazırlanan 0.1 mg/ml biyotinli antikor çözeltisinden hacimce % 10 oranında partiküllere eklenmiştir. 50 dk boyunca 140 rpm'de karışmaya bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 2 kez RCF=50 g ve t=4 dk parametrelerinde PBS ile yıkama yapılmıştır.

Son olarak, hazırlanan bakteri dilüsyonları ile antikor bağlı NPLer 40 dk boyunca 140 rpm'de oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Bakteri ile etkileşimden sonra hedefe özgü olmayan etkileşimleri koparmak ve ortamdan uzaklaştırmak için

RCF=50 g ve t=4 dk parametrelerinde PBST ile 2 kez, PBS ile 1 kez yıkama yapılmıştır.

3.4. Bakteri Hazırlık ve Sayım Yöntemleri

3.4.1. Besiyerlerinin Hazırlanması

Tryptic Soy Broth (CASO Bouillon) ile hazırlanan besiyeri, deney tüplerine 5'er ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiş ve kullanılmadan önce oda sıcaklığına inmesi beklenmiştir.

LB-Agar hazır karışımından 35 gram tartılarak 1 litre deiyonize su içerisinde çözüldürülmüş, otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası, besiyeri petri kaplarına dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır. Besiyeri içeren petri kapları ters olarak buzdolabında muhafaza edilmiş ve kullanım öncesi yüzeyleri kurutulmuştur.

3.4.2. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

E.coli K-12 ve *Enterobacter aerogenes* kültürü hazırlamak için; CASO içerisine ekilen bakteri 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir [96]. İnkübasyondan sonra santrifüjle 4500 g'de 7 dk boyunca çöktürülen bakteriler, 10 mM pH 7.4 PBS tamponu ile 2 kez yıkanmıştır. Bakteri dilüsyonları 10^1 - 10^8 kob/ml aralığında olacak şekilde PBS tamponla seyreltilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlarda, bakteri santrifüjle çöktürülüp supernatant çekilip yerine nanopartikül süspansiyonu ile tamamlanmıştır. Partikül bakteri karışımı vorteksle tamamen homojenize edildikten sonra, bağlanma için 40 dk boyunca 140 rpm'de karıştırılmıştır.

3.4.3. Katı Besiyerinde Bakteri Sayımı

Kullanılan bakteri stoğundan 24 saat inkübasyondan sonra kaç bakteri ürediğini görmek için genel besiyeri CASO agar, *E.coli*'ye özgü LB-agar ve *E. aerogenes*'e özgü chromocult agar besiyerlerine yüzeye yayma ekim yöntemi ile ekim yapılmış, 24-48 saat sonra sayım yapılarak stoktaki bakteri sayısı belirlenmiştir.

Sükroz gradient santrifüj ile elde edilen bantlarda bakteri sayımı için, seçici katı besiyeri olarak LB Agar kullanılmıştır. Hedefe özgü olmayan ve hedefe özgü çalışmalarda kullanılan NP'lerin *E.coli* bağlanma verimlilikleri ayrı ayrı hesaplanmıştır. Göç mesafesi ve bant alt sınır optik değeri ölçüm yöntemleriyle elde edilen fazların bakteri bağlanma verimliliği Eşitlik 11 ile hesaplanmıştır.

$$\frac{\text{Fazda sayılan bakteri miktarı}}{\text{Tüpteki toplam bakteri miktarı}} \times 100 \quad (11)$$

Fazda ortalama optik yoğunluk ölçümü ile yapılan bakteri tayininde ise bakteri-NP fazı gradientte 2 ml hacimdeki geniş bir bölgeye dağıldığı için fazın gradientten tamamen çekilip sayımının yapılması güç olmuştur. Gerçek örnekle çalışırken ortamdan süt serumunun uzaklaştırılması için yıkama işlemleri yapılmıştır. Bu işlemlerden sonra bakteri-NP fazı gradiente alınmadan önce bağlanma verimliliğinin aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır.

$$\frac{\text{Santrifüjle çöken bakteri miktarı}}{\text{Toplam bakteri miktarı}} \times 100 \quad (12)$$

3.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Yöntemleri

3.5.1. UV-Vis Spektrofotometre ile NPLerin Karakterizasyonu

Sentezlenen altın, gümüş, altın kaplı demiroksit ve karbon nanopartiküllerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları Agilent 8453 UV-Vis spektrofotometre (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, ABD) ile ölçülmüştür. Altın nanopartiküllerin su, etanol ve MES tamponu ortamlarında UV-Vis spektrumlarına bakılarak farklı ortamlardaki kümeleşmeleri incelenmiştir. Aynı zamanda avidin bağlandıktan sonra da çözelti renginde görülen değişim UV-Vis spektrum ile açıklanmıştır.

Sentezlenen altın kaplı demiroksit nanopartiküllerinin UV absorbanslarında görülen farklılıklar nedeniyle indirgenme parametrelerinin ve çekirdek kütlelerinin optimize edilmesi uygun görülmüştür. Bu nedenle 5-10 mg çekirdekle sentezlenen ve 300-500-700-900 µl 1 M NaOH ile indirgenen altın kaplı demiroksit nanopartiküllerin UV-Vis spektrumu incelenerek uygun çekirdek kütle ve indirgenme parametresi seçilmiştir.

3.5.2. FTIR-ATR Spektrometresi ile CNP Yüzeyindeki Fonksiyonel Grupların Karakterizasyonu

Karbon nanoküre yüzeyindeki fonksiyonel grupların karakterizasyonu için FTIR spektrumu Thermo Nicolet is50 (Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, MA, ABD) marka, azaltılmış toplam yansıma (ATR) özelliği olan Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FTIR-ATR) kullanılarak karakterize edilmiştir. Spektrumlar dalgasayısı 4000-600 cm⁻¹ aralığında olacak şekilde seçilmiş, 32 tarama sayısında ve çözünürlük 8 cm⁻¹ olarak ölçüm alınmıştır.

3.5.3. Floresans Spektrofotometresi ile Kuantum Noktaların Karakterizasyonu

Kuantum noktaların floresans ölçümleri Carry Eclipse Floresans Spektrofotometresi (Varian Scientific Instruments, Mulgrave, Avustralya) ile yapılmıştır. Yüzeyinde -asetil sistein ve -merkaptopropiyonik asit fonksiyonel grupları bulunan kuantum noktaların, kitosan kaplama sonrası ve *E.coli* K-12 ile etkileşim sonrası floresans ölçümleri alınmıştır. Böylece Qdotların uygun pH değerinde kitosan kaplama parametresinin belirlenmesi ve *E.coli* bağlandıktan sonra Qdot ışımadaki değişimi takip edilmiştir. Uyarılma dalgaboyu 340 nm, uyarma ve emisyon yarığı 5 nm olarak uygulanmıştır.

3.5.4. İşlemsiz ve Bakteri Yakalayan NPlerin TEM ile Görüntülenmesi

Nanopartiküllerin boyutları ve yüzey morfolojilerini görüntülemek için elektron 120 V hızlandırıcı voltaj ile JEOL 2100 HRTEM cihazı (JEOL Ltd., Tokyo, Japonya) kullanılmıştır. İşlemsiz NPler ile gradientten çekilen örneklerin ayrı ayrı TEM görüntüleri alınmıştır. Boyutlarına ve homojen yapılarına göre uygun NPler seçilip çalışmanın devamında kullanılmıştır.

Gradientteki bantlardan 1 ml'lik steril iğne ile 250'şer µl örnek çekilip ortamdaki sükrözün uzaklaştırılması için 10 mM pH 7.4 PBS ile 3 defa yıkama işlemine tabi tutulmuştur. 1.5×10^6 kob/ml *E.coli* K-12 olan tüplerin bakteri-NP bantlarının üst ve alt fazlarından 250'şer örnek çekilip TEM için hazırlanmıştır. Bakteri-NP fazından çekilen örneklerin görüntülenmesi için % 2.5 gluteraldehit ile sabitleme ön işlemleri yapılmıştır. Hazırlanan seyreltik NP örneklerden karbon formvar grit üzerine 10 µl damlatılıp 10 dk boyunca vakumda kurumaya bırakılmıştır.

3.6. Yoğunluk Gradient Santrifüj İşleminin Hazırlıkları

Yoğunluk gradient çalışmaları 15 ml'lik polipropilen (polypropylene) santrifüj tüpleri (LP Italiana S.p.A., Milano, İtalya) kullanılarak yapılmıştır. Bakteri ile yapılan santrifüj çalışmaları için soğutmalı masaüstü santrifüj cihazı (VMR Megastar 1.6 R, Almanya) ile salınımlı rotor kullanılarak 4°C'de çalışılmıştır.

3.6.1. Sükröz Gradientin Hazırlanması

Ön çalışmalarda stok çözelti olarak 70°C'de saf su ile % 80 a/h'lik sükröz çözeltisi hazırlanmıştır. Bakteri çalışmaları için sükröz çözeltileri saf su yerine 10 mM pH 7.4 PBS içerisinde sükröz çözündürülerek hazırlanmıştır.

Stoktan seyreltme yapılarak istenilen aralıklarda % 70-% 60-% 50-% 40-% 30-% 20-% 10 sükröz çözeltileri hazırlanmıştır. Tüpün en altına % 80 a/h sükröz çözeltisi eklendikten sonra seçilen konsantrasyonlarda istenilen miktarlarda çözeltiler çok yoğun dan az yoğun a doğru üst üste tüplere eklenmiştir. Üst üste eklerken çözeltilerin birbirine karışmaması için, çözeltiler mikropipet ile yavaş yavaş damlatılmıştır. Gradientler hazırlandıktan sonra 4 saat 4°C'de buzdolabında bekletilmiş, üzerine numune eklendikten sonra santrifüj uygulamasına geçilmiştir.

3.6.2. Santrifüj İşlem Parametrelerinin Belirlenmesi

Kullanacağımız santrifüj cihazının ve rotorun seçimi için tüpe etki eden kuvvetin teorik hesaplaması yapılmıştır. İşlem parametrelerinin optimizasyonu için kullanılan açılı ve yatay rotor, uygulanan g kuvveti ve santrifüj süresi detaylı olarak incelenmiştir. Santrifüj işlem parametrelerini belirlemeye yönelik ön çalışmalar için altın ve manyetik nanopartiküller kullanılmıştır.

3.6.2.1. Açılı Rotor ile Yapılan Ön Çalışmalar

Gradient oluşturmadan, sadece su ortamındaki AuNP ile yapılan santrifüj sonucu pembe supernatant içerisinde küçük nanopartiküllerin çökmeden asılı kaldığı görülmüştür. Bu nedenle % 60 a/h ve % 32 a/h sükröz çözeltilerinden 4 ml alınarak üzerine 1 ml AuNP stok çözeltisi eklenmiş, açılı rotorda 14000 rpm ile 20 dk sürede iki kez santrifüj yapılmıştır. Böylece, yoğunluk gradient oluşturulmadan önce partiküllerin viskoz sükröz bölgelerindeki hareketi ayrı ayrı incelenmiştir.

3.6.2.2. Yatay Rotor ile Yapılan Ön Çalışmalar

AuNP ile yapılan ön çalışmalarda 15 ml'lik plastik tüplere % 25-% 30-% 35-% 40-% 60 a/h derişimlerindeki çözeltilerden 2'şer ml alınarak 10 ml sükröz gradienti hazırlanmış, üzerine 1ml AuNP eklenmiştir. Yatay rotorda 4149 g sabit tutularak işlem süresi arttırılmıştır. Partikül bantlarını standardize etmek için gradiente eklenecek örnek hacmi ve derişimi önemli bir faktördür. Bu nedenle; kullanılan partiküller farklı hacim ve konsantrasyonlarda en keskin gaussyen bant yapısı oluşturacak şekilde incelenmiştir.

Altın Nanopartiküllerin İncelenmesi

% 30-% 35-% 40-% 80 a/h derişimlerindeki sükröz çözeltilerinden 1'er ml alınarak hazırlanan gradient üzerine 200 µl AuNP eklenmiş ve zamana bağlı bant oluşumu incelenmiştir. AuNPlerin eş yoğunluk sükröz aralığı tespit edilmiştir. Keskin bant yapısı elde etmek için farklı hacim ve derişimlerindeki sükröz gradientlerde farklı

işlem parametrelerinde çalışılmış, uygun gradient ve işlem parametreleri belirlenmiştir.

Eş-yoğunluk gradient santrifüj yönteminde kuvvet dengesi olması gerektiği için % 30-% 35 a/h sınırında toplanan AuNP partiküllere ters yönde etki eden merkezci kuvvetlerin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla NP süspansiyonu tüpün en altındaki yoğun % 80 a/h sükröz çözeltisi ile karıştırılarak gradiente eklenmiştir.

Gümüş Nanopartiküllerin İncelenmesi

Altın nanopartiküller ile aynı gradient ve işlem parametrelerinde AgNP fazı incelenmiştir. Ayrıca, eşit hacimde AgNP ve AuNP stokları karıştırıldıktan sonra gradient üzerine eklenmiş, farklı boyutlardaki partiküllerin hareketli bölge santrifüj ile ilerlemesi kaydedilmiş, optik yolla fazların ölçümü sağlanmıştır.

Manyetik Nanopartiküllerin İncelenmesi

Hazırlanan % 30-% 35-% 40-% 60-% 80 a/h sükröz çözeltilerinden 2'şer ml alınarak 15 ml'lik tüplerde yatay (swing) rotorda çalışmak üzere 10 ml gradient hazırlanmıştır. Manyetik NPLerden 200 µl ve 500 µl alınarak 10 ml gradient üzerine eklenmiştir. Uygun rotor hızını bulmak için düşük devirden yüksek devire çıkarken süre t=5 dk olarak sabit alınmış, bant yapıları kaydedilmiştir. Hazırlanan Fe₃O₄@Au NPLerinin gradientte bant yapısının daha hızlı ilerlemesi için 5 mg ve 10 mg Fe₃O₄ çekirdek ile hazırlanan NPLer ve 500-700-900 µl 1 M NaOH ile indirgenen NPLer gradientte optik yolla incelenmiştir.

Partiküllerin Hidrodinamik Yoğunluğunun Karşılaştırılması

% 10-% 15-% 20-% 30-% 40-% 80 a/h sükröz çözeltilerden 1'er ml alınarak hazırlanan toplam 6 ml sükröz gradient içerisinde 4149 g ile 45 dk santrifüjden sonra altın ve manyetik nanopartiküllerin bant dağılımları karşılaştırılmıştır. Farklı ortamların partiküllerin çökme hızlarına etkisi karşılaştırılmıştır.

Karbon Nanopartiküllerin İncelenmesi

Uygun CNP konsantrasyonunu belirlemek için 1-3 mg/ml aralığında hazırlanan çözeltilerle gradientte faz ilerlemeleri karşılaştırılmıştır. 50-100-200 µl CNP hacmi kullanılarak Gaussyen bant ilerlemesinin elde edildiği gradient parametreleri çalışılmıştır. CNP fazının tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi için; gradientte

geniş bir bölgede dağılan fazlardan şırınga ile 1 ml çekilip 3 kez PBS ile yıkanmış, tekrar gradient üzerine eklenerek aynı santrifüj işlemine tabi tutulmuştur.

3.7. Yoğunluk Gradient Parametrelerinin İncelenmesi

Yoğunluk gradient parametrelerinin belirlenmesi için tek-çift fazlı gradient, gradient çözelti konsantrasyonu, gradient hacmi, çözelti için kullanılan PBS molaritesi, partikül konsantrasyonu ve partikül hacmi ayrı ayrı incelenmiştir.

3.7.1. Çözelti Ortamlarının NP Fazına Etkisi

Bu çalışmada 3 farklı ortamda manyetik nanopartiküllerin ilerlemesi takip edilmiştir. % 0.8 a/h NaCl, 10 mM PBS pH 7.4 ve 20 mM PBS pH 7.4 kullanılarak çözültideki tuz oranının ve çözelti pH 'nın bant yapısına, NP kümeleşmesine ve tüpte çepere yapışmaya etkisi incelenmiştir. 1000 g santrifüj kuvveti ile 2 dk, 10 dk ve 45 dk işlem sürelerinde partiküllerin gradient bant yapıları ve ilerlemeleri karşılaştırılmıştır.

3.7.2. Örnek Hacimlerinin NP Fazına Etkisi

Bu çalışmada aynı konsantrasyondaki çözültüler farklı hacimlerde üst üste eklenerek toplam 10 ml sükröz gradient hazırlanmıştır. Çözelti hacminin partikülün 2-3 banda ayrılmasına etkisi incelenmiştir. Partikül tüp boyunca ilerlerken partiküle etki eden santrifüj kuvveti de artacağı için farklı mesafelerde viskozitenin etkisiyle partikül hızında azalan ivmelenme söz konusu olabilecektir. Bu nedenle belirli bölgelerde partikül bandı toplanacaktır. Böylece partiküllerin keskin bant yapısı oluşturduğu bölge ve santrifüj parametreleri kaydedildiğinde, bakteri ile etkileşim sonrası partikül bant yapısı karşılaştırılabilecektir.

% 20-% 40-% 50-% 60-% 80 a/h derişimlerdeki sükröz çözültüleri DI su ile hazırlanmıştır. A grubu gradient için; % 80 a/h sükröz çözültisinden 3 ml, % 60 a/h sükröz çözültisinden 1 ml, % 50 a/h sükröz çözültisinden 3 ml, % 40 a/h sükröz çözültisinden 1 ml, % 20 a/h sükröz çözültisinden 2 ml alınarak üst üste eklenmiştir. B grubu gradient için; % 80 a/h sükröz çözültisinden 3 ml, % 60 a/h sükröz çözültisinden 3 ml, % 40 a/h sükröz çözültisinden 3 ml, % 20 a/h sükröz çözültisinden 1 ml üst üste eklenmiştir.

3.7.3. PEG-Sükröz Tek ve Çift Fazlı Gradient Karşılaştırılması

Çalışmanın bir bölümünde PEG ve sükröz kullanarak çok fazlı sistemde partikül-bakteri bandının ilerlemesi takip edilmiştir. PEG biyoyumlu, toksik etkisi az olan

bir malzeme olduğu için bakteri ve NPlerin süzkroz ortam yerine PEG gradientte ya da PEG-süzkroz iki fazlı gradientteki ilerlemelerinin de anlamlı sonuç vermesi beklenmiştir. Partiküllerin iki fazlı gradientte önce 1 ml PEG bölgesinden geçip PEG kaplanarak süzkroz bölgesinde daha kararlı bir halde ilerleyebileceği düşünülmüştür.

% 10-% 12-% 16-% 20 a/h derişimlerindeki PEG çözeltileri DI su ile hazırlanmıştır. % 10-% 12-% 16 a/h çözeltilerinden 2'şer ml, % 20 a/h çözeltilisinden 4 ml alınarak 10 ml PEG gradienti hazırlanmıştır. 400 µl Fe₃O₄@Au (su) eklenmiştir. 1000 g-2 dk ve 1000 g-8 dk santrifüj sonrası partiküllerin ilerlemesi kaydedilmiştir.

3.8. Gradientte Bakteri-Partikül Fazının İncelenmesi

% 30-40-60-80 a/h süzkroz gradientinde manyetik NP ile elde edilen NP ve Bakteri-NP faz farkı incelenmiştir. pH 7.4 PBS ve pH 6.5 MES tampon çözeltilerinin bakteri-NP fazına etkisi incelenerek uygun tampon ortamı seçilmiştir.

Floresans etiketli nanopartikül ile elde edilen bakteri-NP fazının floresans ışımaya kaybetmemesi için floreskamin stoğa PBS ile seyreltme işleminin etkisi incelenmiştir. Floreskamin çözeltilisi 0.8-3 mg/ml farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak ışımaya için yeterli miktar belirlenmiştir. Ayrıca, floreskamin stok ile NP karışımı hacimce 1:1, 2:1 ve 3:1 olacak şekilde karıştırılarak ışımaya ayırt edilebilir olduğu parametre çalışılmıştır.

CdTe@ch Qdot ile bakteri-NP fazını takip edebilmek için kullanılan süzkroz gradientin yoğunluğu artırılmış, % 50-% 60-% 65-% 70-% 80 a/h süzkroz gradient hazırlanmıştır. Gradient parametrelerindeki değişimler ile faz ilerlemeleri incelenmiştir.

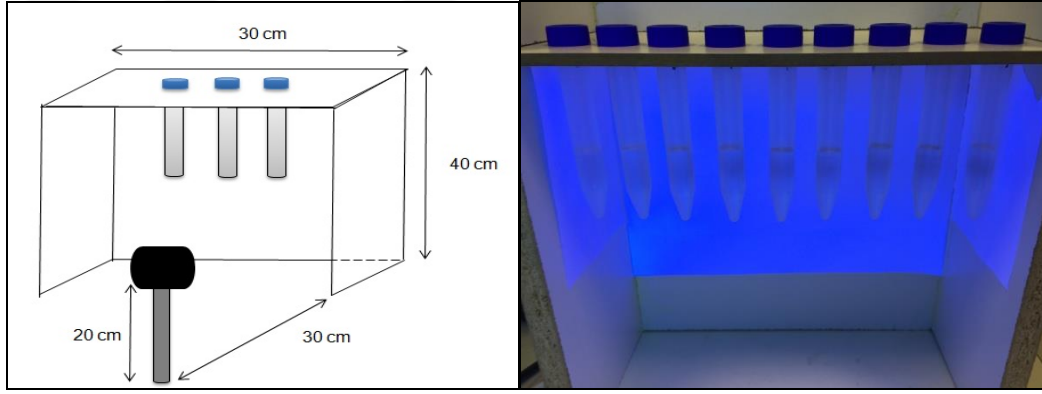
CNPler ile bakteri-NP fazının süreye bağlı ilerlemesi incelenmiş, faz farkı için uygun santrifüj kuvvetinin belirlenmiştir. 10¹-10⁴ kob/ml *E.coli* için bakteri miktarına bağlı faz değişimleri; EDC/NHS aktivasyonu, avidin bağlama, BSA bloklama ve antikor bağlama modifikasyon basamaklarından sonra tek tek incelenmiştir. Her işlemde sonra kullanılan gradientin tekrar düzenlenmesi gerektiği belirlenmiştir. % 60-% 65-% 70 a/h süzkroz çözeltilerinden 1'er ml % 75 a/h süzkroz çözeltilisinden 2 ml eklenerek hazırlanan gradient ile 100 g, 300 g, 500 g, 1000 g santrifüj kuvvetleri 1-12 dk zaman aralığında uygulanarak çalışılmıştır. Bakteri-NP

fazlarının bakteri miktarına bağılı olarak ayırt ediciliğinin yüksek olduğu 500 g 6 dk işlem parametrelerinde *E.coli* için kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

CNPler ile geliştirilen yöntemin seçiciliği için *E.coli* gibi *Enterobacteriaceae* sınıfından olan *Enterobacter aerogenes* ile 10^1 - 10^4 kob/ml aralığında çalışılmıştır.

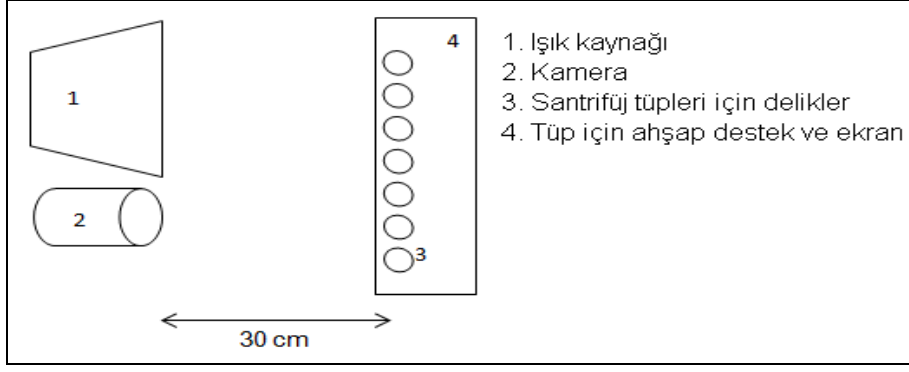
3.9. Optik Ölçüm Düzeneklerinin Kurulumu ve Faz Analizi

Şekil 12'de görüldüğü gibi santrifüjden sonra tüplerin analizi için, tüplerin ve kameranın konumunu sabitleyici düzenek kurulmuştur. Üzerinde 9 adet numune için asılma deliği bulunan beyaz ahşap desteğe tüpler dizilmiştir. Fotoğraflarda tanımlanan alanın piksel sayısının değişmemesi için kameranın tüplere olan mesafesi 30 cm, kameranın yerden yüksekliği 20 cm olacak şekilde kamera sabitlenmiş ve şekildeki düzenek hazırlanmıştır.



Şekil 15. Kameranın yerleşimi ve ekrandaki tüplerin görünümü

Şekil 13'te düzenek krokisinden de görüldüğü gibi ışık titremesi olmayan UV/beyaz ışık transillüminatör (UVP Ltd, Upland, ABD) ve kamera beyaz ekranın karşısına yerleştirilmiştir. Transillüminatörden UV-A siyah ve beyaz ışık kullanılarak, 8 MP dijital kamera ile örneklerin fotoğrafları çekilmiştir. 8 MP kamera 1080x1920 piksel çözünürlükte fotoğraf çekmektedir. Görüntü düzenleyici program ile tüp uzunluğu boyunca 80x1000 piksel alan seçilmiştir.



Şekil 16. Bant görüntüleme için deney düzeneği

Analiz için eşit boyuttaki fotoğraflar üzerinde belirlenen eşit boyuttaki bölgeler kırılmış ve bu fotoğrafların RGB piksel değerleri yazılım yardımıyla hesaplanmıştır. Buna göre tüpteki gradient boyunca elde edilen optik değişiklikler; optik yoğunluk-mesafe grafikleriyle incelenmiştir.

Gradientte faz analizi için üç farklı fiziksel ölçüm metodu geliştirilmiştir. Bu metotlar; göç mesafesi ölçümü, bant alt sınır optik değeri ölçümü ve fazda ortalama optik yoğunluk ölçümü olarak adlandırılmıştır.

Göç mesafesi; NP ve bakteri-NP bantlarının uygulanan santrifüj kuvveti ile gradientin örnek menisküsünden itibaren tüpün dibine doğru kat ettikleri mesafe olarak tanımlanmıştır. Bu mesafenin ölçümü için; optik yoğunluk-mesafe grafiklerinde görülen Gaussyen bant dağılımının tepe noktası hesaplanmıştır. Göç mesafesi ölçümü; eş-yoğunluk santrifüj uygulamalarında partiküllerin karşılaştırılabilir bant konumunun belirlenmesi için kullanılmıştır. Aynı zamanda manyetik NP ve Qdotlar ile elde edilen bakteri-NP fazlarının ilerlemeleri de bu yöntemle ölçülmüştür.

Bant alt sınır optik değeri; çözücü menisküsünden itibaren gradient boyunca bandın ilerlemesi aynıyken bandın alt-sınır noktasındaki ilerlemenin farklı olması neticesinde, bant hacmindeki artışın bir ölçüsü olarak tanımlanmıştır. Bu genişlemenin ölçümü için optik yoğunluk-mesafe grafiklerinin türevlerinin sıfır olduğu noktalar yani eğrilerin platoya vardıkları noktalar hesaplanmıştır. CNP fazlarının hedefe özgü olmadan bakteri miktarına bağlı olarak bant hacimlerindeki değişim bu yöntemle ölçülmüştür.

Fazda ortalama optik yoğunluk; gradientte geniş bir alana yayılan bakteri-NP fazının ortalama optik yoğunluk değeri olarak tanımlanmıştır. Hedefe özgü bakteri çalışmalarında bağlanmayan bakteri santrifüjden sonra süpernatant ile ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Bakteri yakalamayan CNPlerin ise santrifüj ile gradient çeperine yapıştığı görülmüştür. Bu nedenle gradientte dağılan bakteri-NP fazının keskin bant yapısı oluşturmadan bakteri miktarına bağlı optik yoğunluk değişimi takip edilmiştir. Optik yoğunluk-mesafe grafiklerinin altında kalan alan hesaplanarak fazda ortalama optik yoğunluk değerleri belirlenmiştir.

Bu yöntemlerin kullanımıyla bakteri miktarına bağlı faz değişimleri takip edilmiş ve kalibrasyon eğrileri çizilmiştir.

3. 10. Yağsız Sütte *E.coli* K-12 Teşhisi

Geliştirdiğimiz yöntemin gerçek örneklerde kullanılabileceğini göstermek için yağsız süt tozunda deneyler tekrarlanmıştır. Yağsız sütte analiz amacıyla % 8.90 a/h kuru madde içeren standart ortam hazırlamak için; 2 ml PBS ile 0.18 g yağsız süt tozu vorteksle karıştırılmıştır. Hazırlanan yağsız süt ile 10^1 - 10^4 kob/ml aralığında *E.coli* dilüsyonları karıştırılmıştır.

Kararlı yapıdaki süt serumunda kolloidal halde bulunan kazein misellerinin boyutlarının 10-300 nm arasında olması ve yoğunluğunun 1.11 g/ml olması nedeniyle 500 g altında santrifüj kuvveti uygulandığında çökmeyeceği öngörülmüştür. Bu nedenle öncelikle ortamdaki bakteri-NP fazının çöktürülmesi ve süpernatanttaki kazein moleküllerinin pipetlenerek ortamdaki ayrılması planlanmıştır.

Daha önce hedefe özgü analizlerde tekrar edilebilir sonuçlar alınarak optimize edilen gradient santrifüj parametreleri sütte *E.coli* tayini için de aynı şekilde kullanılmıştır. Gradient için 2'şer ml % 75 a/h sükröz çözeltisi ve 1'er ml % 70-% 65-% 60 a/h sükröz çözeltileri şırınga ile 15 ml'lik dereceli polipropilen tüplerde hazırlanmıştır.

1 ml hacimdeki bakteri dilüsyonları 400 µl antikor bağlı CNP ile 40 dk boyunca, oda sıcaklığında ve 140 rpm'de karıştırılmıştır. Yoğunluk gradient santrifüjleme işlemine geçilmeden önce; 2 kez PBST, 1 kez PBS ile yıkama yapılmıştır. Böylece her yıkama işlemi sonrası sütteki kuru madde miktarının azar azar ortamdaki uzaklaştırılması hedeflenmiştir. Daha önce bakteri-NP fazı için PBS çözeltisi

içerisinde 50 g 3 dk olarak ayarlanan yıkama parametreleri; süt ile çalışırken ortamda kazein proteini ve misel yapılar olması nedeniyle bakteri-NP fazının daha yüksek kuvvetle ve uzun sürede çökebileceği ihtimaline karşı daha yüksek RCF uygulanarak değiştirilmiştir. Her yıkama sonrası ortamdaki uzaklaşan misel yapılar nedeniyle santrifüj kuvvetinin 50 g düşürülmesi uygun bulunmuştur. İlk yıkama 250 g 3 dk, ikinci yıkama 200 g 3 dk, üçüncü yıkama 150 g 3 dk parametrelerinde gerçekleştirilmiştir.

Gradient santrifüj işlemi için; sıcaklık 4°C, RCF 500 g ve santrifüj süresi 1-2-4-6-10-12 dk olmak üzere elde edilen sonuçlar ayrı ayrı kaydedilmiştir. Değişimin belirgin olarak görüldüğü 6-10-12 dk santrifüj aralıklarında kalibrasyon eğrileri çizilerek eğim ve standart sapma değerleri karşılaştırılmıştır. Tekrar edilebilirliğin ispatı için 2 paralelde 5 tekrar deneyi yapılmıştır. En uygun işlem parametresi olarak seçilen 500 g ve 6 dk gradient santrifüjden sonra çizilen kalibrasyon eğrisine göre LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

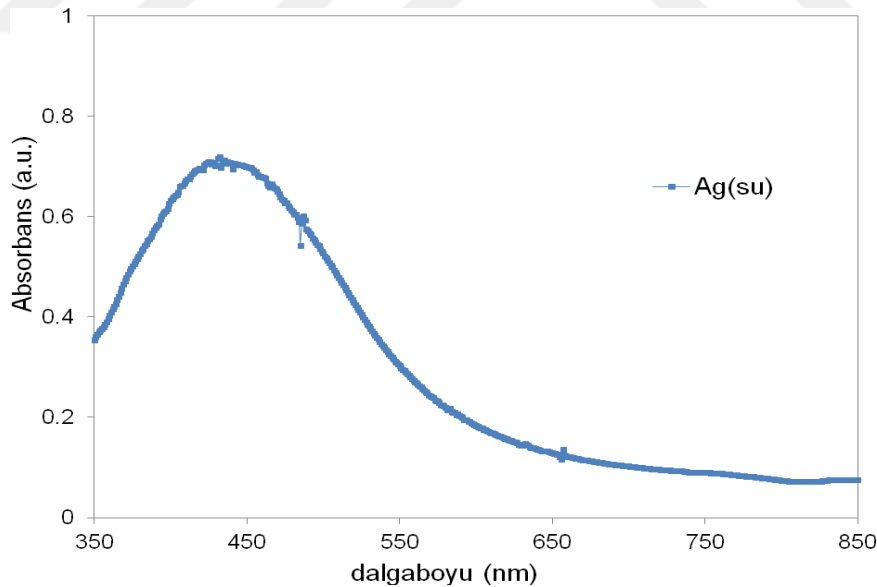
Bu bölümde, sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyon sonuçları, partikül-bakteri çiftinin geçirimli elektron mikroskobu görüntüleri, gradient santrifüj ön deneme sonuçları ve gradientte bakteri-NP çiftinin bant ilerleme sonuçları detaylı bir şekilde yorumlanmıştır. Son olarak sütte *E.coli* tayini için CNPLer ile elde edilen sonuçlar sunulmuştur.

4.1. Partiküllerin Karakterizasyon Sonuçları

Tez kapsamında sentezlenen ve yüzeyi modifiye edilen NPLerin karakterizasyonları alınan UV-Vis, FTIR-ATR, floresans spektroskopisi ve TEM sonuçları bu bölümde ayrıntılı bir şekilde yorumlanmıştır.

