

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

NANOPARÇACIK ETİKETLİ BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Haslet EKŞİ

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2011**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Haslet EKŞİ tarafından hazırlanan “**Nanoparçacık etiketli biyosensör geliştirilmesi**” adlı tez çalışması 12/07/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Ali Osman SOLAK

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI
Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Ali Osman SOLAK
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Ali SINAĞ
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Tuncer ÇAYKARA
Gazi Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Orhan ATAKOL
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Özer KOLSARICI

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

NANOPARÇACIK ETİKETLİ BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Haslet EKŞİ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ali Osman SOLAK

Bu çalışmada su ve gıda örneklerinde *E. coli* türü bakterilerin sebep olduğu, insan sağlığı için tehlike oluşturan fekal kirliliğin belirlenmesi amacıyla bimetalik nanoparçacık işaretli antikorların kullanıldığı elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. Bu amaçla, öncelikle altın-gümüş (Au@Ag) ve gümüş-altın (Ag@Au) bimetalik nanoparçacıklar sentezlenmiş ve bu nano yapıların karakterizasyonu, spektroskopik yöntemler (UV-Vis) ve mikroskopik görüntüleme (TEM) teknikleriyle gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen Au@Ag ve Ag@Au bimetalik yapılara uygun antikor bağlanmış, nanoparçacık işaretli bu antikorlar, polistiren kuyucuk (PS) yüzeyine ekilmiş *E. coli* ile temas ettirilerek antikorun bakteriye tutunması sağlanmıştır. Bağlanma gerçekleşikten sonra elde edilen yüzeyler ATR-FTIR, XPS ve SERS yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Polistiren kuyucukların içerisindeki asit çözeltisinde Au veya Ag nanometallerinin yükseltgenerek çözeltiliye geçmesi sağlanmıştır. Elektrokimyasal deneylerde karbon kalem elektrot çalışma elektrodu olarak kullanılmış ve bu yüzeye, çözeltideki altın ve gümüş iyonları elektrokimyasal olarak biriktirilmiştir. Bu işlemin ardından Au ve Ag iyonlarının anodik sıyırma voltametri ile yükseltgenme akımı tespit edilmiştir. Altının sıyırılma akımı ile bakterinin konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi kullanarak gerçek numuneler içerisindeki *E. coli* miktarı belirlenmiştir.

Temmuz 2011, 136 sayfa

Anahtar Kelimeler: Çekirdek-kabuk bimetalik nanoparçacık, avidin-biyotin etkileşimi, *E. coli*, yüzey karakterizasyonu, elektrokimyasal immünosensör, kare dalga sıyırma voltametri

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DEVELOPING NANOPARTICLE-TAGGED BIOSENSORS

Haslet EKŞİ

Ankara University
Graduate School of Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor : Prof. Dr. Ali Osman SOLAK

In this study, an electrochemical biosensor was fabricated for the determination of fecal contamination in water and food samples due to the presence of *E. coli* bacteria which is seriously dangerous for human health. For this purpose, gold-silver (Au@Ag) and silver-gold (Ag@Au) bimetallic nanoparticles were synthesized and characterized by spectroscopic (UV-Vis) and microscopic (TEM) methods. After preparation of bimetallic nanoparticles, appropriate antibodies were incorporated to these nanostructures. Bimetallic nanoparticle-labeled antibodies were treated with *E. coli* immobilized polystyrene microwells to recognize the bacteria. Following the binding procedure, these surfaces were characterized with ATR-FTIR, XPS ve SERS techniques. Modified microwells were filled with an acid solution and in this way bimetallic nanoparticles were dissolved by the oxidation of metals to the ionic forms. In electrochemical experiments pencil electrode were used as a working electrode and Au³⁺ or Ag⁺ ions in solution were deposited on these electrodes by the electrochemical reduction of gold. Following this process, the oxidation peak current of Au³⁺ or Ag⁺ ions were determined by anodic stripping voltammetry. The relationship between the bacteria concentration and stripping current of gold or silver were investigated. After these studies, the amounts of the *E. coli* in the real samples were then detected by the developed method.

July 2011, 136 pages

Key Words: Core-shell bimetallic nanoparticle, avidin-biotin interaction, *E. coli*, surface characterization, electrochemical immunosensor, square wave stripping voltammetry

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam süresince değerli bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, laboratuvar imkanlarını bana sonuna kadar sunan, maddi ve manevi desteğini sürekli hissettiğim değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ali Osman SOLAK'a (Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya A.B.D.) teşekkür ederim.

Tezimin ilerlemesinde ve tamamlanmasında bilgi ve desteklerini benden esirgemeyen değerli Tez İzleme Komitesi üyelerim Sayın Prof. Dr. Ali SINAĞ (Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya A.B.D.) ve Sayın Prof. Dr. Tuncer ÇAYKARA'ya (Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya A.B.D.) teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında laboratuvarının tüm imkanlarını bana sunan, her türlü bilgi ve desteği sağlayan ve bakterilere karşı sıcağın olmayı öğreten değerli hocam Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI'ya (Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü) teşekkür ederim.

İyi günde, kötü günde, hastalıkta sağlıkta her zaman yanımda olan, kahrımı çeken, bana emek veren, gerek hocam gerek dostum sevgili arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Remziye GÜZEL'e (Dicle Üniversitesi, Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi, İlköğretim Bölümü) teşekkür ederim.

Ekip olmanın güzelliğini yaşatan ve ihtiyaç duyduğumda yanıma koşan Dr. Zafer ÜSTÜNDAĞ'a, Fevziye BÜYÜKKAYA'ya, Ayça ÇİFTÇİ'ye ve Zeynep PINARCIOĞLU'na teşekkür ederim. Doktora eğitimimden önce ve sonra sabırla yanımda olan çok değerli arkadaşlarım Funda GÜK ve Ulaş SELİMOĞLU'na, manevi ve teknik desteğini benden esirgemeyen Gökhan DEMİRCİ'ye teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince varlığıyla bana güç veren ve fedakarlık gösteren, beni her konuda destekleyen sevgili Mustafa KOÇAK'a teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, gözüm yaşlı her eve geldiğimde "Sabret annecim"leri ile kahrımı çeken, özellikle yazım aşamasında bitmek tükenmek bilmeyen "Hadi kızım"ları ile beni destekleyen bir tanecik annem Nedime EKŞİ'ye, küçüklüğümde beri beni "profesörüm benim" diye seven, her türlü isteğimi yerine getiren ve bir defa olsun "Off kızım" dememiş canım babam İsmail EKŞİ'ye, üniversite hayatım boyunca çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan, kendisinin kimya ile alakası olmamasına rağmen gezmediği laboratuvar kalmayan, benim fahri kimyagerim, dostum, her şeyim, kardeşim Neval EKŞİ'ye yürek dolusu teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını 109T633 numaralı proje ile maddi olarak destekleyen TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Destek Grubuna (TBAG) teşekkür ederim.

Haslet EKŞİ
Ankara, Temmuz 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGE DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Elektrokimya	5
2.1.1 Elektriksel çift tabaka.....	5
2.1.2 Elektrokimyasal Hücrede Kütle Aktarım Yolları.....	7
2.1.3 Potansiyel-Konsantrasyon ilişkisi ve Faradaik İşlemler	8
2.2.4 Elektrokimyasal deneylerde kullanılan sistem ve elektrotlar	9
2.2 Elektroanalitik Teknikler	13
2.2.1 Elektroanalitik tekniklerin sınıflandırılması	15
2.2.1.1 Dönüşümlü voltametri	16
2.2.1.2 Kronoamperometri	22
2.2.1.3 Kare dalga voltametrisi	24
2.2.1.4 Sıyırma voltametrisi.....	28
2.3 Yüzey Karakterizasyon Yöntemleri	31
2.3.1 Elektrokimyasal yöntemler	31
2.3.2 X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS)	35
2.3.3 Yüzey güçlendirilmiş raman spektroskopisi (YGRS).....	36
2.3.4 IR spektroskopisi.....	40
2.4 Nanoparçacıklar	41
2.5 Biyosensörler	46
2.5.1 Biyosensörlerin sınıflandırılması	48
2.5.1.1 Dönüştürme tekniğine göre biyosensörlerin sınıflandırılması.....	48
2.5.1.2 Kullanılan biyoreseptör türlerine göre biyosensörlerin sınıflandırılması ..	50
2.6 İmmüno-sensörler	51
2.6.1 Antikorlar	54
2.6.2 Antikor-Antijen Bağlanma Gücü	56
2.6.3 Antijen-antikor Bağlanma Kinetiği.....	57

2.6.4	İmmunosensörlerin sınıflandırılması	57
2.7	Koliform Bakteriler ve <i>E. coli</i>	60
2.7.1	<i>E. coli</i> belirleme yöntemleri.....	61
2.7.1.1	En muhtemel sayı yöntemi	61
2.7.1.2	Katı besiyeri yöntemi	62
2.7.1.3	Membran filtrasyon yöntemi	62
2.7.1.4	MUG yöntemi	63
2.7.1.5	Elektrokimyasal yöntemler	64
2.8	Kaynak Araştırması.....	64
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	76
3.1	Nanoparçacıkların Hazırlanması	76
3.1.1	Altın nanoparçacıkların hazırlanması	76
3.1.2	Gümüş nanoparçacıkların hazırlanması	76
3.1.3	Au@Ag bimetalik nanoparçacıkların hazırlanması	77
3.1.4	Ag@Au bimetalik nanoparçacıkların hazırlanması	77
3.2	Mikrobiyolojik Çalışmalarda Kullanılan Çözeltilerin ve Besiyerlerinin Hazırlanması.....	79
3.2.1	Tampon çözeltilerin hazırlanması	79
3.2.2	Besiyerlerinin hazırlanması	80
3.2.3	<i>E. coli</i> çözeltilisinin hazırlanması.....	81
3.3	Au@Ag ve Ag@Au Bimetalik Nanoparçacık İşaretli Antikorların Hazırlanması.....	81
3.4	Au@Ag ve Ag@Au Bimetalik Nanoparçacık İşaretli Antikorların <i>E. coli</i> ile Etkileşiminin TEM ile Karakterizasyonu için Gerekli İşlemler.....	83
3.4.1	Kullanılan tespit ve tampon çözeltilerinin hazırlanması.....	83
3.4.2	Nanoparçacık etiketli <i>E. coli</i> görüntülenmesinden önce yapılan ön işlemler	84
3.5	İmmünoessey Protokolünün Polistiren Kuyucuklarda Hazırlanması	85
3.6	İmmünoessey Protokolünün Spektroskopik Olarak Karakterizasyonu....	86
3.6.1	XPS deneyleri	86
3.6.2	YGRS ölçümleri	87
3.6.3	ATR-FTIR analizleri	88
3.7	Elektrokimyasal Çalışmalar	89
3.7.1	Elektrokimyasal çalışmalarda kullanılan seyreltilmiş kral suyu çözeltilisinin hazırlanması	89

3.7.2	Elektrokimyasal olarak <i>E. coli</i> tayini.....	89
3.7.3	Gerçek numunede <i>E. coli</i> tayini.....	91
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	92
4.1	Nanoparçacıkların Karakterizasyonu.....	92
4.1.1	UV-Vis ile karakterizasyon	92
4.1.2	TEM ile karakterizasyon.....	96
4.2	Au@Ag ve Ag@Au Bimetalik Nanoparçacık İşaretli Antikorların <i>E. coli</i> ile Etkileşiminin TEM ile Karakterizasyonu	97
4.3	Spektroskopik Karakterizasyon	100
4.3.1	XPS ile karakterizasyon	100
4.3.2	SERS ile karakterizasyon	104
4.3.3	ATR-FTIR ile karakterizasyon.....	107
4.4	Elektrokimyasal Çalışmalar	111
4.4.1	Altın ve gümüşün dönüşümlü voltametri ile biriktirme potansiyellerinin belirlenmesi	111
4.4.2	Altın ve gümüşün kare dalg sızırma voltametri ile sızırma potansiyellerinin belirlenmesi	113
4.4.3	Elektrokimyasal biyosensör çalışmaları	117
4.4.3.1	Ag@Au nanoparçacıkların kullanıldığı elektrokimyasal biyosensör ile <i>E. coli</i> tayini	118
4.4.3.2	Au@Ag nanoparçacıkların kullanıldığı elektrokimyasal biyosensör ile <i>E. coli</i> tayini	121
4.4.3.3	Au@Ag ve Ag@Au bimetalik nanoparçacıklarla hazırlanan elektrokimyasal biyosensörlerin karşılaştırılması	124
4.4.4	Su örneklerinde <i>E. coli</i> tayini	125
5.	SONUÇLAR	127
	KAYNAKLAR	128
	ÖZGEÇMİŞ	134

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ASV	Anodik sıyırma voltametri
ATR	Azaltılmış toplam yansıtma
APTES	3-aminopropil trietoksisilan
CA	Kronoamperometri
CV	Dönüşümlü voltametri
DTNB	5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit)
E_b	Bağlanma enerjisi
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
E_k	Saçılan elektronların kinetik enerjileri
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
ETH	Etkin tarama hızı
FTIR	Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi
GC	Camsı karbon
IgG	İmmünoglobülin G
IL-2	İnterlökin-2
ITO	İndiyum kalay oksit
LOD	Alt tayin sınırı
MBA	4-merkaptobenzoik asit
MES	N-morfolinoetan sülfonik asit tamponu
MUA	Merkaptoundekanoik asit
NHS	N-hidroksisüksinimid
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PBST	Fosfat-Tween 20 tampon çözeltisi
PS	Polistiren
PVP	Polivinilpirolidon
QCM	Kuartz kristal mikrobals
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SPR	Yüzey plasmon rezonans
SWSV	Kare dalga sıyırma voltametri
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu

w	İş fonksiyonu
XPS	X-ışınları fotoelektron spektroskopisi
YGRS	Yüzey güçlendirilmiş raman spektroskopisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Elektriksel çift tabakanın şematik olarak gösterilmesi	5
Şekil 2.2	Elektriksel çift tabaka boyunca potansiyelin değişim grafiği	6
Şekil 2.3	Elektrokimyasal hücrede meydana gelen kütle aktarım yolları	8
Şekil 2.4	Üçlü elektrot sisteminin şematik gösterimi	10
Şekil 2.5	Elektroanalitik tekniklerin sınıflandırılması	16
Şekil 2.6	Dönüşümlü voltametriye uygulanan potansiyelin zamanla değişimi	17
Şekil 2.7	Tersinir bir redoks reaksiyonu için tipik bir dönüşümlü voltamogram	18
Şekil 2.8	Redoks çiftinin dönüşümlü voltametri deneyi esnasında farklı zamanlardaki indirgenen ve yükseltgenen türlerinin konsantrasyon dağılımı	19
Şekil 2.9	Kronoamperometrik çalışmalarda (A) Potansiyel-zaman dalga biçimi, (B) Konsantrasyon profilinin zamanla değişimi, (C) Akım-zaman değişimi	22
Şekil 2.10	Kare dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu	25
Şekil 2.11	Kare dalga voltametrisinde tersinir bir tepkime için net akım	27
Şekil 2.12	Diazonyum tuzu ile modifiye edilen yüzeyin hazırlanması	32
Şekil 2.13	Ferrisiyanür çözeltisinde diazonyum antikor modifiye elektrotlar	32
Şekil 2.14	Altın nanoparçacık etiketli antikorun hazırlanması ve altın elektrot üzerine modifikasyonu	34
Şekil 2.15	EIS ile karakterizasyon	35
Şekil 2.16	ATR kristaline gelen ışının davranışı	41
Şekil 2.17	Nanoparçacık sınıflandırılması için uzunluk skalası	42
Şekil 2.18	Metal nanoparçacıkların hazırlanma yöntemleri	44
Şekil 2.19	Sitrat indirgemesi ile hazırlanan Au-Pt bimetallik nanoparçacıkların UV-Vis spektrumu	45
Şekil 2.20	Bir biyosensörün şematik gösterimi	47
Şekil 2.21	Biyosensörlerin sınıflandırılması	48
Şekil 2.22	Doğrudan ve doğrudan olmayan immünosensörlerde ölçüm prensipleri ..	53
Şekil 2.23	İmmünosensörlerin hazırlanma metotları	54
Şekil 2.24	Tipik bir IgG molekülü yapısı	55
Şekil 2.25	Dequaire ve arkadaşlarının elektrokimyasal ölçümlerini gerçekleştirdiği elektrot düzeneğinin şematik gösterimi	65
Şekil 2.26	Gümüş nanoparçacık etiketin kullanıldığı DNA hibritleşmesinin	

	elektrokimyasal sıyırma voltametri ile tayininin şematik gösterimi	66
Şekil 2.27	Wang ve arkadaşlarının sentezledikleri altın nanoparçacıkların a. UV-Vis spektrumu, b. TEM görüntüsü	67
Şekil 2.28	Wang ve arkadaşları tarafından hazırlanan altın kaplı demir nanoparçacık etiketli DNA tayin protokolünün şematik gösterimi	68
Şekil 2.29	Chen ve arkadaşlarının elde ettiği (A) İnsan IgG için voltamogram, (B) indirgenme pik akımına karşı insan-IgG derişiminin kalibrasyon grafiği	69
Şekil 2.30	Adenin, 2-aminopurin ve 2,6 diaminopurinin 20µL'lık Cu(II) ile dönüşümlü voltamogramı	71
Şekil 2.31	DNA hibritleşmesi ve tayini için geliştirilen yöntemin şematik gösterimi	72
Şekil 2.32	a. 0-500 mg/L arasında değişen konsantrasyonlarda kafeinin kare dalga sıyırma voltamogramı, b. Kalibrasyon grafiği	73
Şekil 2.33	Pournaghi-Azar ve arkadaşlarının kullanmış oldukları (A) Kalem grafit elektrot, (B) Elektrot yüzeyin kesit yüzeyi	74
Şekil 2.34	Guzel ve arkadaşları tarafından camsı karbon elektrot yüzeyine biriktirilen a. HS(CH ₂) ₂ CONHPhSH, b. AuS(CH ₂) ₂ CONHPhSH, c. AuS(CH ₂) ₂ CONHPhS(Au@Ag) yapılarının SERS spektrumları	75
Şekil 3.1	Au@Ag bimetallik nanoparçacıkların sentez basamaklarının şematik gösterimi	77
Şekil 3.2	Ag@Au bimetallik nanoparçacıkların sentez basamaklarının şematik gösterimi	78
Şekil 3.3	Nanoparçacıkların görüntüleri	78
Şekil 3.4	Merkaptoundekanoik asit ile etkileştirilen bimetallik nanoparçacıkların şematik gösterimi	82
Şekil 3.5	MUA ile modifiye edilen bimetallik nanoparçacıkların EDC-NHS karışımı ile etkileştirilmesinin şematik olarak gösterimi	82
Şekil 3.6	Avidin ve biyotin işaretli antikor ile etkileştirilen BNP'ların şematik gösterimi	83
Şekil 3.7	5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit (DTNB)' in kimyasal yapısı	87
Şekil 4.1	Sentezlenen monometallik altın nanoparçacıkların UV-Vis spektrumu	93
Şekil 4.2	Sentezlenen monometallik gümüş nanoparçacıkların UV-Vis spektrumu	94

Şekil 4.3	Sentezlenen Ag@Au bimetalik nanoparçacıkların UV-Vis spektrumu	95
Şekil 4.4	Sentezlenen Au@Ag bimetalik nanoparçacıkların UV-Vis spektrumu	95
Şekil 4.5	Sentezlenen Ag@Au bimetalik nanoparçacıkların farklı bölgelerden alınan TEM görüntüleri	96
Şekil 4.6	Sentezlenen Au@Ag bimetalik nanoparçacıkların TEM görüntüleri	97
Şekil 4.7	Yalın <i>E. coli</i> 'nin TEM görüntüleri	98
Şekil 4.8	İmmünoessey yoluyla bimetalik nanoparçacıklarla bağlanan <i>E. coli</i> 'nin TEM görüntüsü.....	99
Şekil 4.9	Oksijenin XPS Spektrumu.....	101
Şekil 4.10	Karbonun XPS Spektrumu	102
Şekil 4.11	Azotun XPS Spektrumu	103
Şekil 4.12	Gümüşün XPS Spektrumu	103
Şekil 4.13	DTNB'nin kullanıldığı nanoparçacıklarla etiketlenen <i>E. coli</i> ile nanoparçacıklarla etiketlenmeden alınan <i>E. coli</i> yüzeylerinin YGRS deneyleri için şematik gösterimi	105
Şekil 4.14	Yüzeylerin YGRS Spektrumu	106
Şekil 4.15	DTNB'nin kullanıldığı nanoparçacıklarla etiketlenen <i>E. coli</i> ile nanoparçacıklarla etiketlenmeden alınan <i>E. coli</i> yüzeylerinin ATR-FTIR analizleri için şematik gösterimi	108
Şekil 4.16	Polistiren kaplı GC yüzeyi üzerinde birincil antikorun <i>E. coli</i> ile etkileşiminden sonra alınan spektrumu	109
Şekil 4.17	Ag@Au bimetalik nanoparçacık işaretli ikincil antikorun <i>E. coli</i> ile etkileşiminden sonra alınan ATR-FTIR spektrumu	110
Şekil 4.18	Au@Ag bimetalik nanoparçacık işaretli ikincil antikorun <i>E. coli</i> ile etkileşiminden sonra alınan ATR-FTIR spektrumu	110
Şekil 4.19	Seyreltilmiş kral suyunda hazırlanan H ₂ AuCl ₄ 'ün dönüşümlü voltamogramı.....	112
Şekil 4.20	0.1 M HNO ₃ içerisinde hazırlanan AgNO ₃ 'ün dönüşümlü voltamogramı.....	113
Şekil 4.21	Seyreltilmiş kral suyunda altının sıyırma voltamogramı.....	114
Şekil 4.22	0.1 M nitrik asit çözeltisi içerisinde gümüşün sıyırma voltamogramı.....	115
Şekil 4.23	Seyreltilmiş kral suyunda çözünen Ag nanoparçacıkların kare dalga sıyırma voltametri ile sıyırma voltamogramı.....	116

Şekil 4.24	Destek çözeltisi içerisinde sıyırma voltamogramı.....	117
Şekil 4.25	Bimetalik nanoparçacık ile işaretlemenin kullanıldığı elektrokimyasal immünoşensörün şematik gösterimi	118
Şekil 4.26	Elektrokimyasal çalışmalarda kullanılan üç kuyunun şematik gösterimi	118
Şekil 4.27	10^5 ve 10^1 kob/mL dilüsyon aralığında kullanılan <i>E. coli</i> ile değişen Au^{3+} 'ün sıyırma voltamogramı.....	120
Şekil 4.28	<i>E. coli</i> 'nin Au^{3+} 'nin sıyırma akımına karşı çizilen kalibrasyon grafiği	121
Şekil 4.29	10^5 ve 10^1 kob/ mL dilüsyon aralığında kullanılan <i>E. coli</i> ile değişen Ag^+ 'in sıyırma voltamogramı.....	122
Şekil 4.30	<i>E. coli</i> 'nin Ag^+ 'nin sıyırma akımına karşı çizilen kalibrasyon grafiği	123

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 4.1	Su örneklerinde geliştirilen elektrokimyasal analiz yöntemi ve kültürel sayım yöntemiyle elde edilen sonuçlar.....	126
-------------	--	-----

1. GİRİŞ

Son yıllarda nano boyutta madde sentezlenmesi, karakterizasyonu ve uygulamaları birçok araştırmacının dikkatini çeken ve yoğun bir şekilde araştırılan konular arasında yer almıştır. Nanoparçacıklar, genellikle 100 nm'den küçük boyutlardaki parçacıklar olarak tanımlanır. Nanoparçacıklar, küçük boyutlarda ve geniş yüzey alanlarına sahip olmalarından dolayı mikro- ve makro materyallerden birçok bakımdan farklı özellikler gösterirler. Bu özellikleri nedeniyle spektroskopik, optik, elektronik ve kimyasal uygulama alanlarında büyük önem taşırlar (Thomas 2008).

Son zamanlarda, çekirdek/kabuk (core-shell) nanoparçacıklar yaygın uygulama alanı bulmuştur. Çekirdek/kabuk nanoparçacıklar, çekirdek materyalin bir başka materyalle kaplanmasıyla oluşan nano yapılarıdır. Çekirdek/kabuk nanoparçacıkların boyutu 20 nm - 200 nm arasında değişebilmektedir. Nanoparçacıkların boyutu göz önüne alınarak, parçacıkların kümelenmesini engellemek amacıyla kabuk kısmı ortamda kararlı kalmasını sağlayacak bir madde ile de kaplanabilmektedir. Çekirdek/kabuk yapılar nanoparçacıkların termal ve kimyasal kararlılığını artırır, çözünürlüğünü geliştirir ve bu parçacıkların başka moleküllerle birleşmesini kolaylaştırır. Kabuk aynı zamanda çekirdek materyalin yükseltgenmesini de önler. Çekirdek/kabuk yapılar inorganik ve organik olmak üzere iki grupta sınıflandırılabilir.

İnorganik çekirdek/kabuk nanoyapılarda hem çekirdek hem de kabuk, inorganik maddelerden (yarı iletken, metal veya metal oksitleri) oluşur. Sentezlerde en çok kullanılan nanoparçacıklar metaller, yarı iletkenler ya da lantanitlerdir. Organik çekirdek/kabuk nanoyapılar ise çekirdek organik-kabuk inorganik; çekirdek inorganik-kabuk organik ya da polimerik çekirdek-kabuk yapılar olabilir. Uygulamalarda biyoyumlu olduğu için inorganik çekirdek-kabuk yapılar daha çok tercih edilmektedir (Manocha 2006, Mihai 2007).

Yukarıda da belirtildiği gibi çekirdek/kabuk nanoparçacıklar çeşitli endüstri dallarında geniş uygulama alanları bulmaktadır. Özellikle metal çekirdek/kabuk nanoparçacıklar

kimyasal, elektronik, biyomedikal, inşaat ve makine endüstrilerinde kullanılmaktadır. Nanoparçacıklar, çevre özelliklerindeki çok küçük değişmelere karşı yüksek ve hızlı duyarlılığa sahip olduklarından dolayı katalizör, modifiye edici, termal ve mekanik özellikleri artırıcı sensör materyaller olarak da kullanılırlar. Bu özellikleri nedeniyle biyomedikal endüstrisinde büyük öneme sahip oldukları bilinmektedir. Nanoparçacıklar, biyomedikal endüstrinin çeşitli dallarında biyo görüntüleme, ilaç korunması, biyo işaretleyici ve organ naklinde de uygulama alanı bulmaktadır (Wang 2003).

Biyosensörler, hızlı cevap yetenekleri ve kullanım kolaylıkları sebebiyle klinik cihazlarda, eczacılıkta ve gıda endüstrisinde son yıllarda önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. Biyosensör yapımında kullanılan enzimlerin kararlılığı çok önemli bir parametredir. Enzimatik aktiviteyi ve kararlılığı geliştirmek için çeşitli immobilizasyon teknikleri kullanılmaktadır. Nanoyapılı malzemeler, büyük yüzey/hacim oranı, yüksek yüzey reaksiyon ve katalitik aktivite ve güçlü adsorpsiyon yeteneği gibi özellikleri sebebiyle özellikle biyosensör yapımında tercih edilirler. Nanomalzemeler yüksek yüzey alanına sahip olmalarından dolayı enzimlerin immobilizasyonunda daha iyi bir matris görevi görürler. Enzim moleküllerinin birden fazla kısımdan nanomalzemeye bağlanması proteinin ayrılmasını zorlaştırarak, nanomalzeme yüzeyinde bağlı olan enzimin kararlılığını arttırmaktadır. Enzim bağlı nanoparçacık çözeltide bulunan serbest enzim gibi davranır ve enzim-substrat etkileşimini arttırarak serbest enzimin agregasyonunu engeller.

Etkileyici optik ve elektronik özelliklere sahip olan altın nanoparçacıklar, enzimler için uygun ortam sağlamalarından dolayı biyouyumlu malzemeler olarak tanımlanmaktadır. Altın nanoparçacıklar aynı zamanda elektron transferi için enzimin aktif merkezi ile elektrot yüzeyi arasındaki elektron transfer hızını arttıran bir mediatör olarak ta kullanılmaktadır (Pandey 2007).

Koliform grup bakteriler, Enterobacteriaceae familyası içinde yer alan, fakültatif anaerob, gram negatif, spor oluşturmeyen, 35°C'de 48 saat içinde laktozdan gaz ve asit

oluşturan, çubuk şeklindeki bakterilerdir. Bu grupta yer alan ve gıda mikrobiyolojisi açısından önemli olan mikroorganizmalar; *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* 'dir. Koliform grup mikroorganizmalara pek çok gıda hammaddesinde rastlanmaktadır. Bunların başında taze sebzeler, taze yumurta, çiğ süt, kanatlı etleri ve koliform bakımından sayıca zengin suların alınmasıyla gelen kabuklu ve diğer su ürünleri gelmektedir.

Gıdalarda koliform mikroorganizmaların bulunması, kötü sanitasyon koşullarının, yetersiz veya yanlış pastörizasyon uygulamalarının, pişirme ve pastörizasyon sonrası tekrar bulaşma olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Koliform grubu mikroorganizmaların hepsi dışkı kökenli değildir. Bu grupta bulunan bakterilerden normal florası, insanların ve sıcakkanlı hayvanların alt sindirim sistemleri olanlar "fekal koliform" olarak tanımlanmakta ve bunlar fekal kontaminasyonun bir göstergesi olarak kabul edilmektedirler. Koliform grup içinde fekal koliform olarak tanımlanan bakterilerin büyük çoğunluğunun *E. coli* olduğu bilinmektedir. Grubun diğer üyeleri toprak ve bitki kökenli olabilmektedirler. Herhangi bir örnekte *E. coli*'ye ve/veya fekal koliform bakterilere rastlanması o örneğe doğrudan ya da dolaylı olarak dışkı bulaştığının ve yine bağırsak kökenli *Salmonella* ve *Shigella* gibi primer patojenlerin de olabileceğinin bir göstergesidir. Bu nedenle hiçbir gıda maddesinde, içme ve kullanma sularında, denizlerde ve göllerde *E. coli* ve fekal koliform bulunmasına izin verilmezken, bazı gıdalarda belirli sayıda koliform bakteri bulunmasına izin verilebilmektedir. *E. coli* fekal kontaminasyonun bir göstergesi olması yanında genetik yapısı en iyi bilinen canlı olma özelliğine de sahiptir. Suşlarının birçoğu zararsız olan bu bakterinin bazı patojenik tipleri, insan ve hayvanlarda sonucu ölüme kadar giden ishallere, yara enfeksiyonlarına, menenjit, septisemi, arteriosklerosis, hemolitik üremik sendrom, çeşitli immünolojik hastalıklar vb. gibi hastalıklara sebep olabilmektedir (Çakır 2000).