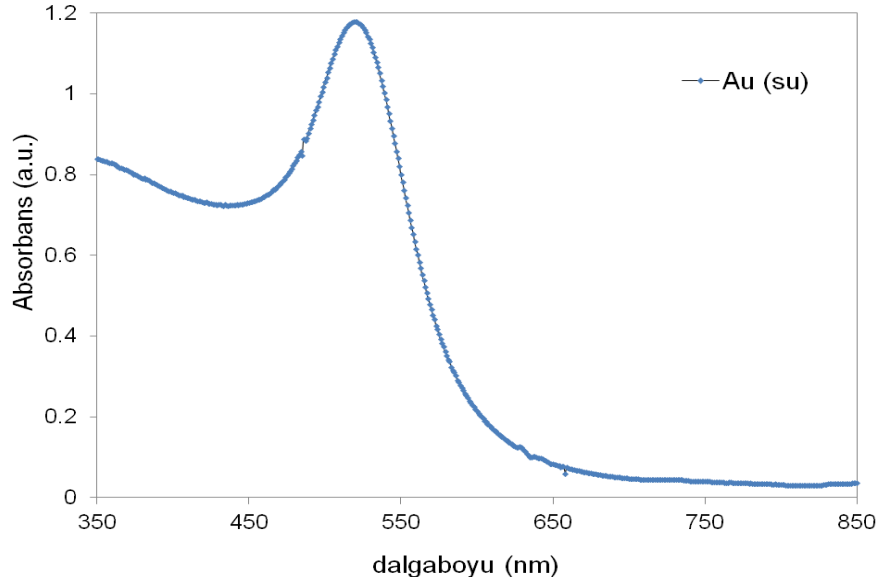
4.1.1. NPLerin UV-Vis Spektroskopisi ile Karakterizasyon Sonuçları

Şekil 17'deki AgNP spektrumdan görüldüğü gibi 431 nm'de geniş pik elde edilmiştir. Dolayısıyla AgNP boyutlarının homojen olmadığı düşünülmüştür. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında 10 nm ve altındaki gümüş nanopartiküller 400 nm'de pik vermiştir [97]. Partikül boyutu arttıkça dalgaboyu kırmızıya kayacağı için sentezlenen AgNP boyutlarının büyük olması beklenilmiştir.



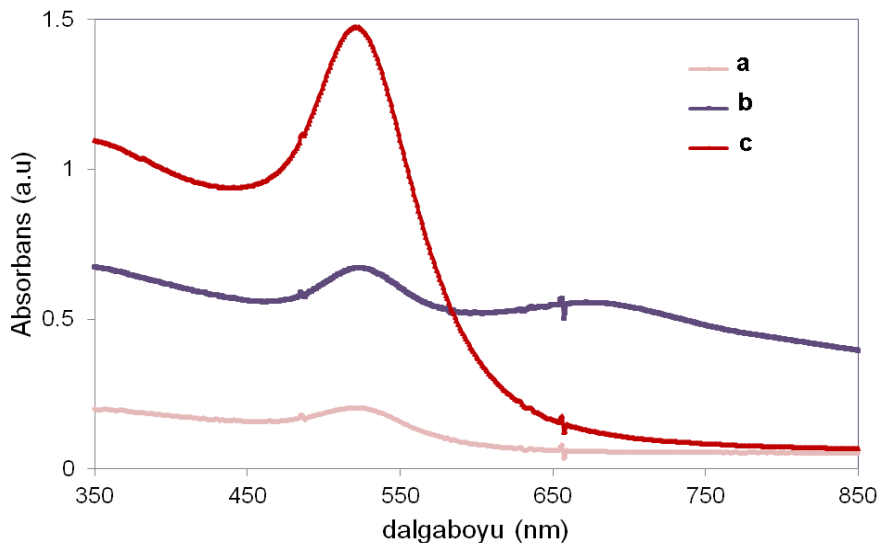
Şekil 17. Gümüş nanopartiküllerinin su ortamında UV-Vis spektrumu

Şekil 18'deki UV-Vis spektrumundan görüldüğü gibi literatür ile uyumlu olarak 520 nm'de keskin AuNP piki görülmüştür [8].



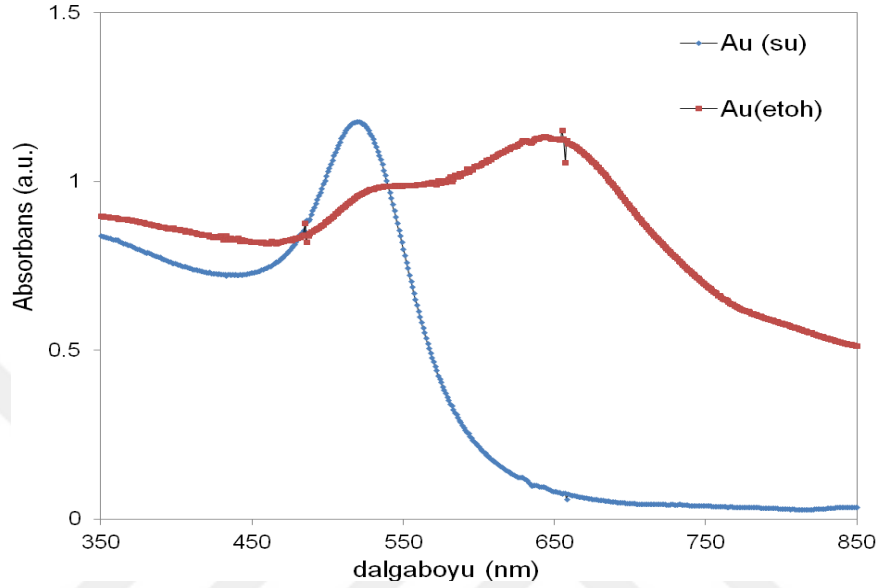
Şekil 18. Altın nanopartiküllerinin su ortamında UV-Vis spektrumu

Şekil 19'da altın nanopartiküller kendi fazında diferansiyel santrifüjle ayrıldıktan sonra pembe süpernatant ve mor çökeltinin ayrı ayrı absorbanları UV-Vis spektrumla karşılaştırılmıştır. 520 nm'deki keskin kırmızı pik AuNP'nin ayrılmadan önceki haline aittir. Pembe süpernatant kısmında bulunan sitrat fazlası nedeniyle 520 nm'deki altın pikinin şiddeti düşük çıkmıştır. Mor partiküle ait 525nm ve 677 nm'de olmak üzere iki pik görülmüştür. 677 nm'de görülen yayvan pikin ortamdaki uzaklaşan sitrat nedeniyle kümeleşen büyük yapılara ait olduğu düşünülmüştür.



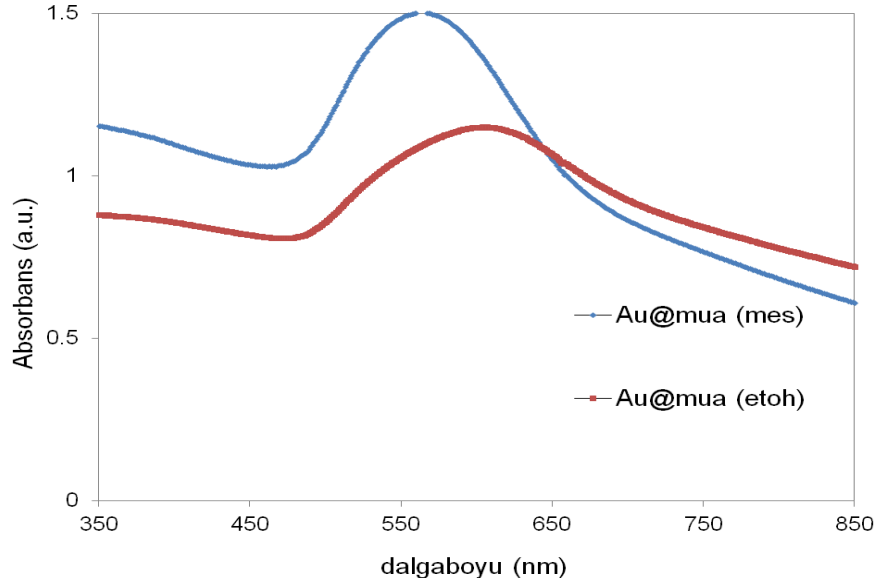
Şekil 19. Diferansiyel santrifüj ile kendi fazında kümeleşme özelliğine göre ayrılan a) süpernatant b) çökelti c) işlemsiz AuNP fazlarının UV-Vis spektrumları

Etanol ortamına çekilen altın nanopartiküllerin rengi maviye dönmüştür. UV absorbands sonuçlarına bakıldığında AuNP sulu süspansiyonu 520 nm'de pik verirken etanoldeki AuNPler 655 nm'de ikinci pik vermiştir (Şekil 20). 655 nm'deki pikin etanol içerisindeki büyük kümeleşmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.



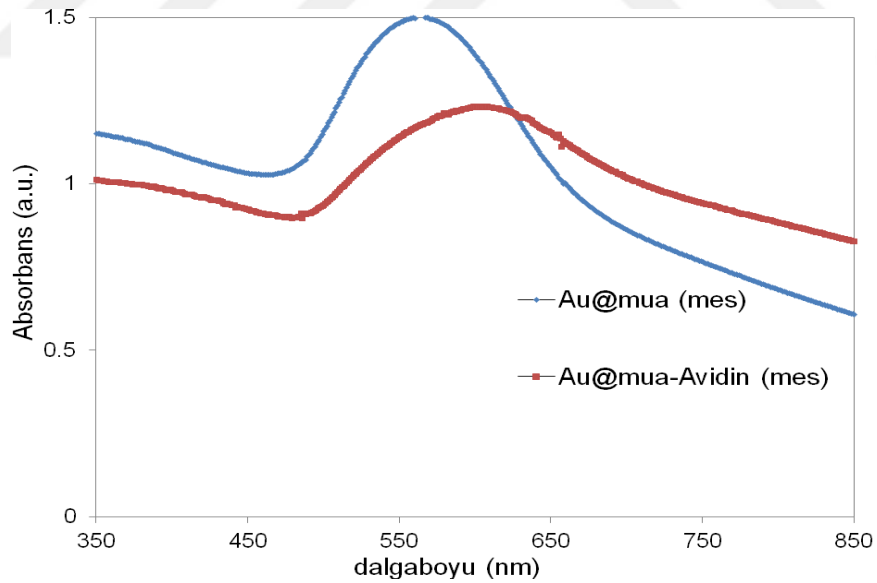
Şekil 20. Su ve etanol içerisinde hazırlanan AuNP fazlarının UV-Vis spektrumları

Şekil 21'de görüldüğü gibi Mua kaplı AuNP 50 mM pH 6.5 MES tamponundayken 563 nm'de, etanol içerisindeyken 600 nm'de pik vermiştir. MES tamponunda kararlı kolloidal yapıda bulunan nanopartiküllerin etanolde kümeleşme özelliği artmıştır. Bir miktar partikülün dibe çöktüğü görülmüştür.



Şekil 21. MES tampon ve etanol içerisindeki MUA kaplı AuNPLerin UV-Vis spektrumları

AuNP'ye avidin bağlandığında 563 nm'deki pikin 598 nm'ye kaydığı ve pikte genişleme olduğu görülmüştür (Şekil 22). Avidin bağlanan partiküllerin kümeleşme nedeniyle boyutlarının arttığı düşünülmüştür.

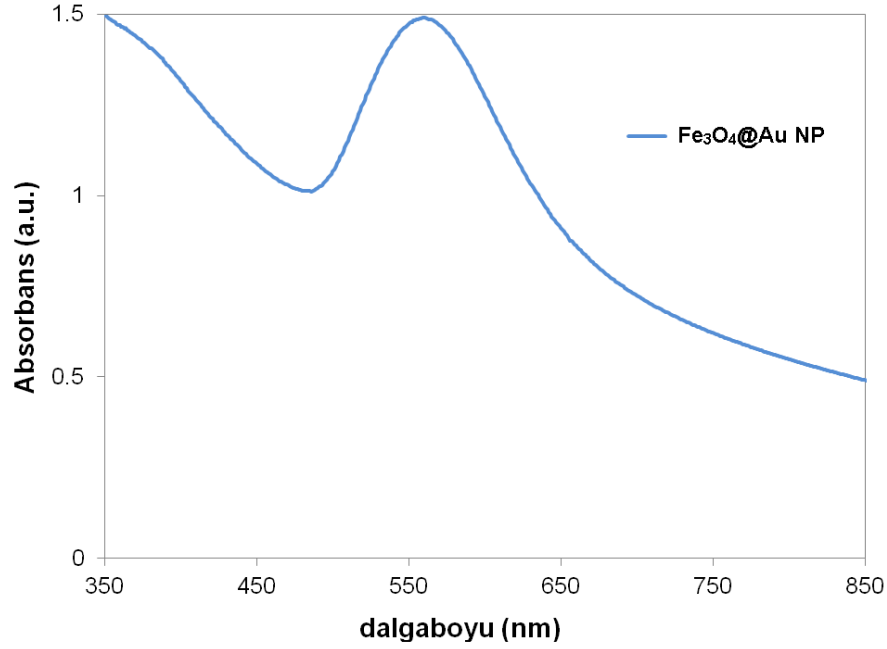


Şekil 22. 50 mM pH 6.5 MES tampon ortamındaki işlemsiz ve avidin bağlanan 11-MUA kaplı AuNPLerin UV-Vis spektrumları

300-500-700-900 µl 1 M NaOH ile indirgenen altın kaplı demiroksit nanopartikülleri karşılaştırıldığında; 700 µl 1 M NaOH ile indirgenen NPLerin diğer hacimlerde NaOH kullanılarak sentezlenen partiküllere oranla dalgaboyunun daha kısa ve

daha keskin pik vermesi nedeniyle çalışmaların devamında kullanılması uygun görülmüştür. Şekil 23'te 5 mg çekirdek kullanılarak, 700 µl 1 M NaOH indirgemesiyle hazırlanan Fe₃O₄@Au NPlerin verilen UV-Vis spektrumu verilmiştir. 560 nm'de absorbans piki görülmüştür. 500-650 nm'de pik elde edilmesi yüzeylerin altın kaplandığını göstermiştir [98].

Bunun yanısıra 5 mg ve 10 mg çekirdek kullanılarak sentezlenen Fe₃O₄@Au NPlerinin UV-Vis spektrumu karşılaştırıldığında 10 mg demiroksit çekirdek kullanıldığında absorbans pikinin 565 nm'ye kaydığı görülmüş bu nedenle boyutunun daha küçük olduğu düşünülen 5 mg çekirdek ile sentezlenen partikül çalışmanın devamında da tercih edilmiştir.

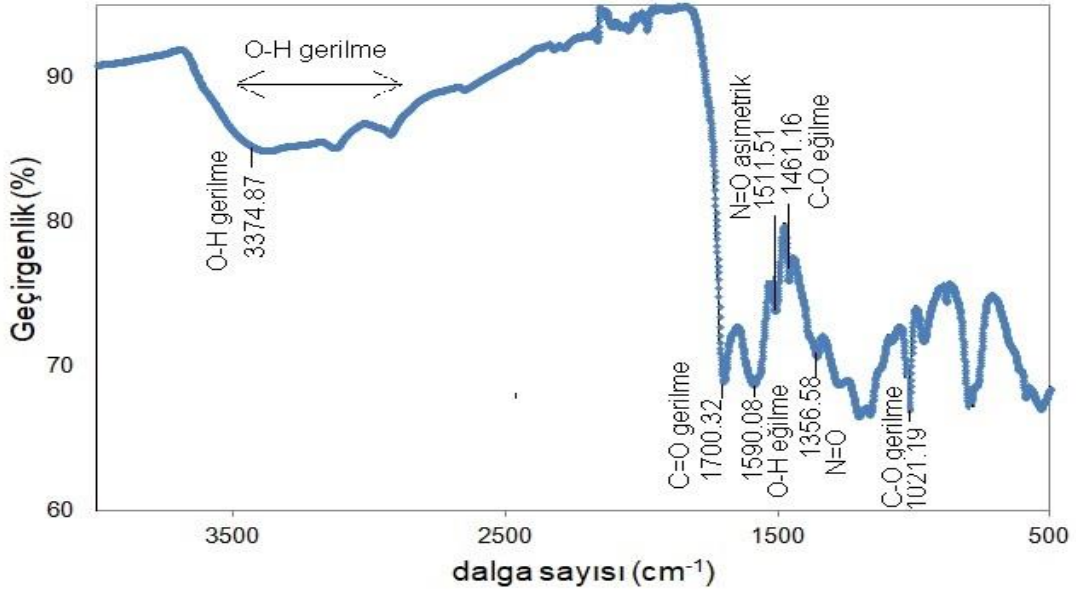


Şekil 23. 5 mg çekirdek kullanılarak, 700 µl 1 M NaOH indirgemesiyle hazırlanan Fe₃O₄@Au NPlerin su ortamında UV-Vis spektrumu

4.1.2. CNP Fonksiyonel Yüzeylerinin FTIR-ATR ile Karakterizasyon Sonuçları

Şekil 24'te FTIR-ATR ile CNP yüzeylerindeki OH⁻, RCOOH⁻ ve NO₂⁻ fonksiyonel grupların karakterizasyon sonucu verilmiştir. Spektrumda 3374.87 cm⁻¹ 'de işaretlenen geniş bandın karboksilik asit gruplarından kaynaklı O-H gerilme bölgesine ait olduğu düşünülmüştür. Karboksilik asitten (RCOOH⁻) kaynaklı 1700.32 cm⁻¹, 1590.08 cm⁻¹ ve 1461.16 cm⁻¹'de görülen kuvvetli pikler sırasıyla C=O gerilme, O-H eğilme ve C-O gerilme bölgelerine karşılık gelmiştir. Partikül yüzeyindeki nitrit nedeniyle 1511.51 cm⁻¹ ve 1356.58 cm⁻¹'de görülen bantlar

sırasıyla N=O asimetrik ve simetrik gerilme bölgelerini temsil etmiştir [99]. Aynı zamanda 1511.51 cm^{-1} 'deki pike aromatik zincirdeki C=C gerilme bölgesinin de katkı yaptığı düşünülmüştür. 1500-650 cm^{-1} aralığındaki parmak izi bölgesinde karbon bağlarına ait pek çok pik görülmüştür. 1021.19 cm^{-1} 'de karboksilik asitten kaynaklı C-O gerilme bölgesine karşılık gelmiştir. 797.93 cm^{-1} 'de görülen pikin ise =C-H düzlem dışı eğilme bölgesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.



Şekil 24. Yüzeyinde karboksilik asit grupları bulunan CNPnin FTIR-ATR spektrumu

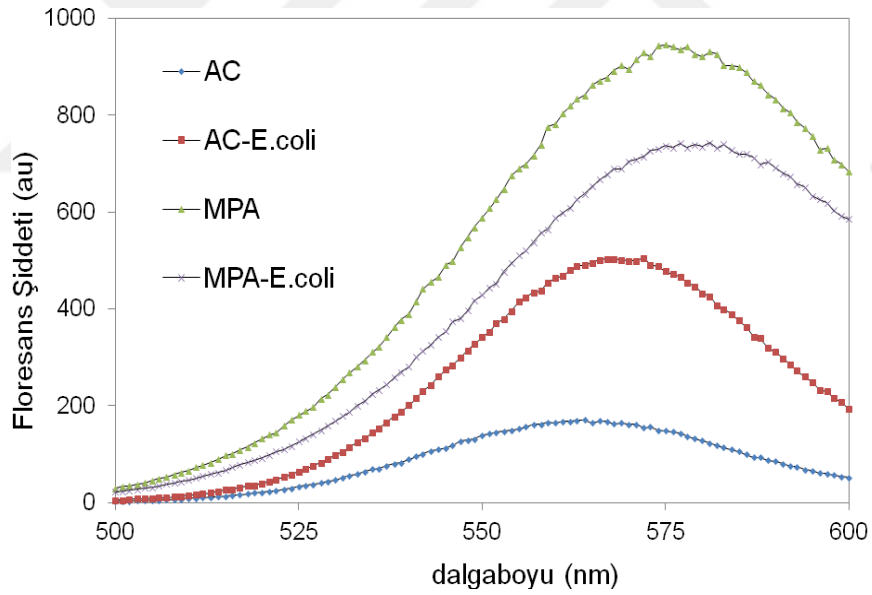
4.1.3. Kuantum Noktaların Floresans Spektroskopisi Sonuçları

Tez kapsamında sentezlenen yüzeyinde -asetil sistein ve -merkaptopropiyonik asit fonksiyonel grupları bulunan kuantum noktaların, kitosan kaplama sonrası ve *E.coli* K-12 ile etkileşim sonrası floresans ölçüm sonuçları bu bölümde verilmiştir.

Yüzeyinde farklı fonksiyonel grup bulunan Qdotlar UV ışık altında farklı renkte görülmüştür. Qdotların çekirdek boyutu sabit olduğu sürece bulunduğu sıvı ortamın elektriksel özelliklerinin ve Qdot yüzeyin farklı ligand ile kaplanmasının ışınım dalgaboyuna etkisi olmayacaktır. Lakin 2013'te Lee Montiel ve Imoukhuede'nin yaptığı çalışmada Qdot floresans şiddetine tampon pH'nın ve BSA bağlamanın etkisini gözlemişlerdir [100, 101]. Yaptığımız çalışmada işlemsiz CdTe/MPA partikülleri ile kitosan kaplı CdTe/MPA arasında renk farkı gözlenmiştir. Kitosan kaplandıktan sonra UV ışık altında gözle görülen partikül rengi sarıdan turuncuya değişmesine rağmen floresans spektroskopisi sonuçlarına göre

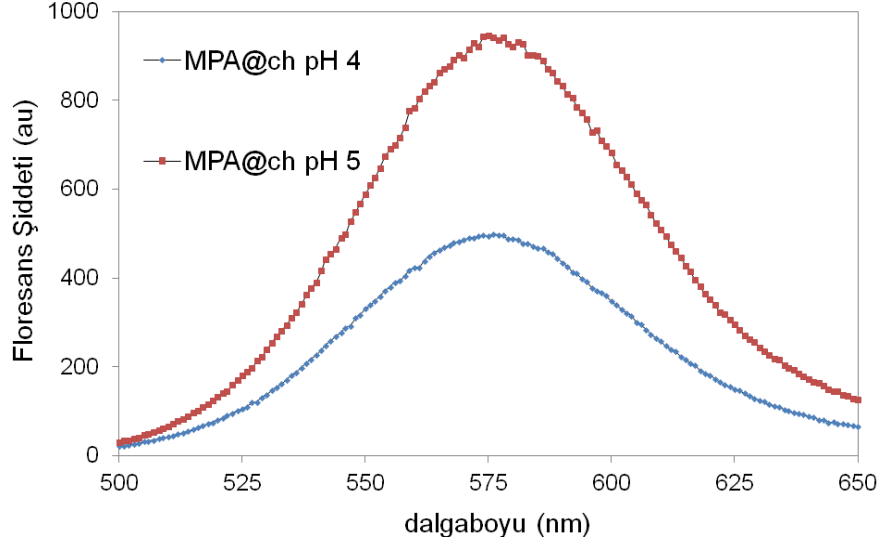
dalgaboyunda kayma görülmemiştir. Literatürde de yüzeyi modifiyeli Qdot'ların renk değişimi ile ilgili herhangi bir bilgi yer almamıştır.

E.coli K-12 ile etkileşimden sonra partiküllerin gözle görülür rengi ve floresans ışımaya şiddeti azalmıştır. Literatüre bakıldığında Yang ve arkadaşları 2015'te bakteri ile Qdot etkileşiminden sonra floresans sönümlenmesi (fluorescence quenching) etkisinin görüldüğü bildirilmiştir [102]. Burada da bakteri ile etkileşen CdTe/MPA Qdotların floresans sönümlenme nedeniyle UV ışımalarını kaybettiği düşünülmüştür. CdTe/MPA'ya benzer şekilde AC ile hazırlanan NPLerin de *E.coli* K-12 ile etkileşimden sonra renk değiştirdiği ve floresans ışımaya şiddetinin azaldığı görülmüştür. CdTe/MPA@ch'den farklı olarak gradient üzerine eklendiği zaman belirgin renk değişimi gözlenmiştir. Şekil 25'te görüldüğü gibi floresans şiddetleri ve dalgaboyları karşılaştırılmıştır. CdTe/AC *E.coli* yakaladıktan sonra dalgaboyu 562 nm'den 567 nm'ye kaymıştır. CdTe/MPA@ch ise *E.coli* yakaladıktan sonra dalgaboyu 575 nm'den 578 nm'ye kayma göstermiştir.



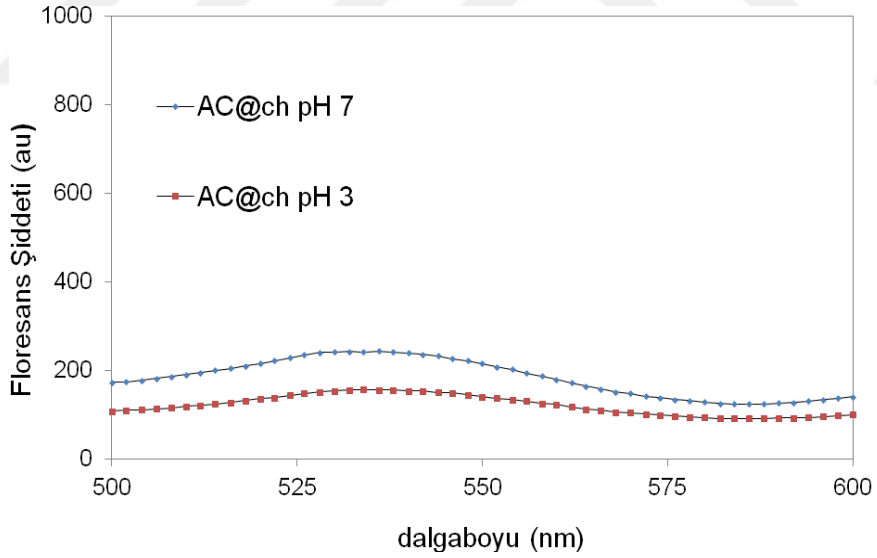
Şekil 25. Yüzeyi MPA ve AC ile modifiyeli Qdotların a) işlemsiz b) *E.coli* K-12 yakaladıktan sonra floresans spektrumları

Şekil 26'da farklı pH değerlerinde kitosan kaplanan CdTe/MPA Qdotları için floresans şiddeti karşılaştırılması verilmiştir. pH 4 ve pH 5 değerlerinde kitosan kaplanan partiküllerin dalgaboyunun 575 nm'de olduğu, ışımaya şiddetinin ise pH 4'te % 50 azaldığı görülmüştür. Bu nedenle çalışmanın devamında CdTe/MPA için kitosan kaplama parametresi olarak pH 5 seçilmiştir.



Şekil 26. pH 4 ve pH 5'te kitosan kaplanan Qdotların floresans spektrumları

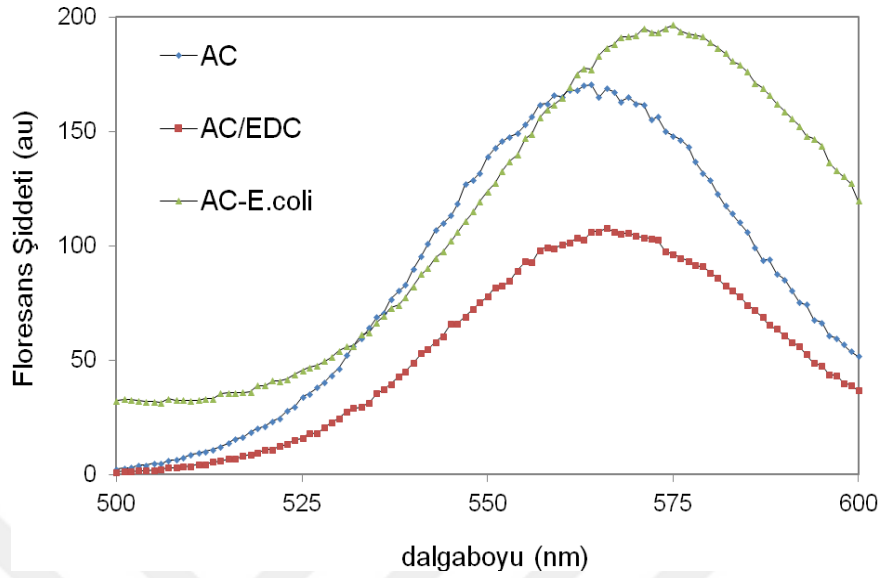
Benzer şekilde pH 7 ve pH 3'te kitosan kaplanan CdTe/AC@ch ışımaya şiddetinin % 35 azaldığı görülmüştür (Şekil 27). Kaplama için uygun pH parametresinin çalışılması düşünülmüştür.



Şekil 27. pH 3 ve pH 7'de kitosan kaplanan CdTE/AC Qdotların floresans spektrumları

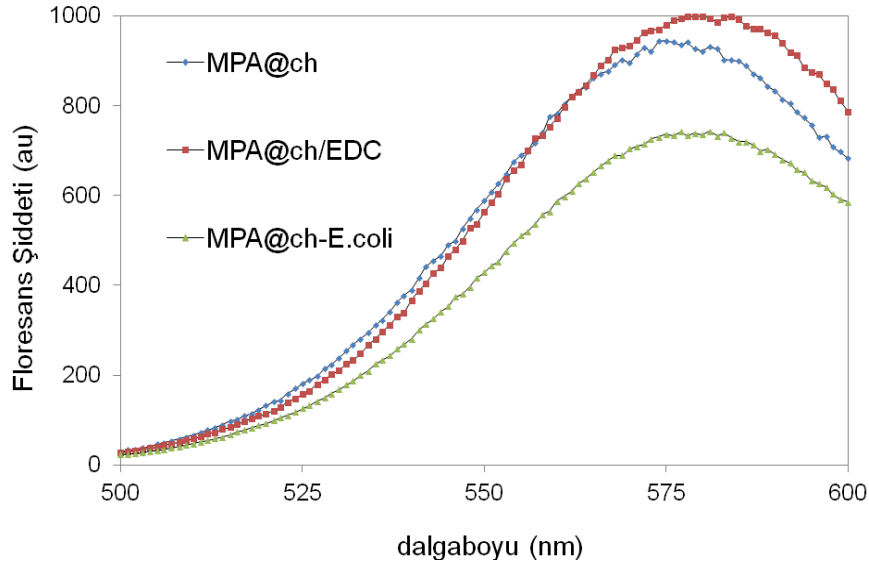
Şekil 28'de CdTe/AC Qdotlarının kimyasal aktivasyon ve bakteri etkileşimi sonrası floresans spektrumu verilmiştir. *E.coli* K-12 etkileşiminden sonra ışımaya şiddeti net bir şekilde düşmüştür. Bu nedenle CdTe/AC-*E.coli* K-12 için Ex slit 10, Em slit 10 olarak seçilerek dalgaboyu takibi yapılabilmektedir. Spektrumda görüldüğü gibi işlemsiz Qdot 566 nm'de, EDC aktivasyonundan sonra 562 nm'de, *E.coli*

etkileşiminden sonra ise 572 nm'de pik vermiştir. Kimyasal aktivasyon ve bakteri etkileşimi arasındaki 10 nm kayma dikkate alınır bir değişimdir.



Şekil 28. CdTe/AC Qdotların a) işlemsiz b) kimyasal aktivasyondan sonra c) *E.coli* etkileşimi sonrası floresans spektrumları (Ex slit 2.5 nm)

Şekil 29'daki spektrumda görüldüğü gibi bakteri ile etkileşimden sonra CdTe/MPA@kitosan floresans dalgaboyu 575 nm'den 582 nm'ye doğru 7 nm sağa (red shift) kayma göstermiştir. CdTe/AC ise *E.coli* K-12 etkileşiminden sonra 565 nm'den 575 nm'ye 10 nm sağa kayma göstermiştir. Ancak kitosan kaplama sonrası aradaki bu değişim de kaybolmuştur. Sonuçlara bakıldığında EDC/NHS aktivasyonundan sonra 5 nm, bakteri ile etkileşimden sonra ise CdTe/MPA@kitosan'da 2 nm, CdTe/AC partikülün ışımada 5 nm sağa kayma gözlenmiştir. Değişimler 10 nm altında olduğu için ihmal edilebileceği düşünülmüştür.



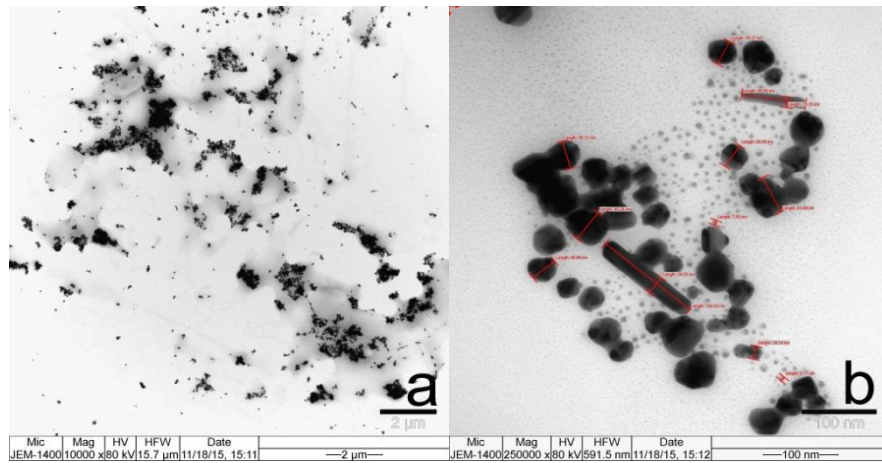
Şekil 29. CdTe/MPA@ch Qdotların a) işlemsiz b) kimyasal aktivasyondan sonra c) *E.coli* etkileşimi sonrası floresans spektrumları

4.1.4. İşlemsiz ve Bakteri Yakalayan NPlerin TEM Sonuçları

Bu bölümde işlemsiz nanopartiküllerin ve gradientin bakteri-NP fazından alınan örneklerin TEM ile elde edilen karakterizasyon sonuçları verilmiştir.

4.1.4.1. Gümüş Nanopartiküllerin TEM Görüntüleri

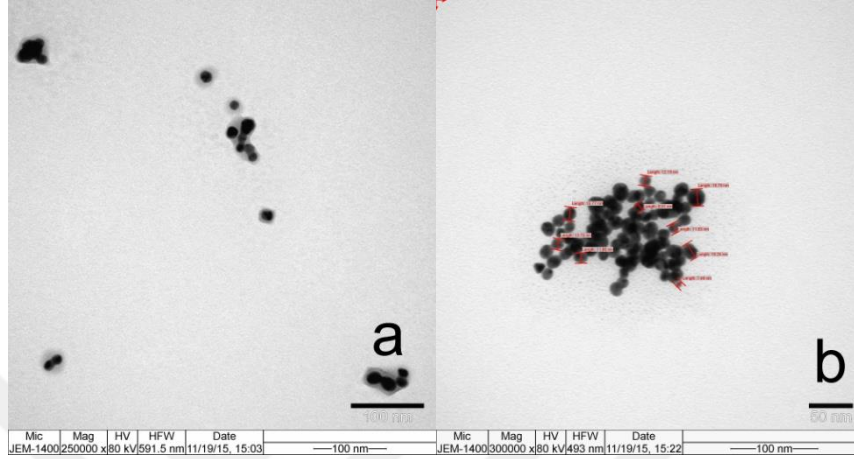
Şekil 30'da verilen TEM görüntülerine bakıldığında AgNPlerin homojen şekil ve boyutlarda sentezlenemediği görülmüştür. Küresel yapıların yanısıra çubuk yapıların da bulunması nedeniyle gradient çalışmalarının devamında kullanılması uygun bulunmamıştır. Küresel gümüş nanopartiküllerin ortalama çapı 31 ± 12 nm olarak ölçülmüştür.



Şekil 30. AgNPlerin a) 100000x b) 250000x büyütme ile TEM görüntüleri

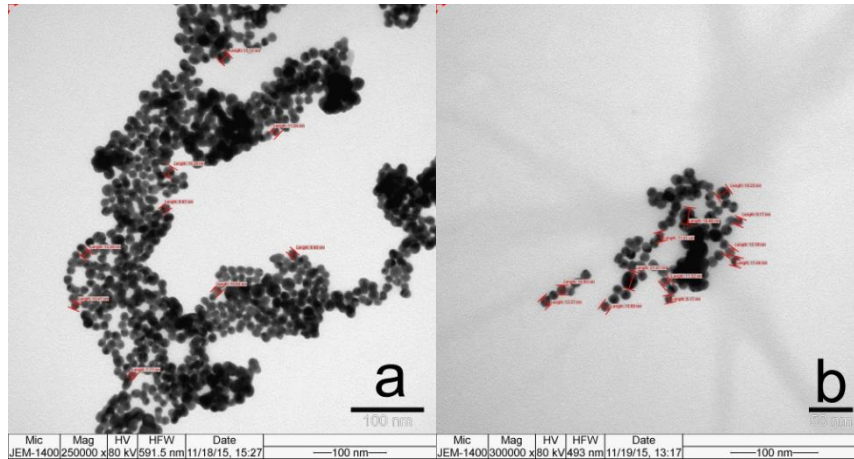
4.1.4.2. Altın Nanopartiküllerin TEM Görüntüleri

Su ortamındaki altın nanopartiküllerin ortalama yarıçapı 13 ± 4 nm olarak ölçülmüştür (Şekil 31). Şekil 31.a'da NPLerin etrafında sitrat bulutları görülmüştür. Şekil 31.b'de ise yıkama işleminden sonra sitrat bulutlarının uzaklaştığı görülmüştür.



Şekil 31. İşlemsiz AuNP fazının a) yıkama öncesi b) yıkama sonrası 300000x büyütme ile TEM görüntüleri

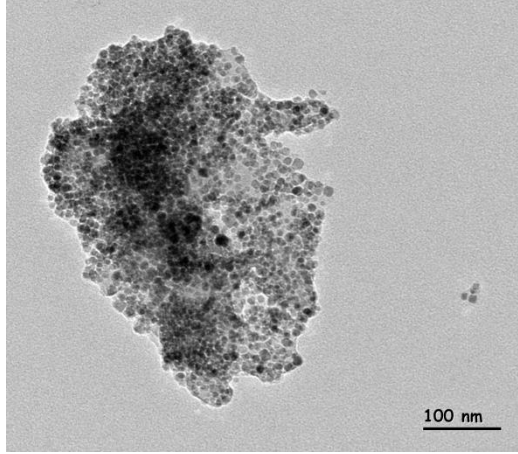
Şekil 32'de etanol ortamına çekilen altın nanopartiküllerin TEM görüntüleri yer almaktadır. Homojen, küresel nanopartiküllerin boyutları 13 ± 4 nm olarak ölçülmüştür. 250000x büyütme ile büyük kümeli yapıların varlığı gözlenmiştir.



Şekil 32. Çökelti fazındaki AuNPLerin a) 250000x b) 300000x büyütme ile TEM görüntüleri

4.1.4.3. Manyetik Nanopartiküllerin TEM Görüntüleri

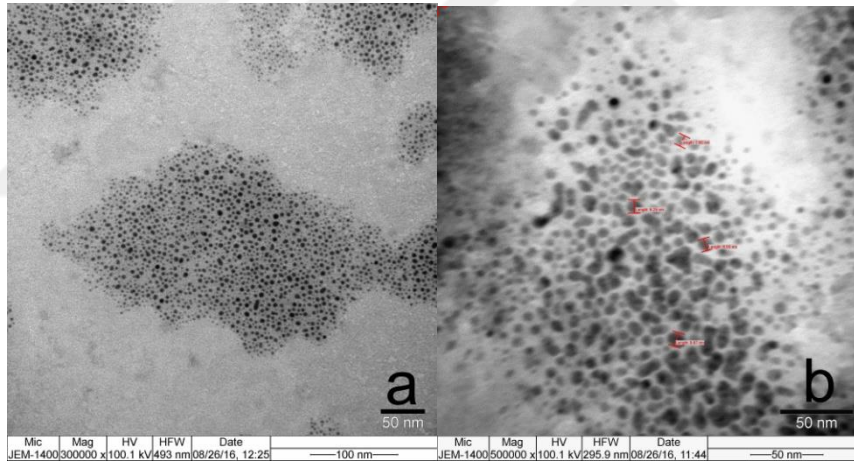
Şekil 33'de altın kaplı manyetik nanopartiküllere ait TEM görüntüsünde küresel yapıdaki NPLerin homojen dağılım sergilediği görülmüştür. Boyutları 12 ± 4 nm olarak ölçülmüştür.



Şekil 33. Fe₃O₄@Au NPlerin 30000x büyütme ile TEM görüntüsü

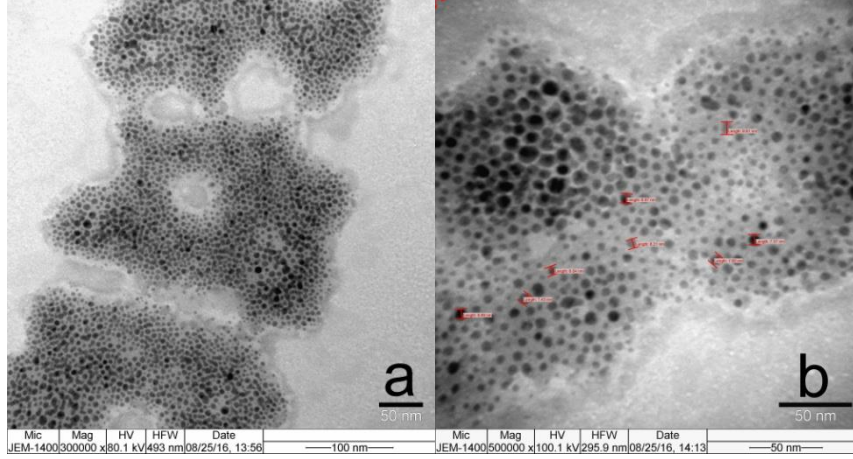
4.1.4.4. Kuantum Noktaların TEM Görüntüleri

Şekil 34'te sükröz gradiente alınmadan önce ve gradientten çekilip yıkama işlemlerine tabi tutulan Qdotların TEM görüntüleri verilmiştir. Partiküllerin homojen olduğu görülmüş, boyutları 6±1 nm olarak hesaplanmıştır.



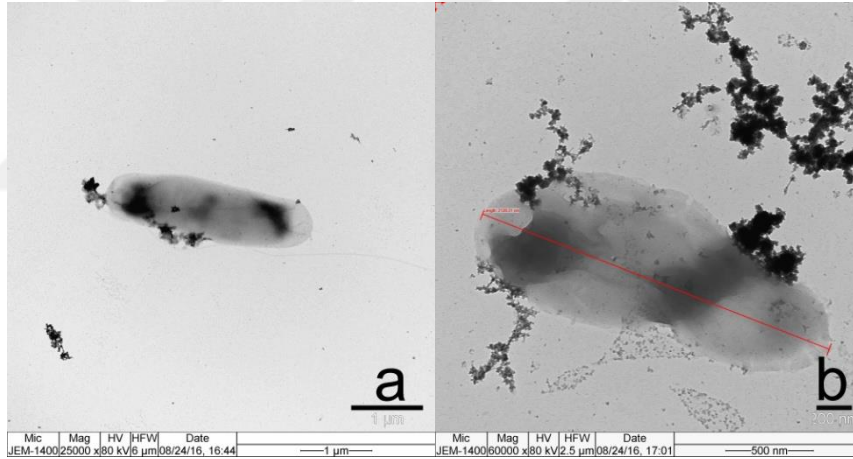
Şekil 34. İşlemsiz CdTE/MPA@ch-EDC NPlerinin a) 30000x b) 50000x büyütme ile TEM görüntüleri

Şekil 35'te sükröz gradientten çekilen CdTE/MPA@ch kuantum noktaların yoğun sükröz etkisinde ve yıkama işlemlerinden sonra morfolojik yapısını koruduğu görülmüştür. Bu TEM görüntüsü ile sükröz gradientten çekilen partiküller için iki kez PBS ile yıkama işleminin yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Partikül boyutları 6±1 nm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 35. Gradientten çekilmiş Qdotların a) 30000x b) 50000x büyütme ile TEM görüntüleri

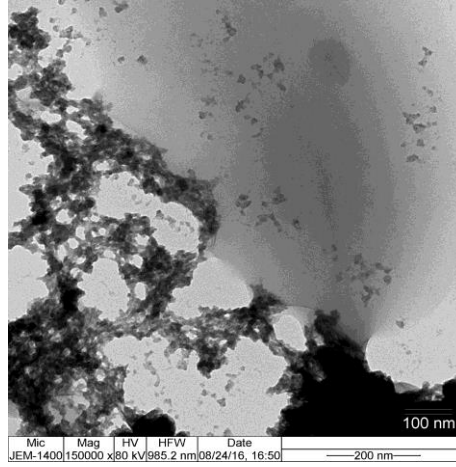
İşlemsiz partiküle ait TEM fotoğraflarında büyük kümeli yapılar olmadığı görülmüştür. Şekil 36'da görüldüğü gibi bakteri-NP bandından çekilen Qdotlar kendi aralarında kümeleşerek *E.coli*'ye bağlanmışlardır. Bakteri boyutu 2-3 μm arasında ölçülmüştür.



Şekil 36. Gradientten çekilmiş *E.coli* yakalayan Qdotların a) 25000x b) 60000x büyütme ile TEM görüntüleri

Bunlara ek olarak, Şekil 37'de detaylı görüldüğü gibi bakteri hücre duvarının şeklinde bozulma ve hücre boyunda plastik uzama (plastic elongation) görülmüştür. Atma şeklindeki (pulse-like forces) kesikli kuvvetler elastik deformasyona sebep olmakta ve etki ortadan kalktığında bakteri eski şekline dönmektedir [103]. Plastik deformasyon içinse büyüme ve uzun zamanlı kuvvet gerekmektedir. Şekil 37'de 150000x büyütme ile görülen bakteri duvarındaki deformasyonlar santrifüj kuvvetinin etkisi ortadan kalksa bile bakteri duvarının şeklinin eski haline geri dönmediğini göstermiştir. Dolayısıyla bu deformasyon

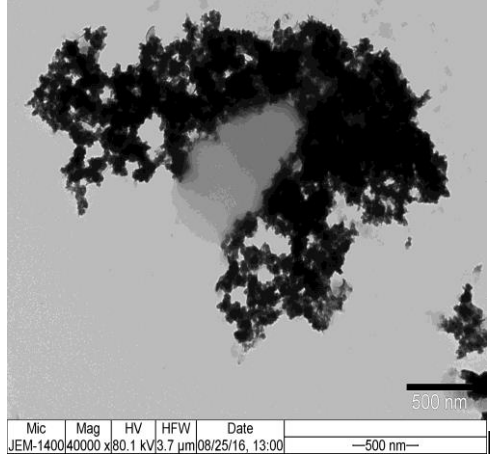
plastik deformasyona örnek olup bakterinin santrifüj sırasında büyümeye devam etmesi ile açıklanmıştır.



Şekil 37. *E.coli* yakalayan CdTE/MPA@ch NPlerinin 150000x büyütme ile TEM görüntüsü

Uygulanan santrifüj kuvveti gradient santrifüj sırasında 500 g yıkama işlemleri sırasında 4500 g, 5 dk süre ile uygulanmıştır. Uygulanan kuvvet ve uygulama süresi çok yüksek olmamasına rağmen gözlemlenmiş olduğumuz deformasyonun sebebinin; yıkama işlemleri sırasında vortex uygulanırken etki eden bükülme kuvvetleri ve sükoz içerisinde bakteri-NP fazına etki eden sürtünme kuvvetlerinin yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

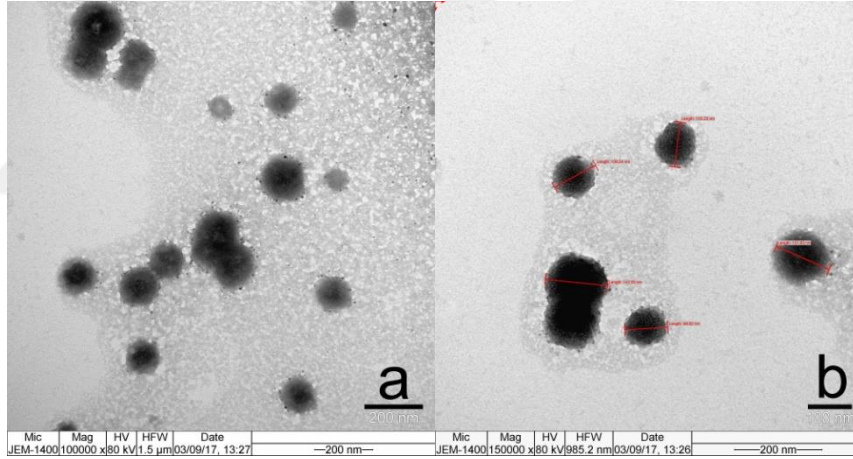
Banttın çekilen bakteri-NP kümelerinin partikül ve bakteri sayıları farklı olacağı için kümelerin yoğunlukları ve çökme katsayılarının da farklı olacağı öngörülmüştür. Şekil 38'de görüldüğü gibi bakterinin etrafında yoğun Qdot kümeleri oluşmuştur. Bu nedenle her seferinde aynı hızda hareket edecek, tekrar edilebilir ve keskin yapıda bir bant elde etmek güç olmuştur. Aynı zamanda polimer matris içerisine birden fazla bakteri ya da parçalanmış bakteri duvarı yerleşebileceği gibi birden çok bakteri de aynı kümeye dâhil olabilmektedir. Dolayısıyla bakteri-NP fazına ait geniş bir bant yapısı oluşmaktadır.



Şekil 38. Gradientin CdTE/MPA@ch-*E.coli* fazından çekilen 40000x büyütme ile TEM görüntüsü

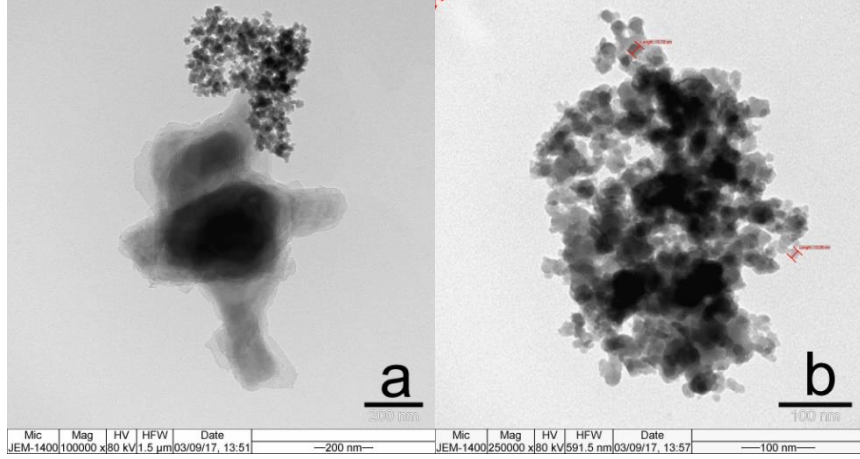
4.1.4.5. Karbon Nanopartiküllerin TEM görüntüleri

Şekil 39'da CNPlere ait TEM görüntüsü verilmiştir. Homojen dağılımlı, küresel yapıların 119 ± 33 nm boyutunda olduğu ölçülmüştür.



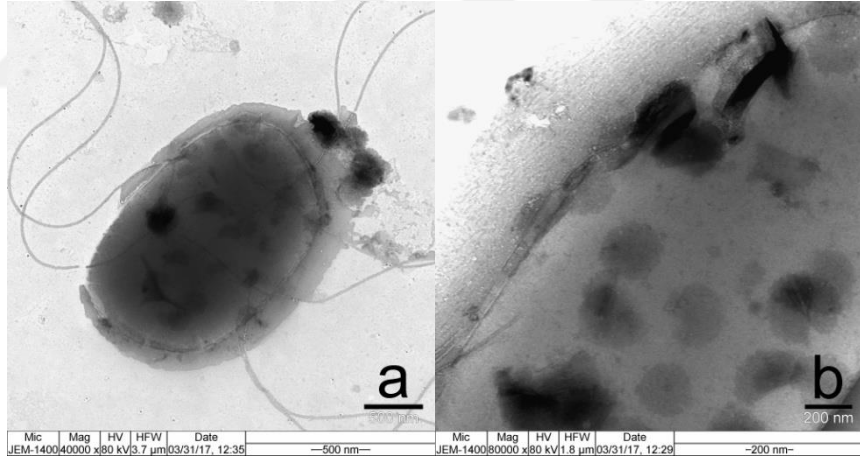
Şekil 39. PBS içerisindeki işlemsiz CNPlerin a) 100000x b) 150000x büyütme ile elde edilen TEM görüntüleri

Şekil 40'da ise CNPlerin sükröz gradientin partikül bandından çekilip sükröz ortamdan uzaklaştırılması ile elde edilen TEM görüntüleri verilmiştir. Santrifüjle yıkama sırasında viskoz ortamda partiküllere etki eden yüksek RCF ve sürtünme kuvveti partiküllerin stabilitesini etkilemiştir. Şekil 40.a'da plaka şeklindeki grafen yapıların görülmesi küresel yapının bozulduğunu göstermiştir. Şekil 40.b'de görüldüğü gibi CNPlerin bulunduğu viskozitesi yüksek sükrözün ve uygulanan santrifüj kuvvetinin etkisi ile CNPler kümeleşmiş ve deforme olmuştur.



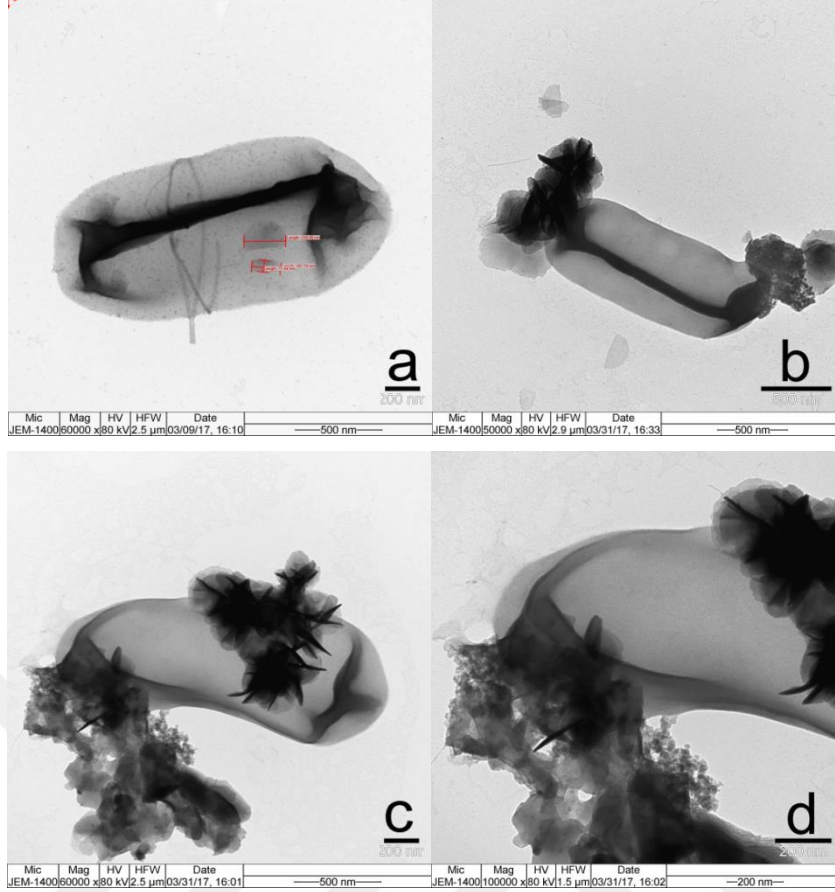
Şekil 40. Gradientin partikül fazından çekilip yıkama işlemlerine tabi tutulan CNPlerin a) 100000x b) 250000x büyütme ile TEM görüntüleri

Şekil 41'de bakteri yakalamış CNPlerin TEM görüntüleri verilmiştir. *E.coli* K-12 boyu 1.7-3.2 μm aralığında ölçülmüştür. Görüldüğü gibi dairesel ve yarım daire şeklindeki karbon küreler *E.coli* K-12 üzerine dağılmıştır. *E. coli* K-12 etrafındaki belirgin tabakanın besinlerin hücre içine alımı ve atık ürünlerin boşaltımına sebep olan ekzopolisakkarit (EPS) tabakasına ait olduğu düşünülmüştür [104].



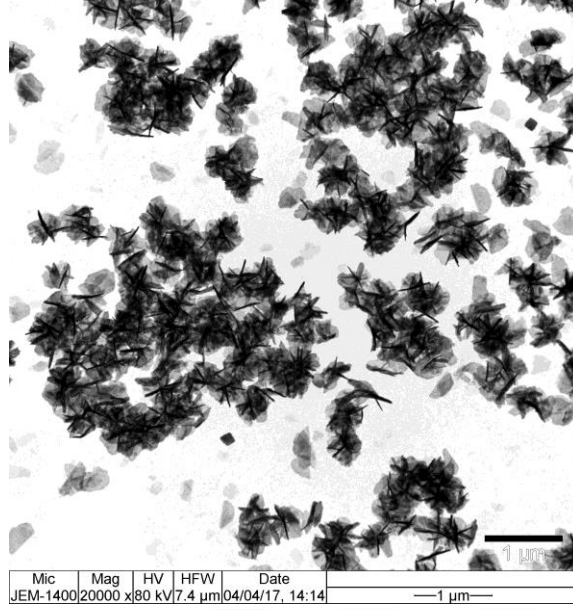
Şekil 41. Hedefe özgü olmadan *E.coli* yakalayan CNPlerin a) 40000x b) 80000x büyütme ile TEM görüntüleri

Gradientin bakteri-NP bandından çekilen örneklerin TEM görüntüleri Şekil 42'de verilmiştir. Yıkama işlemleri sırasında uygulanan santrifüj kuvvetlerinin CNPlerin şeklini ve kümeleşmesini değiştirdiği görülmüştür. Yıkama işlemleri sırasında partiküllere etki eden santrifüj ve sürtünme kuvvetleri neticesinde, CNPlerin gerilme, kesme ve eğilme iç kuvvetlerinin etkisinde açısız olarak yeni bir yapısal düzenlenime girdiği, farklı formlarda kümeleştiği düşünülmüştür.



Şekil 42. Gradientin hedefe özgü bakteri-NP fazından çekilen CNPlerin a-c) 60000x d) 100000x büyütme ile TEM görüntüleri

Şekil 43'de parçalanmış bakteri membranları ile kümeleşen NPler görülmüştür. Literatürde enerjisi en yüksek olan bölgelerin kristalin köşe bölgeleri olduğu, kristalin tabaka yüzeyi ve yüzeydeki amorf karbonun daha az enerjili olduğu yer almıştır [60, 105]. Ayrıca bakteri bağlayan yüzeylerin; yüzey enerjisi, zeta potansiyeli, topoğrafyası, substrat malzeme sertliği gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerinin bakteri yapışma (adhesion) özelliğini etkilediği literatürde çeşitli çalışmalarda sunulmuştur [106-109]. Yüzeyler ve bakteri membranı arasındaki etkileşim, yüzey enerjisinin yüksek olduğu yerlerde gerçekleşmekte, yüzey enerjisi düştükçe yüzeye tutunan bakteri miktarı azalmaktadır [106]. Bu nedenle, yıkama işlemleri sırasında yapısal formu bozulan karbon NPlerin kristalin forma geçerek, aktif köşeleri bakteri yüzeyine bağlanmış şekilde minimum enerjili yassı tabakalar oluşturduğu düşünülmüştür (Şekil 43).



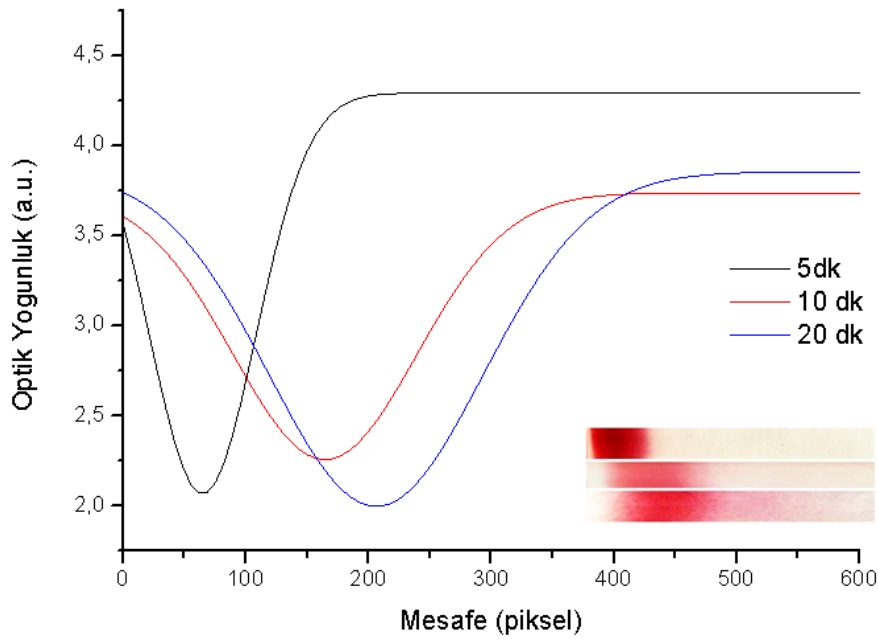
Şekil 43. Gradientin bakteri-NP fazından çekilen CNPlerin 20000x büyütme ile TEM görüntüsü

4.2. Gradient Santrifüj Parametrelerinin Optimizasyonu

Maksimum rotor hızı 18000 rpm olan açılı rotorda tüpün en altında partiküle etki eden maksimum merkezkaç kuvveti 28978 *g* olarak hesaplanmıştır. Bu kuvvet partiküllerin boyutlarına göre ayrılması için literatürde kullanılan yüksek santrifüj kuvvetlerine uyumlu bulunmuştur. Lakin bakteri-NP fazı ile çalışırken ultra santrifüj kullanılmasının bakteri duvarına sakıncalı olabileceği düşünülerek literatürde yer alan 6000 *g* santrifüj kuvveti üst sınır olarak belirlenmiştir [110]. Bakteri-NP etkileşimi incelenen çalışmalarda, bakteri duvarının zarar görmemesi, viskoz ortamın da etkisiyle bakteri-NP konjuge yapısındaki bağların kopmaması veya yapılar arasında kümeleşme olmaması için nispeten düşük *g* kuvvetlerinin kısa sürede uygulanmasına karar verilmiştir. Viskoz ortamda bakteri-NP fazına etki edecek sürtünme kuvveti neticesinde ısınma ve yapıda bozunmalar meydana gelebilecektir. Bu nedenle, maksimum merkezkaç kuvveti 4149 *g* olan, yatay (swing-salınımlı) rotorlu, 4°C soğutmalı santrifüj cihazının kullanılması uygun bulunmuştur. Bu kuvvet bakteri ile yapacağımız hareketli alan santrifüj çalışmalarımız için yeterli bulunmuştur. Bunun yanında tez çalışması boyunca bakteri yıkama için uygulanan parametreler; RCF 4500 *g*, süre 7 dk olarak belirlenmiştir.

4.2.1. Gradient Santrifüj ile Partikül Fazının İncelenmesi

Şekil 44'te sırasıyla 5-10-20 dk santrifüjden sonra elde edilen AuNP fazlarının optik ölçümü verilmiştir. 20 dk sonra tüpte oluşan pembe bulutsu yapılar santrifüj süresi arttırıldığı zaman daha fazla dağılmış ve rengi mora dönüşmüştür (Şekil 45). Keskin bant yapısını engelleyen bu davranışın partiküllerin etrafındaki sitrat bulutuntan sıyrılıp NPlerin sükroz ile birlikte kümeleşmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. 45 dk ve 90 dk'lık çalışma sürelerinde AuNPlerin % 30-% 35 a/h sükroz sınırında kaldığı görülmüştür. Bu sonuç; altın nanopartiküllerin eş-yoğuluk ayırma ile ayrıldığını göstermiştir.



Şekil 44. Gradientte AuNP bandının zamana bağlı ilerlemesi ve optik ölçümü
a) t=5 dk b) t=10 dk c) t=20 dk

Aynı derişimdeki sükroz çözeltilerinden farklı miktarlarda kullanılarak hazırlanan gradientler karşılaştırıldığında; % 30-% 35 a/h sükroz çözelti miktarının arttırılması partiküllerin daha geniş bant aralığında dağılmasına sebep olmuştur. Partikül derişiminin arttırılması da aynı etkiyi yaparak bant hacmini arttırmıştır. Bu nedenle NP konsantrasyonu, NP hacmi ve sükroz çözelti hacimlerinin gradientte Gaussyen bant ilerlemesini bozmayacak şekilde araştırılması düşünülmüştür.

Yatay rotorda 4149 g ile 45-90 dk çalışma sürelerinde değişim kaydedildiğinde 45 dk sonra AuNP bandı % 30 a/h bölgesine hareket etmiştir. İkinci 45 dk santrifüj sonrası AuNP bandının bozulmadan 1ml daha aşağı doğru ilerlediği gözlenmiştir. İlk ve ikinci 45 dk'lık süreçte partikül bandının aynı mesafe kat etmiş olması sabit

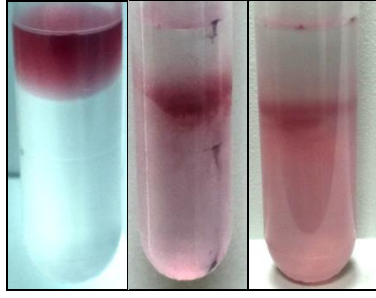
hızlı harekettir. Partiküle etki eden net kuvvet sıfırsa ivme sıfırdır. Partikül derişimi fazla olan bölgeye girince viskozite artacağı için hareketin tersi yönde partiküle etki eden sürtünme kuvveti artmaktadır. Fakat NP ile rotorun dönme merkezi arasındaki mesafe artacağı için partiküle etki eden bağıl merkezkaç kuvveti (RCF) de artacaktır. Kuvvetler birbirini dengelerse ivme sıfır olacaktır. $t=90$ dk'dan sonra kümeleşen partiküllerin ($F_{net} \neq 0$) tüpün dibinde ve çeperinde mor renkte biriktiği gözlenmiştir. Tüpün ucuna doğru NPye etki eden bağıl merkezkaç kuvveti (RCF) artacaktır. Bu nedenle kümeleşen NPLerin mor renkte gradient içinde ilerlediği, bir kısmının çepere yapıştığı ve çöktüğü görülmüştür.

Ön çalışmalarda toplam gradient hacmi (4-10 ml) değiştirilerek partiküllerin rotorun dönme eksenine olan mesafesi değiştirilmiştir. Gradient hacmi azaldığında partikülün rotorun dönme eksenine olan mesafesi ve partiküllere etki eden g kuvveti artırılmıştır. Toplam gradient hacmi 10 ml'ye arttığında partikülün gradientte dağılarak ilerlediği görülmüştür. Bu nedenle uygun işlem parametrelerinin (RCF ve süre) belirlenmesi için gradient hacminin 5 ml'de sabit tutulup santrifüj kuvveti ve uygulanan sürenin değiştirilmesi tercih edilmiştir.

Ters yöne etki eden kuvvetlerin sürücü kuvvet olarak kullanıldığıının ispatı için AuNP çözeltisi tüpün altında en yoğun sükroz bölge ile karıştırılıp gradiente alınmıştır. Santrifüjle birlikte NP bandı tüpün dibinden yukarıya doğru hareket etmeye başlamıştır. 4149 g 45 dk santrifüj sonrası keskin bant yapı oluşmasa da % 35 a/h'lik bölgede partikül yoğunluğunun fazla olduğu gözlenmiştir. Partiküllere tüpün altına doğru merkezkaç kuvveti etki ederken tersi yönde hareketi sağlayan kuvvet kaldırma kuvveti olmuştur. Böylece NP bandı uygun yoğunluk aralığına çıkmıştır. Kuvvet dengesi sağlanana kadar gradient içerisinde partikül hareketi devam etmiştir. Bu sonuç, santrifüj işleminin hareketli alan (rate zonal) değil yoğunluk gradient santrifüj işlemi olduğunu doğrulamıştır.

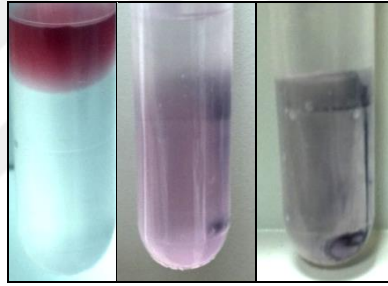
4.2.2. Açılı Rotor ile Zamana Bağlı Santrifüj Sonuçları

% 60 a/h sükroz çözeltisinin viskozitesi yüksek olduğu için bariyer görevi görmüş, AuNP bandı belirgin bir şekilde viskozite bariyerini geçememiştir (Şekil 45). Partiküller 1 ml hacimdeki su fazını terkedip sükroz çözeltisi içerisinde uygulanan yüksek RCF (17968 g) ile hareketlenmiştir. Bariyeri geçen partiküller koloidal yapıda olup ve kırmızı rengini korumuştur. Kümeleşen partiküller çepere yapışmış ya da dibe çökmüştür.



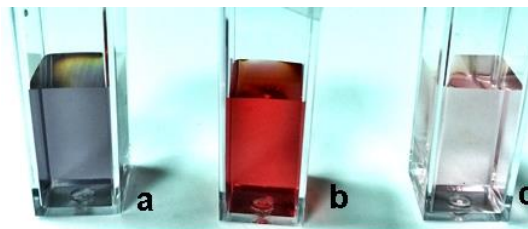
Şekil 45. AuNPlerin 17968 g ile t=0-20 dk-40 dk santrifüj sürelerinde %60 a/h süzkroz bariyerinden ilerlemesi

% 32 a/h süzkroz çözeltilisinde ise viskozite bariyeri etkisi görülmemiştir. % 30-% 35 a/h süzkroz yoğunluğu aralığı AuNP partiküllerinn hidrodinamik yoğunluk aralığıdır. Bu nedenle, bölgede ilerleyen partiküller kümeleşerek mor renge dönüşmüştür. İkinci santrifüj sonrası ise Şekil 46'da görüldüğü gibi yoğun kümeleşme nedeniyle partikül rengi siyaha dönüşmüştür.