Bu araştırmada insanların tüketimine sunulan maddelerde *E. coli* bakterisinin elektrokimyasal biyosensörler kullanılarak belirlenmesi hedeflenmektedir. Son zamanlarda elektrokimyasal biyosensörler için nanomateryaller biyomolekül etiketleyici olarak kullanılmaktadır. Nanoparçacıklar enzim etiketleyicilere göre daha kararlı ve

yüksek hassaslığa sahiptirler. Bu açıdan nanoparçacıklardan yararlanılarak biyosensörlerin oluşturulmasının literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmüştür.

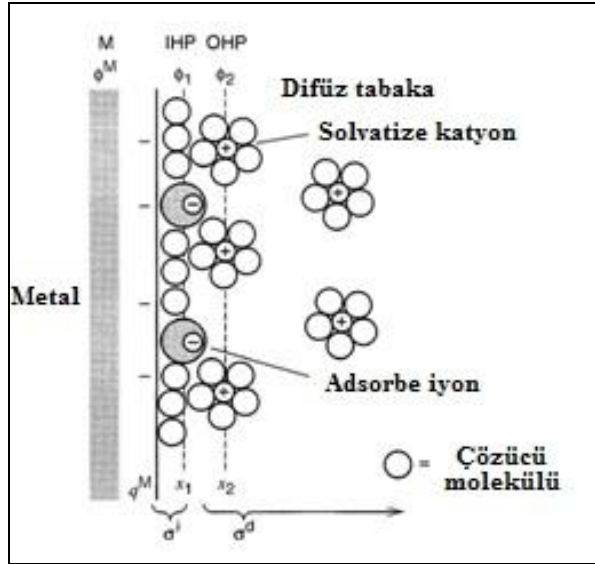
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Elektrokimya

Elektrokimya, maddenin elektrik enerjisi ile etkileşmesi sonucu meydana gelen fiziksel ve kimyasal değişiklikleri inceleyen bilim dalıdır.

2.1.1 Elektriksel çift tabaka

Elektriksel çift tabaka her malzemenin arayüzünde var olan yüklü parçacıklar ve/veya yönlenmiş dipoller dizisidir. Elektrokimyada böyle bir tabaka elektrot üzerindeki yükün fazlasını dengelemek için çözelti içerisinde oluşan iyonik bölgeleri göstermektedir (q_e). Arayüzün nötral olması ($q_e + q_s = 0$) için pozitif yüklü elektrot negatif yüklü tabakayı çekmektedir. Karşı tabaka elektrodunkinden zıt yüklü iyondan oluşmaktadır. Şekil 2.1'de elektriksel çift tabakanın kompleks yapısı görülmektedir.



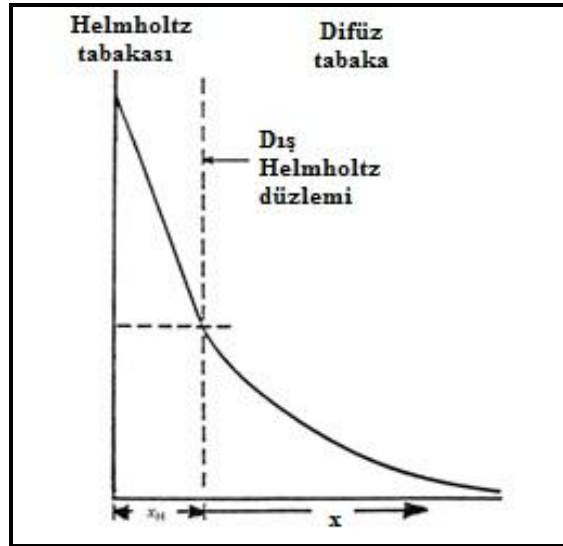
Şekil 2.1 Elektriksel çift tabakanın şematik olarak gösterilmesi

İç tabaka (elektroda yakın olan kısım), iç Helmholtz düzlemi (IHP) olarak adlandırılır. Çözücü moleküllerini ve adsorplanan iyonlarını içerir. Bu tabakada elektrot yüzeyinden

uzaklaştıkça ortaya çıkan potansiyel uzaklık ile doğru orantılı olarak azalır. Bir sonraki tabaka dış Helmholtz düzlemi (OHP) olarak adlandırılır ve yüzeye en yakın durumdaki solvate iyonların merkezinden geçen sanal düzlemi gösterir. Solvate iyonlar spesifik olmayan bir şekilde adsorplanmışlardır ve uzun mesafeli Coulomb kuvvetleriyle yüzeye çekilirler. Helmholtz tabakalarının her ikisi de yoğun tabakayı temsil ederler. Bu tabakada elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça potansiyel, uzaklık ile doğru orantılı olarak azalır.

Dış tabaka, difüz tabaka olarak adlandırılır ve saçılan iyonlardan oluşan, OHP'den bulk çözeltiliye doğru genişleyen üç boyutlu bir bölgedir. Bu tabakada elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça ortaya çıkan gerilim üstel olarak azalır.

Elektrot yüzeyindeki ve yüzeye bitişik çözeltideki bu yük topluluğu "elektriksel çift tabaka" olarak adlandırılır (Bard ve Faulkner 2001). Şekil 2.2'de elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça potansiyel değişimi verilmiştir (Wang 2000).



Şekil 2.2 Elektriksel çift tabaka boyunca potansiyelin değişim grafiği

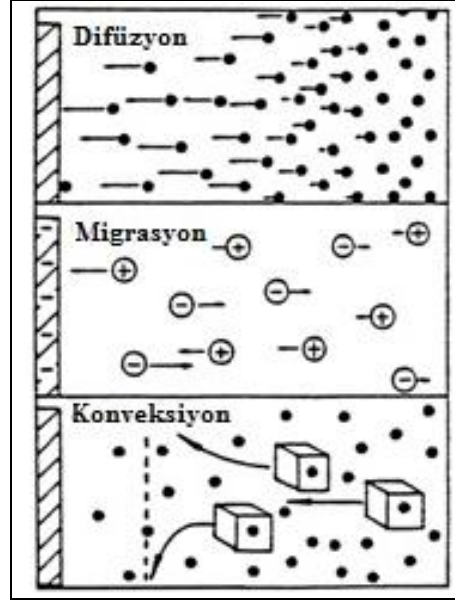
2.1.2 Elektrokimyasal hücrede kütle aktarım yolları

Elektrokimyasal hücrede maddenin bir yerden başka bir yere hareketine kütle aktarımı denir. Hücrede elektrot yüzeyine kütle aktarımı üç yolla gerçekleşir. Bu kütle aktarım yolları, elektriksel göç (migrasyon), difüzyon ve karıştırma (konveksiyon) olarak adlandırılır. Uygulanan analizin türüne de bağlı olarak bu olaylardan biri ya da birkaçı kütle aktarımına katkı sağlar. Şekil 2.3’de belirtilen kütle aktarım yollarının şematik gösterimi verilmiştir.

Elektriksel Göç (Elektriksel Migrasyon): Elektriksel alanın etkisi altındaki yüklü parçacıkların hareketidir. Pozitif yüklü iyonların negatif yüklü elektroda ya da negatif yüklü iyonların pozitif yüklü elektroda hareketi ile sağlanır. Hemen tüm elektrokimyasal analiz yöntemlerinde elektriksel göç etkisi istenmez, bunu engellemek için genelde elektrolit çözeltisine bu göçü kendi üzerine alacak KCl, HNO₃ gibi derişimi 0.1–1 M arasında değişen elektrolitler katılır.

Karıştırma (Konveksiyon): Sıcaklık/yoğunluk farkına ya da çözeltinin karıştırılması, elektrodun döndürülmesi, titreştirilmesi ile oluşan mekanik bir harekete dayanan bir kütle aktarım yoludur. Genellikle akan bir sıvı yoğunluk farkından dolayı doğal bir konveksiyon meydana getirirken, karıştırma ise dış bir etki ile konveksiyon oluşturur.

Difüzyon: Elektrotta tüketilen elektroaktif maddenin arayüzeyde azalan derişimini artırmak üzere çözeltiden madde aktarımı difüzyon adını alır. Difüzyonla kütle aktarımının hızı, arayüzeyle çözeltinin iç kesimleri arasındaki derişim farkına ve elektroaktif madde ile çözücünün türlerine bağlıdır. Difüzyon, kütle aktarım çalışmalarında üzerinde en çok çalışılmıştır. Elektrokimyasal sistemler genelde bir ya da iki kütle aktarım türlerinin yok sayılacağı şekilde tasarlanır (Wang 2000, Bard ve Faulkner 2001).

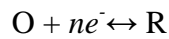


Şekil 2.3 Elektrokimyasal hücrede meydana gelen kütle aktarım yolları

2.1.3 Potansiyel-konsantrasyon ilişkisi ve Faradaik işlemler

Kontrollü potansiyelin uygulandığı elektrokimyasal deneylerde amaç, analitin derişimiyle orantılı olan akım yanıtını elde etmektir. Elektrot-elektrolit ara yüzeyinde meydana gelen redoks tepkimesi sırasında akım, elektronların doğrudan aktarımı yoluyla iletilir.

Çözelti ve elektrot arasındaki yüzeyden akımın iletimi sırasında, elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonları olurken diğesinde indirgenme reaksiyonu meydana gelir. Bu reaksiyonlarda;



O ve R, sırasıyla, redoks çiftinin yükseltgenmiş ve indirgenmiş şeklini göstermektedir. Termodinamik kurallarla kontrol edilen sistemlerde, elektrot potansiyeli (E), elektroaktif türünün elektrot yüzeyindeki derişiminin (C_o ve C_R), Nernst Denklemine göre saptanmasında kullanılabilir.

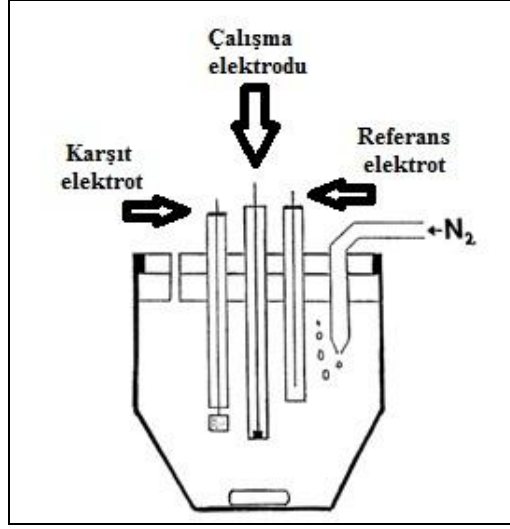
$$E = E_0 + \left(\frac{2.3RT}{nF} \right) \log \frac{C_0}{C_R}$$

Bu denklemde E^0 , redoks tepkimesi için standart potansiyeli; R, gaz sabitini ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T, sıcaklık ($^{\circ}\text{K}$), n, elektrot tepkimesinde aktarılan elektron sayısını ve F, Faraday sabitini ($96.487 \text{ coulomb mol}^{-1}$) göstermektedir.

Elektrot çözelti ara yüzeyinden akım iki tip işlemle iletilir. Birincisinde, elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonu olurken diğerinde indirgenme reaksiyonu olur, bu sırada elektronların doğrudan aktarımı ile akım iletilir. Bu tip işlemlere, bir elektrottaki kimyasal reaksiyon miktarının geçen akımla orantılı olduğunu ifade eden Faraday yasalarına uygun olması nedeniyle **Faradaik işlemler** adı verilir, bu şekilde oluşan akımlara **Faradaik akımlar** denir. Kısacası; bir elektrokimyasal hücrede elektrot/çözelti ara yüzeyi boyunca bir yükseltgenme/indirgenme işlemiyle taşınan akımdır. Reaksiyondan (analiz edilecek maddeden) kaynaklanan akımdır (Skoog vd. 1998).

2.1.4 Elektrokimyasal deneylerde kullanılan sistem ve elektrotlar

Üçlü elektrot sistemler elektrokimyasal deneylerde sıklıkla kullanılırlar. Bir üçlü elektrot sistemi elektrolit içerisine daldırılmış çalışma, karşıt ve referans adı verilen üç elektrottan oluşur. Şekilde üçlü elektrot sisteminin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.4 Üçlü elektrot sisteminin şematik gösterimi

Çalışma elektrodu: Yük aktarımının gerçekleştiği, yüzeyinde elektroaktif türün yükseltgendiği veya indirgendiği elektrottur. Çok çeşitli türde çalışma elektrodu bulunmaktadır. En sık kullanılan elektrotlar civa, metal (platin veya altın gibi) ve karbon elektrotlardır. Kullanılan çalışma elektrotlarının yüzey alanları, polarizasyonu arttırmak için küçük tutulmaktadır. İdeal bir çalışma elektrodu geniş bir potansiyel aralığına ve düşük dirence sahip olmalı, kolay temizlenebilmeli ve sinyal/gürültü oranı yüksek olmalıdır. Çalışılan elektrodun potansiyel aralığının belirlenmesi çok önemlidir. Elektrotların potansiyel aralığı, elektrodun malzemesine ve çalışılan elektrolitin bileşimine bağlıdır. Pozitif potansiyel sınırları genellikle moleküler oksijen verecek şekilde, suyun yükseltgenmesi sonunda oluşan büyük akımlarla belirlenir. Negatif potansiyel sınırları yine suyun indirgenmesi sonunda oluşan hidrojen kaynaklanır.

Karbon temelli katı elektrotlar; geniş bir potansiyel penceresinde çalışmaya olanak sağlaması, yüzey kimyasının zengin olması, inert olmaları, düşük artık akım vermeleri, yüksek duyarlılığı ve ucuzluğu nedeniyle elektrokimyasal analizlerde sık kullanılan elektrotlardır. Elektron aktarım hızları metal elektrottakinden daha yavaş gerçekleşmektedir. (Wang 2000). En sık kullanılan karbon elektrotlar; camsı karbon, karbon pasta, karbon fiberler ve kalem grafitidir.

Çalışmamızda oldukça kolay hazırlanması, tek kullanımlık ve ucuz olması nedeniyle kalem grafit elektrot çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda bu elektrotlarla alınan sonuçların daha tekrarlanabilir olduğu ve daha düşük tayin sınırlarına ulaşılabildiği gözlenmiştir.

Daha önce de belirtildiği şekilde karbon elektrotlarda olduğu gibi tüm katı elektrotlarla çalışılırken en bilinen sorun; analiz sırasında bazı bileşiklerin yükseltgenme ürünlerinin elektrot üzerinde ince bir film olarak birikmesi sonucu analitik yanıtın büyüklüğünün azalması, elektrot temizleme işlemleri uygulansa bile tekrarlanabilirlik kayıplarının oluşmasıdır. Bu nedenle elektrot temizliği, elektrokimyasal tekniklerin analizlerde geniş çapta kullanılmasını kısıtlayıcı en önemli sorundur. 1990'lı yılların sonundan başlayarak el-yapımı kalem grafit (kalem ucu) elektrotlar (PGE) camsı karbon ve karbon pasta elektrotlara tek kullanımlık özelliklerinin yanı sıra çok düşük maliyetlerinden dolayı alternatif olmuşlardır (Bond vd 1997, Wang vd. 2000, Wang ve Kawde 2001). Elektrot olarak farklı sertlik ve çapta her yerde bulunabilen ticari mekanik kurşun kalem uçlarından yararlanılır. Kalem uçları, doğal grafitin kil ve balmumu karışımı içerisine dispersiyonu (dağılması) ve ardından ısı işlem uygulanması ile üretilir. Kil yerine selüloz gibi organik temelli materyal kullanılıp oksijensiz atmosferde yakıldığı zaman selüloz karbon şekline dönüşür. Oluşan yapı son derece elastiktir. PG elektrotlar, ne karbon pasta ve pirolitik karbon kadar kırılğan, ne de camsı karbon kadar serttir. Tek kullanımlık olmaları nedeniyle elektrot temizleme işlemlerine gerek yoktur; dolayısıyla yeni bir elektrot yüzeyi yaratmak çok daha basit ve hızlı olup tekrarlanabilirlik yüksektir.

Literatür taramasında kalem elektrotların pek çok uygulaması görülmektedir. Demetriades ve arkadaşları bir çalışmalarında kalem elektrot kullanarak Cd(II), Pb(II) ve Zn(II) gibi eser elementleri aynı anda tayin etmeyi başarmışlardır (Demetriades vd. 2004). Wang ve arkadaşları kalem elektrotlar ile nükleik asitlerin tayinini gerçekleştirmişlerdir (Wang vd. 2000, Wang vd. 2001). Hepatit B (Erdem vd. 2005) ve hepatit C virüsüne ait DNA dizinleri yine kalem elektrot kullanılarak başarılı bir şekilde tayin edilmiştir. Bunun dışında polisiklik aromatik hidrokarbonların analizinde (Yardım vd. 2010, Keskin vd. 2010), kafein analizinde (Ly vd. 2004) ve Cu(II) varlığında

aminopurinlerin analizinde (Aladağ vd. 2010) çalışma elektrodu olarak kalem elektrot kullanılmıştır. Ayrıca çeşitli ilaç analizlerinin (Masawat vd. 2002, Gao vd. 2005) ve insana ait interlökin-2 geninin (Hejazi vd. 2007) tayini kalem elektrotun kullanıldığı çalışmalara örnek verilebilir.

Kalem ucunun sertlik ve siyahlığı ticari olarak grafit ve kil oranlarının ve sıcaklığının değiştirilmesi ile modifiye edilmektedir. Daha fazla grafit içermesi durumunda daha yumuşak ve daha kalın uçlar elde edilir. Kurşun kalemin sertliği 19 farklı derece olarak 9H (en sert)'den 8B (en yumuşak)'ye kadar değişir. Bu elektrot kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde doğru kalem sertliğinin seçimi de önemlidir (Tavares ve Barbeira 2008).

Referans elektrot: Çalışılan çözeltinin bileşiminden bağımsız olan, hücre potansiyeli sabit olan bir yarı hücredir ve anot olarak ele alınır. Elektrik direnci çok büyük olduğu için hemen hemen hiç akım geçmez. En sık kullanılan referans elektrotlar Ag/AgCl veya doymuş kalomel elektrottur. İdeal bir referans elektrot, kolay hazırlanabilmeli, potansiyelin sıcaklıkla değişim katsayısı küçük olmalı, belli bir akım aralığında tersinir davranmalı, yani içinden küçük akımlar geçtiğinde bile gerilimi sabit kalmalıdır. Polarize edilemeyen bir elektrot olmalı, potansiyeli zamanla değişmemeli, doğru ve tekrarlanabilen bir potansiyel değeri hızlı bir şekilde okunmalıdır (Bard ve Faulkner 2001, Skoog vd. 1998).

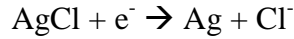
Çalışmamızda Ag/AgCl referans elektrodu kullanıldığı için aşağıda bu referans elektrotla ilgili bilgi verilmiştir.

Gümüş–gümüş klorür referans elektrot

Gümüş–gümüş klorür referans elektrotları oldukça yaygın kullanım alanına sahip olan elektrotlardır. Doymuş kalomel elektrottan üstünlüğü gümüş–gümüş klorür elektrodun doymuş kalomel elektroda göre daha yüksek sıcaklıklarda kullanılabilmesidir. Aynı

zamanda gümüş iyonları civa (I) iyonlarına göre daha az sayıda analitle reaksiyona girerler.

Bir gümüş–gümüş klorür referans elektrot gümüş bir telin, elektrolitik yoldan AgCl ile kaplanarak Cl⁻ iyonu içeren bir çözeltiye daldırılmasıyla elde edilir. Oluşan tepkime şu şekildedir;



Doygun KCl çözeltisi kullanıldığı zaman 25 °C’ de standart hidrojen elektrota göre potansiyeli +0,222 V’ dur.

Karşıt elektrot: Çalışma elektroduyla bir çift oluşturarak onu elektronlarla besler, ortamda oluşabilecek istenmeyen akımların üzerinden geçmesine izin verir. Sinyal kaynağından çıkan elektriğin çözülden geçerek çalışma elektroduna aktarılmasını sağlar. Karşıt elektrotta genellikle bir platin tel veya bir civa havuzudur. Çalışmamızda platin tel karşıt elektrot olarak kullanılmıştır.

2.2 Elektroanalitik Teknikler

Elektroanalitik teknikler, akım, potansiyel veya yük gibi elektriksel miktarların ölçülmesine dayanan ve bunların kimyasal parametrelerle ilişkisini gösteren, elektrik ile kimyanın birleşmesiyle oluşan yöntemlerdir. Elektriksel ölçümlerin analitik amaçlarda kullanımları, çevresel görüntüleme, endüstriyel kalite kontrol ve biyomedikal analizleri içeren uygulamalarda geniş yer almaktadır. 1980’ler ve 1990’lardaki gelişmeler, özellikle ultramikroelektrotların gelişimi, moleküler tek tabakalar ve özel arayüzlerin tasarlanması, biyolojik bileşenler ile elektrokimyasal dönüştürücülerin birleşmesi, moleküler boyutta boşluklar içeren reseptörlerin ve iyonoforların sentezlenmesi, moleküler cihazların mikro boyutta üretimi, elektroanaliz yöntemlerinin popüleritesinde önemli bir artışa yol açarak yeni alanlara yayılmasını sağlamıştır.

Elektroanalitik yöntemlerini avantajlarını sıralayacak olursak,

- Tekrarlanabilirlikleri yüksek hızlı tekniklerdir
- Kullanılan cihazlar diğer yöntemlerde kullanılanlara göre daha ucuzdur.
- Çok düşük tayin sınırlarına inilebilmektedir.
- Elde edilen sonuçlar çoğu zaman bir element ya da molekül için spesifiktir.
- Çok az numune ile çalışılabilmektedir.
- Çok çeşitli elektrotlar kullanılabilir.
- Doğrusallık aralığı geniştir.

Elektroanalitik teknikleri, potansiyometrik ve potansiyostatik olmak üzere iki temel kısma ayırabiliriz. Her iki türde bir elektrokimyasal hücre oluşturmak için en az iki elektrot ve elektrolit çözeltiye gerek duyulmaktadır. Elektrot yüzeyi, iyonik iletken ile elektronik iletken arasında bağlantıyı sağlamaktadır. Bu iki elektrottan biri hedef analite yanıt verir ve bu elektrot indikatör (veya çalışma) elektrodu olarak adlandırılır. Diğer elektrot referans elektrot olarak adlandırılır ve çözelti özelliklerinden bağımsız sabit bir potansiyele sahiptir.

Potansiyometri, örnek bileşimi hakkında bilgi veren akımın sıfır olduğu statik bir tekniktir. Örnek bileşimi, membran boyunca potansiyel ölçümüyle elde edilir. Farklı türde membran malzemeleri, farklı iyon tanıma işlemlerine sahip olmak yüksek seçiciliği sağlamak için geliştirilmiştir.

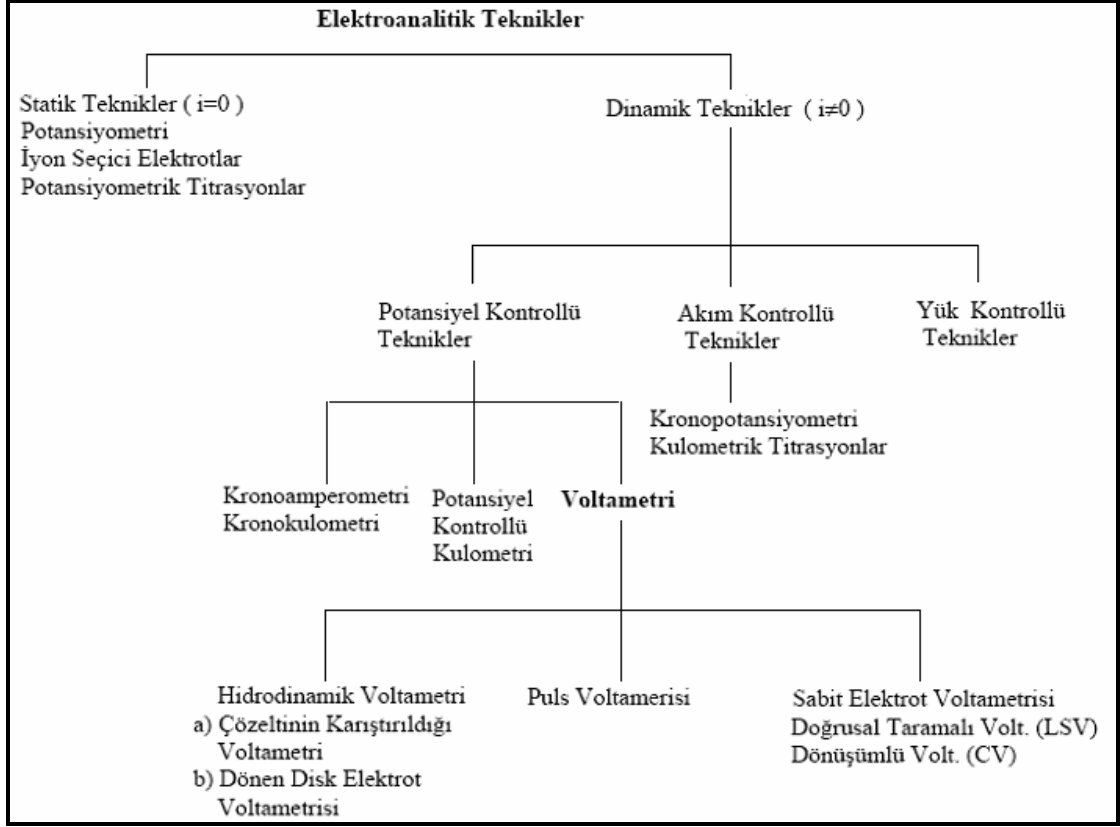
Kontrollü potansiyel (potansiyostatik) tekniklerinde elektrot-çözelti ara yüzeyindeki yük transfer işlemleri çalışılmaktadır. Bu teknikler akımın sıfır olmadığı dinamik hallere dayanmaktadır. Burada elektrot potansiyeli elektron transfer reaksiyonu oluşturmak için kullanılır ve meydana gelen akım ölçülür. Potansiyel burada “elektron basıncı” olarak görev yapan kontrol edilebilir bir parametredir. buradaki rolü, optik ölçümlerdeki dalga boyu ile benzerdir. Bu basınç kimyasal türlerin elektron kazanmasına veya kaybetmesine (indirgenme veya yükseltgenmesine) neden olur. Bundan dolayı

meydana gelen akım elektrot-çözelti arayüzeyinde dolaşan elektronların hızlarına yansır. Potansiyostatik teknikler, elektroaktif olan herhangi bir kimyasal türü ölçebilir. Verilen bileşikteki fonksiyonel grubun reaktiflik bilgisi o bileşiğin elektroaktifliğini tahmin etmek için kullanılabilir. Elektroaktif olmayan bileşikler doğrudan olmayan veya türevlendirme yöntemleri ile bağlanarak da tayin edilebilirler.

Kontrollü potansiyel tekniklerin avantajları, yüksek hassasiyet, elektroaktif türlere karşı seçicilik, geniş bir doğrusal aralık, taşınabilir ve düşük maliyetli teçhizat, değişik ortamlarda kullanılacak birçok elektrot seçeneği bulundurmasıdır (Wang 2000).

2.2.1 Elektronalitik tekniklerin sınıflandırılması

Elektroanalitik tekniklerin temeli çözelti-elektrot sistemine bir elektriksel etki uygulandığında sistemde meydana gelen değişimin ölçülmesi prensibine dayanır. Hemen hemen bütün elektrokimyasal teknikte potansiyel, akım ve zaman parametreleri bulunmaktadır. Bu parametreler tekniklerin adlandırılmasında kullanılmaktadır. Örneğin, voltametri tekniğinde potansiyel-akım parametrelerinden yararlanıldığı tekniğin adından açıkça görülmektedir. Elektroanalitik tekniklere birçok sınıflandırma literatürde mevcuttur. Bunlardan en yaygın olanı şekil 2.5’de gösterilmiştir.



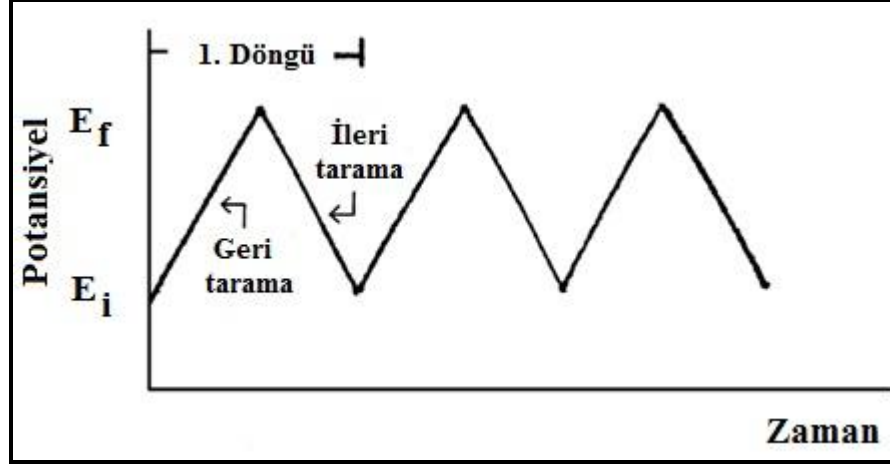
Şekil 2.5 Elektroanalitik tekniklerin sınıflandırılması

Burada çalışmada yer alan dönüşümlü voltametri, kronoamperometri ve sıyırma voltametri hakkında geniş bilgi verilecektir.

2.2.1.1 Dönüşümlü voltametri

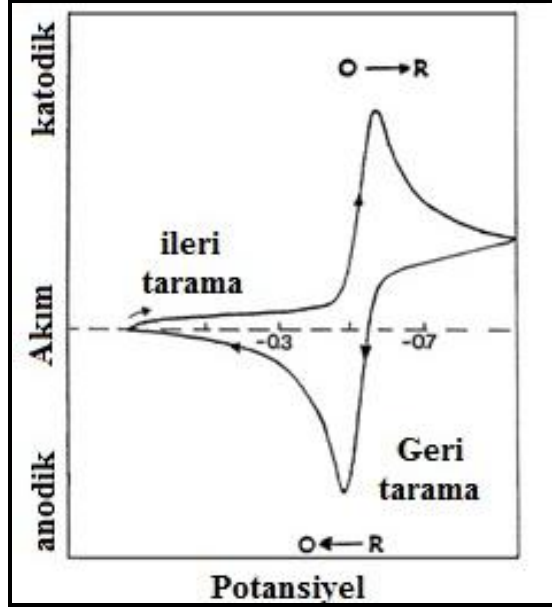
Dönüşümlü voltametri elektrokimyasal reaksiyonlarda kalitatif bilgi elde etmek için sık kullanılan bir tekniktir. Dönüşümlü voltametrimin kuvvetli bir teknik olmasının sebebi, redoks sürecinin termodinamiği, heterojen elektron transferinin kinetiği ve birleşik kimyasal reaksiyonlar veya adsorpsiyon hakkında hızlı bir şekilde önemli bilgi verebilmesidir. Dönüşümlü voltametri, bir elektrokimyasal çalışmada ilk uygulanan tekniktir. Bu teknik özellikle, elektroaktif türlerin redoks potansiyellerinin hızlı bir şekilde yerlerinin saptanmasını ve redoks işleminde ortamın etkisinin uygunluğunun belirlenmesini sağlarlar. Dönüşümlü voltametri tekniği, belli bir tarama hızında çalışma elektroduna, hem ileri hem de geri yönde bir potansiyelin uygulanması sırasında akımın

izlenmesi prensibine dayanır. Dönüştümlü voltametri deneyinde uygulanan potansiyelin zamanla değişimi şekil 2.6'da görüldüğü gibidir.



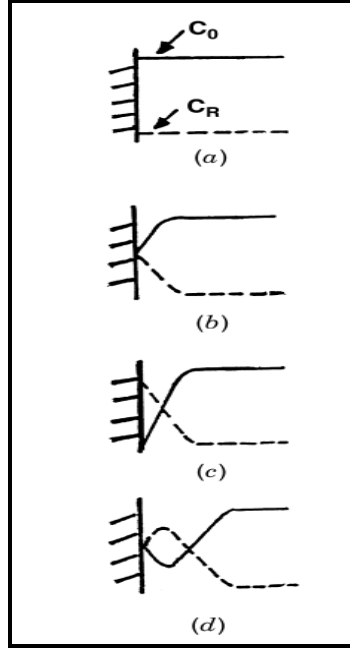
şekil 2.6 Dönüştümlü voltametricde uygulanan potansiyelin zamanla değişimi

Dönüştümlü voltametric üçgen dalga potansiyel formunu kullanarak sabit çalışma elektrot potansiyeli doğrusal tarama oluşur. İstenilen bilgilere dayanılarak, tek ya da çoklu döngüler kullanılabilir. Potansiyel basamağı sırasında potansiyostat uygulanan potansiyel sonucunda oluşan akımı ölçer. Potansiyele karşı çizilen akıma ait grafik dönüştümlü voltamogram olarak adlandırılır. Dönüştümlü voltamogram çok sayıda fiziksel ve kimyasal parametrenin zamana bağlı karmaşık bir fonksiyondur.



Şekil 2.7 Tersinir $O + ne^- \leftrightarrow R$ redoks reaksiyonu için tipik bir dönüşümlü voltamogram

Şekilde tersinir redoks çiftinin tek bir potansiyel döngü sırasında beklenen davranışı görülmektedir. Başlangıçta sadece O'nun yükseltgenmiş hali bulunmaktadır. Böylece ilk yarım döngü için indirgemenin meydana gelmediği bir potansiyel değerinden başlayan negatif yönde bir potansiyel seçilmektedir. Uygulanan potansiyel redoks işleminde karakteristik bir E° değerine ulaştığında, pik oluşuncaya kadar katodik akım artmaya başlar. İndirgemenin meydana geldiği potansiyel bölgenin gezilmesinden sonra, potansiyel taramanın yönü ters çevrilir. Ters tarama sırasında R molekülleri (ileri yöndeki yarım döngüde oluşan ve yüzeye yakın yerde biriken) yeniden O moleküllerine yükseltgenir ve anodik akım oluşur (Wang 2000).



Şekil 2.8 Redoks çiftinin dönüşümlü voltametri deneyi esnasında farklı zamanlardaki indirgenen ve yükseltgen türlerinin konsantrasyon dağılımı
a.başlangıç potansiyeli, b. ve d. ileri ve geri tarama sırasında redoks çiftinin formal potansiyeli, c. sıfır reaktant yüzey konsantrasyonuna ulaşılması

Dönüşümlü voltamogramdaki karakteristik pikler elektrot yüzeyine yakın difüzyon tabakasının oluşumundan kaynaklanır. Bu durum potansiyel tarama sırasında konsantrasyon-uzaklık profilinin dikkatli bir şekilde incelenmesi ile daha iyi anlaşılabilir. Örneğin şekil 2-3 reaktant ve ürün için farklı zamanlardaki 4 farklı konsantrasyon gradientini göstermektedir. Burada (a) başlangıç potansiyel değeri (b) ve (d) redoks çiftinin formal potansiyeli (sırasıyla ileri ve ters yöndeki taramalar sırasında) ve (c) reaktantın yüzey konsantrasyonunun sıfıra ulaşıldığı değerdir. Yüzey konsantrasyonundaki sürekli değişimi difüzyon tabakasının kalınlığının genişlemesi ile ilgilidir. Ortaya çıkan akım pikleri konsantrasyon gradientinin zamanla sürekli değişimini yansıtmaktadır. Bundan dolayı, pik akımındaki artış difüzyon kontrolünün sağlanmasına karşılık gelmektedir, akımdaki düşme (pikin ilerisindeki) $t^{-1/2}$ bağımlılığını ortaya koymaktadır. Yukarıdaki nedenlerden dolayı, ters yöndeki akımda ileri yöndeki ile benzer şekildedir (Wang 2000).

Tersinir sistemlerde ileri taramada indirgenme olmuşsa, ters taramada yükseltgenme meydana gelir. Tersinir bir reaksiyon için konsantrasyon - pik akımı ilişkisi Randles Sevcik eşitliği ile gösterilir (25 °C'de).

$$i_p = 2,686 \times 10^5 n^{3/2} A C^0 D^{1/2} \nu^{1/2}$$

Burada, n transfer edilen elektron sayısını, A elektrot yüzey alanını (cm^2), C konsantrasyonu (mol/cm^3), D difüzyon katsayısını (cm^2/s) ve ν tarama hızını (V/s) göstermektedir. Bu eşitliğe göre pik akımı, konsantrasyon ile doğru orantılı olup, tarama hızının karekökü ile artmaktadır. Geri yöndeki pik akımının ileri yöndeki pik akımına oranı tersinir bir redoks çifti için birdir. Bu pik oranı redoks süreci ile birlikte yürüyen kimyasal reaksiyonları fazlasıyla etkilemektedir. Akım pikleri genellikle baseline akımına ekstrapole edilmesiyle ölçülür.

Potansiyel ekseninde piklerin pozisyonu, redoks işleminin formal potansiyeli ile ilgilidir. Tersinir çiftin formal potansiyeli, E_{pa} ve E_{pc} arasında ortalananmaktadır.

$$E^0 = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2}$$

Pik potansiyelleri arasındaki ayrılma (tersinir bir çift için) aşağıdaki eşitlik ile verilir:

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = \frac{0.059}{n} \text{ V}$$

Pik ayrımı eşitliği, transfer edilen elektron sayısının belirlenmesi için kullanılır ve Nernst davranışı için bir ölçüt olarak kullanılır. Genellikle hızlı bir elektron işlemi ΔE_p yaklaşık olarak 59 mV göstermektedir. Katodik ve anodik pik potansiyellerinin her ikisinde tarama hızından bağımsızdır. Yarı pik potansiyelini ($E_{p/2}$) polarografik yarı pik potansiyeli ($E_{1/2}$) ile ilişkilendirmek mümkündür (Wang 2000).

$$E_{p/2} = E_{1/2} \pm \frac{0.028}{n}$$

Dönüşümlü voltametri verileri ile bir reaksiyonun tersinirlik testi yapılabilir. Eğer $i_p-v^{1/2}$ grafiği doğrusal ise ve orijinden geçerse sistem tersinirdir. Buna ilaveten bir sistemin tersinir olması için diğer bazı özelliklerin de bulunması gerekir. Bu özelliklerin test edildiği kriterler çizelge 4.1'de verilmiştir.

Tersinir O+ ne \leftrightarrow R reaksiyonunun tanınma kriterleri

1. $E_p^c - E_p^a = 59/n$ mV veya $E_p - E_{p/2} = 57/n$ mV'tur.
2. E_p tarama hızı ile değişmez.
3. $i_p^a / i_p^c = 1$ 'dir ve bu oran tarama hızı ile değişmez.
4. $i_p/v^{1/2}$, tarama hızı ile değişmez.
5. E_p 'den daha negatif (veya daha pozitif) potansiyellerde akım, $t^{-1/2}$ ile orantılıdır.
6. Dalga şekli tarama hızı ile değişmez.

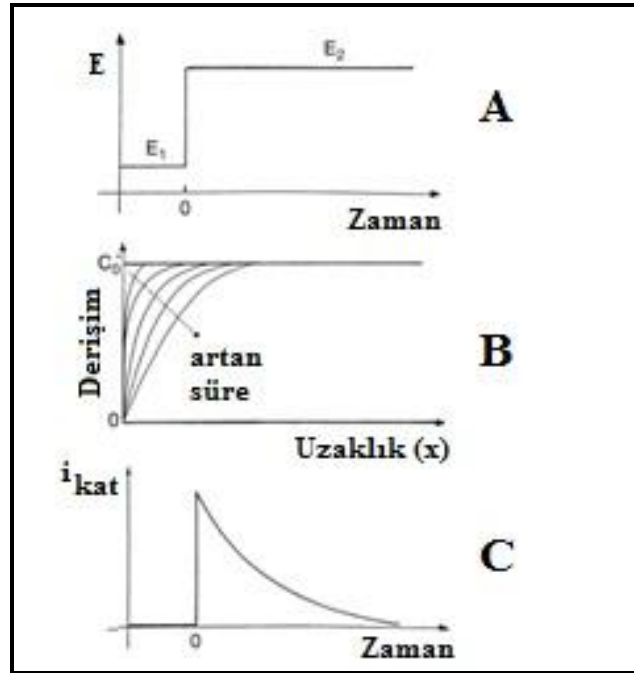
Bir sistemin tersinir olması için yukarıdaki kriterlerin hepsinin geçerli olması gereklidir. Bir veya bir kaç geçerli değilse sistem tersinir değildir. i_p ve E_p 'in v ile ilişkisi yeteri kadar geniş bir tarama hızı aralığında test edilmelidir. Yukarıdaki kriterlerden biri veya birkaçı geçerli değilse elektrot reaksiyonu ya tersinmez ya da elektron aktarım basamağından daha kompleks bir mekanizmaya sahiptir (Bard ve Faulkner 2001).

Tersinir sistemlerde her potansiyelde elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından büyüktür ve bu nedenle Nernst eşitliği elektrot yüzeyinde geçerlidir. Tersinmez sistemlerde ise elektron aktarım hızı yeteri kadar büyük olmadığından elektrot yüzeyinde Nernst eşitliği geçerli değildir. Bu durumda CV voltamogramının şekli, tersinir durumdan farklıdır. Tersinmez durumlarda potansiyel tarama hızı çok düşük ise, elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından daha yüksektir ve sistem tersinir gibi

gözlenebilir. Tarama hızı arttıkça kütle aktarım hızı elektron aktarım hızı ile aynı seviyeye gelir. Bu durum tarama hızı arttıkça anodik ve katodik pik potansiyellerinin birbirinden uzaklaşması ile kendini belli eder.

2.2.1.2 Kronoamperometri

Kronoamperometride öncelikle çalışma elektroduna herhangi bir indirgenmenin olmadığı E_1 potansiyeli uygulanır. Sonra uygulanan potansiyel aniden E_2 potansiyeline değiştirilir. E_2 potansiyeli seçilirken indirgenme difüzyon kontrollü olmalıdır. E_1 ve E_2 potansiyeli seçilirken önce maddenin DC polarogramı veya CV'si alınır. Başlangıç potansiyeli (E_1) olarak akımın henüz gözlenmediği artık akım bölgesindeki potansiyel seçilir. Normal polarogramın plato bölgesinde veya CV'nin pik potansiyelinin biraz daha ilerisindeki bir potansiyel E_2 potansiyeli olarak seçilir. Potansiyel E_2 değerinde bir süre sabit tutulur.



Şekil 2.9 Kronoamperometrik çalışmalarda: a. Potansiyel-zaman dalga biçimi, b. Konsantrasyon profilinin zamanla değişimi, c. Akım-zaman değişimi

Kronoamperometri çalışma elektrodunun potansiyelinde faradaik bir reaksiyonun meydana gelmediği bir potansiyelden, elektroaktif türün yüzey konsantrasyonunun sıfır olduğu potansiyele arttırılması söz konusudur. Bu yöntemde sabit bir konumda çalışma elektrodu ve karıştırılmayan bir çözelti kullanılmaktadır. Bu şartlar altındaki kütle transferi sadece difüzyon ile olur, akım-zaman eğrisi yüzeyin etrafında konsantrasyon gradientindeki değişimi yansıtmaktadır. Bu durum reaktantın tükenmesiyle birlikte difüzyon tabakasında kademeli bir genişlemeye yol açmaktadır ve böylece zamana bağlı olarak konsantrasyon profilinin eğiminde azalma olmaktadır. Bu yüzden düzlemsel bir elektrotta akım zamanla azalır ve bu durum Cottrell eşitliği ile verilir:

$$i(t) = \frac{nFACD^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} = kt^{-1/2}$$

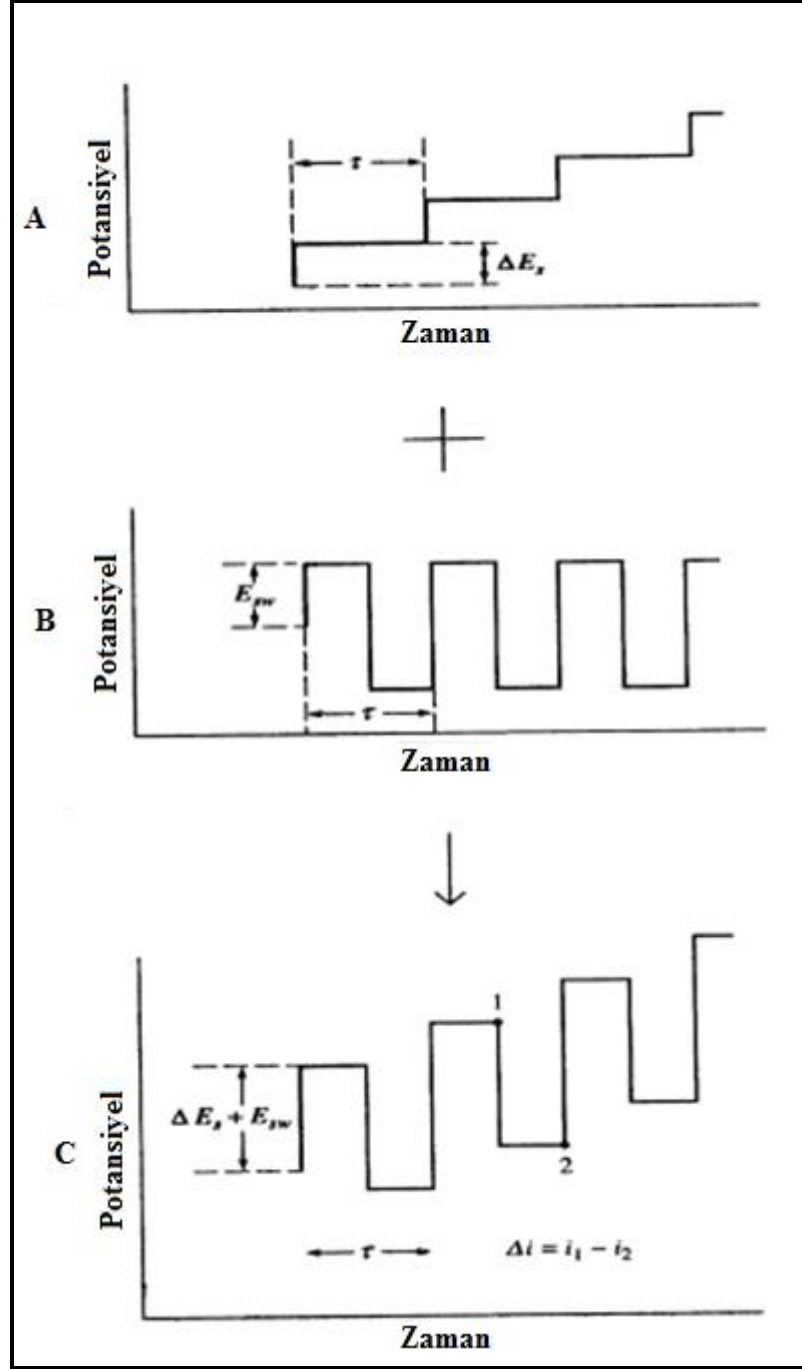
$it^{1/2}$ genellikle “Cottrell davranışı” olarak adlandırılır. Bu tür bir davranışta meydana gelen sapma, doğal konveksiyon etkisinin bir sonucu olarak uzun sürelerde veya yüksek çevre uzunluğuna karşı alan oranına sahip mikroelektrot kullanılmasıyla meydana gelir. İkinci durumda zamandan bağımsız akım (konsantrasyon ile orantılı) büyük radyal difüzyon katkısına bağlı olarak $t > 0.1$ s için elde edilir. Benzer hususlar küresel elektrotlar için de uygulanabilir. Akım cevabını takip eden süreye bağlı ve süreden bağımsız terimler içeren potansiyel basamağı. t 'nin küçük değerleri için ($t < 50$ ms) kronoamperometrik sinyal yüklenme akımından meydana gelen bir gürültü katkısı içermektedir. Geçici gürültü katkıları katı elektrotların kullanıldığı deneylerde sıklıkla gözlenmektedir.

Kronoamperometri elektroaktif türlerin difüzyon katsayılarının bulunmasında veya çalışma elektrotlarının yüzey alanının hesaplanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Kronoamperometrinin analitik uygulamaları sabit zaman aralıklarında çalışma elektrodunun potansiyelini puls tekrarlayarak. Kronoamperometri elektrot proseslerinin mekanizmalarının anlaşılması için kullanılabilir. Özellikle bu görev için tersinir çift basamaklı kronoamperometri deneyleri yapılmaktadır.

Potansiyel basamağı deneyleri yüke karşı zamanın bağıllığını belirlemek için de kullanılabilir. Bu durum potansiyel basamağından oluşan akımın integralinin alınmasıyla elde edilir. Bu tür bir yük ölçüm prosedürü kronokulometri olarak bilinir, özellikle adsorplanan reaktantların miktarının ölçülmesinde kullanışlı bir tekniktir. Yükün $t^{1/2}$ karşı grafiğı çizildiğinde $t=0$ 'da keşisim adsorplanan türler ile çift tabaka yüklemesinden kaynaklanan toplam yüke karşılık gelmektedir.

2.2.1.3 Kare dalga voltametri

Kare dalga voltametri, ilk olarak Ramaley ve Krause tarafından bulunmuş olup, teorik ve uygulama bakımından gelişimi 1985 yılında Osteryoung ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Kare dalga voltametrisinin sabit elektrotlarda potansiyel-zaman dalga şekli şekil 2.10'da görölmektedir.



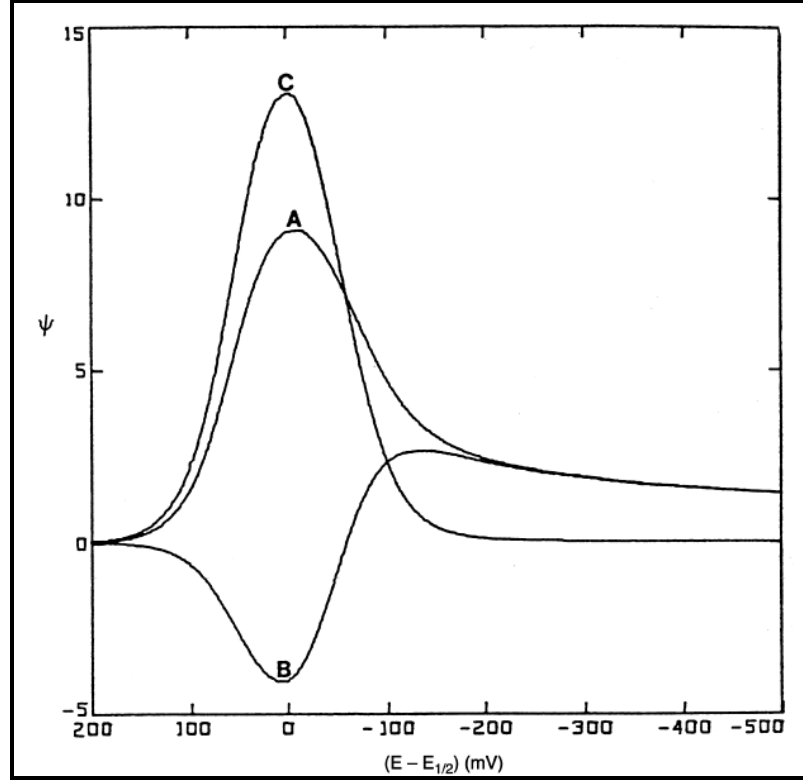
Şekil 2.10 Kare dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu

(a)'daki uyarma sinyali (b)'deki puls taraması ile (c)'deki kare dalga uyarma sinyalini verecek şekilde toplamaktadır. Akım cevabı Δi , 1 potansiyelindeki akımdan 2 potansiyelindeki akım çıkarılarak bulunur. ΔE_s : adım yüksekliği, E_{sw} : puls genişliği, τ : periyot

Kare dalga voltametrisinin şekil 2.10.b'deki pulsun şekil 2.10.a'daki basamak sinyali üzerine bindirilmesiyle elde edilen uyarma sinyali şekil 2.10.c'de görülmektedir. Dalga şekli, simetrik kare dalgalardan oluşan merdiven görünüşündedir.

Bir kare dalganın tamamlanma süresi (her basamağın boyu) periyot adını alır ve τ ile gösterilir. Yaklaşık 5 ms civarındadır. Birbirini takip eden kare dalgalar arasındaki yükseklik farkına adım yüksekliği (sinyalin potansiyel basamağı) denir ve ΔE_s ile gösterilir. Genelde ΔE_s 10 mV'dur. Her bir dalganın alt ve üst noktaları arasındaki farkın yarısı kare dalga yüksekliği (puls genliği) olarak bilinir ve E_{sw} şeklinde gösterilir. Pulsun büyüklüğü $2 E_{sw}$ ise genelde 50 mV'dur. Sistemin bu şartlar altında çalıştırılması 200 Hz'lik puls frekansına karşılık gelir ve bu durumda 1 V'luk tarama 0.5 s'de yapılır. Çoğu zaman τ yerine $1/\tau$ 'a eşit olan frekans kullanılır ve f ile gösterilir.

Tersinir bir indirgenme tepkimesinde bir pulsun boyutu, ileri tarama sırasında oluşan ürünün geri tarama sırasında yükseltgenmesini sağlamaya yetecek kadar büyüktür. Kare dalga voltametrisinde akım ölçümleri ileri ve geri pulsların sonuna doğru t_s kadar zaman aralığında yapılır. İleri puls için ölçülen akım i_1 , geri puls için ölçülen akım i_2 olmak üzere her bir kare dalganın net akımı $\Delta i = i_1 - i_2$ 'ye eşittir ve ileri fark adımı olarak adlandırılır. Genelde voltamogramları elde etmek için bu akımların farkı (Δi) grafiğe geçirilir. Bu fark derişimle doğru orantılıdır, pik potansiyeli de polarografik yarı dalga potansiyeline karşılık gelir. Ölçüm son derece hızlı yapıldığından birkaç voltametrik taramanın sinyal ortalaması alınarak analizin kesinliğini arttırmak mümkündür.



Şekil 2.11 Kare dalga voltametrisinde tersinir bir tepkime için net akım
A: ileri tarama piki, B: geri tarama piki, C: net akım piki

Kare dalga voltametrisinde deneysel parametreler belirli aralıklarda seçilir. Frekansın artması ile buna bağlı olarak periyodun azalması ile kare dalga pik akımı ve dolayısıyla duyarlılığı artar. 1000 Hz'den daha yüksek frekansla yapılan çalışmalar çok büyük dikkat ve hassasiyet gerektirir. 200 Hz duyarlılık ve kararlılık açısından analitik amaçlı çalışmalar için problemsiz bir frekans olarak gözlenmiştir. Sonuç olarak frekans genellikle $10 \leq f \leq 1000$ Hz veya periyot $1 \leq \tau \leq 100$ ms aralığında seçilir. Adım yüksekliği ise aktarılan elektron sayısına (n) bağlı olarak $\Delta E_s = 10/n$ mV eşitliğinden seçilir. Kare dalga voltametrisinde tarama hızı, frekans ve periyot ile adım yüksekliğine bağlı olarak belirlenir ve etkin tarama hızı (ETH) olarak adlandırılır. ETH aşağıdaki eşitlikle belirlenir.

$$ETH = f \times \Delta E_s = 1/\tau \times \Delta E_s$$

ΔE_r kadar bir potansiyel aralığında tarama yapmak için sadece τ ($\Delta E_r/\Delta E_s$) kadar bir zaman gereklidir. Uygun frekansların seçimi ile deney süreleri çok azaltılabilir. Örneğin

$n=1$ iken $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$ ve $f = 200 \text{ Hz}$ ($\tau=1/200$) ise $ETH=2 \text{ V/s}$ 'dir. 500 mV 'luk (ΔE_s) bir potansiyel aralığını tarayabilmek için gerekli süre sadece 0.25 s 'dir. Bundan dolayı kare dalga voltametri hızlı taramalı teknik olarak tanımlanır.

2.2.1.4 Sıyırma voltametri

Sıyırma analizleri eser elementlerin tayininde kullanılan oldukça hassas bir elektrokimyasal tekniktir. Son derece iyi bir duyarlılığın elde edilmesi, gelişmiş ölçüm yöntemleri ile etkin önderiştirme basamağının birleştirilmesinden kaynaklanmaktadır. Oldukça iyi sinyal/gürültü oranına sahip bir teknik olup, alt tayin sınırında çözelti fazı voltametik tekniklerinin 2 veya 3 katı kadar altına inilebilmektedir. Dörtten altıya kadar metal iyonu aynı anda 10^{-10} M konsantrasyonun altına kadar ölçülebilmektedir. Bu kadar düşük alt tayin sınırları ulaşılması, girişimin minimum seviyede olmasına dayanmaktadır.

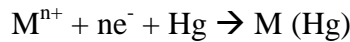
Sıyırma analizleri iki basamaklı bir tekniktir. Birinci basamak yani biriktirme basamağı çözelti içerisindeki metal iyonlarının küçük kısımların elektrolitik olarak elektrot yüzeyine biriktirilmesidir. Biriktirme basamağı adsorptif, katodik ve anodik olmak üzere üç farklı şekilde olabilir. İkinci basamak biriktirilen metalin çözünmesinden oluşan sıyırma yani ölçüm basamağıdır. Biriktirme ve ölçüm basamaklarına bağlı olarak farklı çeşitlerde sıyırma analizleri kullanılabilir.

Biriktirme basamağında analitin bulunduğu çözelti belirli bir süre karıştırılır daha sonra önderişim işlemine bırakılır. Çalışma elektroduna uygulanan biriktirme potansiyeli, analitin derişimine de bağlı olarak belirli bir süre uygulanır ve analizlenecek türler seçilir. Biriktirme potansiyelinin uygulanması ölçümlerin oldukça seçici olmasını sağlar (Sun vd. 2005). Biriktirme zamanı, daha fazla analitin elektrot yüzeyine birikebilmesi için daha fazla süre uygulanarak kontrol edilmelidir. Biriktirme işlemi boyunca çözeltinin karıştırılması çalışma elektrodu yüzeyin iyonların taşınmasını kolaylaştırmaktadır.

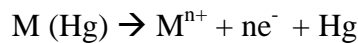
Sıyırma basamağında ise potansiyel, katodik sıyırma için katodik olarak, anodik sıyırma için anodik olarak taranır. Elektrot yüzeyine biriken elektroaktif türün potansiyeli standart potansiyeline ulaştığında çözelti ortamına geri döner. İndirgeme veya yükseltgemenin meydana geldiği bu aşamada hücreden akım geçer. Deney sonucunda elde edilen voltamogramdan analit hakkında bilgi elde edilir.

Anodik sıyırma voltametrisi

Anodik sıyırma voltametrisi (ASV) sıyırma analizlerinin en sık kullanılan biçimidir. Bu teknik; çalışma elektrodunun biriktirme basamağında katot, sıyırma basamağında anot olarak görev yaptığı sıyırma tekniğidir. ASV genellikle çalışma elektrodu üzerinde indirgenebilen ve daha sonra yeniden yükseltgenebilen metal iyonlarının belirlenmesinde kullanılır (Arancia vd. 2004, Shams vd. 2004). Bu yöntemde biriktirme potansiyeli genellikle belirlenecek metal iyonunun standart indirgenme potansiyelinden daha negatif bölgelerde seçilir. ASV tekniği iki önemli basamaktan oluşur. Birinci adım, çalışma elektrodunun yeterli katodik potansiyelde tutulduğu ve metal iyonlarının (M^{n+}) çalışma elektrodu ile amalgam $M(Hg)$ oluşturduğu biriktirme basamağıdır.



İkinci basamakta potansiyel, anodik olarak daha pozitif bölgelere doğru taranır. Çalışma elektrodu yeterli pozitif gerilime ulaştığında analit elektrot yüzeyinden sıyırılır ve yükseltgenmiş olarak tekrar çözelti ortamına döner. Bu basamak sıyırma adımı olarak adlandırılır ve aşağıdaki eşitlik meydana gelir.



Yükseltgenme potansiyelinde, yükseltgenme ile oluşan her bir analitik türün faradaik akımı ölçülür. Okunan değer sıyırma akımının elektrot potansiyelinin bir fonksiyonu olarak elde edilir. Her bir analitin yükseltgenmesine bağlı olan sıyırma akımı çözelti içerisindeki analitin derişimi ile orantılıdır.

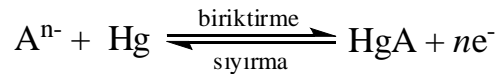
Voltametik pik, potansiyel tarama sırasında cıva elektrodunda metalin zamana bağlı konsantrasyon gradientini yansıtmaktadır. Pik potansiyeli, örnekteki metalin tanımlanmasını sağlar. Pik akımı, biriktirme ve sıyırma basamaklarındaki çeşitli parametrelere bağlı olduğu kadar metal iyonuna ve elektrodun geometrisine de bağlıdır. Örneğin, cıva film elektrot için pik akımı

$$i_p = \frac{n^2 F^2 \nu^{1/2} A l C_{Hg}}{2.7 RT}$$

Burada A ve l sırasıyla filmin alanı ve kalınlığını, ν potansiyel tarama hızını göstermektedir.

Katodik sıyırma voltametri

Katodik sıyırma voltametri, çalışma elektrodunun biriktirme basamağında anot, sıyırma basamağında katot olarak görev yaptığı sıyırma tekniğidir. Yani benzetme yapacak olursak ASV'nin ayna görüntüsüdür. Burada analitin anodik olarak biriktirilmesi ve negatif yönde potansiyel taraması ile sıyırılması söz konusudur.