Şekil 46. AuNPlerin 17968 g ile t=0-20-40 dk santrifüj sürelerinde % 32 a/h süzkroz bariyerinden ilerlemesi

Şekil 47'de kırmızı renkteki işlemsiz AuNPler ile differansiyel santrifüj işleminden sonra pembe ve mor renkte fazlara ayrılan AuNPlerin görüntüleri verilmiştir. Pempe renkli süpernatant kısmın sitrat bulutu nedeniyle çözeltilde asılı kalan NPlere, mor renkli fazın ise etrafındaki iyon bulutunu kaybedip kümeleşen NPlere ait . Şekil 47'de görüldüğü gibi süpernatant pempe bölümün ve tüpün dibinden alınan çökeleğin ayrık partikül yapısını koruduğu, koloidal halde bulunduğu görülmektedir. Bu sonuç ile NP etrafındaki iyon bulutunun önemi görülmüştür.

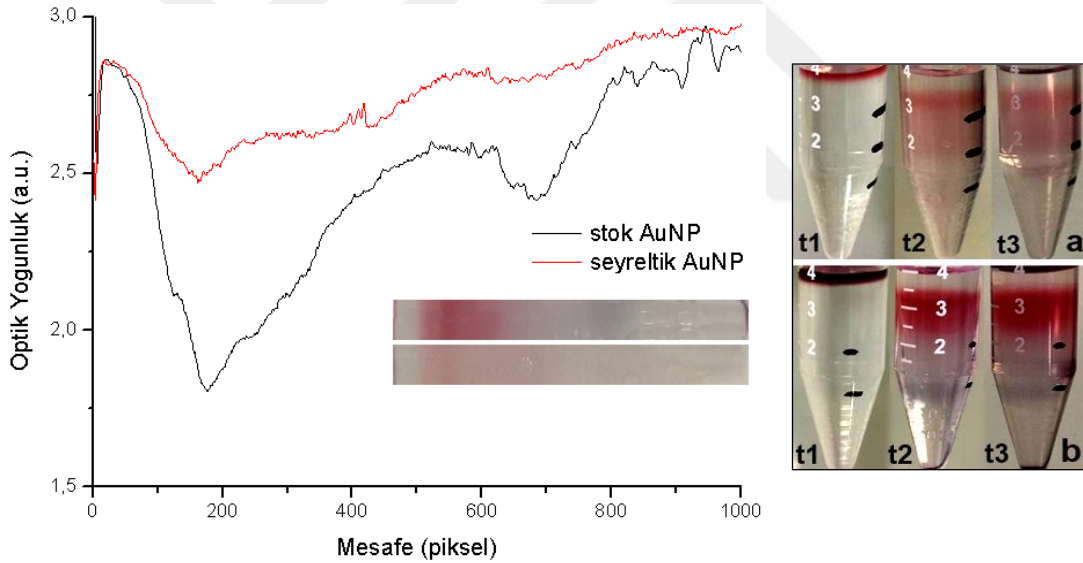


Şekil 47. Diferansiyel santrifüjle ayrılan AuNP fazları a) çökelti b) işlemsiz c) süpernatant

4.2.3. Yatay Rotor ile Gradientte Partikül Fazının İncelenmesi

4.2.3.1. Altın Nanopartiküller ile Elde Edilen Sonuçlar

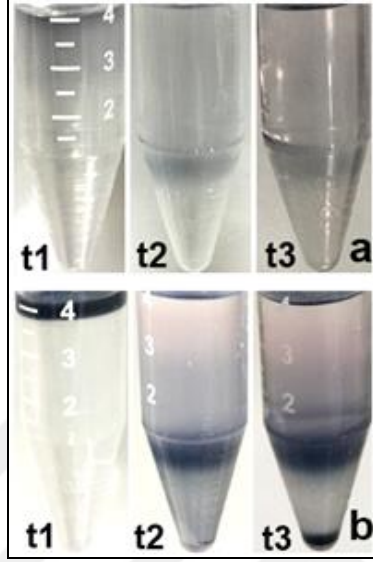
Şekil 48'de 1:3 oranında DI su ile stoktan seyreltilmiş AuNP ve stoktan alınan ANuP fazlarının gradientte optik ölçümü verilmiştir. Seyreltik stoktan alınan örnekte kümeleşme görülmemiştir. Ön çalışmalar ile uyumlu bir şekilde 45 dk santrifüjden sonra kırmızı AuNP bandı % 30-% 35 a/h süzkroz bölgesine hareket etmiştir. Ancak örnek hacminin fazla olması nedeniyle partikül bandında dağılım gözlenmiştir. Şekil 48.b'deki derişik çözeltide ise; partiküllerin yoğunlukları aynı olsa da birim hacimdeki partikül miktarı ve kümeleşme oranı arttığı için iki ayrı partikül fazı ve dibe çöken partiküller gözlenmiştir. AuNP kümelerinin boyut farklılaşması nedeniyle kırmızı bandın altında % 40-% 80 a/h süzkroz sınır bölgesinde mor bant oluşmuştur. Zamana bağlı değişimler optik yolla takip edilmiş, 15 saat bekledikten sonra partikül fazlarında bozulma olmadığı az miktarda dibe çöken partikül olduğu görülmüştür.



Şekil 48. AuNP a) seyreltik b) derişik stoktan 200 µl örnekle, gradientte 4149 g ile t1=0, t2=45 dk santrifüjden sonra ve t3=15 saat bekledikten sonra optik faz ölçümü

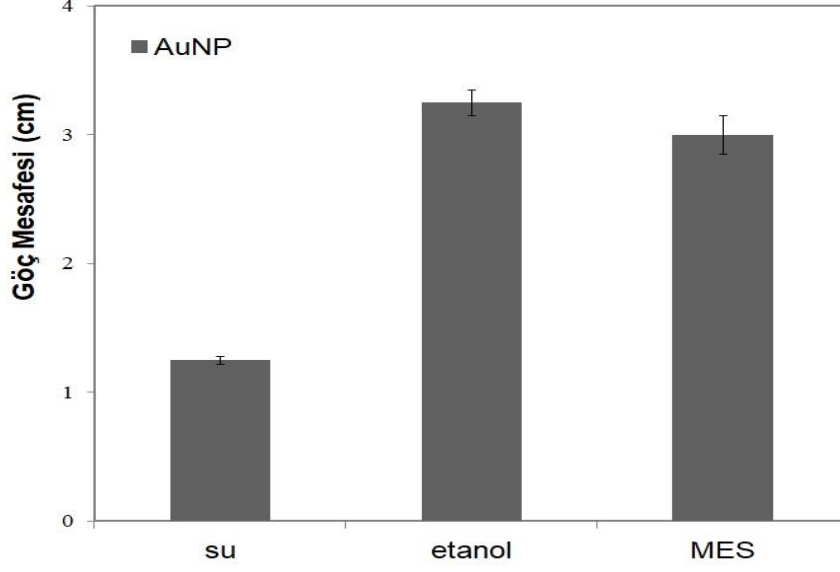
Şekil 49'da etanol ortamına çekilen seyreltik ve derişik AuNPlerin optik faz ölçüm sonuçları verilmiştir. NPlerin zeta potansiyelinin azalması ve kümeleşmesi nedeniyle renginin laciverte dönüştüğü düşünölmüştür. Yoğunluk gradient santrifüjden sonra AuNP bandının (yoğun mavi) % 40-% 80 a/h sınırına indiği görölmüştür. Şekil 49.b'de derişik çözelti ile çalışıldığında kümeleşme artmış, kek sıkıştırma nedeniyle gradient santrifüj işleminden önce de bant yapısında dağılım görölmemiştir. Ancak santrifüjle birlikte bant yapısı bozulmuş iki faz oluşmuştur.

Seyreltik çözelti ile görülemeyen % 30 a/h sükröz bölgesindeki pembe AuNP bandı görülmüştür. Bu sonuç seyreltik çözelti ile çalışırken NPLer daha homojen hızlarla hareket ederek gradiente yayılması şeklinde yorumlanmıştır. Derişik çözelti kullanıldığında hızlı kümeleşen NPLer % 80 a/h sükröz sınırına inerek % 30 a/h sükröz bölgesinde asılı duran NPLer ile arasında belirgin faz farkı yaratılmıştır.



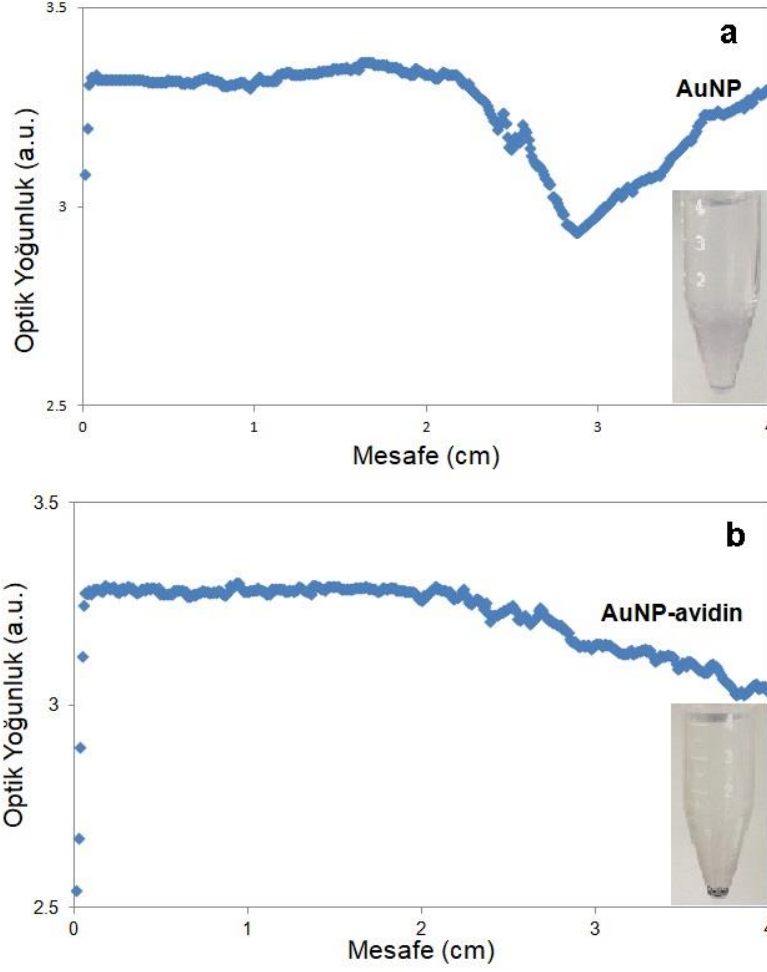
Şekil 49. Etanolde yıkanan a) seyreltik b) derişik AuNP bant görüntüsü t1=0, t2=45 dk santrifüjden sonra, t3=15 saat beklendikten sonra

Şekil 50'deki grafikte farklı ortamlar içerisindeki altın nanopartiküllerin hidrodinamik davranışı yoğunluk gradientte bant ilerlemesi nicel olarak karşılaştırılmıştır. Su, etanol ve pH 6.5 MES çözeltisinde bulunan AuNP partiküllerinin 45 dk, 4149 g ile santrifüj sonuçları göstermiştir ki; saf etanolde ve pH 6.5 MES tampon içerisinde kümeleşme nedeniyle AuNP çökme katsayısı artmıştır ve hidrodinamik yoğunluğun 1.4 g/ml üzerine çıktığı düşünülmüştür. Kullanılan partiküllerin yoğunluğu aynı olduğu halde, kümeleşen yapıda yüzey alanı/hacim oranı düşmüş, partiküle etki eden sürtünme kuvveti azalmış ve çöktürme katsayısı artmıştır. Dolayısıyla, kümeleşen partiküller daha fazla mesafe katederek tüpün aşağısında bir faz oluşturmuştur. AuNP (su) 350 mg/ml sükröz alanındaki seviyesini, santrifüj süresi 120 dk'ya çıkarıldığında da korumuştur. Bu nedenle, su içerisindeki AuNP hidrodinamik yoğunluğunun 1.12 g/ml-1.15 g/ml arasında olduğu tahmin edilmiştir.



Şekil 50. Farklı ortamlar içerisindeki AuNPLerin % 30-% 35 -% 40 -% 60 a/h sükröz gradientinde RCF=4149 g, t=45 dk ile karşılaştırılması

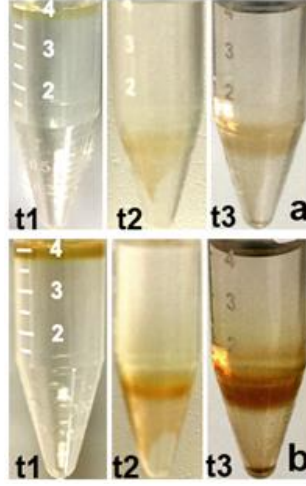
AuNPLerin çözelti rengi EDC/NHS aktivasyonundan sonra açık gri renge dönmüş ve gözle takip edilebilirliği azalmıştır. Şekil 51'de görüldüğü gibi optik yoğunluk ölçümü ile bant yapısındaki değişimler ayırtedilebilir hale gelmiştir. Şekil 51.a'da görüldüğü gibi kimyasal aktivasyon sonrası AuNP bandı % 80 a/h sükröz sınırına inmiştir. Şekil 51.b'de avidin bağlanan NPLer ise daha yüksek çökme hızıyla tüpün dibinde toplanmıştır. Bu değişimin gözlenmesi ileriki çalışmalar için umut verici olmuştur.



Şekil 51. Kimyasal aktivasyondan sonra a) işlemsiz b) avidin bağlı AuNPLerin % 30-% 35 -% 40 -% 60 a/h sükröz gradientinde 4149 g 45 dk ile faz karşılaştırması

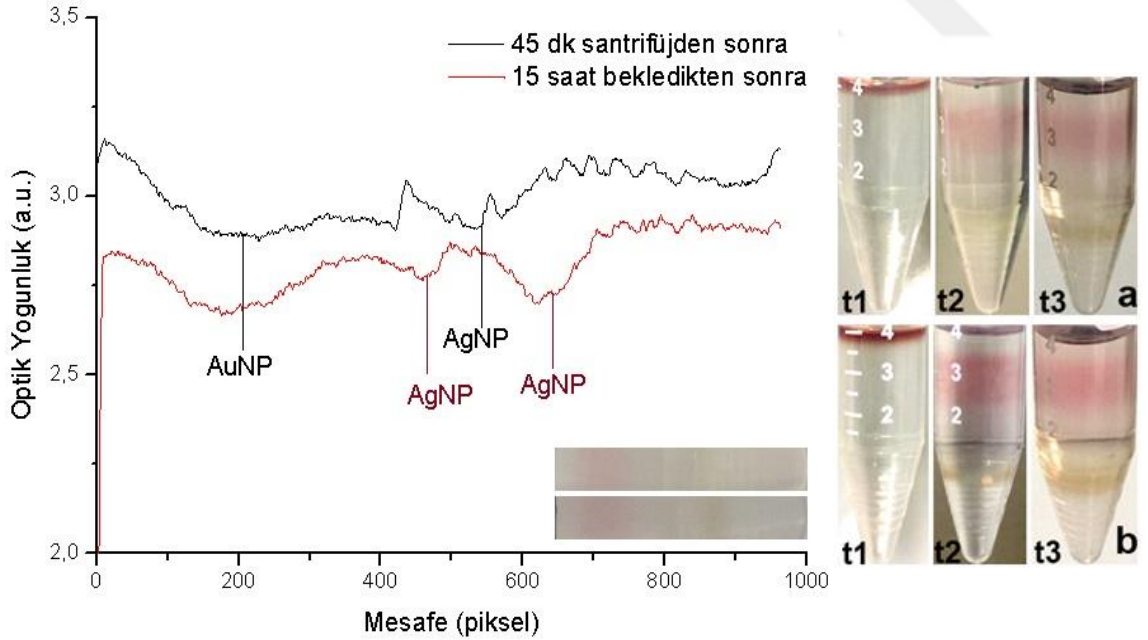
4.2.3.2. Gümüş Nanopartiküller ile Elde Edilen Sonuçlar

Şekil 52'de AgNP çözeltileri ile çalışıldığında elde edilen sonuçlar yer almıştır. % 80 a/h sükröz çözeltisi bölgesinde sarı renkte AgNP faz oluşumu görülmüştür. Gümüş NPLerin AuNPLerden daha hızlı ilerlemesi nedeniyle daha büyük boyutlarda olduğu öngörülmüştür. Numune 15 saat bekletildikten sonra derişik seyreltide kümeleşme oranı yüksek olduğu için dibе çöken NPLer olmuştur. Derişik AgNP fazında 0.75 ml ve 1.2 ml de olmak üzere 2 bant gözlenmiştir. Farklı bir gradient ortamı ve işlem parametreleriyle AgNPLerin şekil ve boyutlarına göre ayrılabilceği düşünülmektedir.



Şekil 52. a) seyreltik b) derişik AgNP stoktan % 30-% 35 -% 40 -% 60 a/h süzkroz gradientinde faz oluşumu t1=0, t2=45 dk, RCF=4149 g ile santrifüjden sonra, t3=15 saat bekleddikten sonra

Şekil 53'te Au/Ag NP karışımının gradientte dört banda ayrıldığı görülmüştür. Bu bantlar altın ve gümüşe ait olmak üzere örnek menüsküsünden itibaren 1 ml, 2.8 ml ve 3.2 ml'de iki adet görülmüştür. Altın ve gümüş NPler birbiri ile kümeleşmemiş, dibe çöken NP olmamıştır. Altının mor renkteki fazı gümüşün sarı bandının hemen üstünde yer almıştır.



Şekil 53. a) seyreltik b) derişik AuNP-AgNP karışımının % 30-% 35 -% 40 -% 60 a/h süzkroz gradientinde faz oluşumu t1=0, t2=45 dk santrifüjden, t3=15 saat bekleddikten sonra

4.2.3.3. Manyetik Nanopartiküller ile Elde Edilen Sonuçlar

500 µl ve 200 µl hacimde gradiente eklenen manyetik NPLerin farklı RCF etkisinde ilerlemeleri incelendiğinde; iki örnek için de bantlarda aşırı miktarda genişleme görülmüştür. Şekil 54'te t=5 dk sabit olmak üzere 500 g-1500 g-3000 g santrifüjden sonra faz ilerlemesi görülmüştür. Kahverengi renkteki manyetik Fe₃O₄ nanopartikülleri üzerinde herhangi bir (altın ya da silika) kaplama yapılmadığı için kendi aralarındaki manyetik etkileşimler nedeniyle kümeleşme olmuştur. Sükroz gradienti üzerine demir nanopartikülleri ekler eklemes kümeleşen nanopartiküller sükroz içerisine diffüz etmiş bant yapısı bozulmuştur. Madde miktarındaki fazlalık, boyut dağılımı ve kümeleşme sebebiyle bant yapıları belirgin bir şekilde gözlenememiştir. Belirli bir miktarın üzerinde partikül bandı kayma gösterip bozulurken, uygun miktar ve konsantrasyonda örnek koyulduğu zaman bantlar Gauss dağılımını korumaktadır [14]. Bu nedenle bantların net bir şekilde görülmesi için örnek konsantrasyonu ve miktarını doğru tayin etmek gerektiği düşünülmüş, partikül derişiminin azaltılmasına karar verilmiştir.

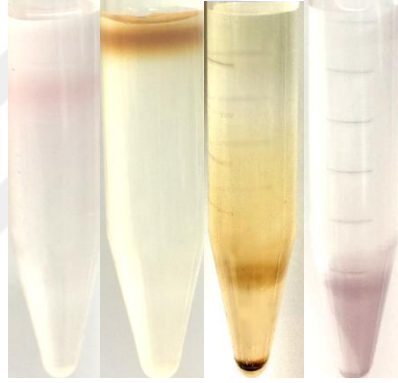


Şekil 54. Fe₃O₄ nanopartikülün sükroz gradiente 5 dk santirüj ile ilerlemesi
a) RCF=0 b) RCF=500 g c) RCF=1500 g d) RCF=3000 g e) RCF=4149 g, t=45 dk

4.2.3.4. Nanopartiküllerin Hidrodinamik Davranışlarının Karşılaştırılması

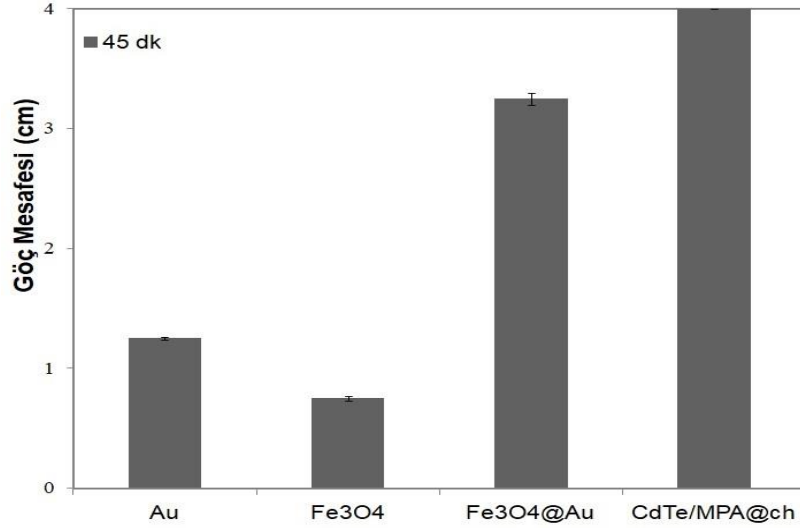
Eş-yoğunluk sükroz gradient santrifüjleme sonuçlarına göre % 30-% 35 a/h sükroz sınırındaki altın nanopartiküllerin su içerisindeki hidrodinamik yoğunluğunun 1.12-1.15 g/ml sükroz bölgesinde olduğu görülmüştür. Manyetik NPLerin fazı ise 1.08 g/ml sükroz yoğunluğunda oluşmuştur. Manyetik NPLerin çoğunluğu 45 dk sonra % 10 a/h'lik kısımda bant yapısını korumuş bir miktar partikül çökmüş veya gradiente dağılmıştır. Altın ve manyetit karışımı ise aralarındaki etkileşim nedeniyle kümeleşmiş ve % 60 a/h'lik bölgeye kadar ilerlemiştir.

Şekil 55.a'da AuNP 150 mg/ml süzkroz içerisinde asılı kalırken Şekil 55.d'de altın kaplı manyetik nanopartikül 800 mg/ml süzkroz içinde ilerlemiştir. Manyetik NPLerin hidrodinamik yoğunluğunun AuNPLerin hidrodinamik yoğunluğundan düşük olduğu düşünülmüştür. Bakteri-NP konjuge yapılarını çalışmak için bakteri ile işlemsiz partikülün çökme hızlarının ayırt edilebilir olması istenilmiştir. Bu nedenle, AuNPLerine kıyasla çökme hızı yüksek olan altın kaplı manyetik NPLerin kullanılması elde etmek istediğimiz hız farkı için uygun görülmüştür. Şekil 55.b ve Şekil 55.c karşılaştırıldığında ortamda altın yokken manyetit NPLeri dibe çökmediği, ancak altın eklendiğinde kümeleşen manyetit ve altın NPLerin gradiente yayıldığı ve büyük çoğunluğunun dibe çöktüğü görülmüştür. Şekil 55.d'de gradiente dağılan partikül olmaması manyetit NPLerin homojen olduğunu göstermiştir.



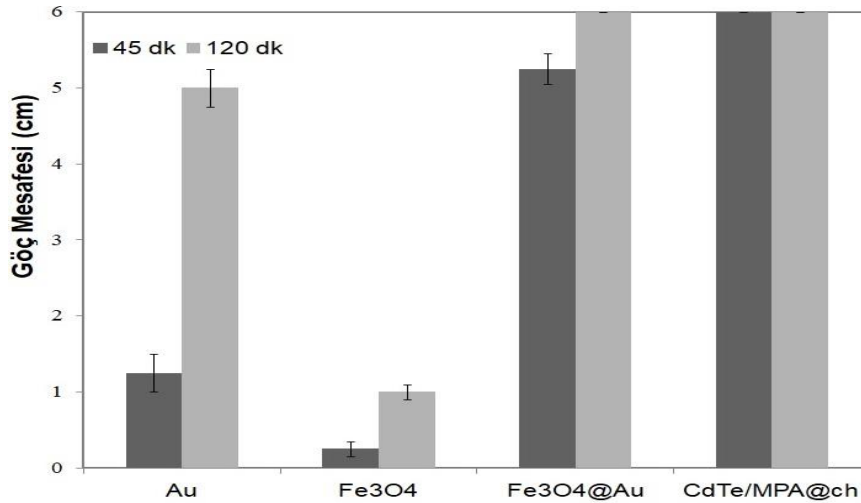
Şekil 55. % 10-% 15 -% 20 -% 30-% 40-% 80 a/h süzkroz gradientinde RCF=4149 g ile farklı NPLerin bant ilerlemelerinin karşılaştırılması a) AuNP b) Fe₃O₄ c) Au-Fe₃O₄ d) Fe₃O₄@Au NP

Yoğunluk gradient santrifüj ile elde edilen partikülün hidrodinamik yoğunluğunun; toz halindeki partikülün yığın yoğunluğu (bulk density) ve elementlerin ayırt edici özelliği olan yoğunluk değeri ile karşılaştırılabilir olmadığı görülmüştür. NPLerin yığın yoğunluğuna partiküller arası boşlukların ve porlu yapıların etkisi olduğu gibi, partiküllerin hidrodinamik yoğunluğuna da hidrodinamik çapın etkisi olmaktadır. Çalışmada kullanılan NPLerin Şekil 56'da bölgesel çökme hızları karşılaştırılmış ve $SV_{Fe_3O_4} < SV_{Au} < SV_{Ag} < SV_{Fe_3O_4@Au} < SV_{CdTe/MPA@ch}$ eşitsizliği elde edilmiştir.



Şekil 56. Farklı NPLerin % 30-% 35 -% 40 -% 60 a/h sükröz gradientinde RCF=4149 g ile hareketli alan santrifüj uygulanarak göç mesafelerinin karşılaştırılması

Şekil 57'de santrifüj sürelerine bağlı olarak nanopartikül bant ilerlemeleri karşılaştırılmıştır. 45 dk santrifüjden sonra AuNP ve Fe₃O₄ nanopartikülleri 100 mg/ml sükröz bölgesinde duraksamıştır. 120 dk santrifüjden sonra ise sadece manyetit nanopartikülleri 100 mg/ml sükröz bölgesinde kalmıştır. Hazırlanan tüm NPLer karşılaştırıldığında Fe₃O₄@Au ve CdTe/MPA@ch nanopartikülleri yüksek çökme hızıyla kısa sürede % 80 a/h sükröz bölgesine ilerlediği için hareketli alan santrifüjleme yöntemi için uygun bulunmuştur.



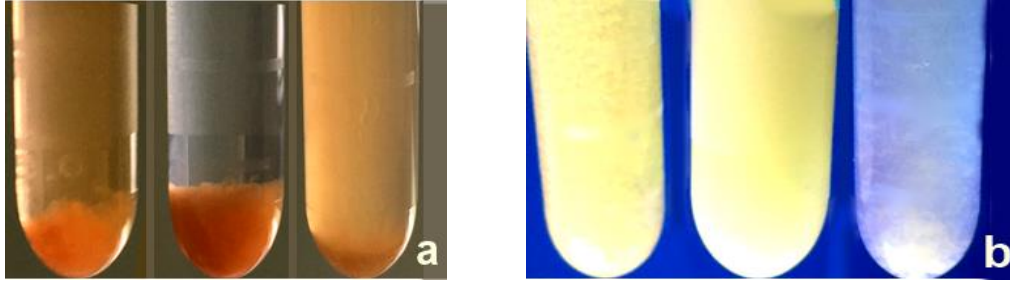
Şekil 57. Partikül fazlarının % 10-% 15 -% 20 -% 30-% 40-% 80 a/h sükröz gradientinde RCF=4149 g ile zamana bağlı ilerlemesi a) AuNP b) Fe₃O₄ c) Au-Fe₃O₄ d)Fe₃O₄@Au NP

4.2.3.4. Kuantum Noktalar ile Ön Çalışma Sonuçları

Sulu ortamda hazırlanan yüzeyi asetil sistein (AC) ve merkaptopropiyonik asit (MPA) ligandları ile modifiyeli Qdotların yüzey aktivasyon işlemleri için PBS ortamına alınmaları gerekmektedir. Ultrasonrifüj ile iki farklı rotor ve farklı hacimlerde Qdot kullanılarak 100000 g-15 dk, 160000 g-15 dk ve 180000 g-40 dk parametrelerinde partiküllerde çökme gözlenmemiştir. 300000 g-20 dk, 4°C işlem parametrelerinde santrifüj ile partiküller çöktürülürken supernatantta bir miktar partikülün asılı kaldığı görülmüştür. 10 mM pH 7.4 PBS çözeltisi ile 2 kez yıkama işlemi yapıldıktan sonra madde miktarında büyük oranda azalma görülmüştür. Qdotlarla bu şekilde çalışmak hem zaman alıcı olması hem de madde kaybına sebep olması nedeniyle çalışmanın devamında tercih edilmemiştir.

HCl, etanol, aseton vb. kimyasal kullanımı ile Qdot ortamının elektriksel özelliklerini değiştirmek partiküllerin zeta potansiyellerinin değişmesi sonucu kümeleşip santrifüj ile kolay çökmelerini sağlamaktadır [100, 111]. 20 mM pH 7.4 PBS çözeltisi, saf etanol ve saf aseton ile Qdotlar % 50 h/h oranında seyreltilerek santrifüj ile çöktürülmeye çalışılmıştır. Ancak 20000 g ile çökme gözlenmediği için ilerleyen gradient çalışmaları için işlemsiz CdTe/AC ve CdTe/MPA kuantum noktaların kullanılması uygun bulunmamıştır. Bu nedenle partikülleri ile kitosan kaplamaya yönelik çalışmalar yapılmıştır.

Şekil 58'de görülen numuneler pH 9.6 olan 2 ml CdTe/MPA@ch karışımının üzerine 10-20-50 µl saf asetik asit eklenerek karışım pH'sı 5.5-5.0-4.0 olarak ayarlanmıştır. 10 dk sonikatörde karıştırıldıktan sonra 3 kez 50 mM pH 6.5 MES tamponunda yıkanmıştır. Şekil 58.a'da 3. eppendorfa bakıldığında pH 4'te kitosan asetik asit içerisinde tamamen çözünmüştür. Bu nedenle kitosan kaplama başarısız olmuş, bulanık bir karışım görülmüştür. pH 5'te ise kitosan kaplama başarılı bir şekilde gerçekleşmiş, polimer kaplanan partiküller dibine çökmüştür. Şekil 58.b'de örneklerin PBS'e alınıp vorteksle karıştırıldıktan sonra UV ışık altında görüntüleri aynı sırayla verilmiştir. pH 5'te kitosan kaplanan örneğin homojen olarak PBS içinde karıştığı görülmüştür.



Şekil 58. Sırasıyla pH 5.5-pH 5.0-pH 4.0 de hazırlanan CdTe/MPA@ch Qdotlarının a) beyaz ışıkta b) 350 nm UV ışıkta görünümü

CdTe/MPA ile benzer şekilde 2 ml'lik pH 7'deki CdTe/AC-kitosan karışımı üzerine 20 ve 50 µl saf asetik asit eklenmiştir. Karışımın pH 'sı 3 ve 7 olarak hazırlandıktan sonra asetik asit fazlası nedeniyle kitosanın tamamen çözündüğü ve başarılı kaplama olmadığı görülmüştür. pH 3'te partiküller kümeleşmiş ve UV ışık altında çözelti rengi kırmızıya dönmüştür. Elde edilen veriler neticesinde farklı pH değerlerinde kitosan kaplanan Qdotların farklı kümeleşme oranında olduğu, belirli bir pH değerinde partiküllerin kitosan kaplanıp hızla kümeleşerek dibe çöktüğü gözlenmiştir. CdTe/MPA için uygun kaplama parametresi olarak pH 4.5-5.0 aralığı seçilmiştir. pH 5'te çalışılmasına karar verilmiştir. Her seferinde karışıma 1M pH 5 asetat tamponu eklenerek pH 5'e ayarlanmıştır. Bu partiküllerin çalkalanınca homojen dağıldığı, ancak bir süre sonra yerçekimi ivmesi ile dibe toplandığı görülmüştür. Gradient çalışmalarında ayırt ediciliğin artması için partikülün hızlı, bakteri-NP fazının yavaş ilerliyor olmasının avantajlı olacağı öngörülmüştür. Bu nedenle bakteri analizlerine CdTe/MPA@ch ile devam edilmesi uygun bulunmuştur.

4.2.3.5. CNPler ile Ön Çalışma Sonuçları

Bu bölümde CNPler ile elde edilen NP fazının ön çalışma sonuçları verilmiştir. CNP hacmi 50-100-200 µl olacak şekilde, NP çözelti konsantrasyonu 1-1.5-3 mg/ml olarak değiştirildiğinde partikül hacmi arttıkça dağılmanın fazla olduğu görülmüştür. 3 mg/ml konsantrasyonunda 50 µl hacimde CNP ile kek sıkıştırma nedeniyle keskin bant yapısı gözlenmiştir, fakat Gaussyen dağılım görülmemiştir. 1 mg/ml NPI ile 200 µl hacimde çalışıldığında bant hacminin daha geniş olduğu ama dağılımın ölçülebilir olduğu görülmüştür.

CNPlerin çökme hızının çalıştığımız diğer NPlere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. CNPler 5 dk santrifülden sonra 800 mg/ml sükröz sınırında birikmiştir.

Farklı çözücü etkisinde CNPlerin kümeleşme özellikleri değişmiştir. 10^6 kob/ml *E.coli* K-12 ile hedefe özgü olmayan etkileşime tabi tutulan CNPler incelendiğinde; DMSO/PBS ile hazırlanan kürelerin NP fazı ve bakteri-NP fazı arasındaki ilk 2 dk içinde görülen farklılık, 5 dk sonra NP fazının % 80 a/h sükröz sınırına inmesi ile kaybolmuştur. 15 dk santrifüjden sonra NPlerin % 80 a/h sükröz çözeltisini geçemediği görülmüştür. Koliform miktarı 10^8 kob/ml olduğunda 3 dk santrifüjden sonra DMSO/PBS kullanılarak hazırlanan CNPlere ait 3 bant görülmüştür. Yalnız bu örneklerde partikül ve bakteri-NP faz farkı görülmemiştir. Sadece PBS ile hazırlanan çözeltide fazlar arasında hız farkı gözlenmiştir. Bakteri olan tüpte NPlerin çepere yapışmadan ilerlediği görülmüştür. Bakteri olmayan tüpte ise % 80 a/h sınırında çepere yapışan NPler görülmüştür.