Katodik sıyırma voltametri cıva ile çözünmeyen tuzlar oluşturan inorganik organik ve inorganik bileşiklerin tayininde kullanılmaktadır. Bunlar arasında çeşitli tiyoller ve penisilinler, halojenürler, siyanürler ve sülfürler bulunmaktadır.

Adsorptif sıyırma voltametri

Adsorptif sıyırma voltametri eser elementlerin, yanı sıra birçok organik ve inorganik türün tayininde sıklıkla kullanılan bir sıyırma tekniğidir. Bu yöntemde biriktirme basamağı elektroliz olmadan adsorptif olarak gerçekleşir. Elektrot yüzeyi üzerinde

adsorplanarak biriken analit biriktirme yeterli düzeye ulaştığında isteğe bağlı olarak anodik veya katodik yönde potansiyel uygulanarak elektrottan sıyrılır.

2.3 Yüzey Karakterizasyon Yöntemleri

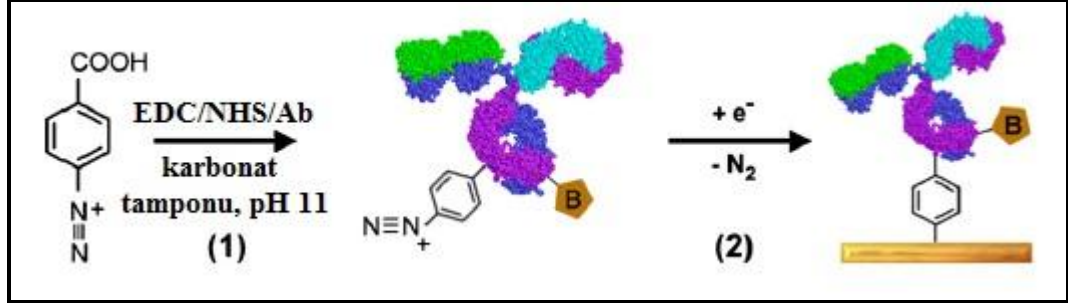
Yüzeylerin kullanılabilirliğinin araştırılması açısından yüzeylerin karakterize edilmesi önem taşımaktadır. Çeşitli teknikler kullanılarak yüzeyin modifiye edilmeden önceki durumu ile modifikasyondan sonraki durumu incelenerek aralarındaki farklar ortaya çıkartılır. Böylece yüzeyin istenilen gibi modifiye edilip edilmediği kanıtlanmış olur. Yüzey karakterizasyon yöntemleri elektrokimyasal, spektroskopik ve mikroskopik teknikler olarak sınıflandırılabilir. Elektrokimyasal teknikler arasında en sık kullanılanlar, dönüşümlü voltametri (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisidir (EIS). Spektroskopik tekniklerde ise X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS), Yüzey güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (YGRS) ve Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR) en çok tercih edilen yöntemlerdir. Görüntüleme tekniklerinde ise geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) ve taramalı elektron mikroskopisi (SEM) kullanılmaktadır.

2.3.1 Elektrokimyasal yöntemler

Elektrokimyasal karakterizasyon yöntemleri, yüzey karakterizasyonunda hızlı ve kolay uygulanabilir olmalarından dolayı sık kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. Dönüşümlü voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi bu sınıfta literatürde sık karşımıza çıkan yöntemlerdir.

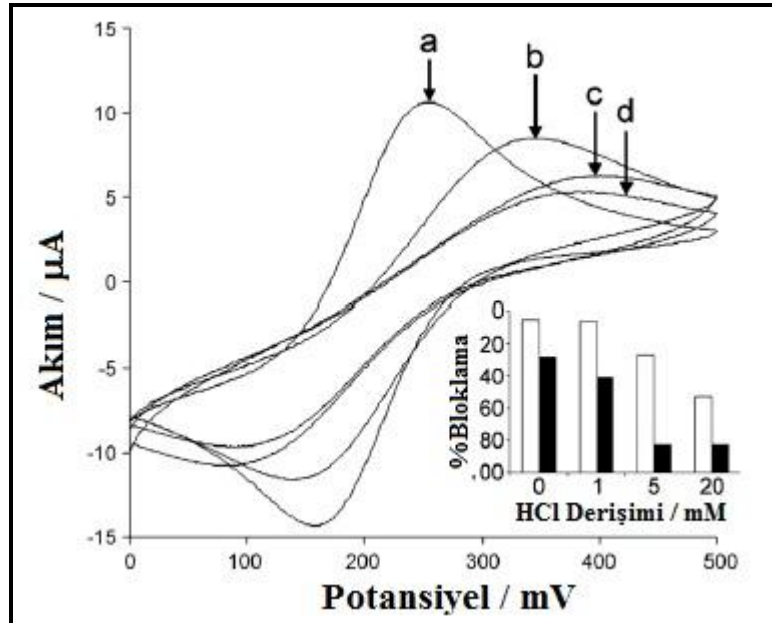
Dönüşümlü voltametri tekniğiyle karakterizasyonda modifiye elektrot yüzeyi ile yalın elektrot yüzeyi arasındaki değişiklikler çeşitli redoks problemler yardımıyla anlaşılabilir. En sık kullanılan redoks problemler, ferrosen, ferrisiyanür, dopamin ve rutenyumheksaminklorürdür. Polysky ve arkadaşları benzoik asit diazoniyum tuzunu, EDC/NHS ortamında biyotinlenmiş antikor ile amitleştirme reaksiyonu sonucu

birleştirmişlerdir (Polsky vd. 2008). Daha sonra elde ettikleri antikor-diazonyum tuzunu indirgeyerek yüzeye bağlamışlardır.



Şekil 2.12 Diazonyum tuzu ile modifiye edilen yüzeyin hazırlanması

Elde ettikleri bu yüzeylerin rutenyum heksamin ve ferrisiyanür redoks prob çözeltilerindeki davranışlarını dönüşümlü voltametri tekniği ile incelemişlerdir (a: yalın, b: 1, c: 2, d:3 döngü). Çalışmada, Ru kompleksi ile yapılan deneylerde yalın ile modifiye elektrotlar arasında bir fark görülmediğini, fakat ferrisiyanüre karşı modifiye elektrotların elektrostatik etkilere bağlı bir duyarlılık gösterdiğini söylemişlerdir.

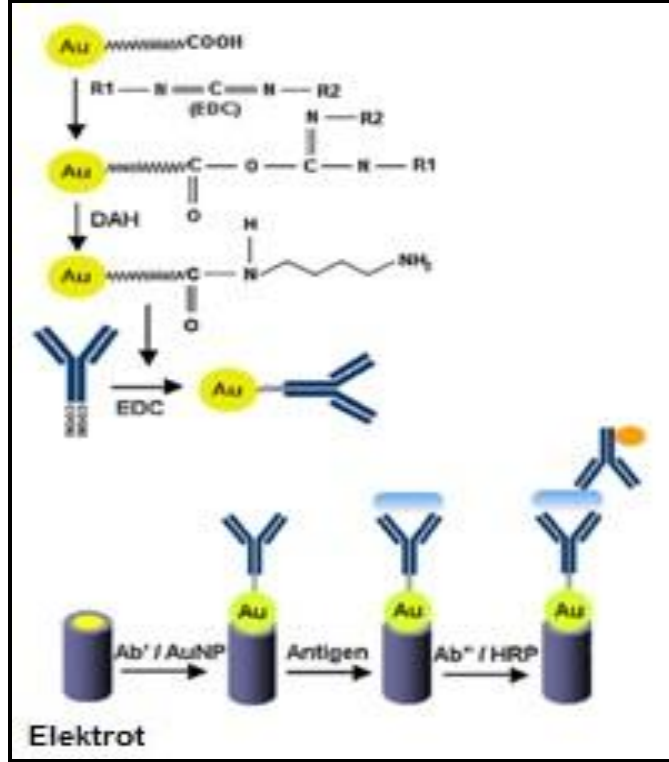


Şekil 2.13 Ferrisiyanür çözeltisinde diazonium antikor modifiye elektrotlar (a: yalın, b: 1, c: 2, d: 3 döngü)

Bir diğerk önemli elektrokimyasal karakterizasyon tekniği de elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) tekniğidir. Elektrokimyasal impedans ölçümleri, frekans değişimlerine bağlı olarak yapıldığı için elektrokimyasal impedans spektroskopisi adını almıştır. Hassas bir teknik olmasının yanı sıra, modifiye yüzeydeki moleküllerin zarar görmeden karakterize edilmesini sağlar. Çünkü uygulanan potansiyelin genliği oldukça düşüktür. CV tekniğinde oldukça büyük bir potansiyel aralığı kullanıldığı için yüzeyin hasar görme riski vardır. Korozyon çalışmalarında, film yüzeylerin karakterizasyonunda, sensörlerde ve biyolojik sistemlerin incelenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tekniğin en önemli avantajı, elektrokimyasal sistemlerin denge halinde incelenmesidir. Voltametrik tekniklerin çoğunda sistemin denge durumu bozulur. Çünkü elektrokimyasal sistemler bir sinyal gönderilir ve cevabı ölçülür. Ancak EIS'de sisteme gönderilen sinyal düşük genlikli AC potansiyelidir. Uygulanan AC potansiyeli genellikle $E_0 = 5$ mV civarındadır. Sistemin denge durumu bozulmaz. Uygulanan AC potansiyeli sinüs dalgasıdır. Bu potansiyelde frekans değişimi ile impedans ölçümü yapılır (Bard ve Faulkner 2001).

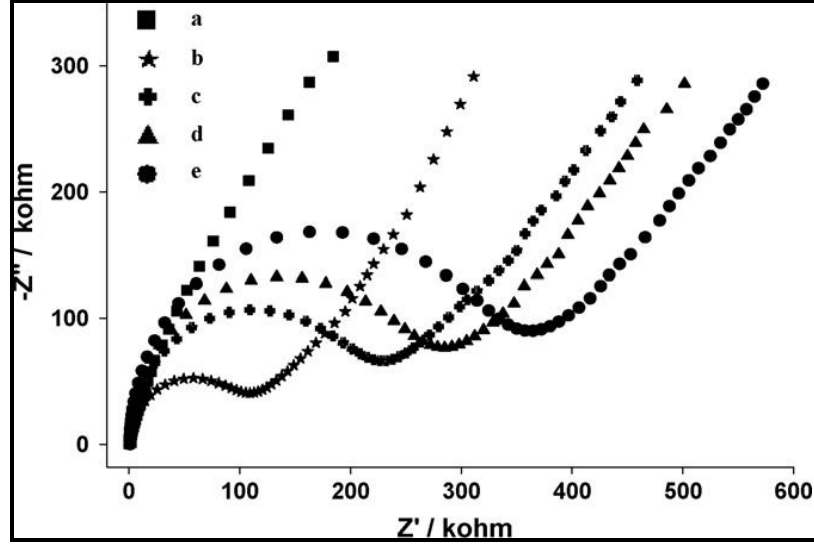
Elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile yüzeyde meydana gelen değişiklerin yanı sıra DNA hibritleşmesi ve antijen-antikör etkileşmesi gibi biyolojik reaksiyonlar da takip edilebilmektedir.

Ahirwal ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada bir aracı kullanarak altın nanoparçacıklara (AuNP) kovalent olarak bir antikör (Ab_1) bağlamışlardır (Ahirwal vd. 2010). AuNP/ Ab_1 ile modifiye ettikleri altın elektrodu elektrokimyasal sandviç immünoessey için kullanmışlardır. Enzim etiketli ikincil antikör (Ab_2) ve elektrotif boyayı kullanarak dönüşümlü voltametri ve impedans ölçümlerini gerçekleştirmiş ve yüzeydeki değişiklikleri takip etmişlerdir.



Şekil 2.14 Altın nanoparçacık etiketli antikorun hazırlanması ve altın elektrot üzerine modifikasyonu

Elde ettikleri yüzeylerin Nyquist eğrilerini incelediklerinde yalın elektrodun hemen hemen düz bir çizgi şeklinde olduğunu, glutatyon kaplı AuNP'ların daha düşük bir resistans gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu durumun altın nanoparçacıkların iyi birer iletken malzeme olmasından kaynaklandığını, redoks prob ile elektrot arasında bir elektron transferinin meydana geldiğini söylemişlerdir. Diğer elektrotları kıyasladıklarında, elektroda AuNP-Ab₁, AuNP-Ab₁/Ag ve AuNP-Ab₁/Ag/Ab₂ bağlanmasıyla yarım dairenin çapında artış gözlemişlerdir. Bu sonuçlardan redoks prob ile elektrot arasındaki elektron transferinin bloklandığını ve impedans deneyi ile elektrot yüzeyindeki tutunmaların başarıyla sonuçlandığını göstermişlerdir.



Şekil 2.15 EIS ile karakterizasyon: a. Yalın altın elektrot, b. glutatyon kaplı altın nanoparçacık, c. AuNP-Ab konjugat, d. AuNP-Ab/antijen, e. AuNP-Ab/antijen/antikor-HRP modifiye elektrot

2.3.2 X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS)

X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS) diğer bir adıyla kimyasal analiz için elektron spektroskopisi (ESCA) yüzey karakterizasyonlarında sıklıkla kullanılan tekniklerden birisidir. 1981 yılında Kai Siegbahn'a fizik dalında Nobel ödülü kazandıran teknik ile malzemelerin elementel kompozisyonu spektroskopik olarak belirlenebilmektedir. Elementlerin yükseltgenme basamağı hakkında bilgiler verebilen XPS tekniği ile aynı zamanda ince film kalınlıkları bile ölçülebilmektedir (Cumpson 2000).

XPS'in temeli, X-ışınlarının gönderilmesi ile yüzeyde bulunan atomların iç kabuklarında bulunan elektronların fotoelektrik olay sonucu uyarılmasına dayanmaktadır. Bu teknikte 10^{-8} - 10^{-9} torr vakum ortamında, atomlar X-ışınları ile bombardıman edildikten sonra saçılan elektronların kinetik enerjileri ölçülür. Gönderilen X-ışınlarının enerjisinin bir kısmı elektronların bağlanma enerjisini yenmek için kullanılırken, geri kalanı saçılan elektronun kinetik enerjisi olarak ortaya çıkmaktadır. Saçılan elektronların kinetik enerjileri spektrometre yardımı ile ölçüldükten sonra bağlanma enerjileri aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanır.

$$E_k = h\nu - E_b - w$$

Bu eşitlikte E_k , saçılan elektronların kinetik enerjilerini, $h\nu$ gönderilen X-ışınlarının enerjisini, E_b bağlanma enerjisini ve w spektrometrenin iş fonksiyonudur. Hesaplanan bağlanma enerjileri elektronun yayınlandığı atoma özgü olduğundan elementlerin nitel analizleri rahatlıkla yapılabilmektedir. XPS tekniğinde bağlanma enerjisine karşı yoğunluk değerleri grafiğe geçirilerek spektrumlar elde edilmektedir. Yüzeydeki atomların dağılımına bağlı olarak saçılan fotoelektronlar yoğunluk ile doğrudan ilişkili olduğundan yüzeyin bağlı atomik bileşiminin dağılımı ve stokiometrik oranları hakkında bilgi vermektedir.

2.3.3 Yüzey güçlendirilmiş raman spektroskopisi (YGRS)

Raman spektroskopisi, molekül yapıları, yüzey özellikleri ve ara yüzey reaksiyonları ile ilgili zengin bilgi verebilmesi sebebiyle kimyasal ve biyolojik analizlerde kullanılan önemli bir analitik tekniktir.

Raman spektroskopisi yüzey karakterizasyonlarında kullanılan bir diğer önemli tekniktir. Tekniğin prensibine kısaca göz atacak olursak, bir malzeme üzerine monokromatik bir ışın demeti gönderildiğinde, ışın demeti madde tarafından soğurulabilir, geçirilebilir veya saçılmaya uğrayabilir. 1928'de Hintli fizikçi C.V.Raman 1928'de saçılan ışının ufak bir kesrinin görünür alandaki dalga boyunun gönderilen ışığın dalga boyundan farklı olduğunu ve saçılmaya sebep olan moleküllerin kimyasal yapısının dalga boyunda kaymalara sebep olduğunu bulmuştur. Bu buluşundan ötürü 1931 yılında Nobel Fizik ödülünü almıştır. Işık saçılması sırasında ışığın büyük bir kısmının enerjisi madde ile etkileşen ışığın enerjisine eşit olur ve bu elastik saçılma olayına *Rayleigh saçılması* denir. Rayleigh saçılımında enerji kaybı olmadığı için foton ve molekül arasındaki çarpışmaların esnek olduğu söylenir. Elastik saçılma olayının yanı sıra saçılan ışığın çok az bir kısmı ise molekül ile etkileşmeye giren ışığın enerjisinden daha farklı enerjilerle saçılır. Bu tür elastik olmayan saçılma olayı ise, *Raman Saçılması* adını alır. *Rayleigh* saçılması olayında, Raman saçılmasına

göre 10^4 - 10^5 kez daha şiddetli bir saçılmış ışık oluşur. Raman saçılması sırasında saçılan ışığın enerjisinde, molekül ile etkileşen ışığinkine göre oluşan fazlalık veya azlık, ışıkla etkileşen molekülün titreşim enerji düzeyleri arasındaki enerji farkları kadardır. Bu nedenle Raman saçılmasının spektroskopik incelenmesi ile moleküllerin titreşim enerji düzeyleri hakkında bilgi edinilebilir. Bu tür bir spektroskopik yöntem, *Raman spektroskopisi* adını alır.

Raman saçılmasının şiddetinin zayıf olması ve floresans oluşumu Raman spektroskopisinin kullanımını sınırlı hale getirmiştir. Bu dezavantajların üzerinden gelmek için Yüzey Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi (YGRS) kullanılmaya başlanmıştır. Aslında YGRS'nin ortaya çıkması 1974 yılında Fleischmann ve arkadaşları tarafından elektrokimyasal olarak pürüzlü duruma getirilen gümüş elektrot yüzeyine piridin moleküllerinin adsorbe edilmesiyle keşfedilmiştir. Adsorplanan moleküllerin raman saçılma sinyalleri için güçlendirme faktörleri normal raman sinyalleri ile kıyaslandığında milyon kat daha fazla olduğu bulunmuştur (Albrecht ve Creighton 1977). YGRS ile hassasiyet artmış olup, daha düşük konsantrasyonlarda çalışılmaya olanak sağlanmıştır. Alt tayin sınırları rezonans raman saçılımında elde edilen değerlerden oldukça düşük seviyelerdedir.

YGRS'nin çalışma prensibini anlamak için klasik ışık saçılımı teorisini incelemek gerekir. Parçacıkta dipol moment oluşturan veya varolan bir dipol momenti değiştiren bir ışın demeti göz önüne alalım. Uygulanan elektrik alanının büyüklüğü çok büyük olmadığında indüklenen elektriksel dipol moment aşağıdaki gibi hesaplanır.

$$\mu = \alpha E \quad (\alpha, \text{moleküler polarlanabilirlik})$$

İndüklenmiş dipol momentin karesi raman şiddeti ile orantılı olduğunu düşünürsek, iki güçlendirme mekanizmasını tahmin edebiliriz. Böylece, güçlendirme etkisi ya moleküler polarlanabilirlik ya da molekülün bulunduğu elektrik alandan etkilenebilir. Yüzey seçim kuralları da mümkündür. Bunlara bağlı olarak, en güçlü bandlar adsorblanan malzemenin elektron bulutunun metal yüzeyine dik bir kutuplaşmanın

neden olduğu titreşimlerle elde edilir. Yüzey seçicilik kurallarını kullanarak adsorplanan molekülün metal yüzeyine göre yönlmesi tahmin edilebilir.

Yüzey güçlendirme etkisini oluşturan mekanizmanın doğası henüz tamamen aydınlatılmamış olup tartışmaların odak noktası olmaya devam etmektedir. Adsorplanan molekülün Raman sinyaline iki temel kuvvetlendirme etkisi vardır. Bunlardan birincisi, molekülün metal yakınında meydana gelen elektromanyetik rezonanstaki kaynaklanan büyük bölgesel alana maruz kaldığı elektrik etkisi olarak nitelendirilen elektromanyetik mekanizma, ikincisi ise molekül ile metal yüzeyi arasındaki moleküler polarlanabilirliğinin söz konusu olduğu moleküler etki olarak nitelendirilen kimyasal ya da yük transfer mekanizmasıdır. Çoğu araştırmacı güçlendirmenin sadece elektromanyetik mekanizmadan kaynaklandığını düşünmektedirler. Ancak yük transfer mekanizmasının güçlendirmeye katkısı göz ardı edilememelidir.

Elektromanyetik güçlendirme, metal yüzeyindeki iletkenlik elektronlarının (yüzey plasmonları) uyarılmasıyla oluşur. Oluşan yüzey plasmonlarının uyarılması yüzey üzerine adsorplanan molekül üzerinde ikinci bir alan etkisi gösterir. Bu durum metal yüzeyinde bulunan molekülün Raman saçılmasında güçlenmeye neden olmaktadır.

Yüzeyin pürüzlülüğü YGRS için temel gereksinimdir. Düz bir metal yüzeyinde, yüzey plasmonları metal yüzeye bağlı elektron dalgaları olarak bulunurlar ve sadece yüzeye paralel bir doğrultuda hareket etme yeteneğine sahiptirler. Pürüzlü bir metal yüzeyde ise plasmonlar sınırlandırılmış olmayıp ortaya çıkan elektrik alanda yüzeye hem dik hem de paralel olarak yayılabilmektedirler. Gelen foton pürüzlü bir yüzeye düştüğünde metalin plasmon rezonansı uyarılması oluşur ve saçılma sağlanır. Buna ek olarak pürüzlü yüzey ve onu çevreleyen ortam arasındaki dielektrik sabitlerindeki farktan dolayı yüzeyin sivri noktalarında elektrik alan yoğunluğunu oluşur. Metal kolloidler ve kolloidal agregatlar bu tür bir bölgesel elektromanyetik güçlendirmeye zengin bir örnektir.

Yük transfer mekanizmasının varlığını aydınlatılabilmek için birçok çalışma yapılmıştır. Bazı araştırmacılar ilk adsorbat tabakasının güçlendirme faktörünün sonraki tabakalardan daha büyük olduğunun nedenini araştırmaktadırlar. Temel olarak, yük transferinden meydana gelen güçlendirme pürüzlü yüzey üzerine moleküllerin fiziksel adsorpsiyonu veya kemisorpsiyonu ile yani adsorbat-metal kompleksi oluşumuyla meydana gelmektedir. Eğer kemisorpsiyon söz konusu ise adsorbatın molekül orbitalleri metal yüzeyinin iletkenlik bandı ile etkileşerek genişlemektedir. Bu durum elektronların hızlı bir şekilde transferi ve metalden adsorbata ya da tam tersi bir uyarı ile sonuçlanır. Sonuç olarak kemisorplanmış olan moleküllerin YGRS spektrumları serbest halinin raman spektrumundan önemli derecede farklıdır. Yük transfer mekanizması, yüzeyin ötesinde belirli mesafede genişleyen elektromanyetik etkinin aksine metal üzerinde doğrudan adsorplanan moleküllere doğası gereği sınırlandırılmıştır. Bu nedenle adsorbatın sadece ilk tabakası etkin olarak çalışır.

Ji ve arkadaşları (Ji vd. 2005) bir çalışmalarında monoklonal antikor ile etiketli Au/Ag çekirdek-kabuk nanoparçacıklar sentezleyip, bunları hepatit B yüzey antijeninin tayin edildiği immunoanaliz çalışmalarında kullanmışlardır. Au/Ag çekirdek kabuk nanoparçacıkları YGRS kuvvetlendirici substratlar olarak kullanmışlardır. Çekirdek-kabuk nanoparçacıkları sentezledikten sonra 4-merkaptobenzoik asit (MBA) ile etiketlemişlerdir. MBA molekülünü Raman işaretleyicisi olarak kullanmışlardır. Bu aşamadan sonra nanoparçacıkları hepatit B yüzey antijenine karşılık gelen monoklonal antikor (anti-HBsAg MAb) ile muamele etmişlerdir. Analizin yapılacağı silikon çipleri kendiliğinden düzenlenme tekniğini kullanarak aktifleştirdikten sonra hepatit B yüzey antijenine karşılık gelen poliklonal antikor (anti-HBsAg PAb) yüzeye bağlamışlardır. Hepatit B yüzey antijeni hazırlanan silikon çiplere damlatıldıktan sonra üzerine MBA ile etiketli anti-HBsAg MAb nanoparçacıkları bırakmışlardır. Antijen-antikor arasında meydana gelen immunoreaksiyondan yararlanmışlar, bağlanma özelliğini YGRS ile MBA molekülüne ait karakteristik pikleri takip ederek belirlemişlerdir.

YGRS tekniği ile *E. coli* tayini, antikor kaplı manyetik nanoparçacıklar kullanılarak Güven ve arkadaşları (Güven vd. 2011) tarafından başarılı bir şekilde yapılmıştır. Bu çalışmada immünomanyetik seperasyon ile YGRS tekniğini birlikte kullanılmıştır.

Bakteri konsantrasyonu ile YGRS sinyali arasında ilişki kurulmuştur. Bu yöntem için bulunan LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 8 ve 24 cFu/mL'dir. Geliştirilen immünoesseyin seçiciliği, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter dissolvens* ve *Salmonella enteriditis* gibi bakterilerin bulunduğu ortamda incelenmiş ve *E. coli*'ye karşı seçiciliği kanıtlanmıştır. İmmünoesseyin gerçek su numunelerinde uygulanabilirliği incelenmiş ve elde edilen deneysel sonuçlar diğer geleneksel yöntemlerle kıyaslanmıştır.

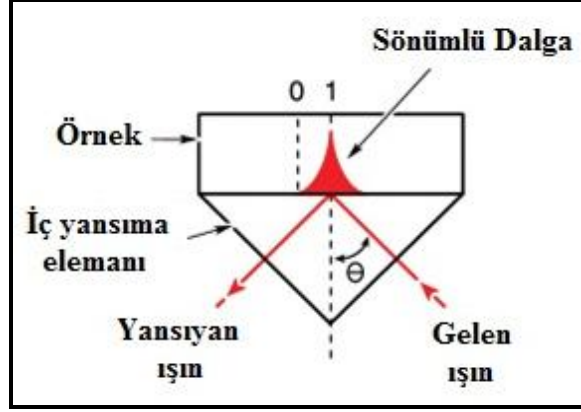
2.3.4 Infrared spektroskopisi (IR)

İnfrared spektroskopisi (IR), önemli yüzey karakterizasyon tekniklerinden bir diğeridir. Bu teknik, moleküllerdeki fonksiyonel grupların, infrared ışınlarını (0,78 – 1000 µm dalga boyu veya 12800 – 10 cm⁻¹ dalga sayılı) absorpsiyonuyla titreşim ve dönme enerji seviyelerine uyarılmalarının ölçümüne dayanmaktadır. Titreşim ve dönme hareketleri sonucunda dipol momentinde net bir değişme meydana gelen grupların infrared spektrumları alınabilmektedir.

Yüzey karakterizasyonu yaparken araştırmacıların en büyük sorunu, yüzeyde elde ettiği ince filmin infrared spektrumlarının alınamamasıdır. Bunun sebebi, yüzeye gönderilen IR ışınlarının, ince filmin fonksiyonel grupları ile etkileştiği halde, bu titreşim enerjilerinin tespit edilmesinin zor olmasıdır. Bu sebeple çok ince film ile kaplanan yüzeylerin IR'sini alabilmek için yeni sistemler geliştirilmiştir. Son yıllarda ince filmlerin karakterizasyonunda azaltılmış toplam yansıtma (Attenuated Total Reflection) (ATR-FTIR) sistemi oldukça dikkat çekmektedir.

ATR-FTIR yönteminde yüzeye gönderilen IR ışınları yüzey ile birçok defa temas ettirilerek, daha şiddetli spektrumların alınmasını sağlanmaktadır. Burada kullanılan sistemde IR ışını kırılma indisi oldukça yüksek kristalin içine yönlendirilir. İnce filmi içeren örnek kristal yüzeyi ile temas ettirilir. IR ışını örnek-kristal arayüzeyinde birçok defa iç yansımaya uğrar. Bu yansımalar sırasında oluşan sönümlü dalganın enerjisinin

bir kısmı örnek tarafından absorplanır ve yansıyan ışına dedektöre geri döner. Şekil 2.16'da ATR kristaline gelen ışının davranışı şematik olarak gösterilmektedir.



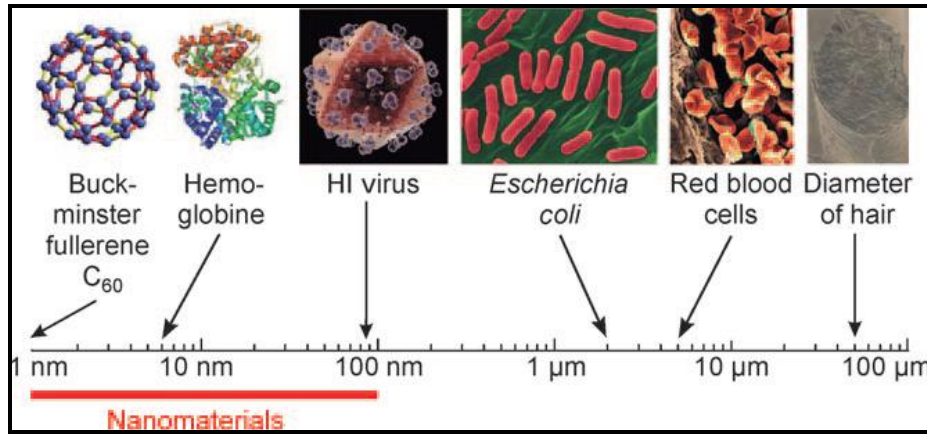
Şekil 2.16 ATR kristaline gelen ışının davranışı

Bakteri kontaminasyonu gıda güvenliği açısından ciddi önem taşıyan bir konudur. Wang ve arkadaşları ıspanak içerisine işlenmiş olan *E. coli* K-12'nin varlığını ATR-FTIR spektroskopisini kullanarak belirlemişlerdir (Wang vd. 2010). Bakteri ıspanak yapraklarının damar ve hücre içi dokularına inoküle etmişler ve *E. coli* K-12 hücrelerinin dağılımını SEM ile doğrulamışlardır. FTIR ölçümleri sonucunda 1590 cm^{-1} ve 1490 cm^{-1} arasındaki amid II bölgesindeki bandlar *E. coli*'nin varlığını kanıtlamıştır. Elde edilen sonuçlardan FTIR'ın *E. coli* K-12'nin ıspanak ekstraktlarında belirlenmesinde ve tayininde kullanılabileceğini ve 5 dakika için LOD değeri 100 kob/mL bulunmuştur. Geliştirilen yöntemin taze sebzelerdeki patojenik *E. coli* zincirleri ve diğer bakterilerin analizinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

2.4 Nanoparçacıklar

Nanoparçacık terimi, Yunanca "nannos=cüce" kelimesinden gelmektedir. Nanoteknoloji kavramı ilk defa Amerikalı fizikçi Richard Feynman tarafından "There's Plenty of Room at the Bottom" (Aşağıda Daha Çok Yer Var) sözüyle ortaya çıkmıştır. Bu terimin etimoloji ve metrik ölçülerdeki yeri, gözlem sınırlarımızın ötesinde çıplak gözle görülebilir boyutta olamayacak kadar küçük olduğunu açıkça ifade etmektedir. Bu

duruma tanıdık bir yaklaşımla bakmak “nanodünya”ya kolay erişmemizi sağlamaktadır. Saç tellerinin, hücrelerin (kırmızı kan hücreleri gibi), bakterilerin (*Escherichia coli* gibi), virüslerin (HI virüsü gibi) veya moleküllerin (hemoglobine gibi) boyutları bizlere birer işaretçi olarak yol göstermektedir (Şekil 2.17). Bu uzunluk ölçeğinde 100 nm’den daha küçük boyutlara sahip olan birimler nanoparçacık olarak adlandırılırlar. Bu sınıflandırma biraz keyfi olsa da bilimsel literatüre büyük ölçüde yerleşmiş olup, aynı zamanda üç boyutlu katılardan farklı ve boyuta bağlı duruma gelen malzemelerin belirli özelliklerini de kapsamaktadır (Feldmann ve Goesmann 2010).