Ayrıca, gradientin % 50-% 70 a/h sükröz aralığının % 50-60-65-70-80 a/h sükröz çözeltileriyle genişletilmesi ile bakteri miktarına bağlı bakteri-NP faz değişimlerinin daha detaylı incelenebileceği düşünülmüştür.

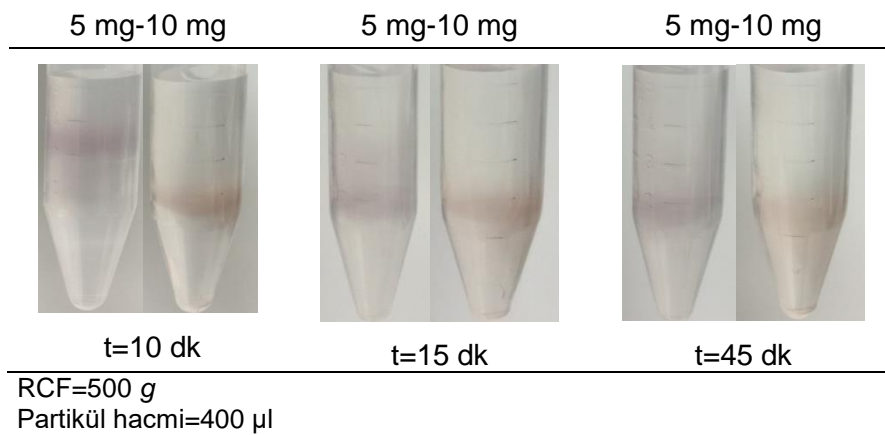
4.3. Gradient Parametrelerinin Optimizasyonu

Bu bölümde daha keskin NP bandı elde etmek ve daha belirgin bakteri-NP faz farkı oluşturmak için yapılan çalışma sonuçları verilmiştir. Gradient parametrelerini araştırmak için altın kaplı demir nanopartiküller kullanılmıştır.

4.3.1. Altın Kaplı Demiroksit Nanopartiküller ile Gradient Parametrelerinin Belirlenmesi

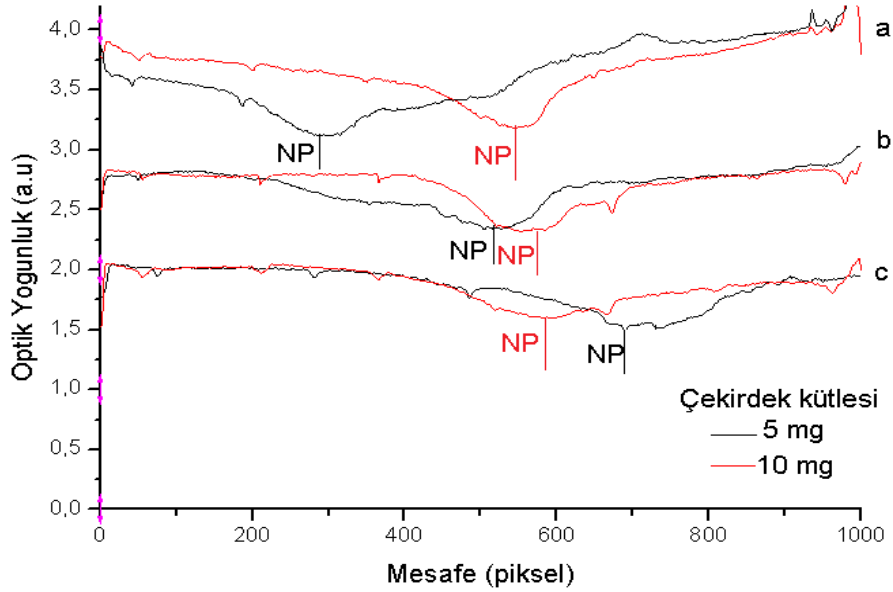
4.3.1.1. Farklı Kütledeki Manyetit Çekirdek ile Elde Edilen Sonuçlar

Çizelge 3. Farklı kütleli manyetik çekirdeklerin gradientte zamana bağlı ilerlemesi



Çizelge 3'te görüldüğü gibi 5 mg ve 10 mg çekirdek ile sentezlenen partiküller arasında kütle farkı sebebiyle partiküllerin çökme hızı farklı olmuştur. Şekil 59'da detaylı olarak NP fazlarının optik ölçüm sonucu verilmiştir. Görüldüğü gibi 5 mg

çekirdekle sentezlenen NP kullanılan gradientte hareketli bölge santrifüj için daha uygundur. 10 mg çekirdek hızla % 80 a/h sükröz sınırına inmiştir. Hızlı hareket eden bant bakteri-NP bandı ile arasında faz farkı yaratmak için daha elverişli olacağı öngörülmüştür. Ancak 45 dk santrifüjden sonra NP fazının sükröz bariyerini geçememiş ve NPLerin çökmeye başlamış olması bu gradient parametrelerinin 10 mg çekirdek için uygun olmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

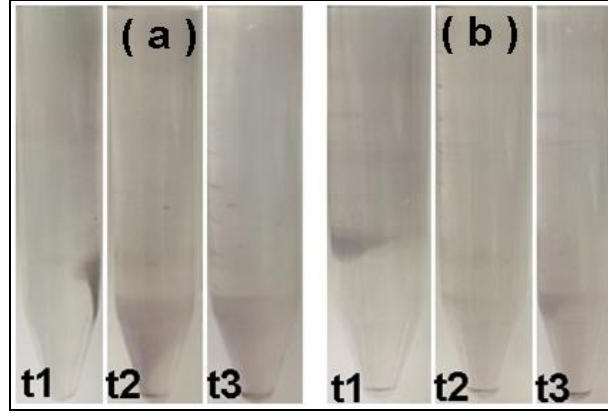


Şekil 59. 5 mg ve 10 mg çekirdek ile sentezlenen manyetik NPLerin sükröz gradientte a) 10 dk b) 15 dk c) 45 dk santrifüjle zamana bağlı faz ilerlemesi

Bakteri çalışma sonuçları da göstermiştir ki; gradientte bakteri ile etkileşince 5 mg çekirdekle sentezlenen partiküller takip edilebilir bakteri-NP fazı oluşturmada daha başarılı olmuştur. Bu nedenle çalışmanın devamında 5 mg çekirdekle hazırlanan manyetit NPLeri kullanılmıştır.

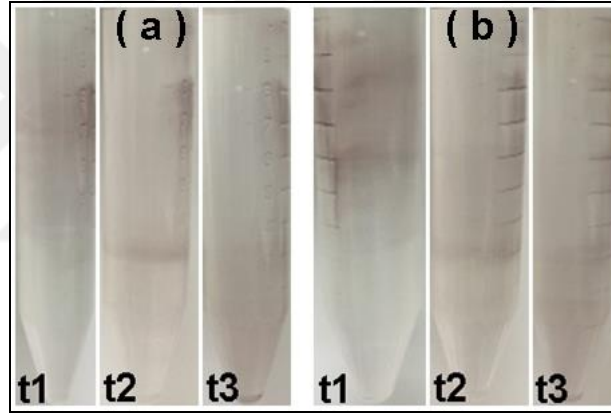
4.3.1.2. Farklı Çözelti Ortamlarındaki Manyetik NPLerle Elde Edilen Sonuçlar

Şekil 60-62'de görüldüğü gibi % 0.8 a/h NaCl, 10 mM pH 7.4 PBS ve 20 mM pH 7.4 PBS ile hazırlanan NP solüsyonlarının gradientte bant ilerlemeleri karşılaştırılmıştır. % 0.8 NaCl oranı manyetik NP bulutsu bant yapısı için uygun bulunmuştur. Fakat NPLer gradient içerisine yayılarak ilerlemiş, keskin bant oluşmamıştır (Şekil 60).



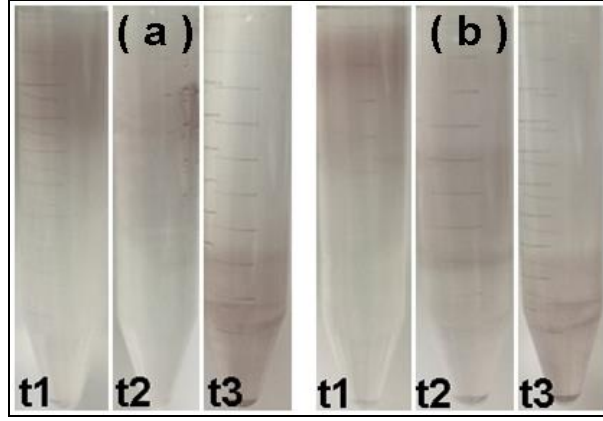
Şekil 60. % 0.8 a/h NaCl ortamındaki manyetik NPLerin A ve B grubu gradientte $t_1=2$ dk, $t_2=10$ dk, $t_3=45$ dk santrifüjle zamana bağlı incelenmesi

Şekil 61'de görüldüğü gibi kullanılan A ve B grubu gradientten bağımsız olarak, 20 mM PBS tamponunda tuz oranı fazla olduğu için partiküllerin kümeleşme oranı artmış, partiküller bant yapısı oluşturmadan çepere yapışmıştır.



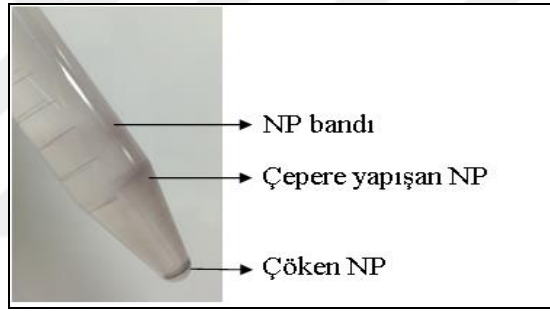
Şekil 61. 20 mM pH 7.4 PBS ortamındaki manyetik NPLerin A ve B grubu gradientte $t_1=2$ dk, $t_2=10$ dk, $t_3=45$ dk santrifüjle zamana bağlı incelenmesi

Partiküllerin 2 dk santrifüjden sonra dibe çökmesi ya da tüpün çeperine yapışması istemediğimiz bir durumdur. Şekilde görüldüğü gibi 10 mM PBS içerisindeki partiküllerin her iki gradient parametresinde de diğer çözelti ortamı sonuçlarına göre daha iyi bant yapısı sergilediği görülmüştür (Şekil 62). Partiküllerin 10 mM PBS pH 7.4 ortamında kümeleşme oranının bant yapısını korumak için uygun olduğu görülmüştür. Bu nedenle 10 mM PBS ortamının bakteri-NP faz farkının takibi için de uygun olacağı sonucuna varılmıştır. Hazırlanan sükröz gradient ortamının da sükrözün PBS içerisinde çözündürülmesi ile hazırlanmasına karar verilmiştir.



Şekil 62. 10 mM pH 7.4 PBS ortamındaki manyetik NPlerin A ve B grubu gradientte $t_1=2$ dk, $t_2=10$ dk, $t_3=45$ dk santrifüjle zamana bağlı incelenmesi

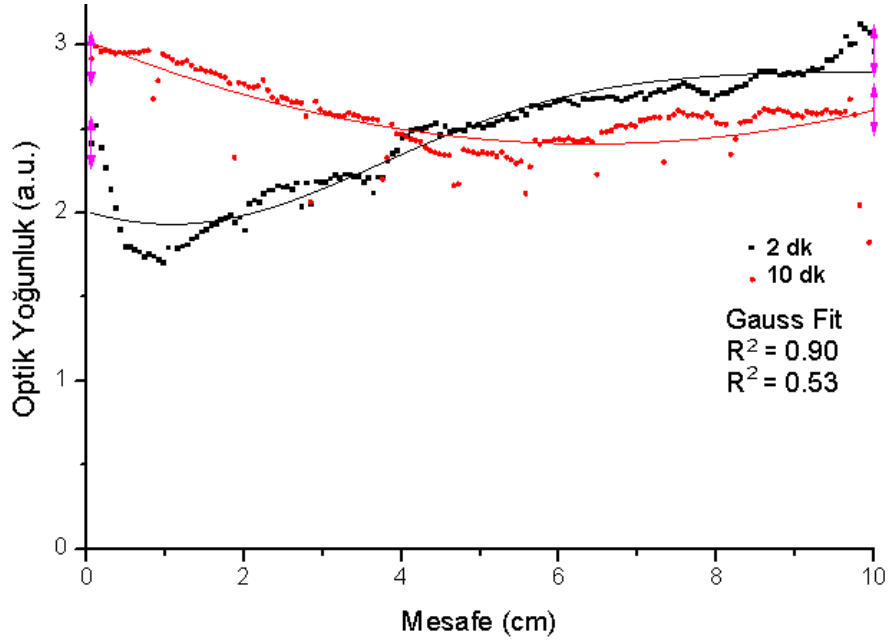
Şekil 63'te görüldüğü gibi tüp 45° eğildiği zaman ayrı bir bant gibi görünen yapının çepere yapışan agregatlar olduğu anlaşılmıştır. Bant takibi için tüplerin dikkatli incelenmesi gerektiği görülmüştür.



Şekil 63. 10 mM pH 7.4 PBS içindeki $Fe_3O_4@Au$ NPlerin B grubu gradientte 1000 g ile 45 dk santrifüjden sonra bant yapısının gösterimi

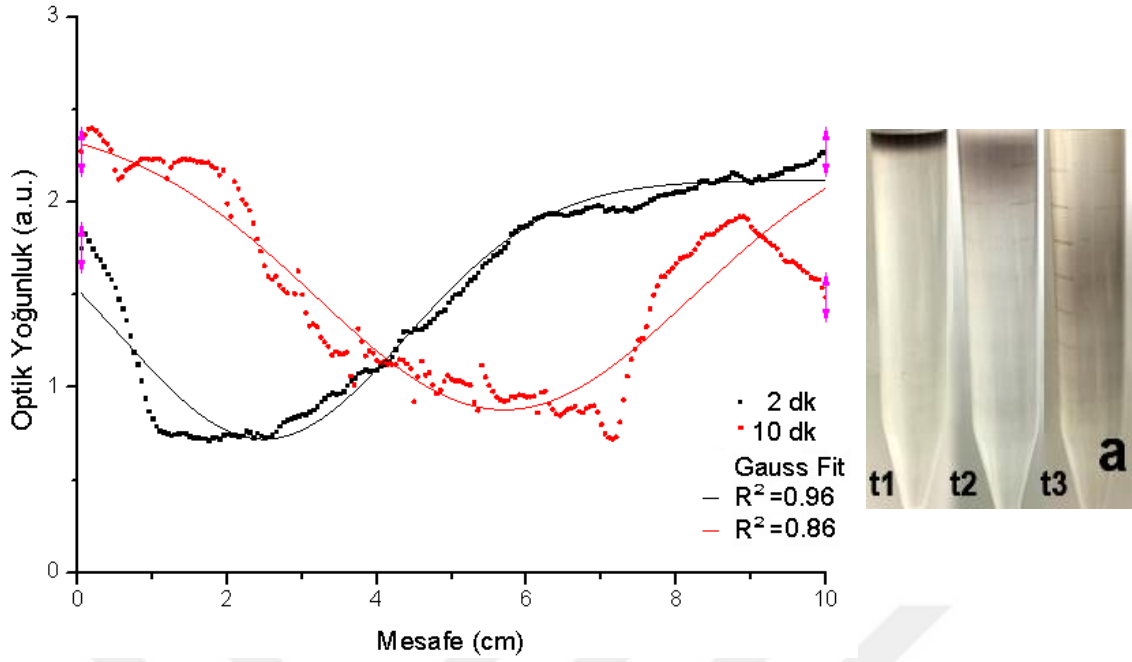
4.3.1.3. Tek ve Çift Fazlı Gradientlerle Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması

Bu bölümde sükröz gradientte alternatif olabileceği düşünülen tek ve çift fazlı PEG gradientleri ile elde edilen sonuçların tek fazlı sükröz gradient sonuçlarıyla karşılaştırması sunulmuştur. Şekil 64'te görüldüğü gibi $Fe_3O_4@Au$ fazının 2 dk santrifüjden sonra gradientte Gauss dağılımıyla ilerlediği, keskin bant oluşturmadığı görülmüştür. 10 dk santrifüjden sonra partiküllerin büyük miktarının % 20 a/h PEG içerisinde çöktüğü görülmüştür. % 16 a/h PEG bölümünde silik bir NP bandı oluşmuştur. PEG içerisinde yapılan çalışmalar sonucunda 4 farklı konsantrasyondaki PEG katmanlarının birbiri içerisinde karıştığı, sükröz gibi kararlı basamak gradient oluşturmadığı gözlenmiştir.

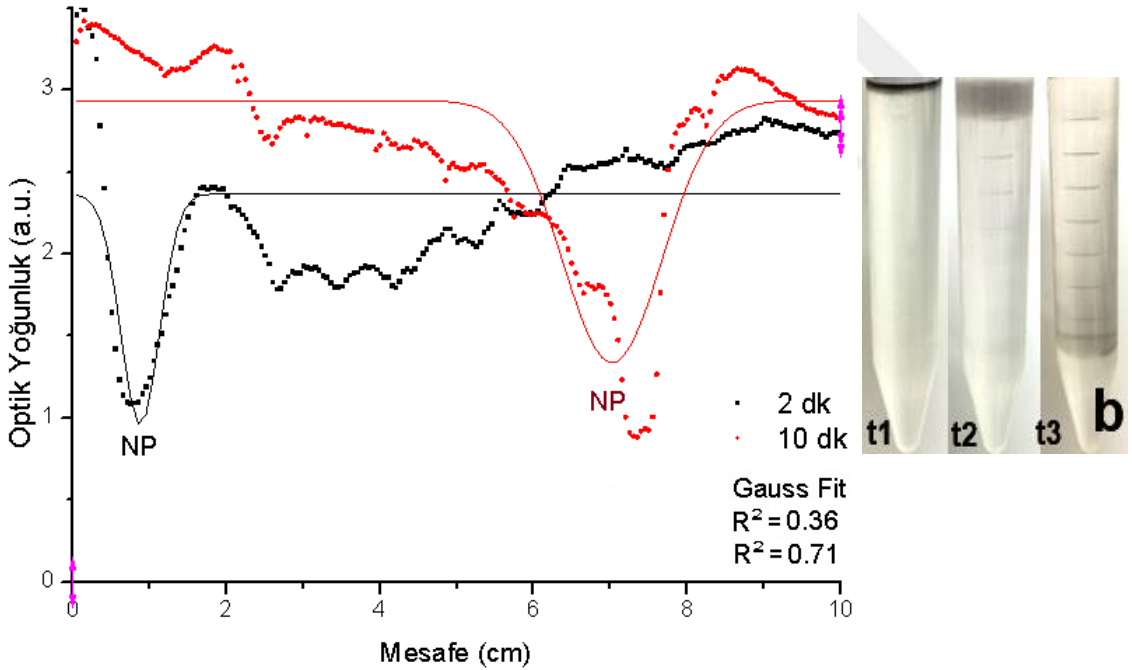


Şekil 64. Fe₃O₄@Au NP fazının % 10-% 12-% 16- % 20 a/h PEG ile hazırlanan gradientte RCF=1000 g ile 2-10 dk santrifüjden sonra zamana bağlı karşılaştırılması

Şekil 65-66'da tek faz sükröz ve çift fazlı PEG-sükröz gradientlerin karşılaştırılması verilmiştir. Şekil 65'te tek fazlı sükröz gradientinde Gaussyen formda ilerleyen bant yapı görülmüştür. Şekil 66'da verilen çift fazlı gradientte 10 ise 2 dk santrifüjden sonra partiküllerin PEG bölgesinde toplanarak ilerlemediği ve Gauss dağılımına uygun faz elde edilmediği görülmüştür. Tek fazlı sükröz gradientte % 40 -% 50 mg/ml sükröz içerisinde partikül kümesi yoğunlaşırken iki fazlı gradientte % 80-% 90 mg/ml sükröz bölgesinde toplanma görülmüştür. PEG kaplanan NPIlerin artan ivmeli hareketi sonucu Gaussyen dağılım yerine daha keskin Lorentz dağılım piki elde edilmiştir.



Şekil 65. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ NP fazının sükröz gradientte 3000 g ile $t_1=10$ sn, $t_2=2$ dk, $t_3=10$ dk santrifüjle zamana bağlı incelenmesi



Şekil 66. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ NP fazının PEG-sükröz çift fazlı gradientte 3000 g ile $t_1=10$ sn, $t_2=2$ dk, $t_3=10$ dk santrifüjle zamana bağlı incelenmesi

Tek fazlı sükröz gradientte NP fazının Gauss dağılımına uygun şekilde ilerlediği görülmüştür. Lakin dağılım geniş bir aralıkta görülmüş, keskin bant yapısı oluşmamıştır. Çift fazlı gradientte ise partiküllerin sükröz ortamına girmeden önce PEG ortamında yavaşlayıp PEG kaplandığı; böylece sükröz ortamında daha

yüksek çökme hızıyla ilerlediği görülmüştür. 1000 g-10 dk santrifüjden sonra 1000 mg/ml sükröz sınırında NPIler bant halinde toplanmıştır. Dolayısıyla 2 ve 10 dk zaman aralığında çift fazlı gradient grafiğinde görülen faz farkı; tek fazlı gradientte elde edilen sonuçla karşılaştırıldığında artış göstermiştir. Aynı zamanda, PEG içerisinden geçen partiküllerde kek sıkıştırma nedeniyle bant yapılarının keskin olduğu görülmüştür. Ancak kullanılan partikül miktarı fazla olduğu için keskin bantın yanısıra gradient içerisine yayılan partiküller de olmuştur. Bu nedenle, Gauss fit yapıldığında R^2 değeri düşük çıkmıştır. Sonuç olarak; çift fazlı gradient partikül fazının hızlı ilerlemesini sağlasa da Gauss dağılımına uymadığı için ve çalışmanın devamında bakteri-NP faz farkını arttırmada etkisi öngörülemediği için; tek faz sükröz gradient kullanılmaya devam edilmesi uygun bulunmuştur.

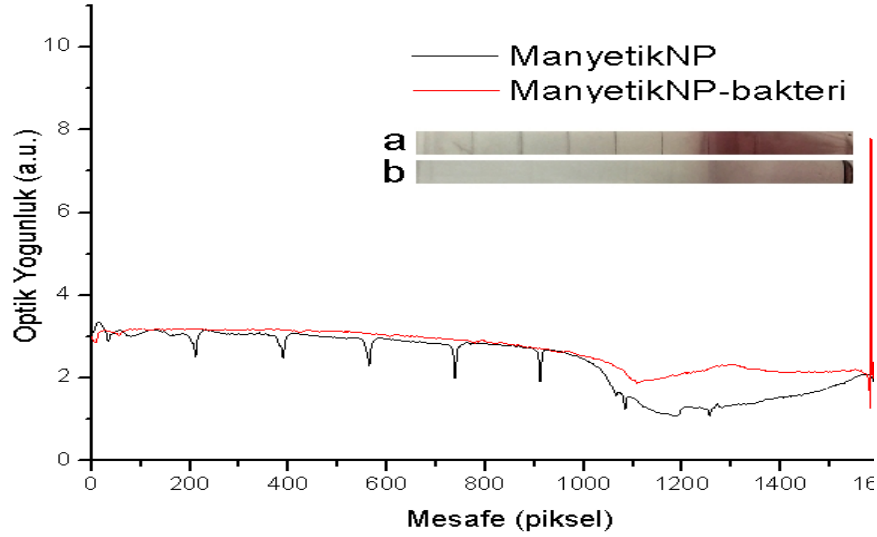
4.3.1.4. Gradient Hacminin Belirlenmesi için Elde Edilen Sonuçlar

Toplam gradient hacmi 10 ml olacak şekilde, farklı hacimlerde sükröz çözeltileri kullanılarak elde edilen gradientler karşılaştırılmış, böylece bakteri-NP bandı ile partikül bandı arasındaki mesafe ve ayırt ediciliğin artırılması istenmiştir. Fakat istenildiği gibi 10 ml hacimli gradientte NP bandı keskin yapıda ilerlememiştir. Çözelti hacimleri 2 ml'yi geçtiğinde o bölgede yayılma ve çepere yapışma çok olmuştur. Bu nedenle toplam hacim 5 ml'yi geçmeyen gradientler uygun bulunmuştur. Manyetik NPIler gradientte çok dağıldıkları için viskozite bariyeri oluşturacak şekilde % 30 a/h sükröz çözeltisinden 1 ml, % 60 a/h sükröz çözeltisinden 2 ml, % 80 a/h sükröz çözeltisinden 2 ml eklenerek hazırlanan gradient ile çalışılması uygun bulunmuştur.

4.4. Gradientte Bakteri-Partikül Fazlarının İncelenmesi

4.4.1. Manyetik NP ile Elde Edilen Bakteri-NP Fazları

Şekil 67'de bakteri, NP ve bakteri-NP fazları arasında ayırma gerçekleştirilen sonuç verilmiştir. Şekil 67.a'da ortamda bakteri yokken NPIlerin 800 mg/ml sükröz içerisinde dağıldığı görülmüştür. Şekil 67.b'de ise, bakteri ile etkileşen ve kümeleşen NPIler daha hızlı dibe çökmüştür. Siyah zemin üzerinde bakıldığında *E.coli*-NP bandının hemen üzerinde beyaz renkte bakteri bandı görülmüştür.

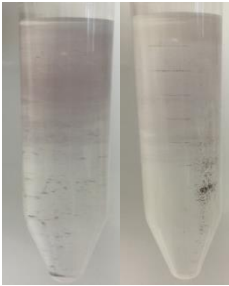



Şekil 67. Sükröz gradientindeki a) işlemsiz b) *E.coli* yakalayan $Fe_3O_4@Au$ NP fazlarının optik ölçümü

Fakat 4149 g ile elde edilen sonuçlar görmek istediğimiz üç fazın da birbirine yakın bölgede yer aldığı ve ayırtediciliğinin düşük olduğunu göstermiştir. Bakteriye tutunan NP ile tutunmadan kalan NPlerin ayrımı yapılamamıştır. Uygulanan RCF 3000 g ve altına düşürüldüğünde ise $Fe_3O_4@Au$ fazına ait çok sayıda bant gözlenmiştir. Bakteri-NP fazı takip için çoklu bant yapısının tekrar edilebilirliğinin güç olduğu ve nicel analize izin vermediği görülmüştür.

4.4.2.Farklı Tampon Çözeltilerin Bakteri-NP Fazlarına Etkisi

Çizelge 4. Farklı çözeltilerin bakteri-NP fazına etkisi

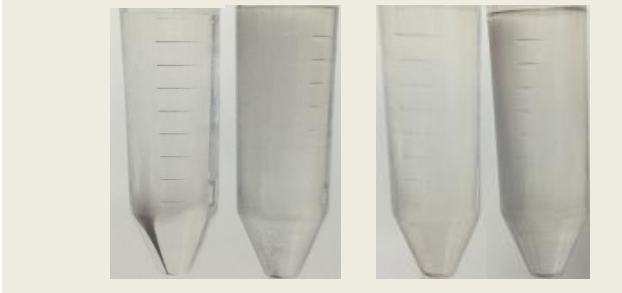
Tampon	pH 7.4 PBS	pH 6.5 MES
Çözelti		
Süre		
t=2 dk		
Faz	NP / Bakteri-NP	NP / Bakteri-NP

NP hacmi=400 µl, *E.coli* miktarı=10⁸ kob/ml, RCF=1000 g

Çizelge 4'e bakıldığında pH 6.5'te hazırlanan gradientte *E.coli* K-12 bağlanan $Fe_3O_4@Au$ partiküllerin tamamen çöktüğü görülmüştür. Bir bakteriye sadece bir

NP bağlanmayıp bir bakteri kümesi bağlanmaktadır. Dolayısıyla tüplere bakıldığında bakteriye bağlanan nanopartikül kümesinin ayrık NP'lere göre daha hızlı ilerlediği düşünülmüştür. Farklı ortamın etkisi ile partiküllerin kümeleşme oranları da farklı olmuştur. pH 6.5 50 mM MES içerisinde bakteri-NP kümeleşme oranı yüksek olmuştur, faz farkı artmıştır. Ancak aşırı kümeleşme nedeniyle bant yapısı oluşmadığı için pH 7.4 PBS ile çalışmaya devam edilmesi uygun bulunmuştur.

Çizelge 5. NP ve bakteri-NP fazlarının zamana bağlı karşılaştırılması

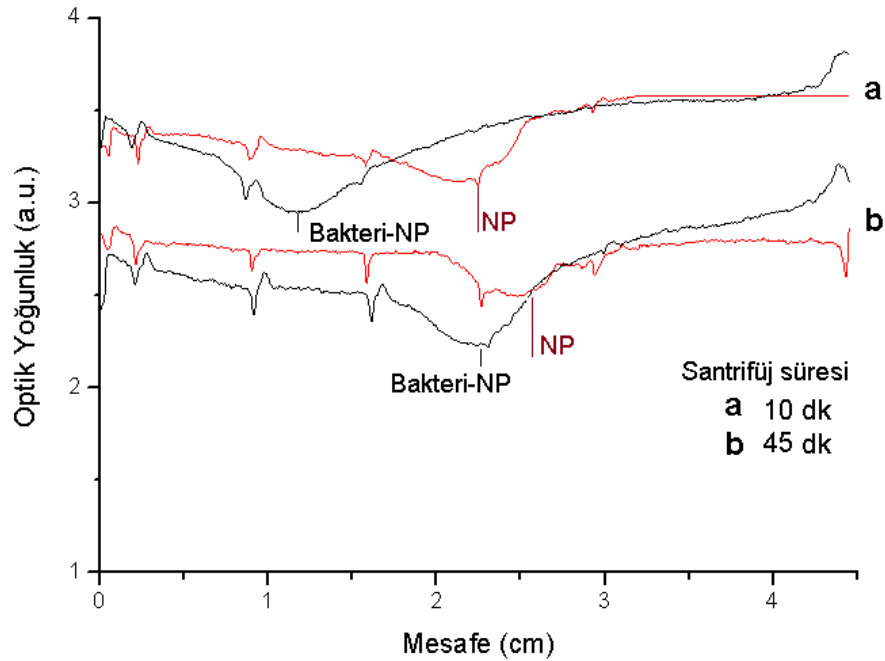
Süre	t=10 dk	t=45 dk
		
Faz	NP / Bakteri-NP	NP / Bakteri-NP
Partikül hacmi=400 µl	Bakteri miktarı=10 ⁸ kob/ml	
Gradient hacmi=10 ml	RCF=2000 g	

Çizelge 5'te görüldüğü gibi NP ve bakteri-NP fazları arasında belirgin farklılık görülmüştür. NP fazının çökerken bakteri-NP fazının gradientte asılı kalması, ölçülebilir faz farkı elde edilmesi için umut verici olmuştur. 45 dk santrifüjden sonra ise NP fazının tüpün dibinde toplandığı, bakteri-NP fazının ise daha yavaş ilerleyerek gradient boyunca çepere yapıştığı görülmüştür. Dolayısıyla; bakteri-NP fazının yoğunluk farkı nedeniyle gradientte ilerleyemediği, uygulanan kuvvetin etkisinde tüp çeperine doğru hareket ettiği şeklinde yorumlanmıştır. Elde edilen sonuçlar işlem parametrelerinin belirlenmesinde yardımcı olmuştur. Bant yapısının oluşmaması partikül hacminin fazla olması ile açıklanmıştır. Sükroz basamaklarının hacminin azaltılmasıyla seçilen gradient parametrelerinin yeniden düzenlenerek uygun bant ilerlemelerinin gözlenebileceği düşünülmüştür.

Çizelge 6. 1000 g ile zamana bağlı bakteri-Fe₃O₄@Au faz ilerlemesi


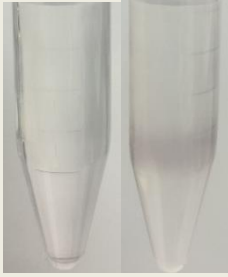

Süre	t=10 dk	t=45 dk
Faz	NP / Bakteri-NP	NP / Bakteri-NP
Partikül hacmi=200 µl		Bakteri miktarı=10 ⁸ kob/ml
Gradient hacmi=5 ml		RCF=1000 g

Çizelge 6'dan görüldüğü gibi örnek hacmi 400 µl'den 200 µl'ye düşürüldüğünde NP bandı oluşmuştur. 1000 g 10 dk santrifüj parametrelerinde partikül ve bakteri-NP bantlarının farklı hızlarda ilerlediği anlaşılmıştır. 1000 g-45 dk ile tüpte NP faz hızının azalması bakteri-NP bandının ayırt edilebilirliğini azaltmıştır. Optik ölçüm sonucundan da görüldüğü gibi 10 dk santrifüjden sonra gözlenen değişim daha ayırt edici olmuştur (Şekil 68). Bakteri olmayan tüpte partiküllerde çökme gözlenmişken, bakteri olan tüpte dibe çöken partikül gözlenmemiştir.



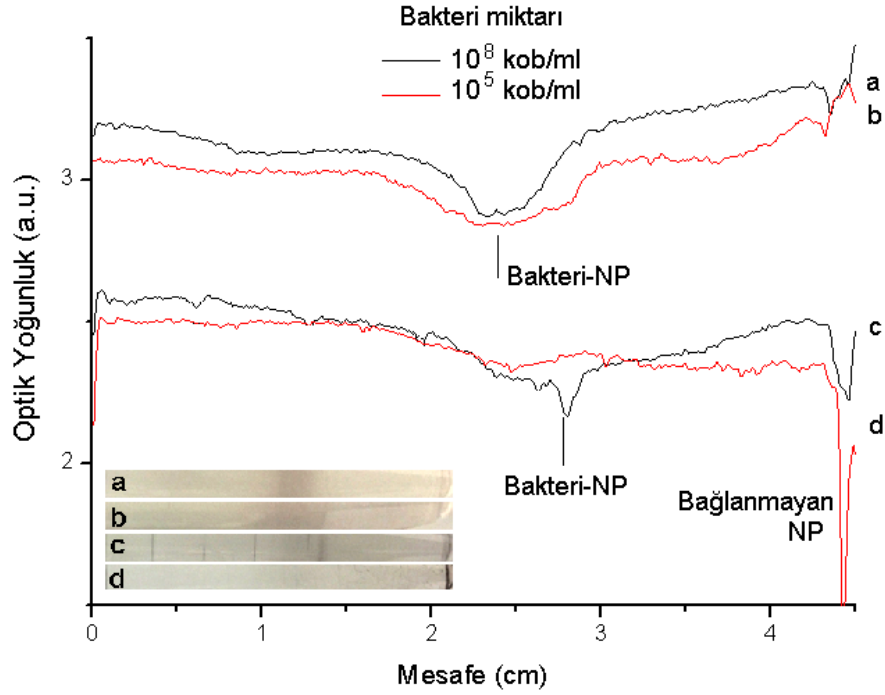
Şekil 68. Gradientte Fe₃O₄@Au ve *E.coli*- Fe₃O₄@Au fazlarının zamana bağlı optik ölçümü

Çizelge 7. 2000 g ile zamana bağlı bakteri-Fe₃O₄@Au faz ilerlemesi

Süre	t=10 dk	t=45 dk	t=45 dk
			
Faz	NP / Bakteri-NP	NP / Bakteri-NP	Bakteri-NP (siyah zemin)
Örnek hacmi=200 µl		Bakteri miktarı=10 ⁸ kob/ml	
Gradient hacmi=5 ml		RCF=2000 g	

Çizelge 7'de 2000 g ile NP ve bakteri-NP bantlarını ivmelendirildiğinde aralarındaki faz farkının arttırılacağı öngörülmüştür. Ancak 10 dk santrifüjden sonra bakteri-NP fazının geniş alana dağıldığı, 45 dk santrifüjden sonra ise NP bandının tamamen çöktüğü görülmüştür. Dolayısıyla Çizelge 8'de gösterilen sonuçlardan daha ayırt edici bir faz farkı elde edilememiştir. Bakteri olmayan tüpte partiküller tamamen çökerken bakteri-NP fazının bant formunda 800 mg/ml sükröz konsantrasyonunda ilerlediği görülmüştür. 5 mg demir çekirdek ile sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküller için 2000 g-45 dk ile faz ayrımının uygun olduğu bulunmuştur. 10 mg demir çekirdekle sentezlenen partiküller 800 mg/ml sükröz içerisinde dağılmış, tamamen dibe çökmemiştir.

Şekil 69'da *E.coli* K-12 koloni sayısı 10⁸ kob/ml'dan 10⁵ kob/ml'e doğru azaltıldığında elde edilen bant ilerlemelerinin optik ölçümü verilmiştir. Bakteri-NP fazı 10 dk ve 45 dk'lık santrifüj periyotlarında aynı bölgede oluşmuştur. Bakteri miktarı azaldığında ise daha silik bir bant oluştuğu için ölçülebilir bir değişim gözlenmemiştir. Bakteriye bağlanmayan NPlerin tamamen dibe çöktüğü kaydedilmiştir.

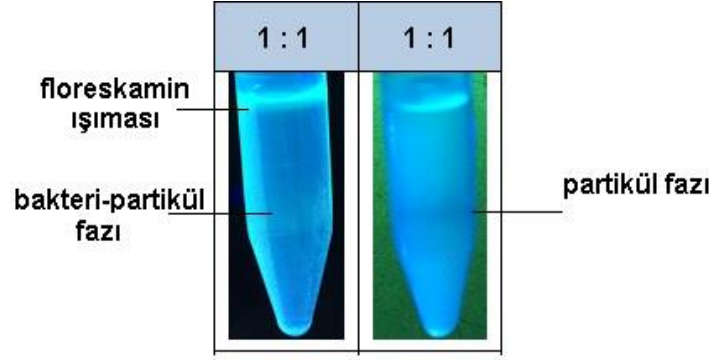


Şekil 69. 10^5 - 10^8 kob/ml *E.coli* K-12 miktarına bağlı a-b) 10 dk c-d) 45 dk santrifüjden sonra $Fe_3O_4@Au$ NP faz oluşumu

4.4.3. Floresans Etiketli Nanopartikül ile Elde Edilen Bakteri-NP Fazları

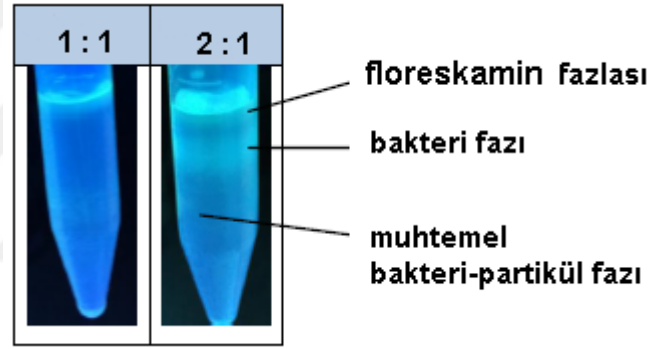
Bu bölümde $Fe_3O_4@Au$ NPLerine ait bakteri-NP fazlarını görsel olarak ayırmak için floresans boya ile yapılan çalışmalar sunulmuştur. Floreskamin konsantrasyonu 0.3 mg/ml'den 0.6 mg/ml'ye artırıldığında ışıma artmamış, tüp yüzeyinde floresans boyanın fazlası ayrı faz oluşturmuştur. Bu nedenle 0.3 mg/ml floreskamin konsantrasyonu yeterli bulunmuştur.

Floreskamin stok farklı hacimsel oranlarda partikül ile karıştırıldıktan sonra elde edilen fazlar Şekil 70 ve Şekil 71'de sunulmuştur. Ortamda floreskamin (dioxan) miktarı arttıkça bakteri bandı gözlenememiş, sadece partikül ve bakteri bandı gözlenmiştir. Diğer tüplerde ise üstte floreskamin bandı bulunurken bakteri-NP bandının gözle görünür ışması kaybolmuştur. Hacimce 1:1 oranında karışma olduğu zaman ışma yapan faz % 80 a/h bölgesine ilerlemiştir. Bu ışmanın çıplak gözle görülen NP bandı bölgesinde olması ilerleyen fazın bakteri-NP fazına ait olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Hacimce karışma oranı 2:1 ve 3:1 olarak artırıldığında bakteri fazı görüntülenebilmiştir.



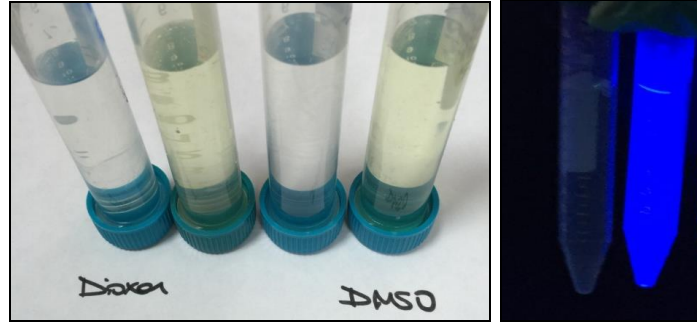
Şekil 70. Hacimce 1:1 oranında karışan floreskamin ile faz görüntüsü

Şekil 71'de tüp çeperinde hafif parlama olarak görüntülenen, muhtemel bakteri-NP fazı olarak işaretlenen konumda, beyaz ışıkta bakteri-NP bandı görüntülenmiştir. Hacimce 3:1 ve 2:1 oranında hazırlanan örneklerde benzer sonuçlar elde edilmiştir.



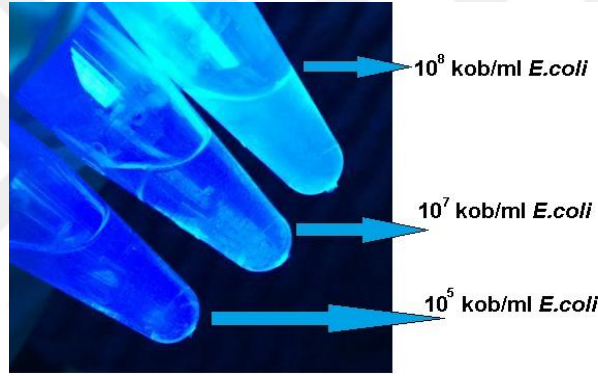
Şekil 71. Farklı oranlarda karışan floreskamin-bakteri ile oluşan faz görüntüsü

Şekil 72'de dioxan ve DMSO çözücüleri ile hazırlanan floreskamin stok ve PBS ile seyreltikten sonra rengi sarıya dönen stoklar verilmiştir. Dioxan ile hazırlanan stoğun UV ışık altında ışınması kaybolurken DMSO ile hazırlanan stokta UV ışınma kaybolmamıştır. Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında ortamdaki dioxanın florofor yapının molekül içi yük transferini etkilediği düşünülmüştür. Floroforun çevresel özelliklere (pH, elektronegatiflik) göre fotofiziksel özellikleri değişmektedir. Molekül içi yük transferi etkilenirse grubun elektron verici davranışı zayıflayıp, absorpsiyon spektrumu maviye kaymaktadır [65, 112]. Bu nedenle DMSO ile hazırlanıp PBS ile seyreltilen floreskamin çözeltisinin verdiği sonuçlar incelendiğinde ışınmasını kaybetmediği görülmüştür. Işımanın gradientte takibi için çözücü olarak DMSO uygun bulunmuştur.



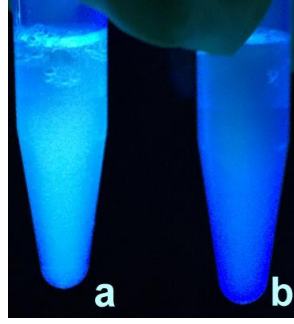
Şekil 72. Dioxan ve DMSO ile floreskamin stok çözeltilerinin beyaz ve UV ışıkta görünümü

Floreskamin çözeltisi bakteri dilüsyonları ile karıştırıldığında Şekil 73'te görüldüğü gibi 10^5 - 10^8 kob/ml aralığında bakteri miktarıyla orantılı olarak floresans ışımalarının azaldığı görülmüştür. Örnekler gradiente alındığında 10^8 kob/ml'den düşük bakteri konsantrasyonlarında siyah ışıkta takip edilebilir bant görüntülenememiştir.



Şekil 73. Siyah ışıkta *E.coli* miktarına bağlı bakteri-floreskamin ışımaları

Şekil 74'te görüldüğü gibi ortamda partikül yokken albumin bağlanan floreskamin yapısı 3.2 mg/ml albumin konsantrasyonunda belirgin ışımaya vermiştir. Fakat farklı konsantrasyonlarda hazırlanan partikül-albumin-floreskamin yapısı ışımaya vermemiştir. Floreskamin ışımaya kaybının kullanılan ortam ile alakalı olmadığı görülmüştür. Albumin bağlı partikül ile floreskamin arasında uygun florofor yapısı oluşmadığı ya da molekül içi yük transferinin $Fe_3O_4@Au$ Npllerinin varlığından etkilendiği için ışımaya vermediği şeklinde yorumlanmıştır.



Şekil 74. 0.3 mg/ml floreskamin (DMSO) stok ile karıştırılan a) 3.2 mg/ml b) 0.8 mg/ml albumin (PBS) çözeltilerinin siyah ışıpta ışması

Gradientte çıplak nanopartiküller 2000 g, 45 dk ile tamamen dibe çökmektedir. Lakin albumin ve floreskamin bağlandıktan sonra partiküllerin tamamen dibe çökmediği görülmüştür. Bu nedenle bakteri-NP ve NP bandını ayırt edebilmek için 2000 g, 10 dk-45 dk işlem parametrelerine ek olarak 90 dk süre ile santrifüj yapılmıştır. Beyaz ışık altında çıplak gözle tüpe bakıldığında 90 dk santrifüjden sonra sadece partiküllere ait olan faz tamamen çökerken bakteri-NP fazı olan tüplerde bant oluşmuştur. Ancak UV ışık altında bu bantlarda ışma görülmemiştir .

Şekil 75'te NP ve bakteri-NP fazlarının detaylı gösterimi için kontrast ayarı düzenlemesiyle faz fotoğrafları verilmiştir. Ortamda bakteri yokken partiküller dibe çökmüş ve 800 mg/ml sınırında bant yapı oluşturmuştur (Şekil 75.a). Bakteri yakalayan partiküllerin olduğu tüpte beyaz ışıpta dört faz görüntülenmiştir (Şekil 75.b). Fakat UV ışık altında ışma görüntülenememiştir. Albumin ve floreskamin arasında oluşan ve ışma yapan florofor yapının, ortamda partikül varken floresans şiddetinin azaldığı (fluorescence quenching effect) ya da yapının bozularak floresans ışma vermediği düşünülmüştür. Literatürde de primer amin yerine sekonder amin ile bağlanan floreskaminin ışma vermediği yer almaktadır [65]. Bakteri konsantrasyonu azaldıkça bakteri-NP bandı takip edilememiştir.



Şekil 75. Floreskamin etiketli a) işlemsiz b) 10⁸ kob/ml *E.coli* K-12 yakalayan Fe₃O₄@Au NPlerin 2000 g ile 10 dk santrifüjden sonra faz görünümü

Beyaz ışıkta çıplak gözle bakıldığında 2000 g ile 45 dk santrifüjden sonra partiküllerin tamamen çöktüğü, bakteri-NP olan tüplerde ise bakteri-NP bandının bulunduğu gözlenmiştir. Lakin siyah ışık altında bakteri-NP bandının ışması görülmemiştir. Yüzeyde bakteriye bağlanmayan floreskamin ışma yapmıştır. Işıma ile görüntülenen bakteri bandı da albumin-floreskamin çiftinin etkisiyle gradientte 1 cm ilerleyerek % 30-60 a/h sükröz sınırın bölgesine inmiştir.

4.4.3. Kuantum Noktalar ile Elde Edilen Bakteri-NP Fazları

Bu bölümde pH 4 ve pH 4.7 değerinde kitosan kaplanan Qdotların, EDC/NHS aktivasyonu sonrası *E.coli* K-12 ile hedefe özgü olmayan etkileşimlerinin gradient sonuçları incelenmiştir. pH 4.7'de hazırlanan CdTe/MPA@kitosan siyah ışık altında izlendiğinde, EDC/NHS sonrası renginin turuncudan kırmızıya değiştiği gözlenmiştir. Aynı zamanda partikülün *E.coli* K-12 ile etkileştiği sükröz gradient santrifüj çalışması sonrası tespit edilmiştir. pH 4'teki Qdot ise UV altında daha az renk değişimi göstermiş ve sükröz gradientinde *E.coli* K-12 ile daha az etkileşmiştir.

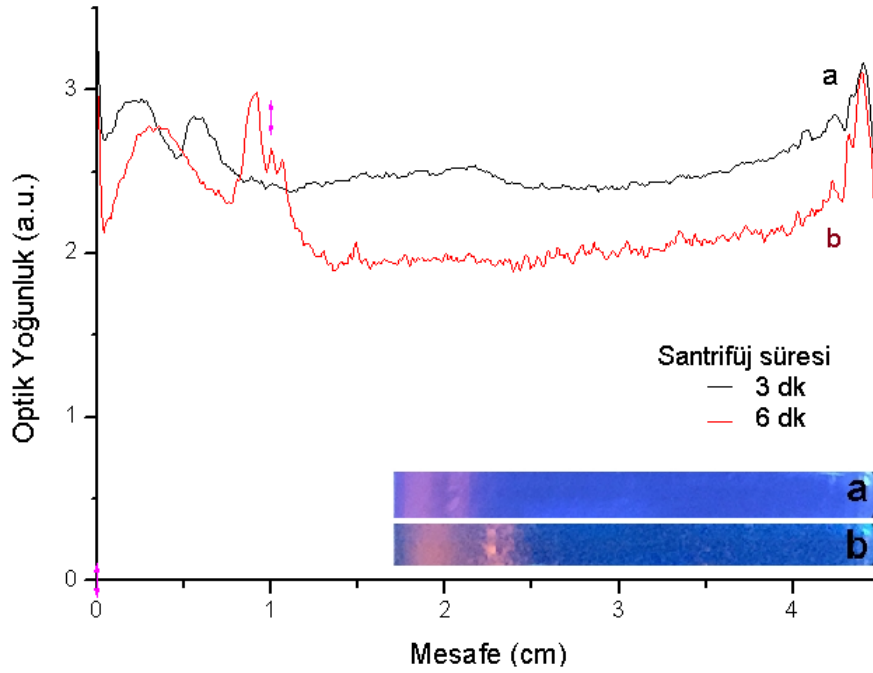
pH 4 ve pH 4.7 sonuçları karşılaştırıldığında; 10^8 kob/ml *E.coli* K-12 varlığında Qdot ve bakteri-Qdot fazları arasında t=2 dk ve t=8 dk santrifüjden sonra belirgin faz farkı gözlenmiştir. Bakteri koloni sayısı 10^7 ve 10^6 'ya indirildiğinde Qdotların büyük çoğunluğunun çöktüğü gözlenmiştir. 10^6 - 10^7 - 10^8 kob/ml *E.coli* olan tüper arasında bakteri miktarına bağlı olarak bantların hızlarında küçük de olsa artış gözlenmiştir. t=12 dk sonra çöken partiküller kıyaslanarak bakteri miktarındaki fark daha belirgin görülmüştür. 45 dk santrifüjden sonra partiküllerin çoğu tüplerin dibine çökmüşken 10^8 kob *E.coli* K-12 varlığında dipte NP birikimi daha az olmuştur. Belirli bir santrifüj parametresinde, dipte toplanan partikül ışma şiddeti ile bakteri sayısının ters orantılı olarak ölçülebileceği düşünülmüştür.

Kitosan kaplama sırasında pH değerindeki küçük farklılıkların, devamındaki tüm işlemlerde farklı sonuçlara sebep olduğu görülmüştür. En kararlı bant yapısı pH 5'te elde edildiği için, kitosan kaplama sırasında pH 5 asetat tamponu kullanılarak pH ayarlanması uygun görülmüştür

Bakteri dilüsyonları olan tüpler arasındaki fark gradient üzerinde % 40 a/h ile % 60 a/h konsantrasyon bölgesinde görülmüştür. *E.coli* K-12 derişimi 10^4 kob/ml mertebesinin altına düşürüldüğünde tüpler arasında gözlenebilir değişimin görülebilmesi için % 40-50-60-70-80 a/h sükröz ve % 50-60-65-70-80 a/h sükröz

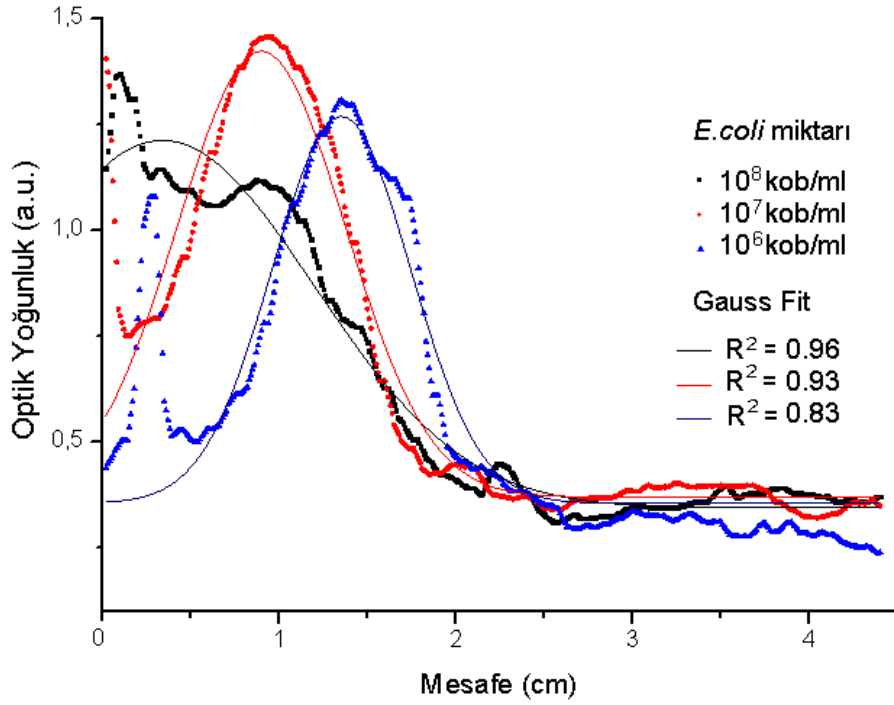
gradientleri çalışılmıştır. Sonuçların istenildiği gibi olmadığı, kuantum noktalar ile tekrarlanabilir sonuçlar elde etmenin güçlüğü görülmüştür.

Şekil 76'da görüldüğü gibi kullanılan sükröz derişimi % 50-60-65-70-80 a/h'ye çıkarıldığı zaman bakteri-NP fazına ait iki belirgin bant oluşmuştur. Fakat santrifüj süresi 6 dk'ya çıkarıldığında bantlarda bozulma meydana gelmiş ve tekrar edilebilir sonuç elde edilememiştir. Ayrıca bu bantların ilerlemesi veya hacimsel değişimi bakteri miktarı ile orantılı değişim göstermemiştir. Bunların yanısıra, bazı tüplerde dibe çöken NP olması ölçüm almayı engellemiştir.



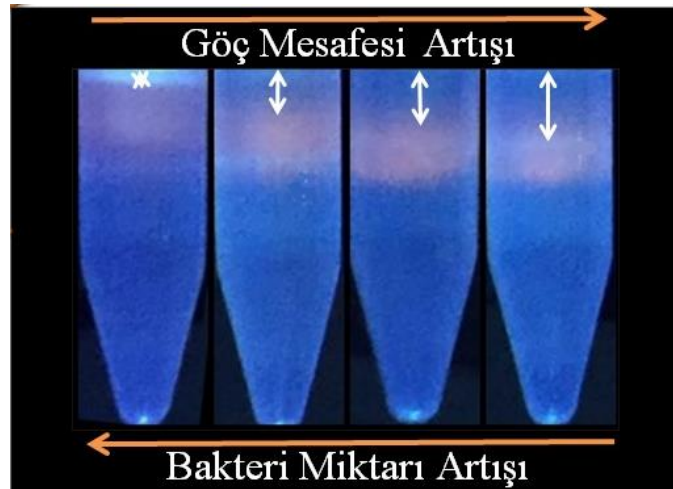
Şekil 76. 10^6 kob/ml *E.coli* K-12 yakalayan *E.coli* - Qdot fazının süreye bağlı ilerlemesi ve optik ölçüm sonucu

Şekil 77'de 10^6 - 10^8 kob/ml derişim aralığında *E.coli* K-12 yakalayan bakteri-NP fazlarındaki 500 g ile 1 dk gradient santrifüjden sonra elde edilen değişimin MatLab ile nicel sonuçları sunulmuştur. Bakteri miktarı arttıkça bakteri-Qdot fazının ilerleme hızı ve dolayısıyla göç mesafesi azalmıştır.



Şekil 77. 10^6 - 10^8 kob/ml *E.coli* yakalayan *E.coli*-Qdot fazlarının optik karşılaştırması

Şekil 78'de görüldüğü gibi *E.coli* K-12 yakalayan CdTe/MPA@ch Qdotları bakteri miktarına bağlı ölçülebilir faz farkı oluşturmuştur. Gradientte kırmızı Qdot bandının görüldüğü yerde MatLab ile absorbans piki elde edilmiştir.

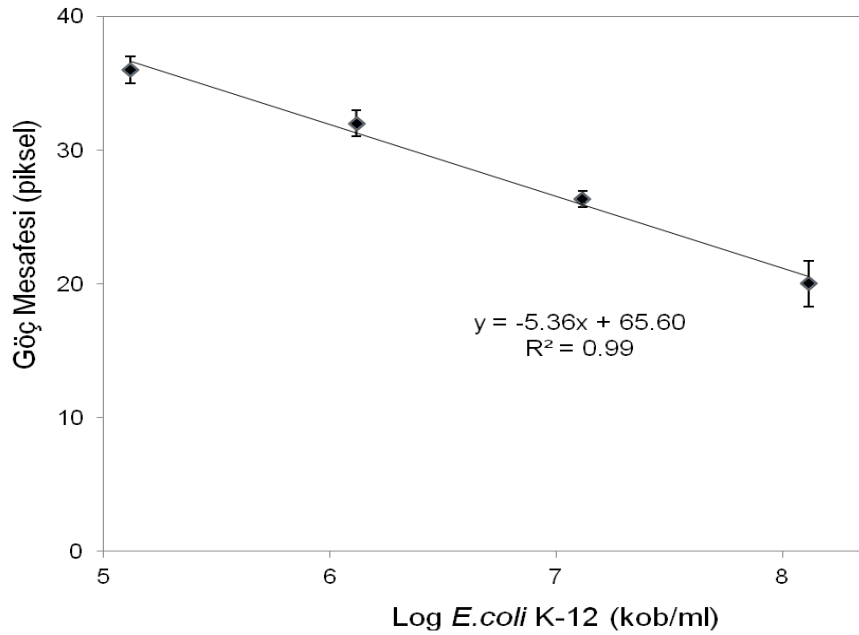


Şekil 78. % 40-% 50-% 60-% 70-% 80 a/h sükröz ile hazırlanan gradientte sırasıyla 10^8 - 10^7 - 10^6 - 10^5 kob/ml *E.coli* K-12 yakalayan *E.coli*-Qdot fazlarının 500 g ile 3 dk santrifüjden sonra UV ışık altında elde edilen bant ilerlemesi

Pikin tepe noktasının değeri Gaussyen bakteri-Qdot bandın orta noktasına karşılık gelmiştir. Bakteri-NP fazının göç mesafesi sükrözün menüsküs noktasından

itibaren bakteri-NP bandının orta noktasına kadar ölçülerek de işlemin sağlanması yapılmıştır.

Absorbans piklerinin ilerlemesi MatLab yazılım ile hassas olarak ölçüldüğünde, bakteri derişimi azaldıkça bant ilerlemesinin arttığı görülmüştür. Şekil 79'da 10^5 - 10^8 kob/ml *E.coli* K-12 yakalayan Qdot fazları ile elde edilen kalibrasyon eğrisi verilmiştir. Bu eğriden tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri sırasıyla 1×10^5 ve 3.4×10^5 kob/ml olarak hesaplanmıştır. 40 dk bakteri ile inkübasyon ve 3 dk santrifüj süresi olmak üzere toplamda 50 dk'nın altında cevap veren, kolay uygulanabilir ve düşük maliyetli bakteri miktar tayini yöntemi geliştirilmiştir.



Şekil 79. *E.coli* K-12 yakalayan Qdot ile % 40-% 50-% 60-% 70-% 80 a/h sükröz gradientte elde edilen kalibrasyon grafiği

EDC/NHS aktivasyonundan sonra partiküllerin kümeleşme oranı azalmıştır. Bakteri yakalamayan Qdot, 10^5 kob/ml bakteri yakalayan Qdot fazından daha az ilerlemiştir. Bakteri olmayan tüpteki faz ilerlemesi 10^5 - 10^8 kob/ml *E.coli* aralığındaki cevap ile çakıştığı için kalibrasyon grafiğinde kullanılamamıştır. Bu nedenle, düşük bakteri miktarlarının kullanılacağı çalışmalarda ve hedefe özgü bakteri tayini için yapılacak çalışmalarda Qdot kullanımının dezavantajlı olacağı öngörülmüştür.

4.4.4. CNPler ile Elde Edilen Bakteri-CNP Fazları

Bu bölümde bakteri-CNP fazını bakteri miktarına bağlı olarak ölçebilecek, ayırt ediciliği fazla bir parametre belirlemek için yapılan çalışma sonuçları sunulmuştur.

4.4.4.1. Bakteri-CNP Fazının Süreye Bağlı İlerlemesi

Bakteri-Qdot fazlarındaki bant ilerlemelerinden farklı olarak bakteri-CNP fazlarının zamana bağlı olarak dağılıma ve bant hacminde genişleme davranışı görülmüştür. Bu fazlardaki bakteri miktarına bağlı değişim ise Qdotlar ile elde ettiğimiz sonuçlarla uyumluluk göstermiştir. Bakteri miktarı azaldıkça partiküllerin çökme katsayısı artmıştır, bakteri-CNP fazı daha fazla ilerlemiştir. t=4 dk sonra bakteri-CNP kümeleşmesi fazla olan tüplerde % 80 a/h sükröz sınırında belirgin bant yapısı görülmüştür. Ancak öngörüldüğü gibi bakteri olmayan tüpteki NP fazı % 80 a/h sükröz sınırına inmemiştir. Bu tüpte çepere yapışma daha fazla görülmüştür ve % 50-60 a/h sükröz bölgesinde gradientte asılı kalan partikül bulunmamaktadır. Bakteri miktarı arttıkça gradientte asılı kalan bakteri-NP miktarı artmıştır. t=10 dk sonra elde edilen sonuca göre; sadece partiküllere ait tüpte % 80 a/h sınırında partiküllerin yoğun olduğu, bakteri miktarı arttıkça partiküllerin gradient içerisinde dağılıp % 80 a/h sınırındaki NP miktarının azaldığı söylenmektedir. Süre 30 dk'ya çıkarıldığında ise NPlerin % 80 a/h sükröz içerisinde ilerlerken bakteri miktarı fazla olan tüpte ilerleme daha az olmuştur.

4.4.4.2. Fazlarının Tekrar Kullanılabilirlik Sonuçları

NP bandından çekilen CNPler tekrar gradiente alındığında gradient içerisine dağılmış, gözle takip edilebilir bant yapısı oluşturmamıştır. Partikül fazlarının tekrar kullanılabilmesi, fazların dağılmaması için madde miktarının UV absorbans değeri ile ayarlanması gerekeceği görülmüştür.

4.4.4.3. Faz Farkı için Uygun Parametrelerin Belirlenmesi

Gradiente yayılan CNP miktarının çok olmaması için gradiente eklenen partikül derişimi 1 mg/ml olarak uygun görülmüştür. Uygulanan santrifüj kuvveti 100 g-2000 g arasında değiştirilerek bant hacmindeki ve bant ilerlemelerindeki değişimler bu bölümde sunulmuştur. 500 g uygulanarak elde edilen bakteri miktarına bağlı bant ilerlemeleri ve genişlemeleri daha belirgin olmuştur. Uygulanan santrifüj kuvveti 500 g'den 1000 g'ye artırıldığında NPler bant halinde ilerlemek yerine daha hızlı olarak gradiente dağılmıştır. 1 dk santrifüjden sonra farklı derişimdeki bakteri-NP karışımları içeren tüpler arasındaki faz farkı azalmıştır. Tüpün yüzeyinden ölçülen göç mesafesinin sabit olduğu görülmüştür.

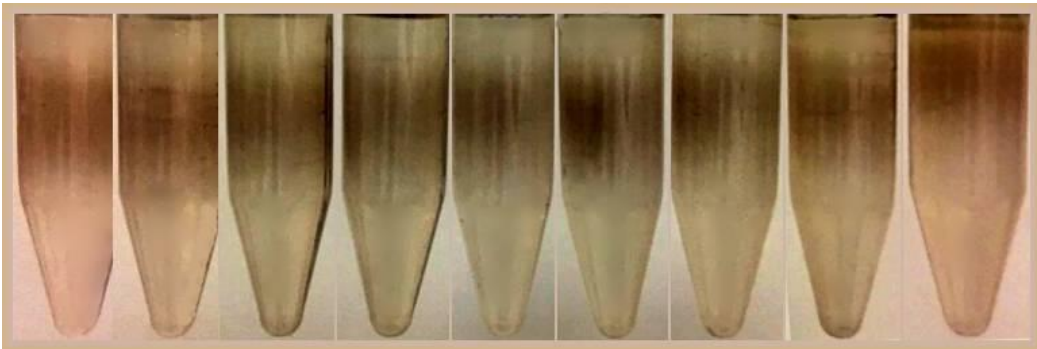
2000 g-1 dk, 500 g-4 dk ve 100 g-20 dk işlem parametrelerinde santrifüjden sonra elde edilen faz dağılımının benzerlik göstermesi uygulanan santrifüj kuvveti ile

santrifüj süresinin ters orantılı olduğunu göstermiştir. Uygulanan kuvvetin 4 katı uygulandığında santrifüj süresi 4'te 1'e düşmektedir. Fakat uygulanan RCF 100 g'ye düşürüldüğünde bakteri miktarıyla orantılı faz değişimleri zaman alıcı olmuş, 12 dk santrifüjden sonra ayırt edici değişim gözlenmiştir.

1000 g-1 dk ile 100 g-10 dk işlem parametrelerinde elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında ise; RCF yüksek olduğunda daha keskin bant geçişi görülmüştür. Literatürde uygulanan kuvvetin yerçekimi ivmesi ile karşılaştırılabilir derecede düşürüldüğünde, bant sınırının (boundary) kavisli bir hal alıp NP bant yapısının bozularak ilerleyeceği yer almaktadır [113]. 100-300-500-1000-2000 g ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında CNPler için uygulanan santrifüj kuvvetinin 500 g'nin altına inmemesi gerektiğine karar verilmiştir. Hem kısa sürede cevap verecek hem de bant yapısını bozmadan bakteri miktarına bağlı faz dağılımı sağlayacak parametre olarak RCF=500 g, t=4 dk uygun bulunmuştur. CNPlerle elde edilen sonuçların tekrar edilebilir olduğu 2 paralelde 4 tekrar deneyi sonucunda görülmüştür.

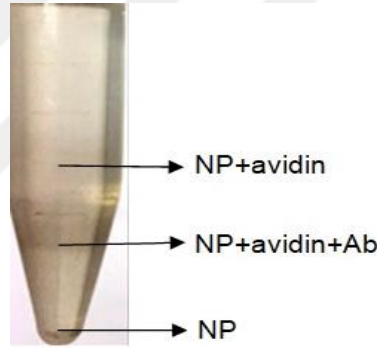
4.4.4.4. Her İşlem Basamağından Sonra Bakteri-NP Fazlarındaki Değişim

Herhangi bir işlem yapılmadan, hedefe özgü olmayan etkileşim ile elde edilen sonuçlara bakıldığında bakteri miktarı artırıldığı zaman CNPlerin kümeleşip daha yoğun ve dar bir alana sıkıştığı gözlenmiştir (Şekil 80). Bakteri olmayan tüpte gradient içerisindeki dağılımın daha fazla olduğu gözlenmiştir. Uygulama süresi 30 dk'ya çıkarıldığında ise partiküllerin dibe çöktüğü, faz farkının kaybolduğu görülmüştür. 10^1 - 10^4 kob/ml *E.coli* K-12 bulunan tüplerde bant hacimlerinde karşılaştırılabilir değişim gözlenmiş 10^4 kob/ml üzerinde elde edilen bantların ilerlemelerinde ve yapılarında bozulmalar olmuştur. Farklı derişimlerdeki süroz çözeltileri ile hazırlanan gradientlerde NP ve bakteri-NP bant ayrışması görülemediği için bant hacimlerindeki değişimin takibi ile çalışmaya devam edilmiştir.



Şekil 80. Hedefe özgü olmayan etkileşimle soldan sağa 10^1 - 10^8 kob/ml *E.coli* K-12 yakalayan CNPlerin gradientte 500 g ile 4 dk santrifüjden sonra elde edilen bant dağılımı

EDC/NHS aktivasyonundan sonra bakteri ile kovalent bağ yapan CNPlerin daha keskin (dar) bantta toplandığı görülmüştür. Avidin bağlandıktan sonra ise partiküllerin kümeleşme oranı artmış gradientte daha hızlı ilerlemişlerdir. Avidin bağlı NPlerin bakteri ile etkileşimden sonra tüplerdeki fazlar arasında belirgin bir ilerleme ya da bant hacminde değişim gözlenmese de optik yoğunluk farkı görülmüştür. Bakteri miktarı çok olan tüpte fazdaki partikül miktarının da daha fazla olduğu gözlenmiştir. Spesifik olmayan etkileşimleri engellemek için gradiente örnekler yerleştirilmeden önce PBST ile yıkanmıştır. Şekil 81'de görüldüğü gibi 12 dk santrifüjden sonra CNP fazı üç bantta toplanmıştır. Bu bantların ağırlık farkına göre NP-avidin, NP-avidin-Ab ve NP'ye ait olduğu düşünülmüştür. NP-avidin-Ab'ye ait olduğu düşünülen ikinci bandın bakteri miktarıyla orantılı ilerleme gösterdiği görülmüştür. Bakteri olan tüplerde dibe çöken NP olmamış, tek faz halinde bakteri ile orantılı ilerlemiştir.