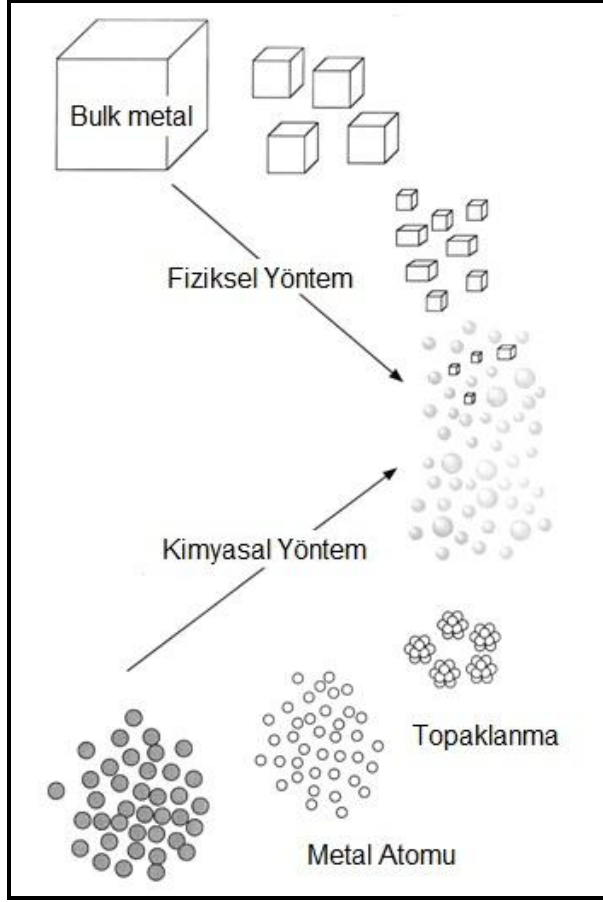
Şekil 2.17 Nanoparçacık sınıflandırılması için uzunluk skalası (Feldmann and Goesmann, 2010)

Nanoparçacıkların karakteristik özellikleri, küçük boyutlarının yanı sıra geniş yüzey alanlarına sahip olmalarıdır. Ayrıca bulk malzemelerden daha iyi ısı transferi ve kütle transferi yapmaktadırlar.

Metalik nanoparçacıklar, sahip oldukları ilgi çekici elektronik, manyetik, optik, termal ve katalitik özellikleri sebebiyle fizik, kimya, biyoloji, eczacılık ve malzeme bilimi alanında önemli uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Naoelektrokimya, elektrokimyanın özellikleri (kolaylık, hız, yüksek seçicilik ve yüksek hassasiyet gibi) ile nanoparçacıkların özelliklerinin birleşmesiyle elde edilen disiplinlerarası bir alandır. Metalik nanoparçacıkların naoelektrokimyanın gelişmesinde önemli rolleri bulunmaktadır (Guo ve Dong 2009). Bunun sebepleri:

- 1) Metalik nanoparçacıklar bulk durumlarına göre fazla yüzey alanına sahiptirler. Bu nanoparçacıklar ile modifiye olan elektrokimyasal arayüzeyler daha fazla aktif yüzey alanına sahip olurlar ve bu sebeple de hedef moleküllerin tayininde daha yüksek hassasiyet gösterirler.
- 2) Metalik nanoparçacıklar, elektrot yüzeyi ile hedef molekül arasında elektron transferinin hızlandırmak üzere güçlendirici ajanlar olarak da rol alabilirler. Bu durum hedef moleküller için daha hızlı akım duyarlılığı göstermelerine sebep olmaktadır.
- 3) Metalik nanoparçacıklar bazı önemli biyomoleküllerle birleştirilebilirler ve nano-bağlayıcılar olarak davranabilirler.
- 4) Metalik nanoparçacıklar ile modifiye edilen elektrokimyasal arayüzler, nanoelektrot gibi davranırlar. Prensipde bu nanoelektrotlardaki gözlenebilme sınırı (LOD) değeri benzer bir makro boyuttaki elektrotlardakinden daha düşük değerde olabilir çünkü Faradaik ve kapasitif akımlar arasında daha büyük bir oran vardır.

Şekil 2.18’de gösterildiği gibi metal nanoparçacıklar iki ayrı yöntemle hazırlanabilirler. Bunlardan birincisi, fiziksel yöntem olarak adlandırılan bulk metallerin parçalarına bölünmesiyle, ikincisi de kimyasal yöntem olarak adlandırılan moleküler veya iyonik araçlardan elde edilen metal atomlarından büyüyerek parçacıkların elde edilmesiyle meydana gelmektedir. İkinci yöntem daha küçük ve düzgün nanoparçacıkların elde edilmesi için uygundur. Yalnız bu yöntemde nanoparçacıkların boyutunu ve düzenliliğini sağlamak için topaklaşmayı engellemek en önemli basamağı oluşturmaktadır.

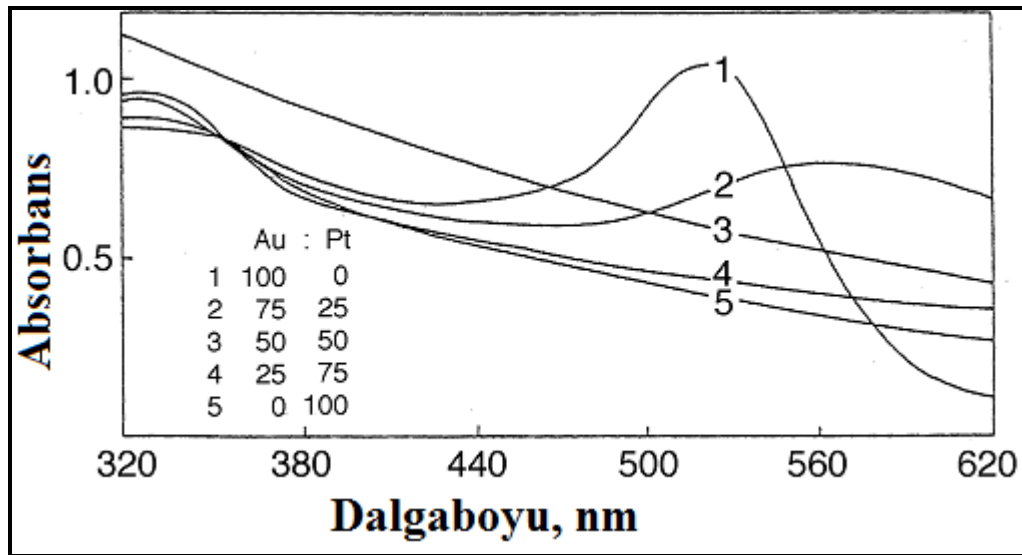


Şekil 2.18 Metal nanoparçacıkların hazırlanma yöntemleri

Bimetalik nanoparçacıklar, bir parçacık içerisinde iki tür metal içeren nanoparçacıklar olarak tanımlanırlar. Her geçen gün bilimsel çevreler tarafından monometalik nanoparçacıklardan daha fazla ilgi görmektedir. İkinci bir metalik bileşenin eklenmesinin saf monometale göre aktiviteyi, seçiciliği ve kararlılığı arttırdığı bilinmektedir. Bimetalik nanoparçacıkların özellikleri sadece büyüklükleri ile değil aynı zamanda kimyasal bileşimi ile değişebilmektedir. Bimetalik sistemler, ikinci metalin birinci metali sarmasından dolayı çoğu zaman çekirdek-kabuk yapısında oluşmaktadır. İkinci metal tabaka genellikle gergindir ve bu yüzden önemli katalitik özellikler ortaya koymaktadır (Manivannan ve Ramaraj 2009)

Metal tuzlarından bimetalik nanoparçacıklar hazırlanması 2 gruba ayrılabilir. Bu yöntemler, iki metal iyonunun birlikte indirgenmesi ve iki metal iyonunun basamaklı indirgenmesidir. İki metal iyonunun birlikte indirgenmesi, bimetalik nanoparçacıkların

hazırlanmasında en kolay yöntem olup monometalik nanoparçacıkların hazırlanması ile benzer şekilde yürütülür. Miner ve arkadaşları, sitrat ile indirgeme yöntemini kullanarak Au-Pt bimetalik nanoparçacıkları sentezlemişlerdir (Miner vd. 1981). Çalışmalarında tetrakloroaurik asit ve platinik asit tuzlarını kullanmışlardır. Metal iyonlarının indirgenmesi sitrat ilavesinden 4 saat sonra tamamlandığı belirtmişlerdir. Şekil 2.19'da Miner ve arkadaşlarının elde ettikleri Au-Pt bimetalik nanoparçacıkların UV-Vis spektrumları görülmektedir. Bimetalik nanoparçacıkların spektrumu yalnızca iki monometalik nanoparçacığın basit bir toplamı olmayıp, bimetalik nanoparçacıkların alaşım yapısında olduğunu göstermektedir. Bimetalik nanoparçacıkların ortalama çapı metal bileşimine dayanmaktadır. Benzer metodla sitrat indirgemesiyle Pd-Pt bimetalik nanoparçacıklar da sentezlenmiştir (Miner vd. 1981).



Şekil 2.19 Sitrat indirgemesi ile hazırlanan Au-Pt bimetalik nanoparçacıkların UV-Vis spektrumu (Miner vd. 1981)

İki metalin basamaklı indirgenmesi ile genellikle çekirdek-kabuk yapılar meydana gelmektedir. 1970'de Turkevich ve Kim, altın kaplı Pd nanoparçacıklar elde etmek için Pd nanoparçacıkların üzerinde altını biriktirmeye çalışmışlardır (Turkevich ve Kim 1970). Bir metalin daha önceden oluşturulan monometalik bir nanoparçacık üzerine biriktirilmesi çok etkili görünmektedir. Bu amaçla ikinci element önceden oluşmuş parçacıkların yüzeyinde biriktirilmeli ve önceden oluşan monometalik nanoparçacıklarda kimyasal olarak biriktirilen elementle sarılmalıdır.

Bu yöntemle PVP ile stabilize edilmiş Au-Pd bimetalik nanoparçacıklar sentezlenmiştir (Harada vd. 1993). Schmid ve arkadaşları bu yöntemle ligand ile stabilize edilmiş Au-Pd ve Au-Pt bimetalik nanoparçacıkları sentezlemiştir (Schmid vd. 1991).

Altın ve gümüş nanoparçacıklar literatüre bakıldığında en sık kullanılan nanoparçacıklardır. Gümüş nanoparçacıklar ile kıyaslandığında altın nanoparçacıkların birçok avantajı söz konusudur. Kolay hazırlanabilmesi ve yüksek homojenliğinin yanı sıra altın nanoparçacıklar biyolojik moleküllere karşı (antijen, antikor veya DNA, RNA gibi) çok iyi bir biyoyumluluk göstermektedir. Bu sebepten ötürü altın nanoparçacıklar gen analizlerinde ve antijen-antikor tayininde geniş bir şekilde yer almaktadır. Ancak Au yüzeyler görünür bölgede Ag'den daha düşük bir güçlendirme etkisi göstermektedir. Yapılan çalışmalarda altın nanoparçacık üzerine biriktirilen gümüşün monometalik altından daha yüksek sinyal verdiği gösterilmiştir. Au-Ag çekirdek-kabuk nanoparçacıklar da gen analizlerinde ve antikor-antijen tayininde kullanılmıştır. Ancak Ag biyoyumlu bir malzeme değildir. Bunun tam tersi olan Ag-Au ise immünoessey çalışmalarında rahatlıkla kullanılabilirler. Ag çekirdek altın yüzeye ekstra bir güçlendirme kazandıracaktır.

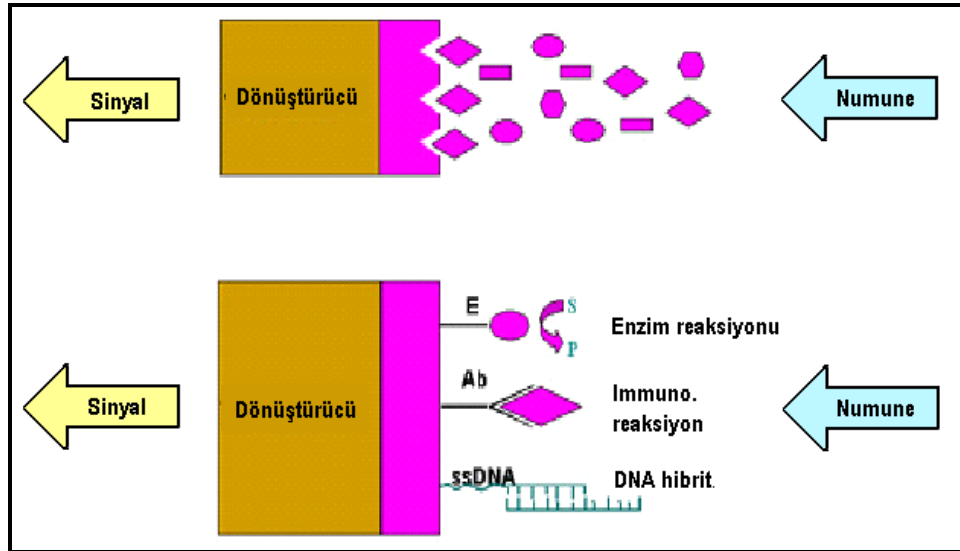
2.5 Biyosensörler

Biyosensörler, biyoloji, fizik, kimya ve mühendislik gibi bilim dallarındaki bilgilerin birleşimiyle geliştirilen cihazlardır. İlk biyosensör kandaki oksijen miktarını ölçmek için 1950 yılı başlarında L.L.Clark tarafından yapılmıştır. Bu yıllardan günümüze kadar biyosensör teknolojisi hızla artan bir şekilde ilerlemiştir.

Biyosensörler genel olarak biyolojik tanımlama elemanı içeren sensörler olarak tanımlanırlar. Başka bir deyişle biyosensörler, biyolojik moleküllerin varlığını veya derişimini ölçebilen biyomoleküler probalar olarak da adlandırılabilirler. Biyosensörleri diğer geleneksel kimyasal sensörlerden ayırt eden iki temel prensip vardır. Bunlar;

- 1) Algılama elemanı (biyoreseptör) olarak hücre, antikor, enzim veya nükleik asit gibi biyolojik yapıları bulundurması
- 2) Tasarlanan sensörün gerçekleşen biyolojik olayın sürecini veya fiziksel değişimini ölçmesi

Biyosensörler, Şekil 2.20’de şematik olarak gösterildiği gibi, meydana gelen fiziksel veya biyolojik olayı ölçülebilir sinyale dönüştürebilen cihazlardır. Başlıca iki kısımdan oluşurlar. İlk kısım spesifik bir biyolojik olayın meydana geldiği bölümdür. İkinci kısım ise bir dönüştürücü sistem ile oluşan biyolojik reaksiyonu ölçülebilir sinyale dönüştüren kısımdır.



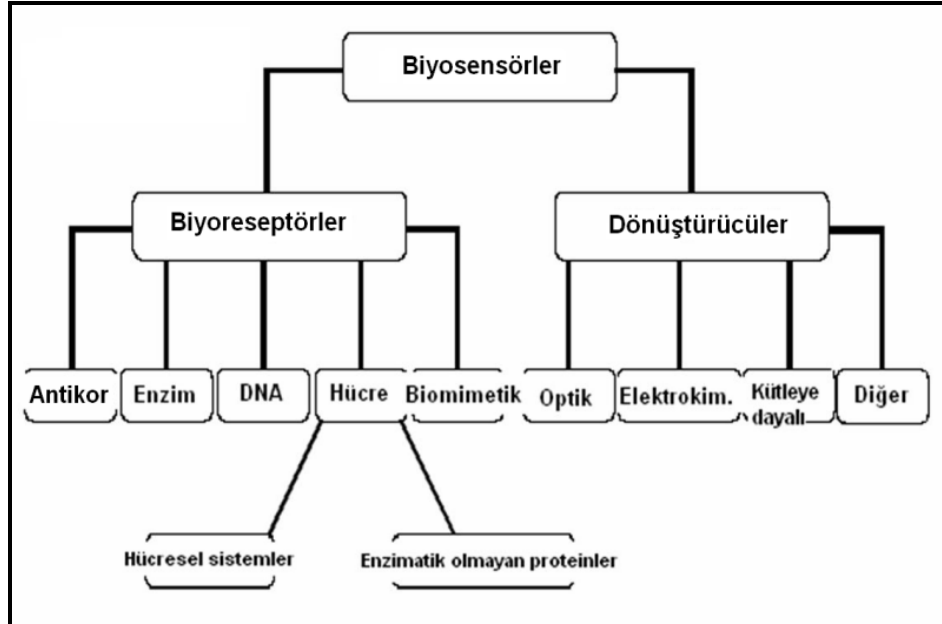
Şekil 2.20 Bir biyosensörün şematik gösterimi

Biyosensörlerin hassasiyetlerinin yüksek olması, daha fazla analiti ayırt edebilmeleri ve düşük maliyetlere sahip olmaları sebebiyle algılama ve dönüştürme performanslarını artırmak için her geçen gün bu konuda yoğun araştırmalar yapılmaktadır.

2.5.1 Biosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler meydana gelen fiziksel veya biyolojik olayı ölçülebilir sinyale dönüştürebilen cihazlardır. Başlıca iki kısımdan oluşurlar. İlk kısım spesifik bir biyolojik olayın meydana geldiği bölümdür. İkinci kısım ise bir dönüştürücü sistem ile oluşan biyolojik reaksiyonu ölçülebilir sinyale dönüştüren kısımdır.

Biyosensörler sahip oldukları biyoreseptörlere göre ve dönüştürme tekniğine göre sınıflandırılırlar. Şekil 2.21’de sınıflandırmanın şematik olarak gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.21 Biyosensörlerin sınıflandırılması

2.5.1.1 Dönüştürme tekniğine göre biyosensörlerin sınıflandırılması

Optik dönüştürücülerin kullanıldığı biyosensörler

Optik dönüştürücülerin kullanıldığı biyosensörlerde farklı spektroskopi teknikleri kullanılabilir. Bu teknikler infrared, raman, lüminesans (floresans, kemilüminesans) ve

yüzey plasmon rezonans olabilir. Bu tekniklerde kullanılan özellikler dalga genliği, enerji ve polarizasyondur. En sık kullanılan parametre dalga genliğidir. Çünkü dalga genliği analitin konsantrasyonu ile orantılıdır. Elektromanyetik ışımın enerjisi analiti saran ortamdaki değişiklikler, molekül içi atomların titreşim hareketleri veya yeni enerji seviyelerinin oluşumu hakkında bilgi verir. Sabit bir yüzeye serbest bir molekülün etkileşimi polarizasyon ölçümleri ile bulunabilir. Yayılan ışının polarizasyonu, molekül çözeltilde serbest durumda bulunduğunda rastgeledir fakat bir yüzeye bağlandığında polarizasyona uğrar.

Kütleye duyarlı dönüştürücülerin kullanıldığı biyosensörler

Kütleye duyarlı dönüştürücülerin kullanıldığı tekniğin temeli piezoelektrik kristallerinin kullanımına dayanır. Bu kristallere belirli frekansta bir elektrik sinyali uygulanınca kristaller spesifik bir frekansta titreşirler. Oksilasyonun frekansı kristalin kütesine ve kristale uygulanan elektriğin frekansına da bağlıdır. Moleküller bağlandıkça kütle artacağından kristalin oksilasyon frekansında bir değişiklik olur ve bu değişim elektriksel olarak ölçülür. Böylece kristalin kütesinde meydana gelen değişiklik belirlenmiş olur.

Elektrokimyasal dönüştürücülerin kullanıldığı biyosensörler

Biyokimyasal işlem sırasında elektron gibi elektroaktif türlerin üretilmesi veya tüketilmesi sonucunda oluşan elektrokimyasal sinyalin ölçülmesine dayanır. Ölçülen elektrokimyasal özelliğe göre amperometrik, potansiyometrik, konduktometrik ve impedimetrik teknik olarak adlandırılırlar. Bunlardan en sık kullanılan dönüştürücüler, amperometrik ve potansiyometrik olanlarıdır. Amperometrik dönüştürücüler yüksek hassasiyetleri sebebiyle biyosensörlerin tasarımında en sık kullanılan dönüştürücülerdendir. Bu dönüştürücülerde biyokimyasal reaksiyon ürünlerinin indirgenme veya yükseltgenmesine bağlı olarak çalışma elektrodundaki akım değişimi ölçülür. Ölçülen akım analit konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak değişir. Potansiyometrik dönüştürücülerin kullanıldığı biyosensörlerde ise referans elektroda

karşı çalışma elektrodundaki potansiyelde meydana gelen değişme ölçülür. Sensör ile ortam ara yüzeyinde bölgesel bir denge oluşturur ve bu denge potansiyeli analit konsantrasyonunun logaritması ile orantılıdır.

2.5.1.2 Kullanılan biyoreseptör türlerine göre biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensör teknolojisinde antikorlar, enzimler, nükleik asitler ve mikroorganizmalar biyoreseptör olarak sıklıkla kullanılırlar. Biyoreseptörler analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratarak değiştirir ve bu değişim dönüştürücü tarafından sinyal olarak ölçülür. Yüksek spesifliklerinden dolayı enzimler en çok kullanılan biyoreseptörlerdir (Luppa 2001).

Biyokatalitik esaslı biyosensörler

Bu tür bir biyosensörün temeli, biyosensörün biyolojik ortamındaki makromoleküller tarafından katalizlenen bir reaksiyona dayanır. Böylece sensör yüzeyinde bulunan biyokatalizör, analit üzerinde moleküler değişime neden olmakta ve bu dönüşüm sonucu ortamda azalan ya da artan madde miktarı takip edilerek sonuca gidilmektedir. En yaygın kullanılan biyokatalitik biyoreseptörler şunlardır:

- Enzimler (mono veya multi enzim) en yaygın kullanılan ve en iyi bilinen algılama sistemleridir.
- Hücreler (bakteriler, funguslar, ökaryotik hücreler veya mantarlar gibi mikroorganizmalar) veya hücre organelleri ya da parçacıkları (mitokondri, hücre duvarları)
- Dokular (hayvan ve insan doku parçaları)

Clark ve Lyon'un öncüsü olduğu biyosensörler üzerine yapılan ilk çalışmalardan bu yana biyolojik matrikslerde en çok kullanılan, üzerinde en çok çalışılan ve en iyi bilinen biyosensörler biyokatalitik esaslı olanlardır.

Biyokompleks veya biyoafinite esaslı biyosensörler

Bu tip biyosensörler, biyosensörün biyolojik yapısında bulunan makromoleküller ile analitin etkileşmesine dayanır. Bu etkileşimde genellikle bir dengeye ulaşılır ve böylece analit, immobilize edilen biyokompleksleştirici ajan tarafından daha fazla tüketilmez. Bu dengenin cevabı bir dedektör yardımıyla takip edilir. Biyoafinite esaslı biyosensörlerde en çok kullanılan biyoreseptörler; antikorlar/antijenler ve reseptör hücrelerdir. Biyoreseptör olarak antijen/antikor çiftinin kullanıldığı biyosensörler immünosensör olarak adlandırılırlar.

Biyokompleksleştirici reseptörlerin kullanıldığı biyosensörlerin en gelişmiş örnekleri, spesifik bir antikora, antijenin (analit) bağlanmasıyla oluşan immünokimyasal reaksiyona dayanmaktadır. Bu reaksiyon son derece spesifik bir reaksiyondur. İmmünosensörlerin duyarlılığını arttırmak için antikor ya da antijen enzim etiketlerle eşleştirilir. Genellikle bağlanma veya afinite sabiti çok büyüktür ve bu sebeple bu sistemler tersinir değildir (tek kullanımlık biyosensörler). Gerekli tampon çözeltiler kullanılarak kompleksin çözünmesi yoluyla sistem yeniden kullanılabilir hale getirilebilir.

2.6 İmmünosensörler

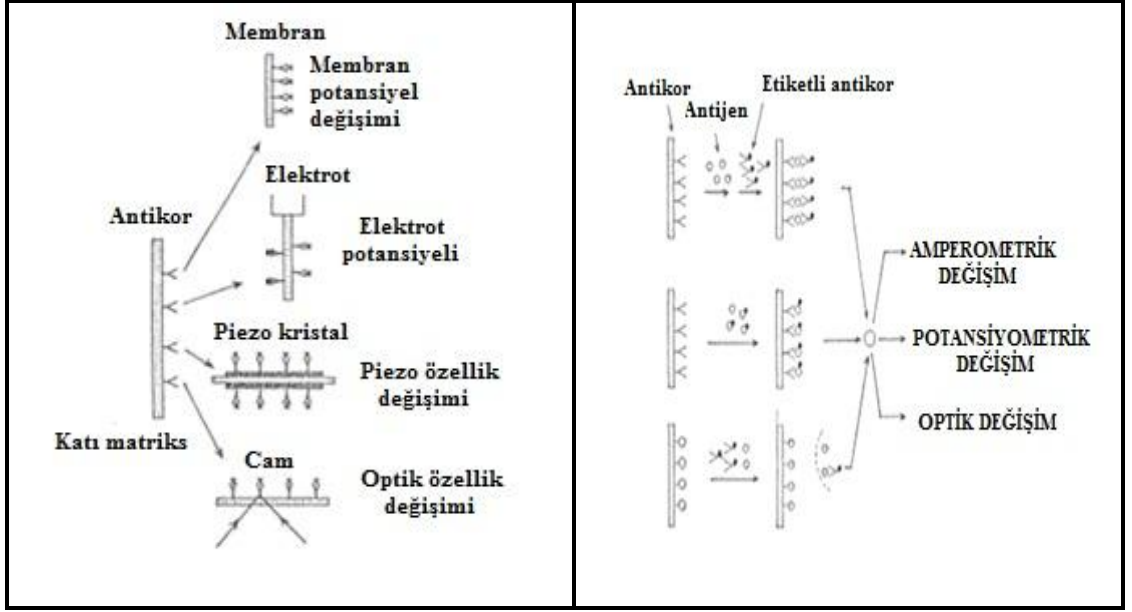
İmmünosensörler antijen ya da antikorun spesifik bir algılayıcı eleman olarak kullanıldığı bir biyosensör tipidir ve uygun antijen ile antikorun kompleks oluşumu esasına dayanır. Antikor-antijen reaksiyonu son derece seçicidir (Thevenot 1999)

Bir immünosensör elde etmek için öncelikle bir antikor, iletken bir yüzeye immobilize edilir. Daha sonra ilgili antijen, antikor ile etkileştiği zaman ara yüzeyin elektriksel özellikleri değişir ve bu değişim ölçülür. Bu değişim, genel olarak ölçüm prensibine göre sınıflandırılır. Bu ölçüm elektrokimyasal (potansiyometrik, amperometrik, kondüktometrik), optik, piezoelektrik ve termometrik olarak yapılabilir. İmmünosensörlerin çoğu optik ya da elektrokimyasal esastır. Elektrokimyasal

immunosensörlerde belirleme, genel olarak ya elektroaktif işaretleyiciler ya da enzim işaretleme yoluyla yapılmaktadır. Ölçüm prensibine göre sınıflandırılan immunosensörler, ayrıca doğrudan ve doğrudan olmayan immunosensörler olarak da sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.22).

Doğrudan immunosensörlerde, arayüzeyde meydana gelen antikor-antijen kompleksinin oluşturduğu fiziksel ya da kimyasal değişimleri dönüştürücü ile ekstra bir etiketleme işlemi kullanılmadan doğrudan ölçülür. Doğrudan immunosensörler, analit konsantrasyonunu gerçek zamanlı olarak ölçerler. Bu tür immunosensörlerde elektrot potansiyeli, membran potansiyeli, piezoelektrik ve optik özelliklerdeki değişimler ölçülür. Doğrudan tayin çoğunlukla düşük duyarlılık ve düşük kesinlik gösterirler. Bunun yanı sıra bu sistemler, spesifik olmayan etkileşimlerden de etkilenir.

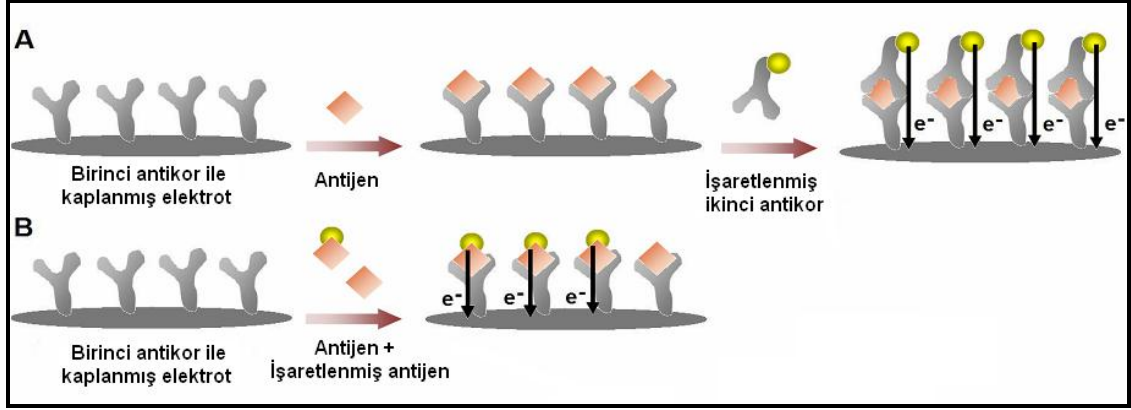
Doğrudan olmayan immunosensörler de ise tayin sırasında bir ya da daha fazla işaretli biyoajan kullanılır ve dönüştürücü ile işaretleyiciden kaynaklanan sinyal ölçülür. Bu tür immunosensörlerde birden fazla yıkama ve ayırma basamağı kullanılır ki bunlar immünoesseyler olarak adlandırılır. Doğrudan immünoesseyler ile kıyaslandığında, doğrudan olmayanlarda duyarlılık daha fazladır. Ayrıca spesifik olmayan adsorpsiyondan kaynaklanan girişimler de engellenmiş durumdadır.