Şekil 81. Bakteri etkileşimi olmaksızın antikor bağlı NPlerin sükröz gradientte 500 g ile 12 dk santrifüjden sonra fazlarına ayrılması

Açıkta kalan karbonil gruplarının kapatılması ve hedefe özgü olmayan bağlanmaların önlenmesi için BSA'nın gradiente etkisi incelenmiştir. BSA'nın yoğunluğu nedeniyle bantlar hızla 800 mg/ml sükröz bölgesine ilerlemiştir. Ancak santrifüj süresi 12 dk'ya arttırıldığında bile 800 mg/ml sükröz içerisinden geçmemiştir. Dolayısıyla o bölgede sıkışan bakteri-NP bantlarının bakteri miktarına bağlı gösterdiği faz farkı azalmıştır. Bu nedenle değişimin görüleceği sükröz gradient parametreleri yeniden düzenlenmesine karar verilmiştir.

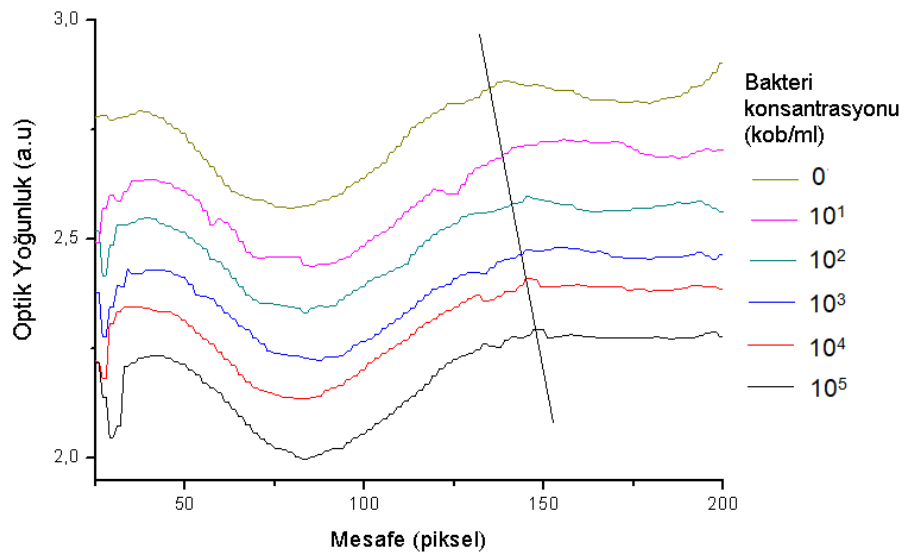
% 60-65-70-75-75 a/h sükröz ile yeniden düzenlenen gradientte % 60 a/h sükröz çözeltisinden geçen bantların 8 dk sonra bakteri miktarıyla orantılı değişimi gözlenmiştir. PBST ile yıkama sonrası ise; hedefe özgü olmayan bağlanmalar ortadan kaldırıldığı için değişimin daha belirgin olması beklenilmiştir. PBST ile

yıkandıktan ve 4 dk santrifüjden sonra faz farkları elde edilmiştir. PBST içerisinde geçen bantlar beklediğimiz gibi ayrışma ve dağılma göstermemiş, daha uzun süre bant formunu bozmadan ilerlemiştir. Yıkama işlemi yapmadan PBST-sükroz ile hazırlanan çift fazlı gradientte yapılan ek deneylerde elde edilen sonucun R² değeri yüksek çıkmıştır. PBST ile yıkanan örnekte ise NP kaybı çok olmuş, bantlar silikleşmiştir ama optik yolla tekrar edilebilir sonuçlar elde edilmiştir.

4.5. Bakteri-NP Fazının Optik Ölçümü

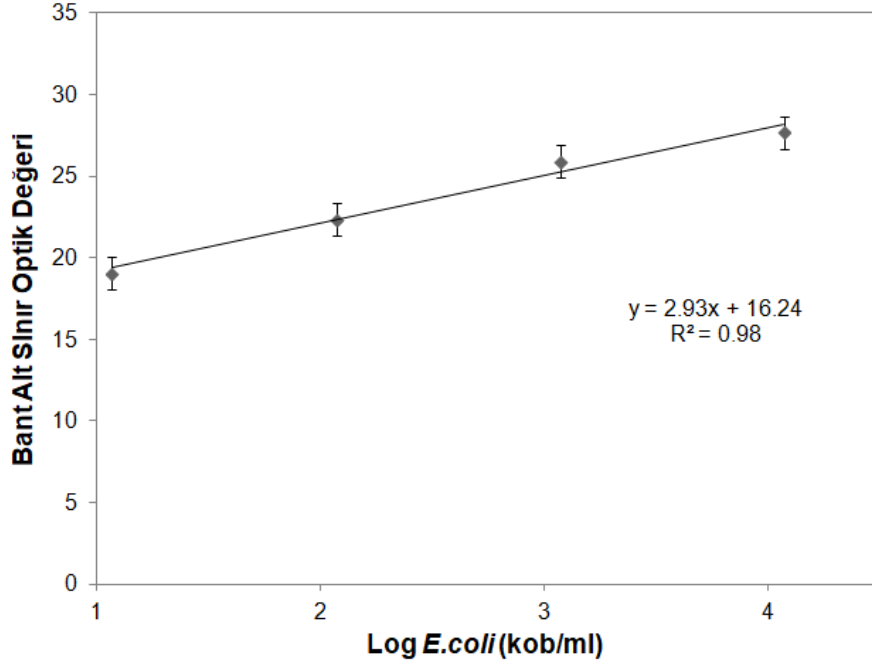
CNP kullanılarak hedefe özgü olmayan etkileşim ile elde edilen grafik Şekil 83'te verilmiştir. Gradientin % 65-70 a/h sükroz sınır (boundary) bölgesinden bantların geçişlerinde elde edilen eğrilerin eğimlerinin eşit ve 0.58 ± 0.07 ($R^2=0.99$) olduğu ölçülmüştür. Belirtilen bölgedeki eğrilerin eğiminin tüplerdeki gradient konsantrasyonu değişimine ve uygulanan santrifüj kuvvetine bağlı olduğu bilinmektedir [114]. Eğimler aynı olduğu için gradient konsantrasyon geçişlerinin her tüp için aynı olduğu doğrulanmıştır.

Gradientte CNP fazının konumu; optik yoğunluk-mesafe eğrilerinin çukur bölgesi ile belirtilmiştir (Şekil 82). CNP bandının göç mesafesini belirten bu konumda bakteri miktarına bağlı farklılık görülmemiştir. Ancak, eğrilerin platoya vardığı konumdaki değişimin bakteri miktarı ile orantılı olduğu görülmüştür. Eğrilerin platoya vardığı konumlar CNP bandının alt sınırını belirtmiştir. Bakteri-CNP fazlarının göç mesafeleri aynı olduğu için bant genişlemeleri; yani bant alt sınırındaki değişimlerin takip edilmesine karar verilmiştir.



Şekil 82. % 50-% 60-% 65-% 70-% 80 a/h sükroz ile hazırlanan gradientte (RCF=500 g, t=4 dk) 10¹-10⁵ kob/ml *E.coli* K-12 yakalayan CNP fazlarının optik sinyali

Bakteri-CNP bant alt sınırının yani eğrilerin platoya ulaştığı noktaların hesaplanması için optik yoğunluk eğrilerinin türevlerinin sıfıra eşit olduğu noktalar ölçülmüştür. Bu yolla çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 83'te verilmiştir. Bakteri miktarı ile elde edilen maksimum bant ilerlemelerinde doğru orantı görülmüştür.

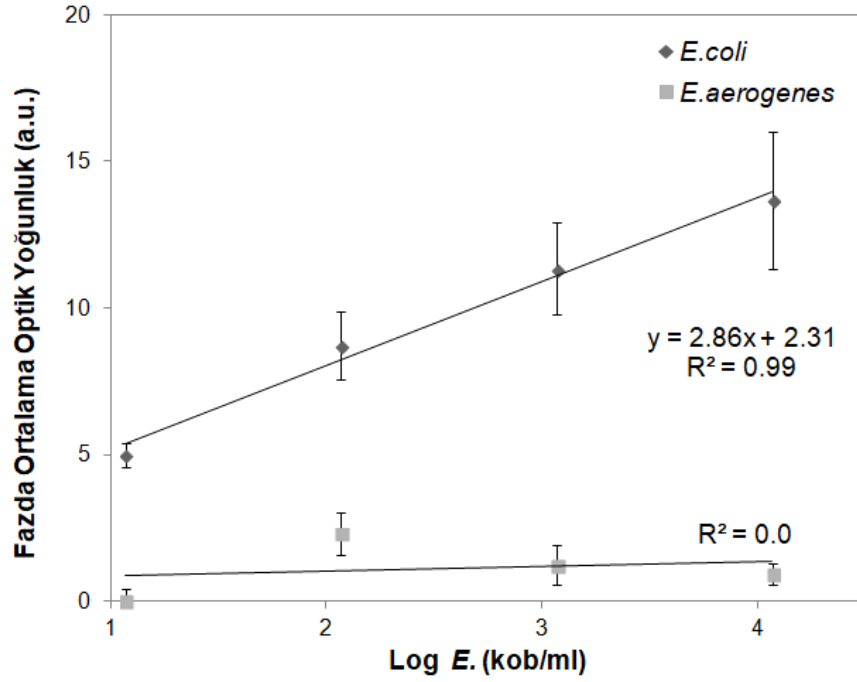


Şekil 83. % 50-% 60-% 65-% 70-% 80 a/h sükröz ile hazırlanan gradientte (RCF=500 g, t=4 dk) hedefe özgü olmayan etkileşimle *E.coli* yakalayan CNPlerin kalibrasyon eğrisi

Bakteri miktarı arttıkça tüpteki NP dağılımının değiştiği görülmüştür. Bakteriye bağlanmayan NPler kümeleşip tüpün çeperine yapışmış ya da dibe çökmüştür. Bakteri yakalayan partiküller ise gradientte bant formunda asılı kalmaya devam ettiği için ve bakteri miktarına bağlı olarak gradientte daha fazla partikül bulunduğu için, tüpler arasında belirgin faz farkı yaratmıştır. Bu nedenle yöntem bakteri sayımı için uygun bulunmuştur.

Şimdiye kadar kuantum noktalar ile bant ilerlemesi (göç mesafesi) ve CNPler ile özgül olmayan etkileşimde bant alt sınır optik değeri (eğrinin plato noktası) ölçümü ile bakteri sayımı gerçekleştirilmiştir. CNPler ile hedefe özgü etkileşimde ise farklı bir optik analize başvurulmuştur. Elde edilen optik yoğunluk-mesafe grafiklerinin altında kalan alan hesaplanarak tüplerde asılı partikül sayısı ile ilişkili yeni bir optik değer takip edilmiştir. Fazda ortalama optik yoğunluk ile tanımlanan bu yöntemin sonucu Şekil 84'te sunulmuştur.

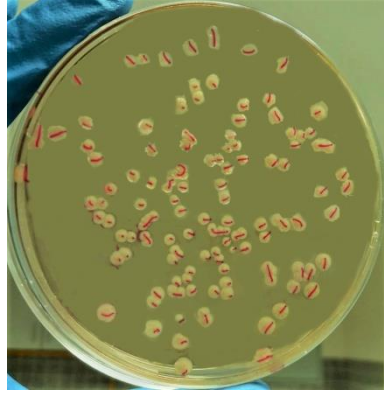
Antikor bağı CNPler (NP-avidin-BSA-Ab) ile elde edilen hedefe özgü ve hedefe özgü olmayan etkileşimlerin kalibrasyon eğrileri Şekil 84'te verilmiştir. Geliştirilen yöntemin seçiciliği için *E.coli* gibi *Enterobacteriaceae* sınıfından olan *Enterobacter aerogenes* ile yine 10^1 - 10^4 kob/ml aralığında çalışılmıştır. Anti-*E.coli* antikoruna bağı CNPler *Enterobacter aerogenes* ile bağlanmadığı için tüpler arasında faz farkı görülmemiştir.



Şekil 84. % 60-% 65-% 70-% 75 a/h sükröz ile hazırlanan gradientte (RCF=500 g, t=64 dk) Anti-*E.coli* bağı CNP fazında ortalama optik yoğunluk ölçümüyle elde edilen kalibrasyon eğrisi

4.6. Katı Besiyerinde Koloni Sayım Sonuçları

Bu bölümde bakteri stoklarından ve gradientin bakteri-NP bantlarından örnek alınarak katı besiyerine ekim sonucu elde edilen sayım sonuçları sunulmuştur. Hedefe özgü olmayan ve hedefe özgü etkileşimlerde elde edilen bağlanma verimlilikleri ayrı ayrı hesaplanmıştır. Üç paralelde ekilen *E.coli* 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra 10^{-7} kob/ml *E.coli* dilüsyonundan CASO Agar katı besiyerine 2'şer paralelde ekilmiştir. Sayım sonucu stokta 1.17×10^8 kob/ml *E.coli* olduğu bulunmuştur (Şekil 85).



Şekil 85. *E.coli* K-12 stoğundan katı besiyerinde bakteri sayımı

Çizelge 8. Gradientin farklı bölgelerinden alınan bakteri sayım sonuçları

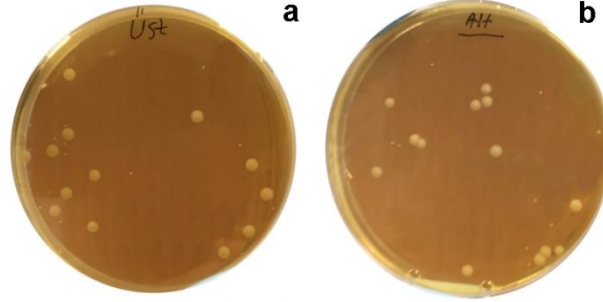
	CNP	CdTe Qdot
Yüzey	1.7×10^6 kob/ml	-
Üst Faz	2.3×10^5 kob/ml	10^6 kob/ml
Alt Faz	1.4×10^5 kob/ml	4.1×10^5 kob/ml
Dip	-	10^2 kob/ml

Tüpte bakteri miktarı= 1.5×10^6 kob/ml

Çizelge 8'de hedefe özgü olmayan etkileşim sonucu bakteri-NP fazlarından ekilen bakteri sayım sonuçları verilmiştir. 1.5×10^6 kob/ml *E.coli* bulunan santrifüj tüplerinde karbon nanoküre ve Qdotlara ait bakteri-NP fazlarının bakteri yakalama verimlilikleri ölçülmüştür.

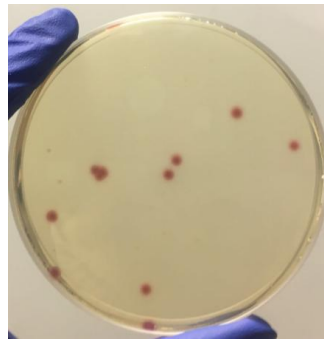
CNPlerin hedefe özgü olmayan etkileşim sonucu bakteri-CNP fazında % 24 bağlanma verimliliğinde bakterileri yakaladıkları görülmüştür. Üst ve alt fazlardan alınan sayım sonuçlarının birbirine yakın çıkmış olması fazda Gaussyen dağılım olduğunu göstermiştir. CNPlere bağlanmayan bakterilerin tüp yüzeyinde kalarak ayrı faz oluşturduğu görülmüştür. Kuantum noktalarla yapılan çalışmada ise bakteri-NP fazında hedefe özgü olmayan bağlanma verimliliği % 93 olarak hesaplanmıştır. Alt fazda daha az bakteri sayılmıştır. Ayrıca, kümeleşen Qdotların dibe çökmesi nedeniyle tüpün dip bölgesinde de 100 kob/ml bakteri sayılmıştır. Kümeleşen bakteri-NPlerin dibe çöküyor olması istenmeyen bir sonuçtur. Bakterilerin belirli bir fazda toplanmayıp gradientin geneline yayılması Qdotlarla tekrar edilebilir ölçüm almayı zorlaştırmıştır. Çalışmanın devamı için CNPlerin daha uygun olduğu düşünülmüştür.

Şekil 86'da CNPlerin *E.coli* ile hedefe özgü etkileşiminden sonra bakteri-NP fazından yapılan sayım sonucu verilmiştir. Bakteri-CNP bandının alt ve üst fazından çekilen örneklerde $K_{üst}=K_{alt}=1.3 \times 10^7$ kob/ml olmak üzere, *E.coli* K-12 miktarında farklılık görülmemiştir. Hedefe özgü etkileşimde *E.coli* bağlanma verimliliği % 89 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 86. % 50-% 60-% 65-% 70-% 80 a/h sükröz ile hazırlanan gradientin bakteri-NP fazından a) üst faz b) alt faz *E.coli* K-12 sayım sonucu

10^4 kob/ml *E. aerogenes* ile etkileşen NP bulunan fazdan alınan örnekle chromocult coliform agar katı besiyerinde yapılan sayım sonucu tüp yüzeyinde 270 kob/ml, partikül fazında 3.10^3 kob/ml *E. aerogenes* sayılmıştır (Şekil 87). Anti-*E.coli* bağlı CNPler *E. aerogenes* ile hedefe özgü bağlanmadığı için yıkama işlemlerinde bakterilerin ortamdaki uzaklaşması beklenilmiştir. Ancak yıkama işlemlerinde uygulanan 1000 g ile bakterilerin supernatantta asılı kalmadığı, hatta gradientte 500 g ile % 70 a/h sükröz bölgesine kadar ilerlediği görülmüştür. Bakteri-CNP fazının hedefe özgü olmayan bağlanma verimliliğinin % 25 olduğu görülmüştür.



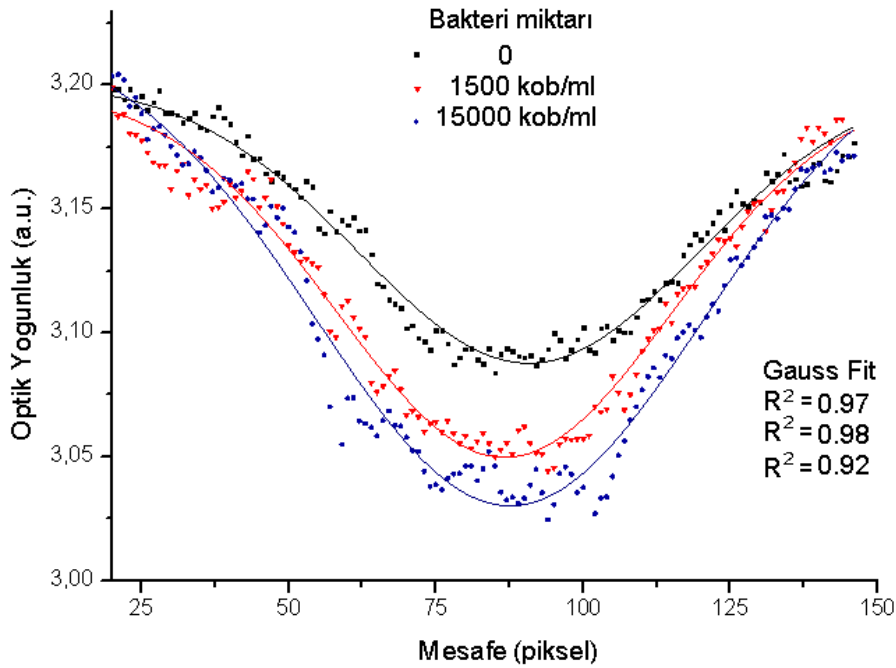
Şekil 87. % 60-% 65-% 70-% 75 a/h sükröz ile hazırlanan gradientin RCF=500 g, t=6 dk santrifüj sonrası bakteri-NP fazından *E. aerogenes* sayımı

Eşitlik 12 kullanılarak ön işlemler sonrası bakteri-CNP fazında *E.coli* bağlanma verimliliği % 68 olarak hesaplanmıştır. Bağlanma verimliliğinin % 89'un altında

olmasına yıkama işlemleri sırasında ortamdan bir miktar bakteri-NP çiftinin uzaklaştırılmasının neden olduğu düşünülmüştür.

4.7. Yağsız Sütte *E.coli* K-12 Teşhisi

Bu bölümde, 10 mM PBS içerisindeki *E.coli* sayımında tekrar edilebilir sonuçlar veren ve seçiciliği *E.aerogenes* ile ispat edilen CNPlerin gerçek örnek analizlerinde de kullanılabileceğini göstermek için yağsız süt analiz sonuçları sunulmuştur. Yıkama işlemleri sırasında CNPlere bağlanmayan bakterilerin süpernatant ile birlikte ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır. Bakteri yakalamayan partiküller de bakteri-CNP çifti ile birlikte dibe çökmüştür. Yıkama işlemlerinden sonra süt serumu kısmen ortamdan uzaklaştığı için karışım berraklaşmıştır. Bu haliyle gradient santrifüj işlemine süt serumunun etkisi olmadığı düşünülmüştür. Şekil 88'de *E.coli* miktarına bağlı olarak tüplerdeki optik yoğunluk ölçüm grafiği verilmiştir. Farklı bakteri konsantrasyonları için elde edilen eğrilerin altında kalan alan hesaplanarak fazda ortalama optik yoğunluk değerleri belirlenmiştir.

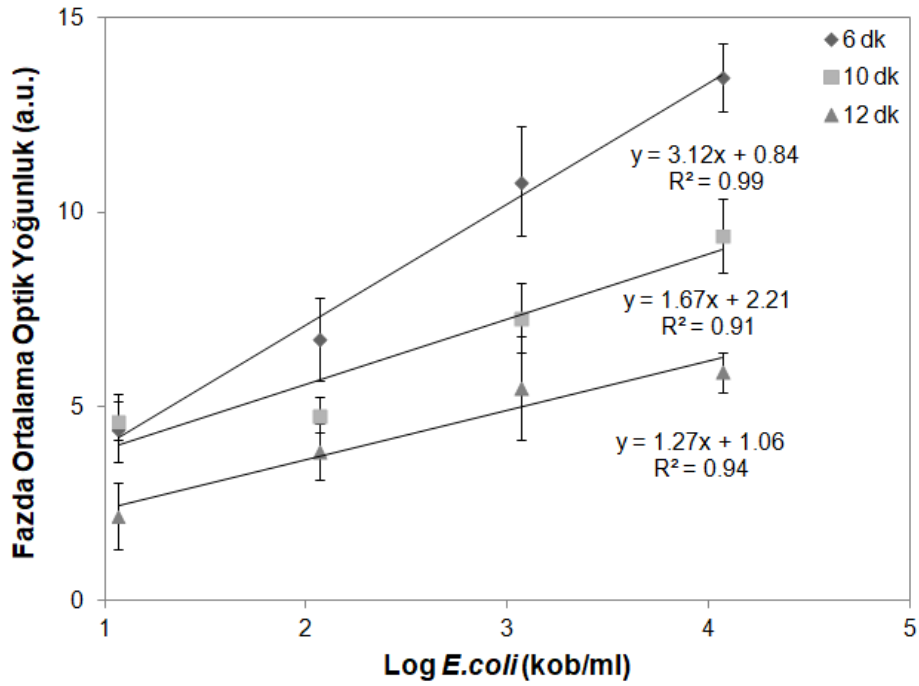


Şekil 88. Sütte bakteri sayımı için % 60-% 65-% 70-% 75 a/h sükröz ile hazırlanan gradientte bakteri miktarına bağlı olarak *E.coli*-CNP fazının optik yolla karşılaştırılması (RCF=500 g, t=6 dk)

Farklı santrifüj sürelerinde 500 g uygulanarak elde edilen sonuçlar aşağıdaki grafiklerde sunulmuştur (Şekil 89). İşlem süresi 6 dk'dan 12 dk'ya çıkarıldığında kalibrasyon grafiğinin eğiminin 3.12'den 1.27'ye düştüğü görülmüştür. Yani santrifüj süresi arttırıldığında bakteri-NP fazları dağılmıştır. Bakteri miktarına bağlı

olarak optik yoğunluk farkının azalması kalibrasyon hassasiyetinin azalmasına neden olmuştur. Hareketli alan santrifüjde santrifüj süresi arttırıldıkça bantların bozuluyor olması daha önce kuantum noktalar ile elde ettiğimiz sonuçlarla da uyum göstermiştir.

Bakteri miktarına bağlı faz değişiminin en iyi elde edildiği 500 g 6 dk işlem parametrelerinde çizilen kalibrasyon eğrisine göre yöntemin tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ) değerleri sırasıyla 8 ve 28 kob/ml *E.coli* olarak hesaplanmıştır (Şekil 89).



Şekil 89. Sütte *E.coli* tayini için % 60-% 65-% 70-% 75 a/h sükröz ile hazırlanan gradientte 6-10-12 dk santrifüj sürelerinde elde edilen kalibrasyon eğrileri (RCF=500 g)

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan gradient santrifüj çalışmaları sonucunda santrifüj süresi ve uygulanan rölatif santrifüj kuvvetinin birbiri ile ters orantılı olduğu görülmüştür.

$$t_{(2)} \approx t_{(1)} \times RCF_{(1)} / RCF_{(2)}$$

Dolayısıyla, kullanılan santrifüj sisteminde uygun işlem parametreleri optimize ettikten sonra farklı bir santrifüj cihazında çalışmak istenildiği takdirde partiküllere etki eden RCF'nin bilinmesiyle yeni sistemde kullanılması gereken parametrelerin öngörülebileceği düşünülmektedir.

Partikül ve bakteri-NP fazlarının Gauss dağılımını bozmadığı sürece bant formunda ilerleyeceği ve gradientte bant alt sınırı ya da göç mesafesinin bakteri miktarıyla orantılı olarak karşılaştırılabileceği görülmüştür.

Gradientte kullanılan komşu sükroz bölgeleri arasındaki yoğunluk farkı düşük olduğunda NP fazı gradientte yayılarak ilerlemiştir. Viskozite farkı arttırıldığında ise bakteri-NP ve NP bantları aynı bölgede toplanmış, bantlar arasındaki faz farkı azalmıştır.

Tez çalışması kapsamında manyetik NPler, Qdotlar ve CNPlerin kullanımı ile faz farkını arttırmak için elde edilen sonuçlar sunulmuştur. Partiküllerin boyut, şekil, hidrodinamik çap ve zeta potansiyelindeki farklılıklar; kullanılan gradient ve işlem parametrelerinde değişikliklere sebep olmuştur. Gradient üzerine eklenen numune hacmi ya da NP konsantrasyonu fazla olduğunda bantta kek sıkıştırma nedeniyle önce keskin bir bant yapısı görülmüş, daha sonra Gauss dağılımının bozularak düzensiz olarak fazın gradientte dağıldığı kaydedilmiştir. Uygun gradient hacmi 5 ml, NP hacmi 200 µl sabit olacak şekilde; santrifüj kuvvetleri 500-2000 g ve süre 1-10 dk aralığında değiştirildiğinde hareketli bölge gradient santrifüj yöntemiyle NP ve bakteri-NP fazları arasında optik yolla ayırt edilebilir faz farkı ölçülmüştür.

Bakteri miktarıyla orantılı optik faz farkı elde etmek için tez kapsamında geliştirilen bakteri-NP göç mesafesi, bant alt sınır optik değeri ve fazda ortalama optik yoğunluk ölçüm metotlarının uygulanırken faz değişiminin görüldüğü minimum santrifüj süresinin seçilmesi uygun bulunmuştur.

Gradientte bakteri ile çalışırken hücre duvarının zarar görmemesi için 4500 g üzerine çıkılması uygun bulunmamıştır. Qdotlar sükroz gradiente alındığında yatay

rotor için maksimum uygulama kuvveti olan 4149 g'de Qdot bandında ilerleme görülmemiştir. Bu nedenle kitosan kaplama sayesinde partiküllerin göreceli olarak düşük kuvvetlerde 100-2000 g ile hareketlendirilmesi sağlanmıştır. CdTe@ch için uygun işlem parametresi 500 g 3 dk olarak belirlenmiştir. CNPler ile 500 g 6 dk santrifüj parametrelerinde bakteri-NP ve NP bantlarının faz farkı kullanılarak seçici bakteri tespiti gerçekleştirilebilmiştir.

Çizelge 9. Bakteri tespiti ve sayımına yönelik hareketli alan santrifüjde kullanılan farklı NPler ile elde edilen başarı tablosu

Kullanılan NPler	Karakterizasyon Sonucu	<i>E.coli</i> Tespiti	<i>E.coli</i> Tayini	Hedefe özgü etkileşim
AgNP	-			
AuNP	+	-		
Fe ₃ O ₄ @Au NP	+	+	-	
CdTe@ch Qdot	+	+	+	-
CNP	+	+	+	+

+ Başarılı
- Başarısız

Çizelge 9'da karakterizasyon sonucu küresel yapıda ve homojenite gösteren nanopartiküllerin seçilip, bu NPler ile *E.coli* tespiti ve sayımında kat edilen yol özetlenmiştir. AgNPler homojen küresel yapıda olmadığı için çalışmanın devamında uygun bulunmamıştır. AuNPler ile sükröz gradiente takip edilebilir bakteri-NP fazı elde edilememiştir. Fe₃O₄@Au NP ile bakteri tespiti yapılmış, ancak bakteri sayımı için gradientte faz değişimi gözlenememiştir. Floresans etiket ile de Fe₃O₄@Au NPlerden istenilen sinyal alınamamıştır. CdTe@ch Qdotlar ile bakteri sayımı toplamda 50 dk'nın altında gerçekleştirilmiştir. Ancak 10⁵ kob/ml *E.coli* derişiminin altında sayım için gradient elverişli olmamıştır. Ayrıca kitosan kaplı Qdotlar kek sıkıştırma özelliğindeki faz yapısı nedeniyle hedefe özgü etkileşime uygun bulunmamıştır. CNPler ise 10¹-10⁴ kob/ml *E.coli* sayımına izin vermiş ve tekrar edilebilir sonuçlar elde edilmiştir. CNPlerin seçiciliği 10¹-10⁴ kob/ml *E.aerogenes* ile ispat edilmiştir. Çizelge 9'da görüldüğü gibi hareketli alan santrifüj ile hedefe özgü bakteri sayımında başarılı olan CNPler, gerçek örneklerde *E.coli* sayımı için aday gösterilmiştir.

Tez kapsamında geliştirilen "fazda ortalama optik yoğunluk" ölçüm yöntemi ile yağsız sütte *E.coli* tayini için de başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Literatürde koliform tayini için geliştirilen nanopartikül tabanlı yöntemlerin LOD değerleri kıyaslandığında; Temur ve arkadaşlarının SERS kullanımıyla 5 kob/ml, Lin ve

arkadaşlarının manyetoelastik algılayıcı ve kitosan modifiyeli manyetik NP kullanımıyla 10 kob/ml, Cheng ve arkadaşlarının ATP-lüminesans yöntemi ve manyetik NPleri kullanarak 20 kob/ml, Wang ve Alocilja'nın elektrokimyasal yöntemlerle 10 kob/ml olarak LOD belirledikleri görülmüştür [2, 3, 40, 83, 89, 90]. Dolayısıyla tespit ve tayin limitlerini sırasıyla 8 ve 28 kob/ml *E.coli* K-12 olarak hesapladığımız gradient yönteminin literatürdeki hassas tayin yöntemlerine alternatif oluşturacağı düşünülmüştür.

Literatürde gradient santrifüj kullanımı ile doğrudan bakteri tayini yapılan bir çalışma yer almamaktadır. Literatürde genellikle mikroorganizma ve biyomolekül ayırmasında eş-yoğunluk gradient yöntemi, NPleri boyut ve şekline göre ayırmada ise hareketli alan santrifüj yöntemi kullanılmaktadır [15, 32, 115]. İlk kez bakteri ve NP çiftlerinin santrifüj altında koloidal kararlılığını incelemek için Sousa ve arkadaşları 2015'te bir metodoloji geliştirmişlerdir. Böylece *Staphylococcus aureus* ve NP çiftlerinin diferansiyel santrifüjle ayrılması gerçekleştirilmiştir [17]. Tez çalışmasında ilk kez *E.coli*-NP çiftlerinin gradientte hareketli alan santrifüj yöntemi ile ayrılması ve aynı zamanda geliştirdiğimiz optik yoğunluk ölçümüyle nicel analizi gerçekleştirilmiştir.

Son zamanlarda PCR, LAMP, floresans dedektör gibi yöntemlerin mikro akışkan entegreli santrifüj disk ile geliştirildiği çalışmalar yer almaktadır. Bu entegre yöntemlerin hassasiyetinin geliştirilmeye devam ettiği, henüz LOD değerinin 2.7×10^4 kob/ml *E.coli* olarak belirlendiği görülmüştür [34, 116]. Bu anlamda tez kapsamında geliştirilen gradient yöntemi yeni, düşük maliyetli ve kullanımı kolay bir yöntem olarak literatüre kazandırılmıştır.

Bunların yanısıra geliştirdiğimiz gradient yöntemi 50 dk'nın altında sonuç vermesiyle; literatürdeki hızlı sonuç veren nanopartikül tabanlı bakteri tayin yöntemleri ile kıyaslandığında 4-methylumbelliferyl- β -d-glucuronide (MUG) tabanlı biyosensörlerin 30 dk'nın altında [74, 75] ve SERS tabanlı yöntemlerin 70 dk'nın altında [83, 89] sonuç vermesi nedeniyle literatüre hızlı ve kolay uygulanabilir bir yöntem olarak kazandırılmıştır.

Yağsız sütte *E.coli* K-12 tayini ile geliştirilen yöntemin gelecek çalışmalarda gıdalarda ve içme sularında koliform bakteri tayini için de santrifüj

parametrelerindeki küçük modifikasyonlarla kullanılmasının uygun olacağı öngörülmüştür.

Gelecek çalışmalarda 15 ml toplam hacimli tüpler yerine çapı daha küçük tüpler kullanılması önerilmektedir. Böylece gradientte kullanılacak çözelti, NP ve antikor miktarı azalacak, bakteri-NP bandı daha küçük bir alanda daha hassas ölçülebilecektir.

İlerleyen çalışmalarda optik yolla ölçüm düzeneğinin tasarımı; Schlieren optik sistemi modellenerek çukur ayna, LED ışık kaynağı ve profesyonel kamera kullanımı ile daha hassas optik ölçüm için geliştirilebilecektir. Schlieren akış görüntüleme optik sistemleri; aerodinamik kuvvetlerin görüntülenmesi için gaz akışkan yoğunluğundaki değişimlere göre ışık kırılmalarını ölçmekte ve gradient konumlarını belirlemektedir [117]. Dolayısıyla insan gözünün ayırtedemediği değişimleri çok hassas kaydedecektir.

Optik ölçüm sistemini geliştirmek için gelecek çalışmalarda kızıl ötesi kamera kullanılması da önerilmektedir. Yüksek çözünürlüklü bir kamera ile 4°C'deki gradientte bakteri ve NPlerin absorbanları ayrı ayrı takip edilebilecektir. Kızılötesi görüntüleme ile süroz gradientin bölgesel ısıl farkı takip edilerek ilerleyen bakteri fazının konumu belirlenebilecektir. Kameranın çözünürlüğüne bağlı olarak bakteri miktarı da tespit edilebilecektir.

Günümüzde bakteri ve NP etkileşiminin doğrudan, sistematik ve nicel analizi için genel bir metot bulunmamaktadır. Bakteri-NP çiftinin fiziksel ve biyolojik etkileri ayrı ayrı incelenebilmektedir. Fiziksel ölçümler için TEM, SEM, AFM, Raman kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemler ile doğrudan bakteri-NP karışımının sıvı ortamında ölçüm yapılamamaktadır. Mikroskop ölçümü öncesi örnek hazırlamak için insan elinin değdiği değişiklikler bakteri-NP etkileşiminin ölçümünde belirsizliklere yol açmaktadır. Yaptığımız tez çalışması ile bakteri-NP etkileşimlerinin uygun gradient ortamında optik yolla incelenebileceği gösterilmiştir. Tez çalışması ile geliştirdiğimiz ölçüm sisteminin akışkan mikro elektro mekanik sistemlerle (MEMS) entegre edilerek geliştirilmesi önerilmektedir. Literatürde akışkan mikro elektro mekanik sistemlerin (MEMS); manyetoforez, elektroforez, karşıt-akım santrifüj temel prensipleri ile geliştirildiği çalışmalar yer almaktadır [118-120]. Hazırladığımız santrifüj tabanlı optik ölçüm sisteminin mikro kanallar ile

geliştirilmesi; nanopartiküllerin biyolojik örnekle etkileşiminin, istenilen faz ayırmasının ve ilgili optik analizlerin el değmeden aynı sistemde yapılacağı minyatür sistemlerin (lab on a chip) geliştirilmesini sağlayacaktır. Böylece hastalıkların erken teşhisi için kan analizinde kullanılmak üzere yeni santrifüj tabanlı-akışkan ölçüm sistemleri de geliştirilebilecektir.



6. KAYNAKLAR

1. Nicolaou, N., Xu, Y. and Goodacre, R., *Detection and Quantification of Bacterial Spoilage in Milk and Pork Meat Using MALDI-TOF-MS and Multivariate Analysis*. Analytical Chemistry, 84(14): p. 5951-5958, **2012**.
2. Cheng, Y., Liu, Y., Huang, J., Li, K., Zhang, W., Xian, Y. and Jin, L., *Combining biofunctional magnetic nanoparticles and ATP bioluminescence for rapid detection of Escherichia coli*. Talanta, 77(4): p. 1332-6, **2009**.
3. Mao, X., Yang, L., Su, X.L. and Li, Y., *A nanoparticle amplification based quartz crystal microbalance DNA sensor for detection of Escherichia coli O157:H7*. Biosens Bioelectron, 21(7): p. 1178-85, **2006**.
4. Chang, H.-K., Ishikawa, F.N., Zhang, R., Datar, R., Cote, R.J., Thompson, M.E. and Zhou, C., *Rapid, Label-Free, Electrical Whole Blood Bioassay Based on Nanobiosensor Systems*. ACS Nano, 5(12): p. 9883-9891, **2011**.
5. Joshi, V.G., Chindera, K., Singh, A.K., Sahoo, A.P., Dighe, V.D., Thakuria, D., Tiwari, A.K. and Kumar, S., *Rapid label-free visual assay for the detection and quantification of viral RNA using peptide nucleic acid (PNA) and gold nanoparticles (AuNPs)*. Analytica Chimica Acta, 795: p. 1-7, **2013**.
6. Dutt-Ballerstadt, R., Evans, C., Pillai, A.P. and Gowda, A., *A label-free fiber-optic Turbidity Affinity Sensor (TAS) for continuous glucose monitoring*. Biosensors and Bioelectronics, 61(0): p. 280-284, **2014**.
7. Yokota, K., Tsutsui, M. and Taniguchi, M., *Electrode-embedded nanopores for label-free single-molecule sequencing by electric currents*. RSC Advances, 4(31): p. 15886-15899, **2014**.
8. Sharma, V., Park, K. and Srinivasarao, M., *Shape separation of gold nanorods using centrifugation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 106(13): p. 4981-5, **2009**.
9. Erickson, H.P., *Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy*. Biological Procedures Online, 11: p. 32-51, **2009**.
10. Korn, E.D. *Biophysical Approaches*. Methods in Membrane Biology. 4, p. 215, **1975**.
11. Lawrence, J.E. and Steward, G.F., *Purification of viruses by centrifugation*. MAVE, 17: p. 166-181, **2010**.
12. Woon-Fong Leung, W. *Centrifugal Separations in Biotechnology*. 312, **2007**.
13. Bonaccorso, F., Zerbetto, M., Ferrari, A.C. and Amendola, V., *Sorting Nanoparticles by Centrifugal Fields in Clean Media*. The Journal of Physical Chemistry C, 117(25): p. 13217-13229, **2013**.
14. Hu, C. and Chen, Y., *Uniformization of silica particles by theory directed rate-zonal centrifugation to build high quality photonic crystals*. Chemical Engineering Journal, 271: p. 128-134, **2015**.

15. Lin, L., Choundhary, A., Bavishi, A., Ogbonna, N. and Maddux, S., *Use of Sucrose Gradient Method for Bacterial Cell Cycle Synchronization*. Journal of Microbiology and Biology Education: p. 50-53, **2012**.
16. Choksawangkarn, W., Kim, S.K., Cannon, J.R., Edwards, N.J., Lee, S.B. and Fenselau, C., *Enrichment of plasma membrane proteins using nanoparticle pellicles: comparison between silica and higher density nanoparticles*. J Proteome Res, 12(3): p. 1134-41, **2013**.
17. Sousa, C., Sequeira, D., Kolen'ko, Y.V., Pinto, I.M. and Petrovykh, D.Y., *Analytical protocols for separation and electron microscopy of nanoparticles interacting with bacterial cells*. Anal Chem, 87(9): p. 4641-8, **2015**.
18. Morijiri, T., Yamada, M., Hikida, T. and Seki, M., *Microfluidic counterflow centrifugal elutriation system for sedimentation-based cell separation*. Microfluidics and Nanofluidics, 14(6): p. 1049-1057, **2013**.
19. Mace, C.R., Akbulut, O., Kumar, A.A., Shapiro, N.D., Derda, R., Patton, M.R. and Whitesides, G.M., *Aqueous multiphase systems of polymers and surfactants provide self-assembling step-gradients in density*. Journal of the American Chemical Society, 134(22): p. 9094-7, **2012**.
20. Vauthier, C., Schmidt, C. and Couvreur, P., *Measurement of the Density of Polymeric Nanoparticulate Drug Carriers by Isopycnic Centrifugation*. Journal of Nanoparticle Research, 1(3): p. 411-418, **1999**.
21. Lee, S.H., Salunke, B.K. and Kim, B.S., *Sucrose density gradient centrifugation separation of gold and silver nanoparticles synthesized using Magnolia kobus plant leaf extracts*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 19(1): p. 169-174, **2014**.
22. Akbulut, O., Mace, C.R., Martinez, R.V., Kumar, A.A., Nie, Z., Patton, M.R. and Whitesides, G.M., *Separation of Nanoparticles in Aqueous Multiphase Systems through Centrifugation*. Nano Letters, 12(8): p. 4060-4064, **2012**.
23. Écija-Arenas, Á., Román-Pizarro, V., Fernández-Romero, J.M. and Gómez-Hens, A., *Separation and purification of hydrophobic magnetite-gold hybrid nanoparticles by multiphase density gradient centrifugation*. Microchimica Acta, 183(6): p. 2005-2012, **2016**.
24. Prantner, A.M., Chen, J., Murray, C.B. and Scholler, N., *Coating Evaluation and Purification of Monodisperse, Water-Soluble, Magnetic Nanoparticles Using Sucrose Density Gradient Ultracentrifugation*. Chemistry of Materials, 24(21): p. 4008-4010, **2012**.
25. Bonaccorso, F., Hasan, T., Tan, P.H., Sciascia, C., Privitera, G., Di Marco, G., Gucciardi, P.G. and Ferrari, A.C., *Density Gradient Ultracentrifugation of Nanotubes: Interplay of Bundling and Surfactants Encapsulation*. The Journal of Physical Chemistry C, 114(41): p. 17267-17285, **2010**.
26. Eroglu, E. and Melis, A., *"Density equilibrium" method for the quantitative and rapid in situ determination of lipid, hydrocarbon, or biopolymer content in microorganisms*. Biotechnol Bioeng, 102(5): p. 1406-15, **2009**.
27. Sun, X., Tabakman, S.M., Seo, W.-S., Zhang, L., Zhang, G., Sherlock, S., Bai, L. and Dai, H., *Separation of Nanoparticles in a Density Gradient*:

- FeCo@C and Gold Nanocrystals*. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(5): p. 939-942, **2009**.
28. Neumann, A., Hoyer, W., Wolff, M.W., Reichl, U., Pfitzner, A. and Roth, B., *New method for density determination of nanoparticles using a CPS disc centrifuge™*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 104: p. 27-31, **2013**.
 29. Sun, X., Luo, D., Liu, J. and Evans, D.G., *Monodisperse Chemically Modified Graphene Obtained by Density Gradient Ultracentrifugal Rate Separation*. *ACS Nano*, 4(6), **2010**.
 30. Pollard, E.C. and Grady, L.J., *CsCl density gradient centrifugation studies of intact bacterial cells*. *Biophys J*, 7(2): p. 205-13, **1967**.
 31. Rhiem, S., Riding, M.J., Baumgartner, W., Martin, F.L., Semple, K.T., Jones, K.C., Schäffer, A. and Maes, H.M., *Interactions of multiwalled carbon nanotubes with algal cells: Quantification of association, visualization of uptake, and measurement of alterations in the composition of cells*. *Environmental Pollution*, 196: p. 431-439, **2015**.
 32. Mortimer, M., Petersen, E.J., Buchholz, B.A. and Holden, P.A., *Separation of Bacteria, Protozoa and Carbon Nanotubes by Density Gradient Centrifugation*. *Nanomaterials*, 6(10): p. 181, **2016**.
 33. Ivanov, Andrei I., *Exocytosis and Endocytosis*, Humana Press, 440, p. 412, DOI:10.1007/978-1-59745-178-9, **2008**.
 34. Yan, H., Zhu, Y., Zhang, Y., Wang, L., Chen, J., Lu, Y., Xu, Y. and Xing, W., *Multiplex detection of bacteria on an integrated centrifugal disk using bead-beating lysis and loop-mediated amplification*. *Sci Rep*, 7(1): p. 1460, **2017**.
 35. Gilmore, J., Islam, M. and Martinez-Duarte, R., *Challenges in the Use of Compact Disc-Based Centrifugal Microfluidics for Healthcare Diagnostics at the Extreme Point of Care*. *Micromachines*, 7(4): p. 52, **2016**.
 36. Olbrich, C., Gessner, A., Schroder, W., Kayser, O. and Muller, R.H., *Lipid-drug conjugate nanoparticles of the hydrophilic drug diminazene-cytotoxicity testing and mouse serum adsorption*. *J Control Release*, 96(3): p. 425-35, **2004**.
 37. Hatch, D.M., Weiss, A.A., Kale, R.R. and Iyer, S.S., *Biotinylated bi- and tetra-antennary glycoconjugates for Escherichia coli detection*. *Chembiochem*, 9(15): p. 2433-42, **2008**.
 38. Lin, Y.-S., Tsai, P.-J., Weng, M.-F. and Chen, Y.-C., *Affinity Capture Using Vancomycin-Bound Magnetic Nanoparticles for the MALDI-MS Analysis of Bacteria*. *Analytical Chemistry*, 77(6): p. 1753-1760, **2005**.
 39. Rodoplu, D., Boyaci, I.H., Bozkurt, A.G., Eksi, H., Zengin, A., Tamer, U., Aydogan, N., Ozcan, S. and Tugcu-Demiroz, F., *Quantitative Characterization of Magnetic Mobility of Nanoparticle in Solution-Based Condition*. *Curr Pharm Des*, 21(37): p. 5389-400, **2015**.
 40. Wang, Y. and Alocilja, E.C., *Gold nanoparticle-labeled biosensor for rapid and sensitive detection of bacterial pathogens*. *Journal of Biological Engineering*, 9: p. 16, **2015**.

41. Gao, J., Huang, X., Liu, H., Zan, F. and Ren, J., *Colloidal Stability of Gold Nanoparticles Modified with Thiol Compounds: Bioconjugation and Application in Cancer Cell Imaging*. Langmuir, 28(9): p. 4464-4471, **2012**.
42. Xiong, B., Cheng, J., Qiao, Y., Zhou, R., He, Y. and Yeung, E.S., *Separation of nanorods by density gradient centrifugation*. J Chromatogr A, 1218(25): p. 3823-9, **2011**.
43. Kowalczyk, B., Lagzi, I. and Grzybowski, B.A., *Nanoseparations: Strategies for size and/or shape-selective purification of nanoparticles*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 16(2): p. 135-148, **2011**.
44. Lee, J. and Deininger, R.A., *Detection of E. coli in beach water within 1 hour using immunomagnetic separation and ATP bioluminescence*. Luminescence, 19(1): p. 31-36, **2004**.
45. El-Boubbou, K., Gruden, C. and Huang, X., *Magnetic Glyco-nanoparticles: A Unique Tool for Rapid Pathogen Detection, Decontamination, and Strain Differentiation*. Journal of the American Chemical Society, 129(44): p. 13392-13393, **2007**.
46. Alivisatos, P., *The use of nanocrystals in biological detection*. Nat Biotech, 22(1): p. 47-52, **2004**.
47. Li, H., Klem, M.T., Seby, K.B., Singel, D.J., Young, M., Douglas, T. and Idzerda, Y.U., J. Magn. Magn. Mater., 321: p. 175, **2009**.
48. Kloefer, J.A., Bradforth, S.E. and Nadeau, J.L., *Photophysical properties of biologically compatible CdSe quantum dot structures*. J Phys Chem B, 109(20): p. 9996-10003, **2005**.
49. Wegner, K.D. and Hildebrandt, N., *Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors*. Chem Soc Rev, 44(14): p. 4792-834, **2015**.
50. Zheng, X.T., Ananthanarayanan, A., Luo, K.Q. and Chen, P., *Glowing graphene quantum dots and carbon dots: properties, syntheses, and biological applications*. Small, 11(14): p. 1620-36, **2015**.
51. Chen, H., Gong, Y. and Han, R., *Cadmium Telluride Quantum Dots (CdTe-QDs) and Enhanced Ultraviolet-B (UV-B) Radiation Trigger Antioxidant Enzyme Metabolism and Programmed Cell Death in Wheat Seedlings*. PLOS ONE, 9(10): p. e110400, **2014**.
52. Gravel, E., Tanguy, C., Cassette, E., Pons, T., Knittel, F., Bernards, N., Garofalakis, A., Duconge, F., Dubertret, B. and Doris, E., *Compact tridentate ligands for enhanced aqueous stability of quantum dots and in vivo imaging*. Chemical Science, 4(1): p. 411-417, **2013**.
53. Gao, B., Shen, C., Yuan, S., Yang, Y. and Chen, G., *Synthesis of Highly Emissive CdSe Quantum Dots by Aqueous Precipitation Method*. Journal of Nanomaterials, 2013: p. 7, **2013**.
54. Maxwell, T., Banu, T., Price, E., Tharkur, J., Campos, M., Gesquiere, A. and Santra, S., *Non-Cytotoxic Quantum Dot-Chitosan Nanogel Biosensing Probe for Potential Cancer Targeting Agent*. Nanomaterials, 5(4): p. 2359, **2015**.

55. Üçgül, İ., Aras, S. and Özdemir Küçükçapraz, D., *Farklı Hammadde Kaynaklarından Kitinin Safılaştırılması Ve Tekstil Uygulamaları*. Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 9(1), **2016**.
56. Arshad, E., Anas, A., Asok, A., Jasmin, C., Pai, S.S., Bright Singh, I.S., Mohandas, A. and Biju, V., *Fluorescence detection of the pathogenic bacteria Vibrio harveyi in solution and animal cells using semiconductor quantum dots*. RSC Advances, 6(19): p. 15686-15693, **2016**.
57. Campos, B.B., Abellan, C., Zougagh, M., Jimenez-Jimenez, J., Rodriguez-Castellon, E., Esteves da Silva, J.C., Rios, A. and Algarra, M., *Fluorescent chemosensor for pyridine based on N-doped carbon dots*. J Colloid Interface Sci, 458: p. 209-16, **2015**.
58. Misra, S.K., Chang, H.-H., Mukherjee, P., Tiwari, S., Ohoka, A. and Pan, D., *Regulating Biocompatibility of Carbon Spheres via Defined Nanoscale Chemistry and a Careful Selection of Surface Functionalities*. Sci Rep, 5: p. 14986, **2015**.
59. Romero, V.J.M., Tsai, J.F., Doma, B.T., Jr., C. and P., C.H., *Development of functionalized carbon spheres from glucose and sucrose for the adsorption of cationic moieties in aqueous solutions*. Sustain. Environ. Res., 24(5): p. 339-347, **2014**.
60. Neng, W., Shuang-ying, L., Jun, X., Matteo, M., Yi-long, Z., Shu, W., Li-tao, S. and Qing-an, H., *Fullerene growth from encapsulated graphene flakes*. Nanoscale, 6(19): p. 11213-8, **2014**.
61. Chaturvedi, S., Dave, P.N. and Shah, N.K., *Applications of nano-catalyst in new era*. Journal of Saudi Chemical Society, 16(3): p. 307-325, **2012**.
62. Liu, Z., Robinson, J.T., Tabakman, S.M., Yang, K. and Dai, H., *Carbon materials for drug delivery & cancer therapy*. Materials Today, 14(7): p. 316-323, **2011**.
63. Baghel, A., Singh, B., Prasad, G.K., Pandey, P. and Gutch, P.K., *Preparation and characterization of active carbon spheres prepared by chemical activation*. Carbon, 49(14): p. 4739-4744, **2011**.
64. Bianco, A., Kostarelos, K. and Prato, M., *Applications of carbon nanotubes in drug delivery*. Current Opinion in Chemical Biology, 9(6): p. 674-679, **2005**.
65. Nakamura, H. and Tamura, Z., *Fluorometric determination of secondary amines based on their reaction with fluorescamine*. Analytical Chemistry, 52(13): p. 2087-2092, **1980**.
66. Zhang, W.-H., Hu, X.-X. and Zhang, X.-B., *Dye-Doped Fluorescent Silica Nanoparticles for Live Cell and In Vivo Bioimaging*. Nanomaterials, 6(5): p. 81, **2016**.
67. Toseland, C.P., *Fluorescent labeling and modification of proteins*. Journal of Chemical Biology, 6(3): p. 85-95, **2013**.
68. Fairhead, M. and Howarth, M., *Site-specific biotinylation of purified proteins using BirA*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 1266: p. 171-184, **2015**.

69. Koo, K., Foegeding, P.M. and Swaisgood, H.E., *Development of a Streptavidin-Conjugated Single-Chain Antibody That Binds Bacillus cereus Spores*. Applied and Environmental Microbiology, 64(7): p. 2497-2502, **1998**.
70. K. Rastogi, S., F. Jabal, J.M., Zhang, H. and M. Gibson, C., *Antibody@Silica Coated Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Capture of E.coli and Sens Titration of Biomolecules with Antibacterial Silver Colloid*. Journal of Nanomedicine & Nanotechnology, 02(07), **2011**.
71. Eksi, H., *Nanoparçacık Etiketli Biyosensör Geliştirilmesi*, Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi, **2011**.
72. Ying, Y.-L., Yu, R.-J., Hu, Y.-X., Gao, R. and Long, Y.-T., *Single antibody-antigen interactions monitored via transient ionic current recording using nanopore sensors*. Chemical Communications, 53(61): p. 8620-8623, **2017**.
73. Yazdankhah, S.P., Sørum, H., Larsen, H.J.S. and Gogstad, G., *Rapid Method for Detection of Gram-Positive and -Negative Bacteria in Milk from Cows with Moderate or Severe Clinical Mastitis*. Journal of Clinical Microbiology, 39(9): p. 3228-3233, **2001**.
74. Wildeboer, D., Amirat, L., Price, R.G. and Abuknesha, R.A., *Rapid detection of Escherichia coli in water using a hand-held fluorescence detector*. Water Research, 44(8): p. 2621-2628, **2010**.
75. Hesari, N., Alum, A., Elzein, M. and Abbaszadegan, M., *A biosensor platform for rapid detection of E. coli in drinking water*. Enzyme and Microbial Technology, 83: p. 22-28, **2016**.
76. Chertok, B., Moffat, B.A., David, A.E., Yu, F., Bergemann, C., Ross, B.D. and Yang, V.C., *Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors*. Biomaterials, 29(4): p. 487-496, **2008**.
77. Yu, F., Zhang, L., Huang, Y., Sun, K., David, A.E. and Yang, V.C., *The magnetophoretic mobility and superparamagnetism of core-shell iron oxide nanoparticles with dual targeting and imaging functionality*. Biomaterials, 31(22): p. 5842-5848, **2010**.
78. Jun, Y.-w., Seo, J.-w. and Cheon, J., *Nanoscaling Laws of Magnetic Nanoparticles and Their Applicabilities in Biomedical Sciences*. Accounts of Chemical Research, 41(2): p. 179-189, **2008**.
79. Jing, Y., Mal, N., Williams, P.S., Mayorga, M., Penn, M.S., Chalmers, J.J. and Zborowski, M., *Quantitative intracellular magnetic nanoparticle uptake measured by live cell magnetophoresis*. The FASEB Journal, 22(12): p. 4239-4247, **2008**.
80. Patricia, C., Patricia de la, P., Pilar, M., Marta, M., José María, A., Guillermo, R., Félix, Y., José María, G.-C. and Antonio, H., *Magnetism in nanoparticles: tuning properties with coatings*. Journal of Physics: Condensed Matter, 25(48): p. 484006, **2013**.
81. S. P. Gubin, Y.A.K., G. B. Khomutov, G. Y. Yurkov, *Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties*. Russian Chemical Reviews, 74(6): p. 489-520, **2005**.

82. Baniukevic, J., Boyaci, I.H., Bozkurt, A.G., Tamer, U., Ramanavicius, A. and Ramanaviciene, A., *Magnetic gold nanoparticles in SERS-based sandwich immunoassay for antigen detection by well oriented antibodies*. Biosensors and Bioelectronics, 43(0): p. 281-288, **2013**.
83. Guven, B., Basaran-Akgul, N., Temur, E., Tamer, U. and Boyaci, I.H., *SERS-based sandwich immunoassay using antibody coated magnetic nanoparticles for Escherichia coli enumeration*. Analyst, 136(4): p. 740-748, **2011**.
84. Tizard, I.R., *Immunology: An Introduction*. Saunders College Pub. 544, **1995**.
85. McCloskey, K.E., Comella, K., Chalmers, J.J., Margel, S. and Zborowski, M., *Mobility measurements of immunomagnetically labeled cells allow quantitation of secondary antibody binding amplification*. Biotechnol Bioeng, 75(6): p. 642-655, **2001**.
86. Leigh, D.R., Steinert, S., Moore, L.R., Chalmers, J.J. and Zborowski, M., *Cell tracking velocimetry as a tool for defining saturation binding of magnetically conjugated antibodies*. Cytometry Part A, 66A(2): p. 103-108, **2005**.
87. Andreu, J.S., Camacho, J., Faraudo, J., Benelmekki, M., Rebollo, C. and Martínez, L.M., *Simple analytical model for the magnetophoretic separation of superparamagnetic dispersions in a uniform magnetic gradient*. Physical Review E, 84(2): p. 021402, **2011**.
88. Zhu, X., *Bead-Based Optical Immunoassay Using Quantum-Dot Labeling and Immunocomplex Dissociation for Detection of Escherichia coli O157:H7*. Analytical Letters, 44(5): p. 874-884, **2011**.
89. Temur, E., Boyaci, İ., Tamer, U., Unsal, H. and Aydogan, N., *A highly sensitive detection platform based on surface-enhanced Raman scattering for Escherichia coli enumeration*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 397(4): p. 1595-1604, **2010**.
90. Lin, H., Lu, Q., Ge, S., Cai, Q. and Grimes, C.A., *Detection of pathogen Escherichia coli O157:H7 with a wireless magnetoelastic-sensing device amplified by using chitosan-modified magnetic Fe₃O₄ nanoparticles*. Sensors and Actuators B: Chemical, 147(1): p. 343-349, **2010**.
91. Liu, J. and Lu, Y., *Preparation of aptamer-linked gold nanoparticle purple aggregates for colorimetric sensing of analytes*. Nat Protoc, 1(1): p. 246-52, **2006**.
92. Lee, P.C. and Meisel, D., *Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols*. The Journal of Physical Chemistry, 86(17): p. 3391-3395, **1982**.
93. Tamer, U., Gündoğdu, Y., Boyaci, İ. and Pekmez, K., *Synthesis of magnetic core-shell Fe₃O₄-Au nanoparticle for biomolecule immobilization and detection*. Journal of Nanoparticle Research, 12(4): p. 1187-1196, **2010**.
94. Dogan, U., Kasap, E., Cetin, D., Suludere, Z., Boyaci, I.H., Türkyılmaz, C., Ertas, N. and Tamer, U., *Rapid detection of bacteria based on homogenous*

- immunoassay using chitosan modified quantum dots*. Sensors and Actuators B: Chemical, 233: p. 369-378, **2016**.
95. Van Thu, L., Cao Long, N., Quoc Trung, L., Trinh Tung, N., Duc Nghia, N. and Minh Thanh, V., *Surface modification and functionalization of carbon nanotube with some organic compounds*. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, 4(3): p. 035017, **2013**.
 96. Lagally, E., *Microfluidics and Nanotechnology: Biosensing to the Single Molecule Limit*. 1 ed.: CRC Press, **2014**.
 97. Rucha, D., Mankad, V., Gupta, S. and Jha, P., *Size Distribution of Silver Nanoparticles: UV-Visible Spectroscopic Assessment*. Vol. 4. 30-34, **2012**.
 98. Robinson, I., Tung, L., Maenosono, S., Wälti, C. and Thanh, N., *Synthesis of core-shell gold coated magnetic nanoparticles and their interaction with thiolated DNA*. Vol. 2. 2624-30, **2010**.
 99. Stobinski, L., Lesiak, B., Kövér, L., Tóth, J., Biniak, S., Trykowski, G. and Judek, J., *Multiwall carbon nanotubes purification and oxidation by nitric acid studied by the FTIR and electron spectroscopy methods*. Journal of Alloys and Compounds, 501(1): p. 77-84, **2010**.
 100. Tirado-Guizar, A., Pina-Luis, G. and Paraguay-Delgado, F., *Fluorescence enhancement study of shell-less CdTe quantum dots*. Vol. 5. **2015**.
 101. Lee-Montiel, F.T. and Imoukhuede, P.I., *Engineering quantum dot calibration standards for quantitative fluorescent profiling*. Journal of Materials Chemistry B, 1(46): p. 6434-6441, **2013**.
 102. Yang, C., Xie, H., Li, Q.-C., Sun, E.-J. and Su, B.-L., *Adherence and interaction of cationic quantum dots on bacterial surfaces*. J Colloid Interface Sci, 450: p. 388-395, **2015**.
 103. Amir, A., Babaeipourb, F., McIntoshc, D.B., Nelsona, D.R. and Suckjoon Junb, S., *Bending forces plastically deform growing bacterial cell walls*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 111(16): p. 5778–5783, **2014**.
 104. Danese, P.N., Pratt, L.A. and Kolter, R., *Exopolysaccharide Production Is Required for Development of Escherichia coli K-12 Biofilm Architecture*, Journal of Bacteriology. 182(12): p. 3593–96, **2000**.
 105. Conzatti, L., Costa, G., Falqui, L. and Turturro, A., *Microscopic Imaging of Rubber Compounds*. Rubber Technologist Handbook, 2, **2009**.
 106. Liu, Y. and Zhao, Q., *Influence of surface energy of modified surfaces on bacterial adhesion*. Biophysical Chemistry, 117(1): p. 39-45, **2005**.
 107. Song, F., Koo, H. and Ren, D., *Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation*. J Dent Res, 94(8): p. 1027-34, **2015**.
 108. Yang, C., Xie, H., Li, Q.C., Sun, E.J. and Su, B.L., *Adherence and interaction of cationic quantum dots on bacterial surfaces*. J Colloid Interface Sci, 450: p. 388-95, **2015**.
 109. Yuan, Y., Hays, M.P., Hardwidge, P.R. and Kim, J., *Surface characteristics influencing bacterial adhesion to polymeric substrates*. RSC Advances, 7(23): p. 14254-14261, **2017**.

110. Peterson, B.W., Sharma, P.K., van der Mei, H.C. and Busscher, H.J., *Bacterial Cell Surface Damage Due to Centrifugal Compaction*. Applied and Environmental Microbiology, 78(1): p. 120-125, **2012**.
111. Wang, Q., Kuo, Y., Wang, Y., Shin, G., Ruengruglikit, C. and Huang, Q., *Luminescent Properties of Water-Soluble Denatured Bovine Serum Albumin-Coated CdTe Quantum Dots*. The Journal of Physical Chemistry B, 110(34): p. 16860-16866, **2006**.
112. Hawe, A., Sutter, M. and Jiskoot, W., *Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization*. Pharmaceutical Research, 25(7): p. 1487-1499, **2008**.
113. Stafford, W.F., 3rd, *Boundary analysis in sedimentation transport experiments: a procedure for obtaining sedimentation coefficient distributions using the time derivative of the concentration profile*. Anal Biochem, 203(2): p. 295-301, **1992**.
114. Schachman, H.K., *Ultracentrifugation in Biochemistry*. Elsevier Science, **2013**.
115. Lee, S., Salunke, B. and Kim, B., *Sucrose density gradient centrifugation separation of gold and silver nanoparticles synthesized using Magnolia kobus plant leaf extracts*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 19(1): p. 169-174, **2014**.
116. Czilwik, G., Messinger, T., Strohmeier, O., Wadle, S., von Stetten, F., Paust, N., Roth, G., Zengerle, R., Saarinen, P., Niittymäki, J., McAllister, K., Sheils, O., O'Leary, J. and Mark, D., *Rapid and fully automated bacterial pathogen detection on a centrifugal-microfluidic LabDisk using highly sensitive nested PCR with integrated sample preparation*. Lab on a Chip, 15(18): p. 3749-3759, **2015**.
117. Htun, Y. and Myint, Z.Y.M., *Some Principles of Flow Visualization Techniques in Wind Tunnels*. International Journal of Advances in Science Engineering and Technology, 4(4): p. 62-66, **2016**.
118. Kim, U. and Soh, H.T., *Simultaneous sorting of multiple bacterial targets using integrated dielectrophoretic-magnetic activated cell sorter*. Lab Chip, 9(16): p. 2313-8, **2009**.
119. Daniel, K., Macdara, G., Gregor, K. and Jens, D., *Rapid and cost-efficient enumeration of rare cancer cells from whole blood by low-loss centrifugo-magnetophoretic purification under stopped-flow conditions*. Cytometry Part A, 87(1): p. 74-80, **2015**.
120. Yousuff, C., Ho, E., Hussain K, I. and Hamid, N., *Microfluidic Platform for Cell Isolation and Manipulation Based on Cell Properties*. Micromachines, 8(1): p. 15, **2017**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Didem Rodoplu

Doğum Yeri: Ankara

Medeni Hali: Bekar

E- posta: didemrodoplu@gmail.com

Adresi: Fakülteler Mah. Dirim Sk. 7/8 İçcebeci Çankaya Ankara

Eğitim

Lisans

2003-2008 Gazi Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Fizik Öğretmenliği

2012-2016 Anadolu Üniversitesi, İktisat Fakültesi, Kamu Yönetimi

Yüksek Lisans

2008-2011 Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı,

"Biyosensör Uygulamalarına Yönelik Olarak Kuvars Kristal Mikroterazi

Yüzeylerin Elektro-Eğirme Yöntemi ile Modifikasyonu"

Doktora

2012-2018 Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı,

"Farklı Nanopartiküller Kullanılarak Bakteri Tayinine Yönelik Gradient Yöntemi

Geliştirilmesi"

Yabancı Dil Düzeyi

İngilizce-TOEFL IBT 88/120

Almanca-Avrupa Dil Portfolyosu A2

İş Deneyimi

-

Deneyim Alanları

- Elektrospinning
- Kütle Hassas (QCM) Biyosensör
- Nanopartikül Karakterizasyonu
(TEM, SEM, AFM, FTIR-ATR, UV-Vis ve Floresans Spektroskopisi)
- Sükroz Gradient Santrifüjleme Teknikleri
- Veri Analizi
(Microsoft Office, MatLab, Image J, Origin, AutoCAD)

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Rodoplu D., Boyacı I. H., Tamer U., Suludere Z., Investigation of Gradient Bands of Carbon Sphere via Optic Density Measurement for the Purpose of *E.coli* Detection in Milk, 2018 (Hazırlık Aşamasında)

Rodoplu D., Boyacı I. H., Tamer U., Suludere Z., Ertas N., A New Nanoparticle Based Bacteria Quantification Method Using Sucrose Gradient Separation, 2018 (Hazırlık Aşamasında)

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 04/09/2018

Tez Başlığı / Konusu: FARKLI NANOPARTİKÜLLER KULLANILARAK BAKTERİ TAYİNİNE YÖNELİK GRADİENT YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 113 sayfalık kısmına ilişkin, 04/09/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.


04.09.2018

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Didem Rodoplu

Öğrenci No: N12149426

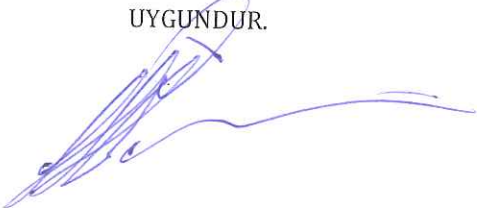
Anabilim Dalı: Nanoteknoloji ve Nanotıp

Programı: Doktora

Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.


Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

(Unvan, Ad Soyad, İmza)