Şekil 2.22 Doğrudan ve doğrudan olmayan immünoensörlerde ölçüm prensipleri

İmmünoensörlerin hazırlanmasında şekil 2.23’de şematik olarak gösterilen iki metod kullanılır:

- Sandwich metodu :** İlk adımda yüzeye immobilize edilen antikor analit ile muamele edilir. Sonra bu yüzey antikor ile bağlı olan enzim çözeltisine daldırılır ve böylece ilk adımda immobilize antikor-analit miktarı okunmuş olur.
- Yarışmalı metod :** Hedef molekül yüzeydeki antikora bağlanmak için, işaretlenmiş haliyle yarışır durumdadır. İşaretlenmiş antijenlerden elde edilen elektrokimyasal yanıt hedef antijenin derişimi ile ters orantılıdır.



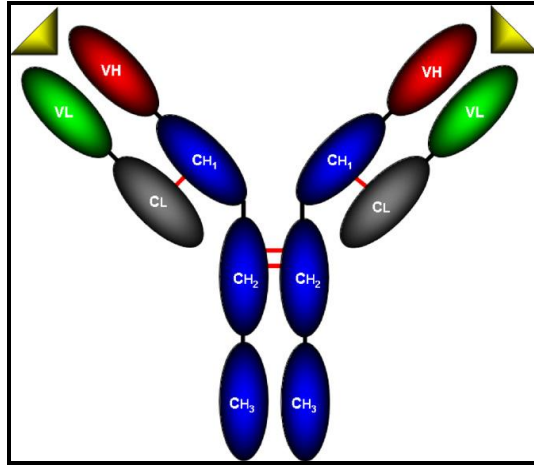
Şekil 2.23 İmmünoensörlerin hazırlanma metotları (Vestergaard 2007)

Antikorum yüzeyde düzenlenmesi ve tutunması bir immünoensörün yapımında en önemli basamaktır. Ayrıca antikor immobilizasyonun kararlılığı/aktivasyonu ve antijen ile etkileşimi de immünoensörün analitik performansının (seçicilik, duyarlılık, kararlılık, cevap süresi vb.) optimizasyonunda önemli parametrelerdir.

2.6.1. Antikorlar

Vücuda giren yabancı maddelere karşı üretilen ve protein yapısında olan vücut silahlarına antikor denir. Diğer bir deyişle spesifik bir antijeni tanıma özelliği kazanmış olan immunoglobülinlerdir ve “Ab” ile simgelenirler. Bir antijen ise immün yanıtı neden olan ve vücut tarafından yabancı olarak tanınan herhangi bir moleküler maddedir ve “Ag” ile simgelenir. Antikorlar, antijenle ilişki kurarak antijene karşı cevaplar oluştururlar. Antikorlar vücutta B hücreleri tarafından üretilir. İmmüno globülinler, serum proteinlerinin γ -globülin kesiminde bulunan proteinlerdir ve toplam plazma proteinlerinin %20’sini oluştururlar. Bir immunoglobülinin temel yapısı Şekil 2.24’de gösterilmiştir. Bir antikor molekülü 4 tane polipeptit zincirine sahiptir. Molekül ağırlığı 50 kDa olan iki ağır zincir (H) ve molekül ağırlığı 25 kDa olan iki hafif zincirden (L) oluşur. Zincirler birbirlerine disülfür bağları ile bağlıdır. Zincirler sabit (C) ve değişken (V) bölgelere sahiptirler. H zinciri, antijen için bağlayıcı bir değişken bölgeye ve üç sabit bölgeye sahiptir. Hafif zincir, antijen bağlayıcı kısmın önemli bir parçası olan bir değişken bölgeye ve bir sabit bölgeye sahiptir. İmmüno globülinler, ağır zincirlerine

göre beş sınıfa ayrılırlar. Bunlar; immunoglobülin G (IgG), immünoglobülin M (IgM), immünoglobülin A (IgA), immünoglobülin D (IgD), immünoglobülin E (IgE) olarak adlandırılırlar. IgG serumdaki immünoglobülinlerin yaklaşık %80'ini oluşturur ve virüslerle savaşta ön planda rol alır (Conroy 2009)



Şekil 2.24 Tipik bir IgG molekülü yapısı (Conroy 2009)

İmmünoglobülin molekülü, ağır ve hafif zincirlerden oluşan Fab (antigen binding fragments) parçasından antijenle spesifik olarak birleşir. Antikoru antijen ile birleştiği yüzey 8-12 aminoasit veya 3-6 glikoz molekülük bir determinant grubunu kavrayacak kadardır. Antikoru antijen ile birleştiği bu bölge “paratop” olarak adlandırılır.

Antikorlar girişim etkileri varlığında uygun bir antijenin tanınmasına imkan veren, yüksek derecede spesifikliğe sahip olduğundan, biyolojik tanıma elementi olarak çok fazla tercih edilirler. Antikorlar, düşük molekül ağırlıklı haptenlerden bakteri gibi büyük hacimli maddelere kadar, geniş bir alanda antijeni tanıma yeteneğine sahiptir. Antijenlerin sadece epitop ya da antijenik determinant denilen spesifik bölgeleri bu immün cevaba neden olur. Epitop ayrıca, uygun antikor için bağlanma bölgesi olarak görev yapar (Thevenot 1999).

2.6.2. Antikor-Antijen Bağlanma Gücü

Herhangi bir biyomoleküler reaksiyon boyunca var olan kuvvetler antikor ve antijen arasındaki etkileşiminin kararlılığını sağlarlar. Bu kuvvetler; hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimlerdir

Elektrostatik etkileşimler, polaritesi yüksek moleküller arasında dipol-dipol etkileşimleri veya yüklü moleküller arasında ya itici ya da çekici kuvvetler olabilirler. Proteinlerde polipeptit omurgasının karbonil grupları ve polar aminler kalıcı dipollere yol açar. Ayrıca polar ve yüklü zincir bölgeleri dipollere katkıda bulunur. Hidrojen bağları elektrostatik etkileşimlerin bir alt grubu olarak düşünülür. Hidrojen bağları elektronegatifliği yüksek bir proton alıcı üzerindeki bağlanmamış bir çift elektron ile elektronegatifliği yüksek bir proton verici arasında meydana gelir. Amin grupları proton verici ve karbonil grupları proton alıcı olarak görev yapar. Hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler bağlanmanın gücüne katkıda bulunurlar ve sulu çözeltilerde bu etkileşimler, moleküller arası kararlılık için oldukça fazla katkıya sahiptirler.

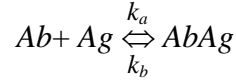
Van der Waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşimlerden daha zayıf dipoller arasında meydana gelir. Yakın moleküllerin elektrik alanları bu kuvvetlerden sorumlu geçici dipollerin oluşumuna sebep olur. Bu etkileşimler kısmen zayıf olmasına rağmen, birçok etkileşimden meydana geldiği için toplam bağlanma şiddetinin %50'sini oluşturabilir.

Hidrofobik etkileşimler, polar olmayan moleküller ve su arasında meydana gelen itici güçlerdir. Termodinamik kararlılığın sağlanmasında polar olmayan bölgeler entropinin etkisiyle bir reaksiyon bölgesinde bulunuyorsa, moleküller arası kararlılığın ve bağlanma şiddetinin artmasına yol açarlar.

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 yapar (Martin 2001).

2.6.3 Antijen-antikor bağlanma kinetiği

Çözeltide antikor antijen arasında gelişen etkileşimlerin temel termodinamik prensibi:



şeklindedir. *Ab*, serbest antikoru, *Ag* serbest antijeni, *AbAg* antijen-antikor kompleksini gösterir ve k_a ve k_d sırasıyla birleşme ve ayrışma sabitidir (Thevenot 1999).

2.6.4 İmmünoensörlerin sınıflandırılması

Elektrokimyasal (potansiyometrik, amperometrik, kondüktometrik), optik, mikrogravimetrik (piezoelektrik) ve termal immünoensörler olmak üzere dört tip immünoensör sistemi vardır. Bu immünoensör sistemlerinde doğrudan (işaretleme kullanılmadan) ya da doğrudan olmayan (işaretleme kullanılarak) yöntemlerle çalışılabilmektedir (Thevenot 1999).

Optik immünoensörler biyoanalizler için en çok tercih edilen yöntemlerdendir. Diğer dönüştürücü yöntemleriyle kıyaslandığında, uygulanan görünür ışınının avantajlarının kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Bunun yanı sıra yüzeyi aşındırmayan ve sinyal oluşumu ile okumanın hızlı olduğu bir tekniktir. Bu teknikte ışık, algılayıcı yüzeyden yansıdığı zaman adsorpsiyon, lüminesans, saçılma veya kırılma indisi gibi özelliklerinde değişiklikler meydana gelir. Bu durum optik biyosensörler için temel prensiplerdir. İmmünoensör teknolojisinde kullanılan en yaygın optik sistem SPR (surface plasmon rezonans) temelli cihazlardır (Thevenot 1999, Jianrong 2004)

Piezoelektrik immünoensörler, antijen-antikor kompleks oluşumuna bağlı kütle değişiminin doğrudan ölçülmesine dayanır. Bu sistemin temel prensibi, sensörün substratında meydana gelen akustik dalgaların yayılımına dayanmaktadır. Akustik dalganın fazı ve hızı, antijen kaplı sensör yüzeyine antikor moleküllerinin spesifik adsorpsiyonundan etkilenmektedir. Kuartz ve çinkooksit en yaygın kullanılan

piezoelektrik malzemelerdir. QCM (Quartz crystal microbalance) ve SAW (Surface acoustic wave) olmak üzere başlıca iki tür kütle sensörü bu tür immünosensörlerde kullanılırlar (Jianrong 2004)

Çoğu kimyasal ve biyokimyasal reaksiyon ısının absorpsiyonunu ve üretilmesini içerir. Kalorimetrik immünosensörlerde ısı değişimi ya bir termistörle ya da bir termofille ölçülebilir. Bir termistör metal oksit ve bir termofil bir silikon-altın materyal içerir. Cihaz biyoreseptör ile kaplanır ve analit ile etkileşime girdiğinde bir sıcaklık değişimi olarak kaydedilen bir ekzotermik reaksiyon meydana gelir. Kalorimetrik esaslı bir biyosensör kullanılarak farklı moleküllerin enzimatik reaksiyonlarını incelemek mümkündür. Bu teknolojinin en belirgin avantajları, bulanık örneklerde kullanılabilirliği ve işaretlemenin kullanılmadığı sistemlerde kullanılabilir olmasıdır. Bu avantajlarına rağmen literatürde immünosensörler üzerine en az çalışma kalorimetrik immünosensörlere aittir. Son zamanlarda antikor-antijen kompleks oluşumu ve DNA hibridizasyonun belirlenmesi için kalorimetrik sistemlerinin kullanıldığı birkaç çalışma literatüre girmiştir (Thevenot 1999).

Elektrokimyasal immunosensörler, potansiyometrik, kondüktometrik ve amperometrik olarak sınıflandırılırlar.

Potansiyometrik immünosensörler ile antijen-antikor etkileşiminden dolayı oluşan potansiyel farkı ölçülür. Ölçülen potansiyel farkı Nernst eşitliği ile ifade edilir ve potansiyeldeki değişim spesifik iyon aktivitesine bağlıdır. İmmobilize edilen antikor ile serbest halde bulunan antijen arasındaki bağlanma olayı referans elektroda karşı ölçülür. İyon seçici elektrotlarda, örnek ile sensör yüzeyi arasındaki yük ayrımını sağlamak için iyon seçici membranlar kullanılır. Sensör ise seçici geçirgen bir dış tabaka ve biyoaktif malzemedir (örneğin enzim gibi) meydana gelir. Bu dış tabaka, çözeltide bulunan herhangi bir elektroaktif türden oluşan girişimi azaltarak sensörün duyarlılığını artırır. Enzim katalizli meydana gelen bir reaksiyon sonucunda oluşan veya harcanan türler iyon seçici elektrotla tayin edilir ve derişimin logaritmasına bağlı sinyaller oluşur (Conroy 2009).

Kondüktometrik immünosensörler, bir biyolojik tanıma olayı ile iletkenlik arasındaki ilişkiyi ölçerler. Birçok reaksiyon iyonik türlerin derişiminden etkilenir, bu durum çözeltilerdeki elektriksel iletkenliğin veya akımın değişimine neden olur. Kondüktometrik immünosensörlerde, antijen-antikor kompleksinin oluşması sonucunda elektrot yüzeyinde meydana gelen elektriksel iletkenlikteki değişim gözlenmektedir. Bu tür bir immünosensörün en büyük dezavantajı duyarlılığının diğerlerine göre düşük olmasıdır.

Amperometrik immünosensörler, bir elektrokimyasal reaksiyon sırasında oluşan akımın ölçülmesi temeline göre çalışırlar. Birçok analit elektrokimyasal reaksiyonlarda bir redoks çiftine sahip değildir ve bu yüzden amperometrik sensörlerin çok az doğrudan uygulamaları vardır. Elektroaktif türler içeren etiketlerin kullanıldığı amperometrik immünosensörler akım oluştururlar. Bu akım elektroaktif türlerin çalışma elektrodunda indirgenmesi veya yükseltgenmesi ile oluşur. Burada analit spesifik olarak bağlandığından, spesifik olmayan bağlanma yoktur. Akım elektroaktif türlerin derişimi ile lineer bir değişim gösterir. Referans elektrot olarak Ag/AgCl, çalışma elektrodu olarak antikorun immobilize edildiği metaller, karbon elektrotlar ve bunların modifiye edilmiş halleri kullanılır.

Amperometrik immünosensörlerde doğrusal taramalı voltametri, dönüşümlü voltametri, puls voltametrisi ve sıyırma voltametrisi gibi teknikler kullanılabilir. Bu tekniklerden sıyırma voltametrisi literatürde en sık görülen yöntemlerden birisidir. Bu yöntemde iki basamak söz konusudur. Burada öncelikle analit bir ön deriştirme işlemi ile elektrot yüzeyine biriktirilir. Biriktirme işlemi adsorptif, katodik ve anodik olmak üzere üç şekilde olur. Sıyırma basamağında ise elektrot yüzeyine biriktirilen analit belirli bir potansiyelde çözelti içerisinde tekrar yükseltgenir ya da indirgenir ve bu sırada hücreden akım geçer. Potansiyele karşı ölçülen akım voltamogramlar ile belirlenir.

2.7 Koliform Bakteriler ve *E. coli*

Koliform grup bakteriler, Enterobacteriaceae familyası içinde yer alan, fakültatif anaerob, gram negatif, spor oluşturmeyen, 35 °C' de 48 saat içinde laktozdan gaz ve asit oluşturan, çubuk şeklindeki bakterilerdir. Bu grupta yer alan ve gıda mikrobiyolojisi açısından önemli olan mikroorganizmalar; *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* 'dir.

Koliform grup mikroorganizmalara pek çok gıda hammaddesinde rastlanmaktadır. Bunların başında; taze sebzeler, taze yumurta, çiğ süt, kanatlı etleri ve koliform bakımından sayıca zengin sulardan alınan kabuklu ve diğer su ürünleri gelmektedir.

Escherichia coli ilk kez 1885 yılında Theodor Escherich tarafından çocuk dışkılarından izole edilip tanımlanmıştır. Bugün üzerinde en çok çalışılan ve genetik yapısı en iyi bilinen mikroorganizmadır (Adams 1999).

E. coli Enterobacteriaceae ailesinin *Escherichia* cinsine ait katalaz pozitif, oksidaz negatif, fermentatif özelliğe sahip sporsuz, kısa, çubuk şeklinde gram-negatif bakterilerdir. *E. coli* optimum 37°C civarı olmak üzere 10°C-50°C arası gelişebilen tipik bir mesofil mikroorganizmadır. Gelişmesi için nötr ortama yakın pH'lar optimum olsa da, optimal koşullarda pH=4,4'e kadar gelişim göstermektedir. Bakterinin gelişimi için minimum su aktivitesi (a_w) 0.95'tir (Chapelle 2001).

Koliform grubu mikroorganizmaların hepsi dışkı kökenli değildir. Bu grupta bulunan bakterilerden normal florası insanların ve sıcakkanlı hayvanların alt sindirim sistemleri olanlar "fekal koliform" olarak tanımlanmakta ve bunlar fekal kontaminasyonun bir göstergesi olarak kabul edilmektedirler. Koliform grup içinde fekal koliform olarak tanımlanan bakterilerin büyük çoğunluğunun *E. coli* olduğu bilinmektedir. Grubun diğer üyeleri toprak ve bitki kökenli olabilmektedirler. Herhangi bir örnekte *E. coli*'ye ve/veya fekal koliform bakterilere rastlanması oraya doğrudan ya da dolaylı olarak dışkı bulaştığının ve yine bağırsak kökenli Salmonella ve Shigella gibi primer patojenlerin de

olabileceğinin bir göstergesidir. Bu nedenle hiçbir gıda maddesinde, içme ve kullanma sularında, denizlerde ve göllerde *E. coli* ve fekal koliform bulunmasına izin verilmezken, bazı gıdalarda belirli sayıda koliform bakteri bulunmasına izin verilebilmektedir (Çakır 2000).

E. coli, fekal kontaminasyonun bir göstergesi olması yanında genetik yapısı en iyi bilinen canlı olma özelliğine de sahiptir. Suşlarının birçoğu zararsız olan bu bakterinin bazı patojenik tipleri, insan ve hayvanlarda sonucu ölüme kadar giden ishallere, yara enfeksiyonlarına, menenjit, sepsisemi, arteriosklerosis, hemolitik üremik sendrom, çeşitli immünolojik hastalıklar vb. gibi hastalıklara sebep olabilmektedir.

2.7.1 *E. coli* belirleme yöntemleri

2.7.1.1 En muhtemel sayı yöntemi

Genel olarak koliform grup/fekal koliform grup bakteriler/*E. coli* sayılmasında EMS yöntemi kullanılmakta ve yöntem üç aşamada uygulanmaktadır. Bu aşamalar sırasıyla, koliform grup bakterilerin muhtemel sayısını belirlemek, koliformların kesin sayısını onaylamak ve aynı anda farklı bir besiyerinde fekal koliformların sayısını belirlemek ve *E. coli* sayısını belirlemektir.

Türk Standartları Enstitüsü (TSE) ve Uluslararası Standartlar Örgütü (ISO)' nün koliform grup mikroorganizma aramak için kullanılan standart analiz yöntemlerine göre örnek hazırlanıp dilüsyonları yapıldıktan sonra ardışık 5 dilüsyondan 3'er adet Lauril Sülfat Triptoz Broth (LST) besiyerine 1'er mL ekim yapılmakta ve 37°C'de 24 (gerekirse 48) saat inkübasyondan sonra pozitif sonuç veren tüpler muhtemel koliform olarak değerlendirilmektedir. Bu yöntemle göre, muhtemel koliformların sayısını doğrulamak için de Brilliant Green Bile Broth (BGBB) besiyerine ekim yapılmakta ve 37 °C'de 24 saat (gerekirse 48) inkübasyondan sonra pozitif sonuç veren tüpler koliform grup olarak doğrulanmaktadır.

TS 6063/ISO 7251'e göre *E. coli* aranmasında analize koliform grupta olduğu gibi örneğin hazırlanıp dilüsyonlarının yapılmasından sonra, ardışık 5 dilüsyondan 3'er adet LST besiyerine 1'er ml ekim yapılmakta ve tüpler 37 °C'de 24 (gerekirse 48) saat inkübasyona bırakılmaktadır. Burada pozitif sonuç veren tüplerden, su banyosunda 44.5°C'de tutulan *E. coli* Broth besiyerlerine ekim yapılmakta ve gaz oluşumu için yine 44.5°C'de 24 (gerekirse 48) saat inkübe edilmektedir. Bu sürenin sonunda gaz oluşumu görülen tüpler fekal koliform olarak değerlendirilmektedir. Testin devamında *E. coli* Broth besiyerinde pozitif sonuç veren tüplerden 44.5°C'deki Tripton Water (TW) besiyerine ekim yapılmakta ve aynı derecede 48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra indol testi yapılmaktadır. Bu testin sonunda indol pozitif reaksiyon veren tüpler *E. coli*, negatif reaksiyon verenler ise *E. coli* dışındaki diğer fekal koliformlar olarak değerlendirilmektedir (Çakır 2000).

2.7.1.2 Katı besiyeri yöntemi

Pek çok kuruluş tarafından koliform grup ve *E. coli* aranmasında standart yöntem olarak EMS yöntemi gösterilirken, özellikle izolasyon amaçlı sayım çalışmalarında katı besiyeri kullanılmaktadır. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan besiyeri Violet Bile Red (VRB) Agardır. Bu besiyerinde sayım yapılırken yayma, dökme ve çift tabaka dökme plak yöntemleri uygulanmaktadır (Çakır 2000).

2.7.1.3 Membran filtrasyon yöntemi

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

Membran filtrasyon tekniğinin bazı üstünlükleri bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri; örnekte az sayıda mikroorganizmanın bulunması durumunda bile belirleme imkânı vermesi ve inkübasyondan sonra filtrelerin kurutularak saklanabilmesidir (Çakır 2000).

2.7.1.4 MUG Yöntemi

İlk kez 1982 yılında ortaya konulan MUG tekniği, son yıllarda *E. coli* sayımına yeni bir yaklaşım getirmiştir. Bu tekniğin prensibi; doğrudan besiyerinin ilave edilen ya da selektif katkı olarak ilave edilen 4-methyleumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) adlı bileşiğin *E. coli*'de yapısal bir enzim olarak bulunan β -D-glucuronidase (MUGase, β -GUR) enzimi tarafından 4-methyleumbelliferone adlı florojenik bir ürüne dönüşmesi ve bu ürünün de 366 nm uzun dalga boylu ultraviyole ışık altında floresan ışımaya vermesi esasına dayanmaktadır. MUG, katı ve sıvı besiyerlerinin bileşimine kolaylıkla ilave edilebildiği için, EMS yöntemi, katı besiyerleri ve membran filtrasyon yöntemi ile yapılan koliform grup/*E. coli* analizlerinde kullanılmaktadır.

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

MUG sistemi kullanıldığında dikkat edilmesi gereken en önemli nokta kendiliğinden floresan veren cam tüplerdir. Analiz sonucu negatif olsa dahi bu tür tüplerde pozitifmiş gibi görünmekte ve bu da sahte pozitif sonuçların alınmasına neden olmaktadır. Bunu önlemek için besiyeri tüplere dağıtılmadan önce tüpler UV lamba ile kontrol edilmeli ve böyle tüpler kullanılmamalıdır (Çakır 2000).

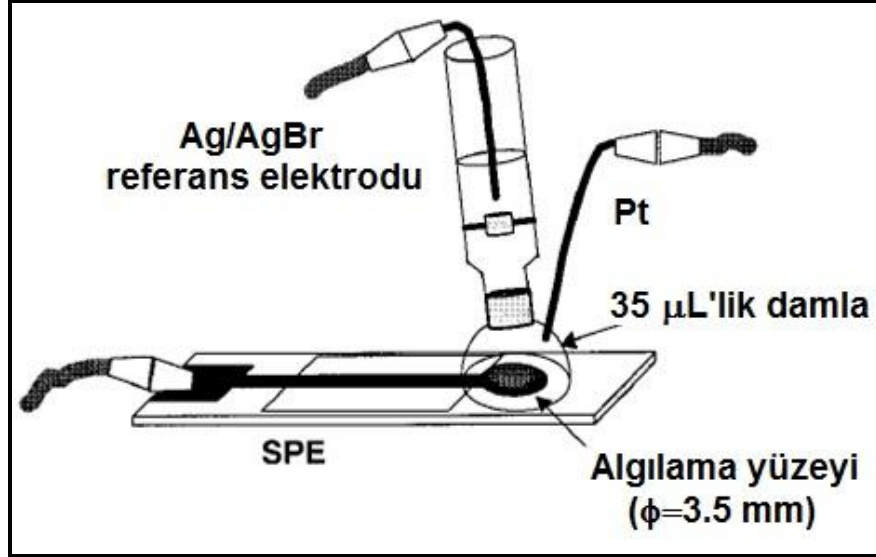
2.7.1.5 Elektrokimyasal yöntemler

Koliform grup/*E. coli* aranmasında elektrokimyasal yöntemler de kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin esası gelişmekte olan bakteri kültüründe oluşan moleküler hidrojenin ölçülmesi, bakteri kültürünün ortama uyum sağlarken oluşan direncin ölçülmesi ve elektrot yüzeyi ile ilişki kurulduğunda bakteri yüzeyleri ile arada oluşan elektron transferinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Çiğ süt, yoğurt, dondurma ve pastörize krema gibi süt ürünlerinde koliform grup mikroorganizma aranmasında kullanılmak üzere geliştirilmiş Bactometer™ mikrobiyel analiz cihazı impedans-kondüktans prensibine göre çalışmaktadır. Bu yönteme göre önce standart miktarda test örneği alınarak aletin inkübatör kısmına yerleştirilerek 35°C'de 3 saat ön zenginleştirmeye bırakılır. Bu aşamada Coliform Medium (CM) besiyeri kullanılmaktadır. Ön zenginleştirme aşamasından sonra 1.5 mL örnek alınarak aletin inkübasyon kuyucuklarına yerleştirilip yine aynı derecede inkübasyona bırakılır. Kuyucuk içindeki test karışımı renginin menekşeden sarıya dönmesi koliform grup pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmektedir. Analiz cihazı bilgisayar donanımlı olduğu için sonuçlar direkt bilgisayara kaydedilebilmekte veya yazdırılabilmektedir.

2.8 Kaynak Araştırması

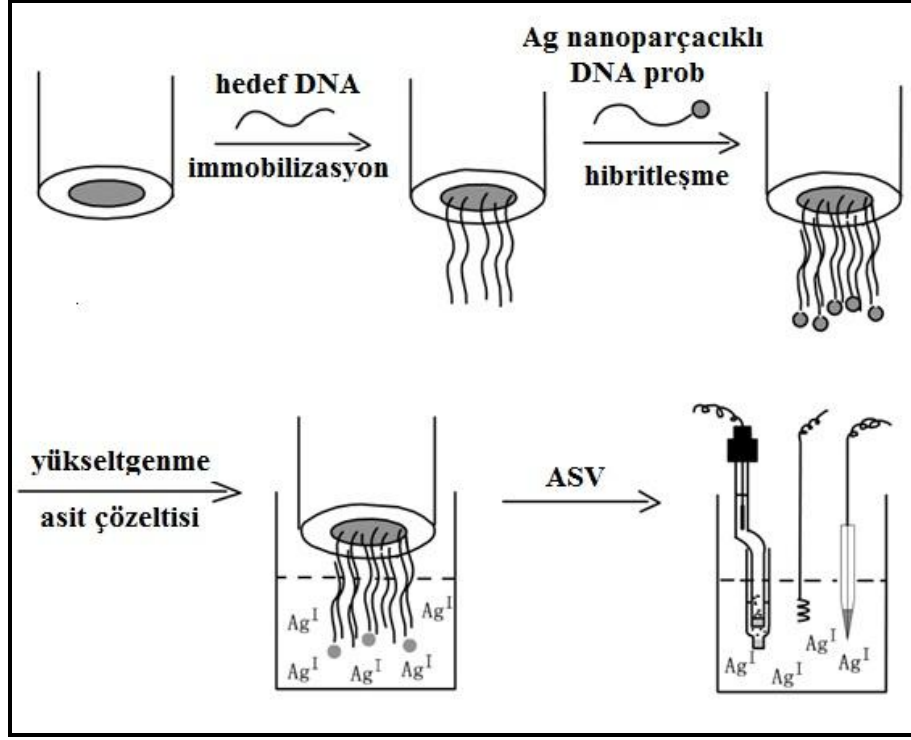
Dequaire ve arkadaşları (Dequaire vd. 2000) altın nanoparçacıkları etiket olarak kullanarak elektrokimyasal immünoessey çalışması gerçekleştirmişlerdir. Altın nanoparçacıkları asidik çözeltide yükseltgeyerek çözdükten sonra anodik sıyırma voltametrisi kullanarak altın miktarını tayin etmişlerdir. Tek kullanımlık karbon esaslı SPE'lerle 35 µL'lik çözeltide ölçümleri gerçekleştirmişlerdir. Bu yöntemi immüno globülin G (IgG)'yi model olarak kullanarak heterojen yarışmasız immünoessey çalışması için kullanmışlar ve 3×10^{-12} M'dan daha düşük IgG konsantrasyonlarını tayin edebilmişlerdir. Yöntemin bu kadar yüksek performans göstermesini, Au³⁺'nin ASV ile SPE elektrotlarda çalışılmasına ve immunokompleks ile bağlanan altın nanoparçacığın her birinden yüksek miktarda altın iyonun ortaya

çıkmasına bağlamışlardır. Şekil 2.25’da Dequaire ve arkadaşlarının kullanmış oldukları elektrot sistemi gösterilmektedir.



Şekil 2.25 Dequaire ve arkadaşlarının elektro kimyasal ölçümlerini gerçekleştirdiği elektrot düzeneğinin şematik gösterimi

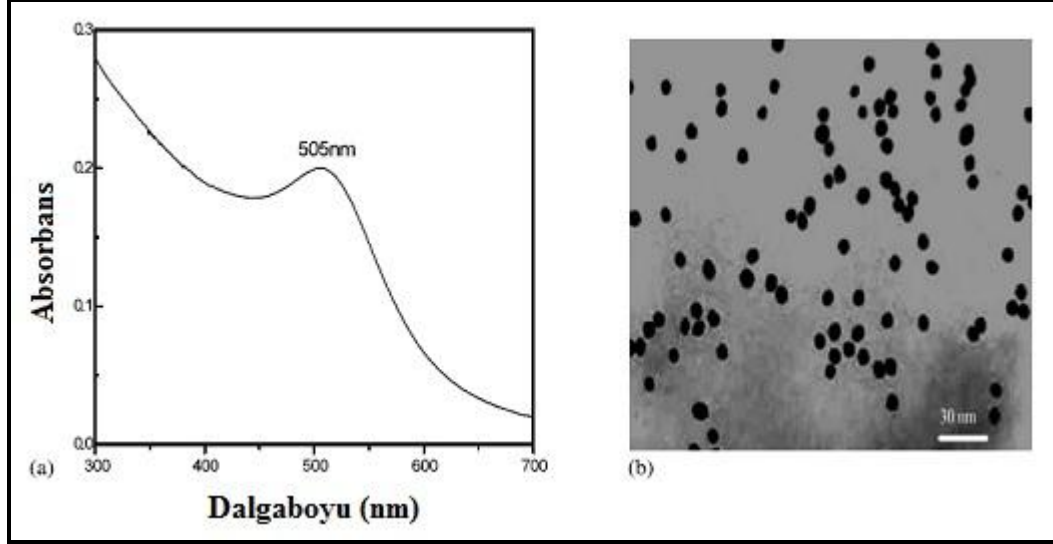
Cai ve arkadaşları (Cai vd. 2002) elektro kimyasal olarak DNA hibritleşmesini belirlemek için bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada gümüş nanoparçacıkları oligonükleotit etiketi olarak kullanmışlardır. Hedef DNA molekülleri ile gümüş nanoparçacık etiketli DNA probunu hibritleştirmişler ve daha sonra hibritteki gümüş nanoparçacıkları asidik çözeltide gümüş iyonlarına yükseltmişlerdir. Çözeltiye geçen Ag^+ iyonlarını karbon fiber elektrotlar kullanarak anodik sıyırma voltametri ile tayin etmişlerdir. Hedef oligonükleotitin yüzeye kaplanma miktarını, gümüşün çözünme süresini ve elektro kimyasal sıyırma deneyleri sırasındaki çeşitli deneysel parametreleri belirleyerek optimize etmişlerdir. Mikroelektrotta gerçekleştirilen sıyırma analizinin çok hassas olması ve her bir DNA hibridinden çok sayıda gümüş (I) iyonunun ortaya çıkması, 0.5 pmol/L kadar düşük tayin sınırına ulaşılmasını sağladığını belirtmişlerdir. Şekil 2.26’da Cai ve arkadaşlarının izlemiş oldukları yöntemin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.26 Gümüş nanoparçacık etiketin kullanıldığı DNA hibritleşmesinin elektrokimyasal sıyırma voltametri ile tayininin şematik gösterimi (Cai vd., 2002)

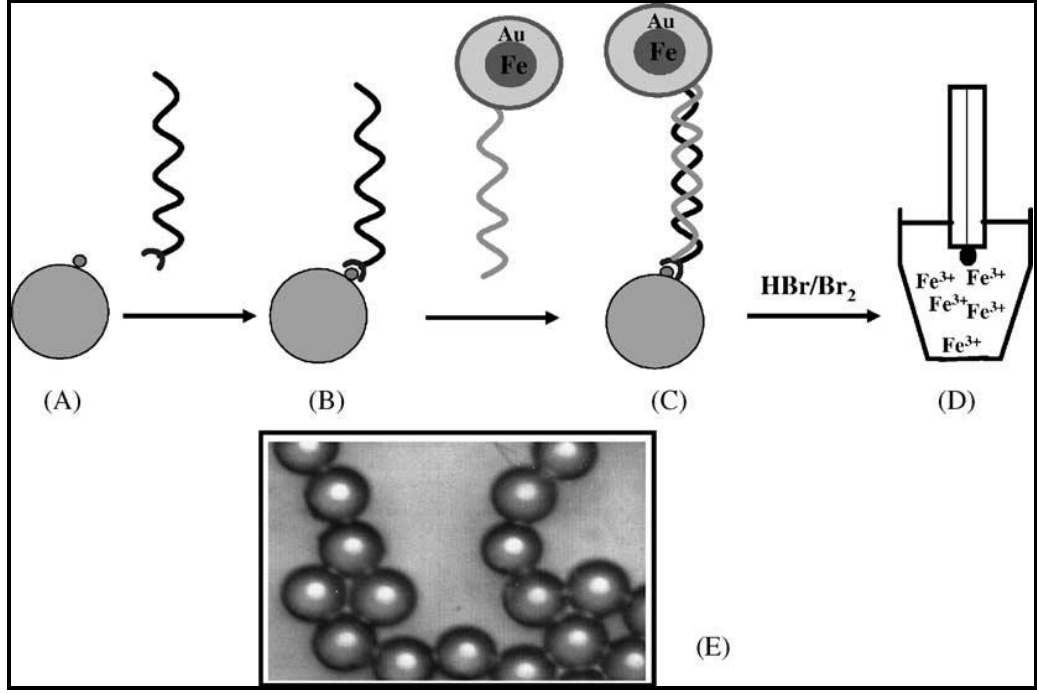
Wang ve arkadaşları (Wang vd. 2003) gümüş nanoparçacık üzerine immobilize ettikleri DNA'yı, kendiliğinden düzenlenme tekniği ile altın nanoparçacık ile modifiye ettikleri yüzeyde elektrokimyasal olarak tayin etmeyi başarmışlardır. Altın elektrodu sisteamin ile kendiliğinden düzenlenme tekniği ile modifiye eden grup, daha sonra bu elektrodu altın nanoparçacık içeren çözelti ile muamele etmişlerdir. Hedef DNA'nın modifiye elektroda immobilizasyonunu gerçekleştirdikten sonra hibritleşme işlemi için gümüş nanoparçacık ile etiketledikleri DNA probunu içeren çözeltiliye daldırmışlardır. Altın elektrodun modifikasyon aşamalarını test etmek için elektrokimyasal impedans spektroskopisi tekniği kullanmışlardır. Hibritleşmenin sona ermesinin ardından elektrot yüzeyi asidik çözeltiliye alınarak hibritteki gümüş nanoparçacıkların çözülmesini sağlamışlardır. Anodik sıyırma voltametri tekniğini kullanarak karbon fiber mikroelektrotlarda elektrokimyasal deneyleri gerçekleştirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlardan 10-800 pmol/L aralığındaki ssDNA tayin edebileceklerini ve alt tayin sınırlarının hedef oligonükleotitler için 5 pmol/L olduğunu belirtmişlerdir. Şekil 2.27'de

Wang ve arkadaşları tarafından sentezlenen altın nanoparçacıkların TEM ve UV-Vis görüntüleri verilmiştir.



Şekil 2.27 Wang ve arkadaşlarının sentezledikleri altın nanoparçacıkların: a. UV-Vis spektrumu, b. TEM görüntüsü

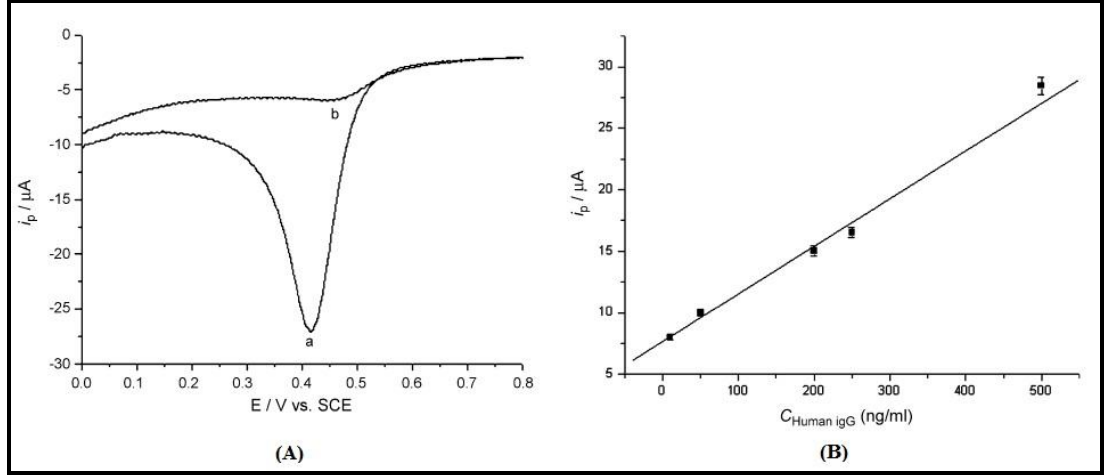
Elektrokimyasal sıyırma tekniğinin kullanıldığı bir başka çalışma altın kaplı demir içeren nanoparçacıklarla yapılmıştır (Wang vd. 2003). Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada sentezledikleri demir-altın çekirdek-kabuk nanoparçacıklara DNA probunu bağlamışlardır. Şekil 2.18’de şematik olarak gösterildiği gibi, streptavidin kaplı polistiren kürelere biyotin işaretli hedef DNA molekülünü bağlamışlardır. Çekirdek-kabuk Fe-Au nanoparçacık ile etikledikleri DNA probu ile hazırladıkları hedef molekül kaplı polistiren küreleri karıştırdıktan sonra hibritleşmenin gerçekleştirilmesini sağlamışlardır. Asit çözeltisine aldıkları demirin pH değerini ayarladıktan sonra ligand varlığında katodik sıyırma voltametri ile tayin etmişlerdir. Demir pikinin, hedef DNA konsantrasyonu ile doğrusal olarak arttığını ve kalibrasyon grafiğinin hassasiyetinin 1.07 nA / μ g olduğunu göstermişlerdir.



Şekil 2.28 Wang ve arkadaşları tarafından hazırlanan altın kaplı demir nanoparçacık etiketli DNA tayin protokolünün şematik gösterimi

A. Streptavidin kaplı polistiren küreler, B. Biyotin işaretli hedef DNA'nın tutturulması, C. Demir-altın etiketli prob DNA ile hibritleşme, D. Sıyırma volametri için demir-altın parçacığın asitte çözülmesi, E. Hibritleşmeden sonra polistiren kürelerin optik mikroskop görüntüsü

Altın nanoparçacıkların etiket olarak kullanıldığı bir başka çalışma Chen ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (Chen vd. 2007). Sandviç immünoessey prosedürünün uygulandığı çalışmada insan-IgG (antijen) molekülü tayin edilmiştir. İlk aşamada kolloidal altın nanoparçacıkları sentezledikten sonra bunları anti-human IgG antikoruna bağlamışlardır. İkinci aşamada ise karbon pasta elektrodu elektrokimyasal olarak önışleme tabii tuttukten sonra adsorpsiyon ile anti-human IgG antikorunu yüzeye bağlamışlardır. Antikor ile modifiye edilen karbon pasta elektrodu üzerine çeşitli konsantrasyonlarda insan-IgG bırakıp bir süre bekletmişlerdir. Daha sonra modifiye elektrodun üzerine antikor ile modifiye edilen altın nanoparçacıkları göndermişler, oluşan immunosensöre 150s 1.30 V potansiyel uygulamışlardır. 1.30-0 V arasında bir potansiyel taraması yaparak altın nanoparçacıkların AuCl₄⁻ iyonlarının karbon pasta elektroda adsorbe olmasını sağlamışlardır. Son olarak da oluşan AuCl₄⁻ iyonlarını elektrokimyasal olarak indirgemişlerdir. Şekil 2.29'da gösterilen voltamogramda gözlenen indirgeme piki ile antijen konsantrasyonu arasında doğrusal bir ilişki gözlemişler ve alt tayin sınırını 4.0 ng/ml belirlemişlerdir.



Şekil 2.29 Chen ve arkadaşlarının elde ettiği: a. İnsan IgG için voltamogram, b. indirgenme pik akımına karşı insan-IgG derişiminin kalibrasyon grafiği

Cai ve arkadaşları (Cai vd. 2002) gümüş ile güçlendirilen altın nanoparçacık etiketlerini kullanarak DNA hibritleşmesini elektrokimyasal olarak tayin etmişlerdir. Bu çalışmada camsı karbon elektrot üzerine hedef oligonükleotit elektrostatik adsorpsiyon ile tutturulmuştur. Daha sonra elektroda tutturulan hedef DNA, altın nanoparçacık ile etiketlenen DNA prob ile etkileştirerek hibritleştirilmiştir. Altın nanoparçacık üzerine gümüşün biriktirilmesinin ardından hedef ile prob molekülü arasındaki bağlanma diferansiyel puls voltametri ile takip edilmiştir. Sinyal şiddetinde gözlenen farktan mükemmel şekilde eşleşen iki DNA zinciri ile bir baz çifti yanlış olan mükemmel yakın eşleşme ayırt edilmiştir.

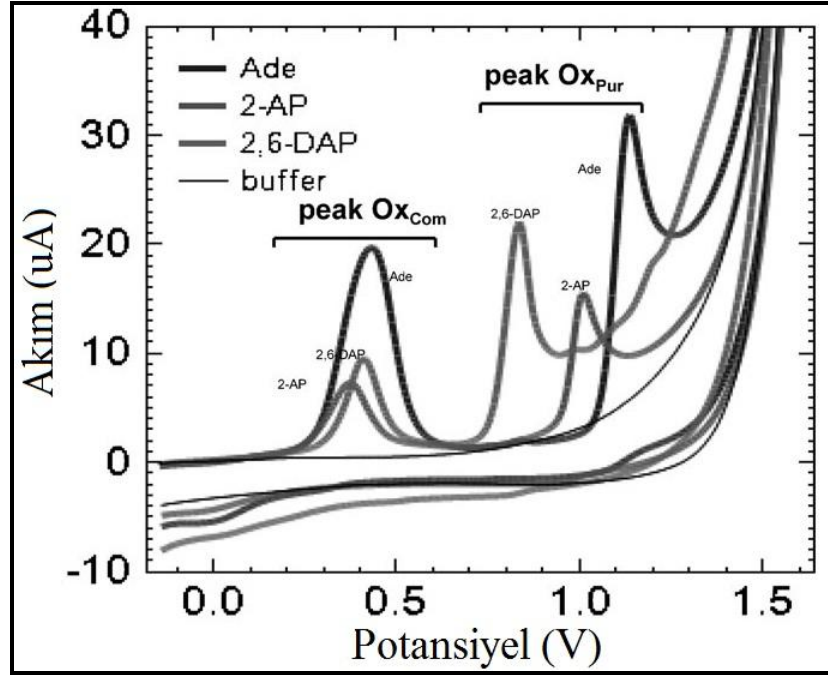
Nakamura ve arkadaşları (Nakamura vd. 1991) pirolitik grafit ve gözenekli nitroselüloz filtreden oluşan bir elektrot sistemi kullanarak idrarda *E. coli* tayinini gerçekleştirmişlerdir. Dönüşümlü voltamogramda gözlenen pik akımı idrardaki *E. coli*'nin başlangıç hücre konsantrasyonu artışı ile artmıştır. Bu sistem ile idrar içerisindeki 5×10^2 - 5×10^5 hücre/ml tayin edilmiştir. Ayrıca çeşitli antibiyotiklere karşı bakterinin duyarlılığı pik akımlarından belirlenmiştir.

Yang ve arkadaşları (Yang vd. 2009) platin nanoparçacık kaplı altın nanogözenekli film (PGNF) sentezlendikten sonra bu malzeme ile modifiye edilen elektrodu *E. coli* bakterisinin hızlı ve başarılı bir şekilde tayinini gerçekleştirmişlerdir. Sentezlenen

filmin geniş yüzey alanı ve yüksek düzenliliği SEM ve EDS görüntüleriyle kanıtlanmıştır. Daha sonra PGNF modifiye elektrodun, elektrokimyasal davranışları dönüşümlü voltametri ve amperometrik i-t grafikleriyle incelenmiştir. PGNF modifiye elektrot, *E. coli*'ye karşı mükemmel bir elektrokatalitik aktivite göstermiştir. Akım duyarlılığı, 2×10^1 ile 1×10^6 kob/ml arasında iyi bir lineerlik göstermiş ve LOD değerinin 10 kob/ml olduğu belirtilmiştir. Yüksek hassasiyete, geniş doğrusal aralığa ve iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olması PGNF'yi taşınabilir amperometrik *E. coli* sensörü olarak ümit verici bir adaydır.

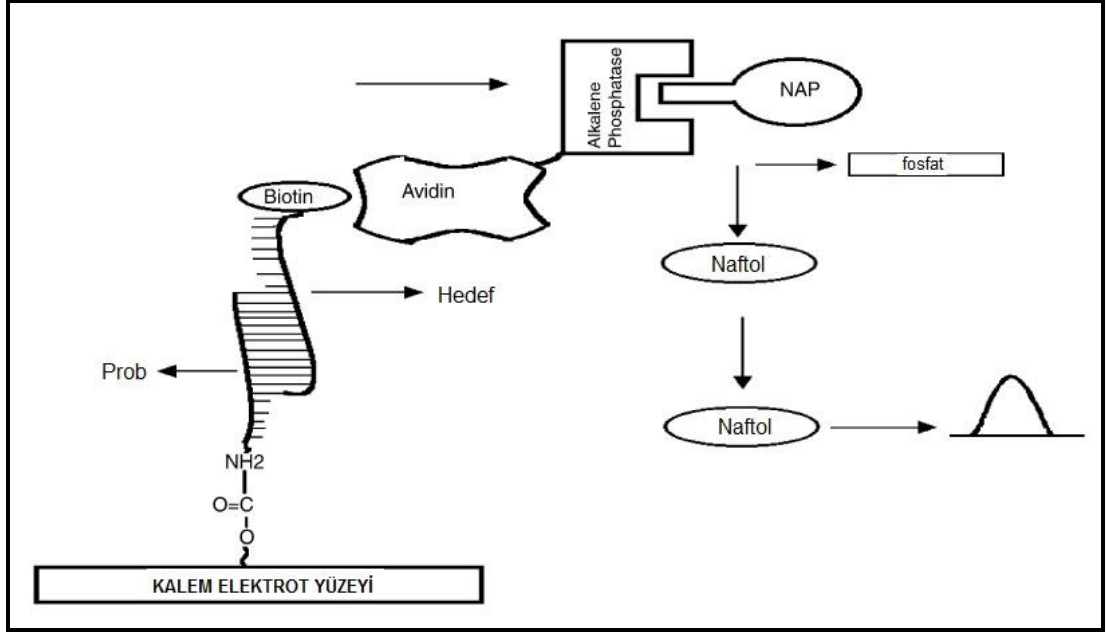
Gümüş nanoparçacıkların etiket olarak kullanıldığı bir başka çalışma Karadeniz ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Karadeniz vd. 2007). Kalem grafit elektrodun kullanıldığı çalışmada yeni bir DNA sensörü geliştirilmiştir. Bu çalışmada hem etiket olarak kullandıkları gümüşün yükseltgenme sinyallerinden hem de elektroaktif DNA bazı guaninden yararlanılmıştır. Sentezlenen nanoparçacıkların karakterizasyonu TEM ve SEM analizleriyle, elektrokimyasal davranışları dönüşümlü voltametri ve diferansiyel puls voltametrisi ile yapılmıştır. Kalem grafit elektrodun nükleik asit ile yapılan yüzey modifikasyonu amino uçlu DNA oligonükleotidin gümüş nanoparçacıkların yüzeyine pasif adsorpsiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal DNA sensörün analitik performansını belirlemek, daha yüksek hassasiyette ve seçicilikte gümüş ve guanin sinyali elde edebilmek için DNA konsantrasyonu, nanoparçacık konsantrasyonu ve değişik tampon çözeltilerin etkisi gibi optimum analitik şartları belirlemiştir.

Aladağ ve arkadaşları (Aladağ vd. 2010) tarafından kalem grafit elektrot ile gerçekleştirilen çalışmada bakır iyonlarının varlığında aminopurinlerin tayini yapılmıştır. adenin, 2-aminopurin, 2,6-diaminopurin ve bunların bakır ile yaptığı komplekslerinin elektrokimyasal oksidasyonları doğrusal taramalı voltametri ve eliminasyon doğrusal taramalı voltametri ile incelenmiştir. Cu(I)-aminokompleksinin yükseltgenme işlemi, Cu(I) in Cu(II)'ye yükseltgenmesine karşılık gelmekte, 0.4 ile 0.5 V potansiyel aralığında meydana gelmektedir. Daha pozitif potansiyelerde aminopurinler purin halkasının yükseltgenmesinden kaynaklanan voltametrik pikler bulundurulur.



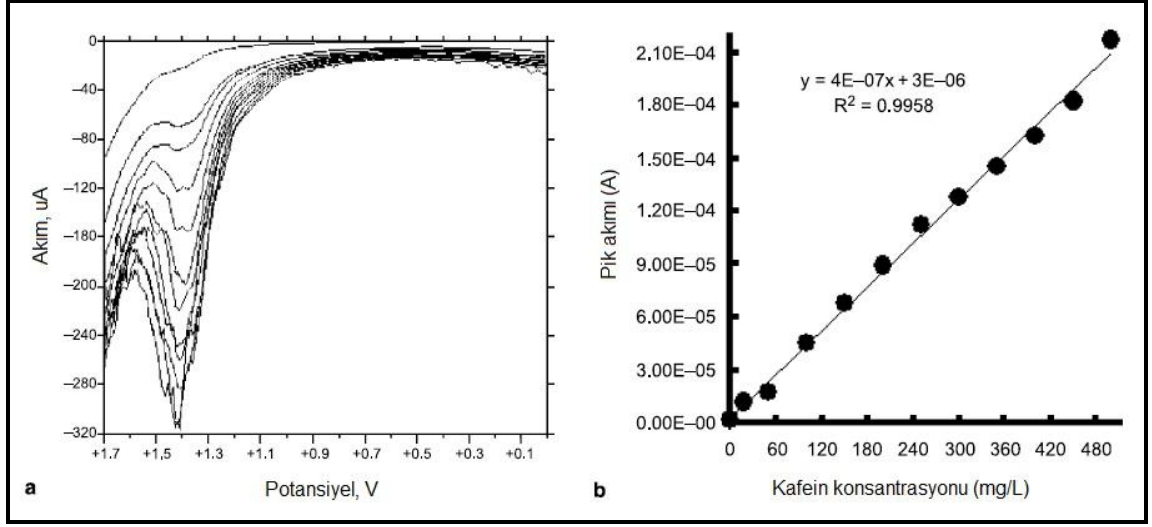
Şekil 2.30 Adenin, 2-aminopurin ve 2,6 diaminopurinin 20 μ L'lık Cu(II) ile dönüşümlü voltamogramları (Aladağ vd. 2010)

Kara ve arkadaşları, enzim etiketli DNA kullanarak kalem grafit elektrotla elektrokimyasal tayin yapmışlardır (Kara vd. 2005). Şekil 2.31'de gösterildiği gibi prob DNA, 5' grubundan kalem grafit elektroda EDC ve NHS kullanılarak kovalent olarak bağlanmıştır. Prob molekülü ile modifiye edilen kalem grafit elektrot, biyotinlenmiş tamamlayıcı nükleotit ile hibritleştirilmiştir. Alkalın fosfataz etiketli extravidin, avidin-biyotin etkileşmesi ile biyotinlenmiş hibride bağlanmıştır. α - Naftil fosfat (α -NAP) eklenerek, alkalın fosfataz ile α -NAP arasında reaksiyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır. Bu reaksiyondan α -NAP'nın indirgenme sinyali diferansiyel puls voltametri ile -0.1 V'da ortaya çıkmıştır. Hibritleşme süresi, prob, biyotinlenmiş oligonükleotit ve enzim konsantrasyonları gibi parametreler optimize edilmiştir.



Şekil 2.31 DNA hibritleşmesi ve tayini için geliştirilen yöntemin şematik gösterimi (Kara vd. 2005)

Kafeinin anodik sıyırma voltametri ile tayini Ly ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (Ly vd. 2004). Bu çalışmada ticari bir kalem grafit elektrot kullanılarak çeşitli çay örneklerinde kafein tayini gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.32’de gösterildiği gibi, kare dalga sıyırma voltametrisinin kullanıldığı teknikte, kafein öncelikle 0.0 V’da biriktirilmiş, daha sonra 1.4 V’da kalem grafit elektrottan indirgenerek sıyrılmıştır. Kullanılan kare dalga sıyırma voltametrisinin parametreleri optimize edilmiştir. Optimum koşullarda 0 ile 500 mg/L konsantrasyon aralığında doğrusal bir grafik elde edilmiştir. Bu çalışma koşullarında kafein için alt tayin sınırı 9.2 mg/L bulunmuştur.

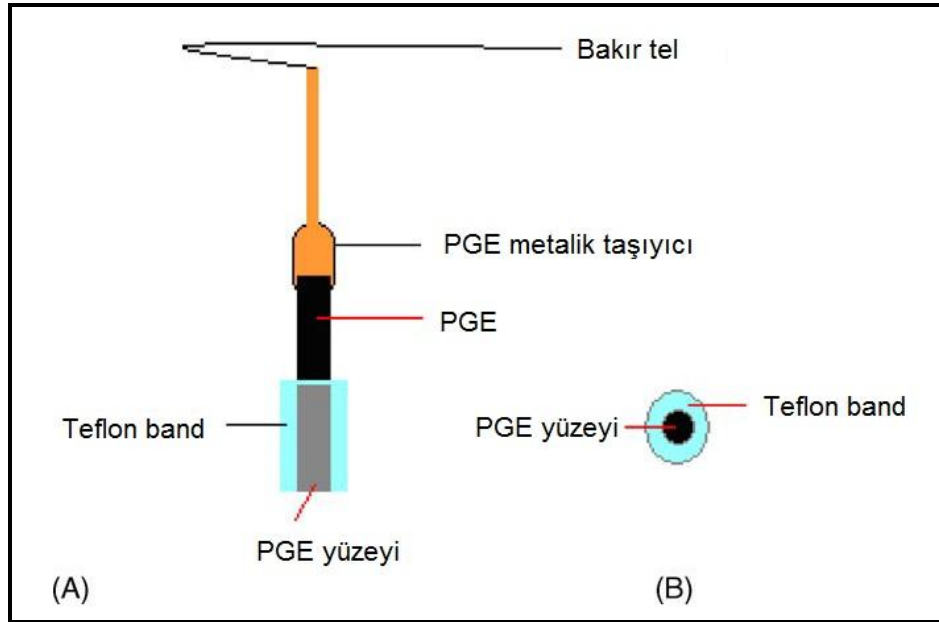


Şekil 2.32 a.0-500 mg/L arasında değişen konsantrasyonlarda kafeinin kare dalga sıyırma voltamogramı, b. Kalibrasyon grafiği (Ly vd. 2004)

Tang ve arkadaşları, *E. coli* bakterisinin hızlı bir şekilde tayin edilmesi için kendiliğinden düzenlenen tek tabaka yöntemine dayanan bir yöntem geliştirmişlerdir (Tang vd. 2006). Geliştirdikleri bienzim biyosensörünü lakkaz ve HRP enzimlerini (3-aminopropil)trietoksisilan (APTES) tabakası ile modifiye ettikleri ITO elektroda kovalent olarak bağlamışlardır. Bienzim biyosensör, *E. coli* metabolizması sırasında kültür ortamı içerisine salisilik asitten (SA) mikrobiyal olarak oluşan polifenolik bileşiklerin tayininde yüksek hassasiyet göstermiştir. Polifenolik bileşiklerin miktarı *E. coli* yoğunluğuna bağlı olduğundan, *E. coli* çözültisi salisilik asitli kültür ortamında 37°C'de 2.5 saat inkübe edildikten sonra bienzim biyosensörü ile hızlı ve yüksek hassasiyette *E. coli* tayini yapılmıştır. Kronoamperometri tekniğinin kullanıldığı çalışmada geliştirilen bienzim biyosensörü ile güçlendirilmiş akım cevabı elde edilmiştir. Bu akım, bienzim-katalizli yükseltgenme ve elektrokimyasal indirgenme ile yürüyen polifenolik bileşiklerin substrat dönüşümünden kaynaklanmaktadır. Akım ile *E. coli* yoğunluğu arasında 1.6×10^3 ile 1.0×10^7 hücre/ml arasında lineerlik gözlenmiştir. Geliştirilen sensörün 3 saat için alt tayin sınırı 9.7×10^2 hücre/ml olarak bulunmuştur.

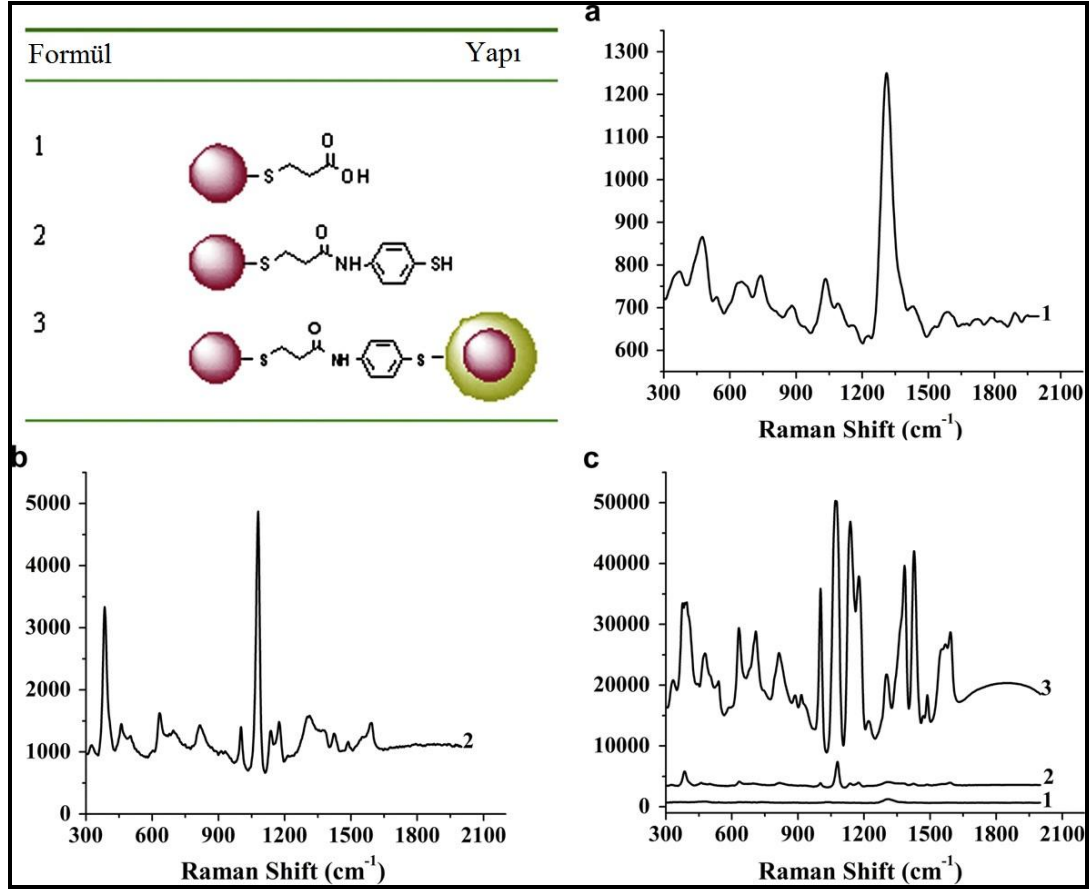
Pournaghi-Azar ve arkadaşları, elektroaktif bir etiket kullanarak insan interlökin-2 (IL-2) geninin belirlenmesine dayanan elektrokimyasal bir DNA biyosensörü geliştirmişlerdir (Pournaghi-Azar vd. 2006). Şekil 2.33'de gösterilen kalem grafit

elektrodun kullanıldığı çalışmada metilen mavisi (MB) de elektroaktif etiket olarak seçmişler, IL-2 genine ait 20 merlik tek sarmallı oligonükleotit dizinini elektrot yüzeyine immobilize etmişlerdir. Prob ile hedefe ait tamamlayıcı dizin arasındaki hibritleşme, metilen mavisi biriktirilmiş kalem grafit elektrotta kare dalga voltametriyle takip edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan yöntemde hibritleşmenin miktarı, proba modifiye edilen MB biriktirilmiş kalem elektrot ile hibritleşmenin olduğu MB biriktirilmiş kalem elektrot arasındaki kare dalga sinyalleri arasındaki farka dayanmaktadır. Biyosensörün performansını etkileyen çeşitli parametreler çalışılarak optimum şartlar belirlenmiştir.



Şekil 2.33 Pournaghi-Azar ve arkadaşlarının kullandıkları: a. Kalem grafit elektrot, b. Elektrot yüzeyin kesit yüzeyi

Guzel ve arkadaşları (Guzel vd. 2010) sentezledikleri monometalik Au ve bimetalik Au@Ag çekirdek-kabuk nanoparçacıklar arasında organik molekülleri köprü olarak kullanmışlar ve bunları YGRS çalışmalarında kullanmışlardır. Kendiliğinden düzenlenme tekniğinin kullanıldığı çalışmada UV-Vis, RAIRS ve XPS teknikleri karakterizasyon işlemlerinde kullanılmıştır. Şekil 2.34’de sentezlenen yapıların Camısı karbon üzerindeki yüzey güçlendirilmiş raman spektrumları görülmektedir.



Şekil 2.34 Guzel ve arkadaşları tarafından camsı karbon elektrot yüzeyine biriktirilen
a. $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{CONHPhSH}$, b. $\text{AuS}(\text{CH}_2)_2\text{CONHPhSH}$,
c. $\text{AuS}(\text{CH}_2)_2\text{CONHPhS}(\text{Au}@\text{Ag})$ yapılarının YGRS spektrumları

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Nanoparçacıkların Hazırlanması

Tez önerisinde sunulduğu üzere antikorları etiketleme işleminde bimetalik nanoparçacıklar kullanılmıştır. Bimetalik nanoparçacıkların çıkış maddeleri monometalik nanoparçacıklar olduğundan öncelikle monometalik nanoparçacık sentezi daha sonra bimetalik nanoparçacık sentezi yapılmıştır. Kullanılan nanoparçacıkların sentezleri Yang ve arkadaşları tarafından yayınlanan makale referans alınarak aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

3.1.1 Altın nanoparçacıkların hazırlanması

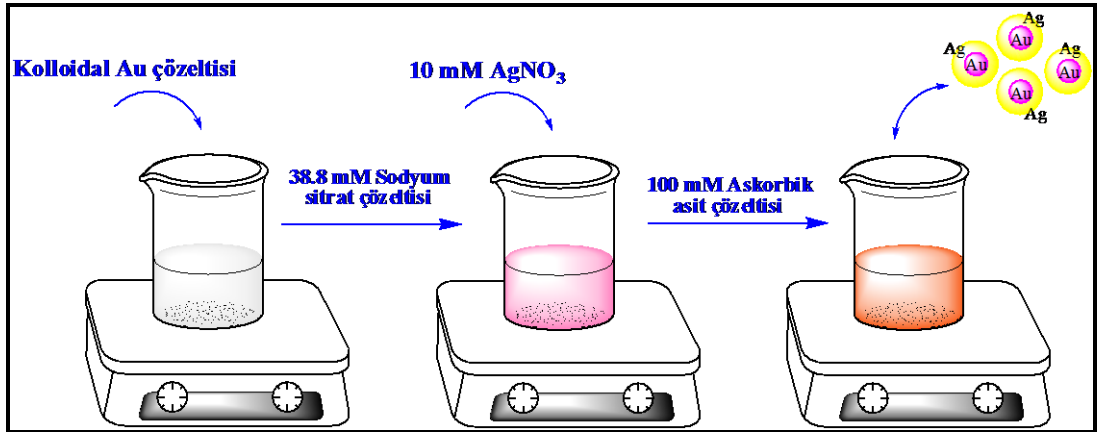
Altın nanoparçacıkları (Au-NP), sodyum sitrat ile termal indirgeme metodu kullanılarak sentezlenmiştir. Bu işlem için öncelikle 100 mL su kaynayıncaya kadar ısıtılmıştır. Kaynayan suya %1'lik 1 mL H_{Au}Cl₄ ilave edilmiştir. Çözelti sürekli olarak bir manyetik karıştırıcı üzerinde bir magnet yardımıyla karıştırılmıştır. Daha sonra bu çözeltiliye 2 mL 38.8 mM'lık sodyum sitrat yavaş yavaş eklenmiştir. Kısa bir süre sonra çözeltilinin renginin kırmızıya döndüğü görülmüştür. Kolloidal altın çözeltisi hızlı bir şekilde soğutularak daha sonra kullanılmak üzere buzdolabında saklanmıştır.

3.1.2 Gümüş nanoparçacıkların hazırlanması

Gümüş nanoparçacıkları (Ag-NP), altın nanoparçacıklarla aynı yöntem kullanılarak sentezlenmiştir. 0.018 g AgNO₃ tartılarak 70°C'ye kadar ısıtılmış olan 100 mL suya eklenmiştir. Çözelti sürekli olarak bir manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. Bu çözeltiliye 2 mL 38.8 mM'lık sodyum sitrat yavaş yavaş ilave edilmiştir. Çözeltilinin renginin sarıya dönmesiyle gümüş nanoparçacıkların sentezlendiği anlaşılmıştır. Kolloidal gümüş çözeltisi hızlı bir şekilde soğutularak daha sonra kullanılmak üzere buzdolabında saklanmıştır.

3.1.3 Au@Ag bimetalik nanoparçacıkların hazırlanması

Au@Ag bimetalik nanoparçacıkların elde edilmesi için öncelikle 30 mL saf suya 5 mL koloidal altın çözeltisi eklenmiştir. Çözelti bir magnetik karıştırıcı yardımıyla sürekli karıştırılmıştır. Bu çözeltiliye 1 mL 38.8 mM'lık sodyum sitrat yavaş yavaş ilave edilmiştir. Çözelti iyice karıştırıldıktan sonra içerisine 10 mM'lık AgNO_3 çözeltisinden 1.2 mL eklenmiştir. Son olarak gümüşün kabuk olarak kaplanabilmesi için çözeltiliye 0.4 mL 100 mM'lık askorbik asit çözeltisi ilave edilmiştir. Bu aşamada pembe olan çözelti renginin dereceli olarak değişerek sarımtırak kırmızı rengi aldığı görülmüştür. Bu durum altın nanoparçacıkların Ag ile kaplandığını göstermektedir. Au@Ag bimetalik nanoparçacıkların sentez basamakları Şekil 3.1'de şematik olarak gösterilmiştir. Au@Ag bimetalik nanoparçacık çözeltileri yapılacak analizlere kadar buzdolabında saklanmıştır.

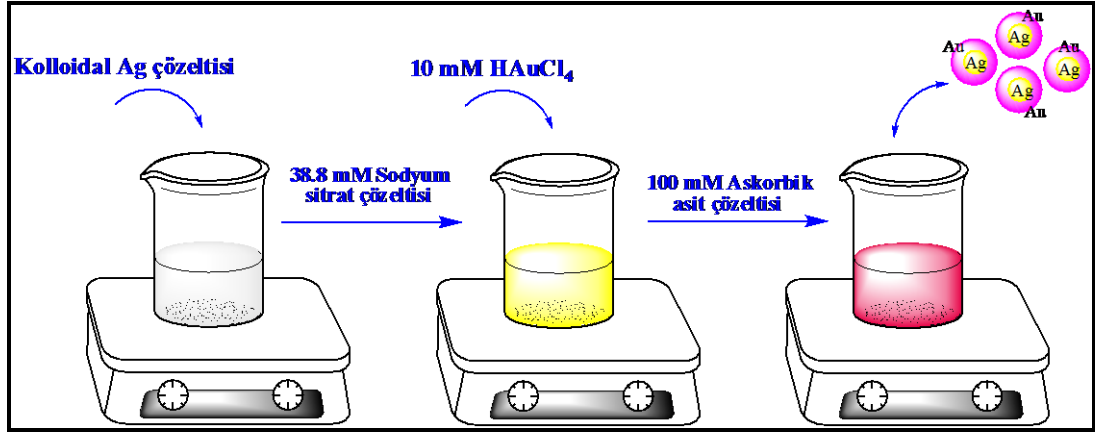


Şekil 3.1 Au@Ag bimetalik nanoparçacıkların sentez basamaklarının şematik gösterimi

3.1.4 Ag@Au bimetalik nanoparçacıkların hazırlanması

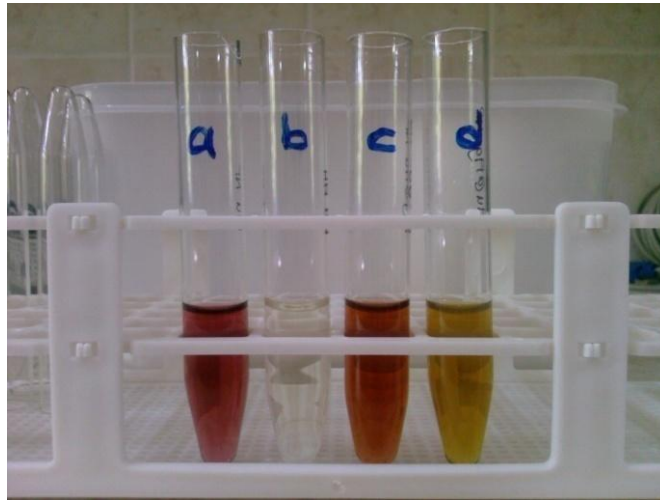
Ag@Au bimetalik nanoparçacıkların sentezi yukarıdaki metoda benzer şekilde yapılmıştır. Öncelikle 30 mL'lik saf suya 5 mL koloidal gümüş çözeltisi eklenmiştir. Karışan çözeltiliye 1 mL 38.8 mM'lık sodyum sitrat çözeltisinden yavaş yavaş ilave edilmiştir. Daha sonra bu çözeltiliye 1.2 mL 10 mM HAuCl_4 damla damla eklenmiştir.

Son olarak çözeltiliye 0.4 mL 100 mM'lık askorbik asit çözeltisi eklenerek Ag nanoparçacıklarının altın ile kaplanması sağlanmıştır. Bu durum sarı renkli koloidal gümüş çözeltisinin renginin dereceli olarak değişerek pembe rengi alması ile gözlenmiştir. Ag@Au bimetalik nanoparçacıkların sentez basamakları Şekil 3.2'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Ag@Au bimetalik nanoparçacıkların sentez basamaklarının şematik gösterimi

Ag@Au bimetalik nanoparçacıklar yapılacak analizlere kadar buzdolabında saklanmıştır. Şekil 3.3'de sentezlenen nanoparçacıkların görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.3 Nanoparçacıkların görüntüleri (a) Au NP, (b) Ag NP, (c) Ag@Au NP, (d) Au@Ag NP

3.2 Mikrobiyolojik Çalışmalarda Kullanılan Çözeltilerin ve Besiyerlerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan tampon çözeltiler ve bakterinin üremesi için gereken besi yerleri aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

3.2.1 Tampon çözeltilerin hazırlanması

Dilüsyon hazırlama ve yıkama işlemlerinde üç farklı tampon çözelti kullanılmıştır. Bu çözeltilerin hazırlanması ile ilgili bilgiler aşağıda verilmiştir.

0.067 M Fosfat tampon çözeltisinin (PBS) hazırlanması (pH=7.4)

Deneyler sırasında kullanılan 0.067 M KH_2PO_4 hazırlanması (A): 0.3446 g KH_2PO_4 tartılarak 40 mL saf suda karıştırılarak çözülmüştür.

0.067 M K_2HPO_4 hazırlanması (B): 2.7524 g K_2HPO_4 tartılarak 180 mL saf suda karıştırılarak çözülmüştür.

164 mL A çözeltisi ile 37 mL B çözeltisi karıştırılmış ve bu karışıma 1.6 g NaCl, 0.04 g KCl ve 0.4 g sodyum azid eklenmiştir. İyice karıştırılan çözeltinin pH'sı 7.4 olacak şekilde ayarlanmış ve bu çözelti kullanılmadan önce otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Fosfat-Tween 20 (PBST) tamponunun hazırlanması

% 0.5'lik PBST çözeltisini hazırlamak için; otoklavlanan PBS tamponundan 10 mL steril cam kaba alınarak üzerine 50 μL Tween-20 ilave edildikten sonra iyice karıştırılarak çözülmüştür.

MES Tamponununun hazırlanması

0.05 M MES tamponu hazırlamak için; 0.2132 g N-morfolinoetan sülfonik asit (MES) tartılarak 20 mL saf suyla tamamlanmıştır. Hazırlanan bu tampon çözelti, safsızlıkları uzaklaştırmak için 0.2 mikronluk filtreden geçirilmiştir.

3.2.2 Besiyerlerinin hazırlanması

LB Agar hazırlanması

LB Agar *E. coli*'nin geliştirilmesinde kullanılmıştır. 14.8 g LB agar tartılmış ve deiyonize su ile 400 mL'ye tamamlanmıştır. Karıştırılarak homojen duruma getirildikten sonra otoklavda 121°C'de bir saat sterilize edilmiştir. Hazırlanan besiyeri petri kaplarına dökülerek katılaşmaya bırakılmış ve kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edilmiştir.

LB Broth hazırlanması

5 g LB Broth tartılarak 200 mL deiyonize suda çözülmüştür. Hazırlanan çözültiden 5'er mL tüplere alınmıştır. Tüplerin ağzı pamukla kapatıldıktan sonra 121°C'de bir saat otoklavda sterilize edilmiştir. Besiyerini içeren tüpler buzdolabında saklanmış ve kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.

SMAC-Agar hazırlanması

SMAC-Agar mikroorganizmaların seçici katı besiyerine inokülasyonunda ve sayımında kullanılmıştır. SMAC-Agar hazır karışımından 25.8 g tartılarak 500 mL damıtık su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan besiyeri otoklavda bir saat 121°C'de sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası, besiyeri petri kaplarına dökülerek katılaşmaya

bırakılmıştır. Besiyerleri içeren petri kapları ters olarak buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2.3 *E. coli* çözeltilisinin hazırlanması

Saf *E. coli* kültürü, 50 µL *E. coli*'nin LB Broth besiyeri içerisinde çözüldükten sonra 37 °C'de 18 saat geliştirilmiştir. Bu çözeltiden 1 mL ependorf tüpüne alınarak 7 dakika boyunca 11000 devirde oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Safsızlıklar uzaklaştırıldıktan sonra *E. coli* PBS tamponunda yıkanıp tekrar PBS tamponunda çözülmüştür.

***E. coli* ardışık dilüsyonlarının hazırlanması**

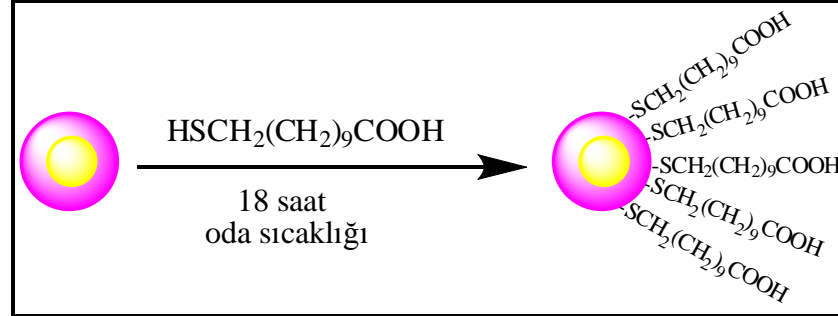
LB Broth besiyerinde 18 saat boyunca 37°C'de inkübe edilen *E. coli* saf kültürünün dilüsyonları (10^7 - 10^1 kob/mL aralığında) 0.067 M'lık pH=7.4 PBS tamponunda hazırlanmıştır.

3.3 Au@Ag ve Ag@Au Bimetalik Nanoparçacık İşaretli Antikorların Hazırlanması

Nanoparçacık etiketli antikorların hazırlanmasında ilk basamakta kendiliğinden düzenlenme tekniğinden daha sonraki basamakta avidin-biyotin etkileşiminden yararlanılmıştır. Sentezlenen Ag@Au ve Au@Ag bimetalik nanoparçacıklar etanolde yıkanarak santrifüjlenmiş ve safsızlıkların uzaklaşması sağlanmıştır. Kullanım öncesine kadar buzdolabında saklanmıştır.

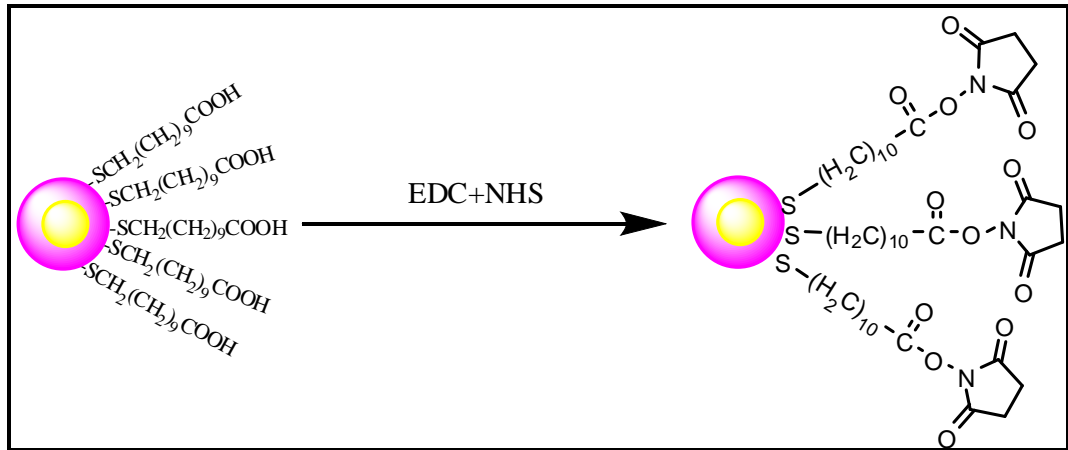
Bimetalik nanoparçacık (BNP) çözeltilisinden (Ag@Au veya Au@Ag) 1 mL alınarak içerisine 150 mM'lık merkaptoundekanoik asit (MUA) ilave edilmiştir (Şekil 3.4). Bu çözelti 18 saat boyunca çalkalanarak MUA'nın nanoparçacıklarla tam olarak etkileşmesi sağlanmıştır. MUA molekülleri ile etkileşen nanoparçacıklar (MUA-BNP)

santrifüjlendikten sonra etanolle bir defa, 50 mM'lık MES tamponu ile iki defa yıkanmıştır. Böylece bağlanmayan MUA molekülleri ortamdan uzaklaştırılmıştır.



Şekil 3.4 Merkaptoundekanoik asit ile etkileştirilen bimetalik nanoparçacıkların şematik gösterimi

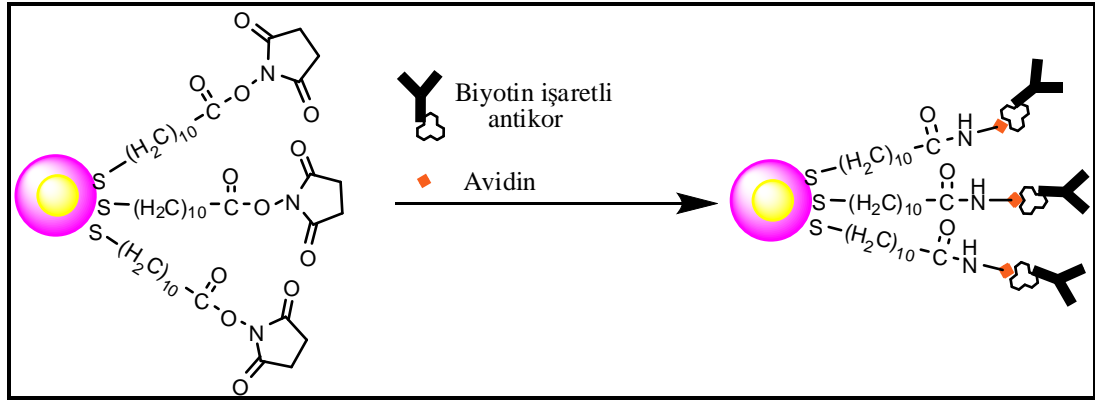
Şekil 3.5'de şematik olarak gösterildiği gibi, MUA-BNP'lara MES tamponunda hazırlanan 1mL'lik 50 mM NHS – 200 mM EDC karışımı eklenerek yapıda bulunan karboksilik asit gruplarının 40 dakika boyunca aktifleşmesi sağlanmıştır. Safsızlıkları uzaklaştırmak için MUA-BNP çözeltisi santrifüjlendikten sonra MES tamponu ile iki defa yıkanmıştır.



Şekil 3.5 MUA ile modifiye edilen bimetalik nanoparçacıkların EDC-NHS karışımı ile etkileştirilmesinin şematik olarak gösterimi

Daha sonra MES tamponunda hazırlanan 0.2 mg/mL'lik avidin çözeltisi nanoparçacıklara eklenerek çözelti 40 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bağlanmayan avidini ortamdan uzaklaştırmak için çözelti santrifüjlendikten sonra fosfat

tamponuna alınarak iki defa yıkanmıştır. Avidin ile etkileştirilen bimetalik nanoparçacıklar üzerine PBS içerisinde hazırlanan 0.5 mg/mL biyotin işaretli antikor eklenerek 40 dakika inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.6). Bu işlemde sonra bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için çözelti santrifüjlenmiş ve 2 defa PBS ile yıkanmıştır.



Şekil 3.6 Avidin ve biyotin işaretli antikor ile etkileştirilen BNP'ların şematik gösterimi

3.4 Au@Ag ve Ag@Au Bimetalik Nanoparçacık İşaretli Antikorların *E. coli* ile Etkileşiminin TEM ile Karakterizasyonu için Gerekli İşlemler

Hazırlanan bimetalik nanoparçacık ile etiketli antikorların *E. coli* ile etkileşimi TEM görüntüleri alınarak incelenmiştir. Bunun için görüntüleme işleminden önce belirli ön işlemler gerçekleştirilmiştir.

3.4.1 Kullanılan tespit ve tampon çözeltilerinin hazırlanması

Millonig Fosfat Tamponu

A Solüsyonu: % 2.26'lık $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ çözeltisi hazırlamak için 5.65 g madde alınarak distile su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.

B Solüsyonu: % 2.52'lik NaOH çözeltisi hazırlamak için 1.26 g NaOH alınarak distile suyla 50 mL tamamlanmıştır.

A çözeltisinden 207.5 mL ve B çözeltisinden 42.5 mL alınarak karıştırılmış, karışımın pH'sı 7.3'e ayarlanmıştır.

Tespit çözeltilerinin Hazırlanması

%5'lik Gluteraldehit (C₅H₈O₂) Çözeltisinin Hazırlanması

%25'lik Gluteraldehit çözeltisinden 20 mL alınarak 80 mL Millonig fosfat çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan 100 mL % 5'lik gluteraldehit çözeltisi buzdolabında 4 °C'de koyu renkli cam şişede kullanılmak üzere saklanmıştır.

% 1'lik Osmium tetroxide Çözeltisinin Hazırlanması

Temiz koyu renkli bir şişe içine 5 mL distile su, 0.27 g glikoz ve üzerine 0.5 g'lık cam ampul içinde bulunan kristalize osmium tetraoksit bırakılmıştır. Şişenin ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra şişe kuvvetli bir şekilde çalkalanarak ampülün kırılması sağlanmıştır. Daha sonra üzerine 45 mL Millonig fosfat çözeltisi eklenmiştir. Kristalize osmium tetraoksitin geç çözünmesinden dolayı hazırlanan çözelti bir gün boyunca bekletildikten sonra kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltinin rengi açık sarıdır. Şişenin ağzı parafilm ile kapatıldıktan sonra etrafı alüminyum folyo ile iyice sarılarak buzdolabında 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.4.2 Nanoparçacık etiketli *E. coli* görüntülenmesinden önce yapılan ön işlemler

İmmünoessey yöntemi kullanılarak bimetalik nanoparçacıklarla etiketlenen ve yalın halde bulunan *E. coli* bakterisi görüntülenmeden önce bazı ön işlemlere tabi tutulmuştur. Görüntüleme işleminde 10⁷ koloni oluşturan birim *E. coli* kullanılmıştır.

1. Birinci tespit işlemi: Yalın ve bimetalik nanoparçacıklarla etiketlenen *E. coli*, gluteraldehit çözeltisine alınarak 4 °C'de 1 saat bekletilmiştir. Gluteraldehit

çözeltisi santrifüjlenerek uzaklaştırıldıktan sonra Millonig tampon çözeltisi ile 20 dakika 4 °C’de yıkanmıştır.

2. İkinci tespit işlemi: Yıkanan yalın *E. coli* ve bimetalik nanoparçacıklarla etiketlenen *E. coli* %1’lik osmiyum tetraoksit çözeltisine alınarak 1 saat 4°C’de bekletilmiştir. Osmiyum tetraoksit santrifüjlenerek uzaklaştırıldıktan sonra tampon çözelti ile 20 dak. 4°C’de yıkanmıştır.
3. Dehidrasyon işlemi: Dehidrasyon işlemi için *E. coli* ve bimetalik nanoparçacıklarla etiketlenen *E. coli* sırasıyla;

- ✓ % 25’lik etanol çözeltisi ile 4 °C’de 1 kez 10 dakika,
- ✓ % 50’lik etanol çözeltisi ile 4 °C’de 1 kez 10 dakika,
- ✓ % 70’lik etanol çözeltisi ile 4 °C’de 1 kez 10 dakika,
- ✓ % 85’lik etanol çözeltisi ile 4 °C’de 1 kez 10 dakika,
- ✓ % 95’lik etanol çözeltisi ile 4 °C’de 1 kez 10 dakika,
- ✓ % 100’lük etanol çözeltisi ile 4 °C’de 2 kez 10 dakika

yıkanmıştır.

Örnekler, son olarak %100’lük etanol çözeltisine alınarak karbon kaplı bakır gridlere dökülerek vakum altında kurutulmuştur (Peeters 1985)

3.5 İmmünoessey Protokolünün Polistiren Kuyucuklarda Hazırlanması

Polistirenden imal edilen ve protein bağlama kapasitesine sahip olan 96 kuyucuklu elisa plate yüzeylerde immünoessey protokolü oluşturulmuştur. Bu kuyucuklara PBS çözeltisinde hazırlanan 0.2 mg/mL’lik avidin çözeltisinden 100 µL konularak 4°C’de 18 saat bekletilmiştir. Avidin ile etkileştirilen kuyucuklar öncelikle PBS, daha sonra PBST ve son olarak tekrar PBS ile yıkanarak polistiren yüzeye bağlanmayan avidinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara PBS’de hazırlanan 0,5 mg/mL’lik biyotin işaretli antikor çözeltisinden 100 µL ilave edilerek 40 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda PBS çözeltisi ile yıkanan kuyucuklara çeşitli dilüsyonlarda hazırlanan *E. coli* çözeltisinden 100 µL eklenerek 40 dakika inkübe edilmiştir. *E. coli* dilüsyonları 10^5 kob/mL, 10^4 kob/mL, 10^3 kob/mL, 10^2 kob/mL ve 10^1 kob/mL olarak hazırlanmıştır.

kob/mL olacak şekilde PBS içerisinde hazırlanmıştır. Bu işlemden sonra yıkanan kuyucuklara Ag@Au ve Au@Ag ile etiketlenen antikor çözeltisinden 100µL konularak 40 dakika bekletilmiştir. Kuyucuklar PBS çözeltisi ile 4 defa yıkanarak spesifik olmayan bağlanmanın önüne geçilmeye çalışılmıştır. Elektrokimyasal deneyler bu kuyucuklarda yapılmıştır.

3.6 İmmünoessey Protokolünün Spektroskopik Olarak Karakterizasyonu

Hazırlanan protokolün spektroskopik karakterizasyonu XPS, SERS ve ATR-FTIR teknikleri kullanılarak yapılmıştır.

3.6.1 XPS deneyleri

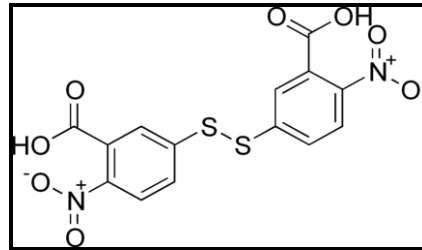
XPS analizleri, 50 W işletilen bir X-ray anodu olarak AlK α (1486.6 eV) monokromatör ile desteklenmiş PHI 5000 Versa Probe(Φ ULVAC-PHI, Inc., Japan/USA) model X-ray photoelectron spectrometer (Berlin, Germany) model cihaz kullanılarak yapılmıştır. Analizör içindeki basınç 10^{-7} Pa olarak ayarlanmıştır. Band enerji skalası, C_{1s} spektrumuna ait 285.0 eV'daki C-H maksimum piki baz alınarak ve multipeak yazılımı kullanılarak yüzeylerin atomik kompozisyonu belirlenmiştir.

XPS analizleri polistiren ile kaplanmış ITO yüzeylerde alınmıştır. ITO (1 cm \times 1 cm) yüzeyler aseton, etanol ve su ile temizlenerek argon gazıyla kurutulmuştur. ITO yüzeylere toluen içerisinde hazırlanan 0.025 mg/mL'lık polistiren çözeltisinden 50 µL damlatılarak çözücünün buharlaşması için bir gece bekletilmiştir. Polistiren kuyucukların hazırlanmasında kullanılan işlemler, polistiren kaplı ITO yüzeylere uygulanarak *E. coli* ile bimetalik nanoparçacıkların yüzeye bağlanması sağlanmıştır.

3.6.2 YGRS ölçümleri

Hassas ve spesifik immünoessey sistemi, 5 megapiksel dijital kamera, 785 nm dalga boyunda çalışan lazer kaynağı ve CCD dedektör ekipmanlarıyla birlikte; Olympus BX51 Difraksiyon Limitli dijital görüntülemeli haritalamaya sahip yüzey güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (YGRS) cihazı ile karakterize edilmiştir.

YGRS çalışmalarında aynı protokol polistiren kaplı ITO yüzeylerde gerçekleştirilmiştir. Bu yüzeylerde diğer analizlerden farklı olarak MUA yerine raman işaretleyicisi olarak kullanılan şekil 3.7’de kimyasal yapısı verilmiş olan 5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit (DTNB) kendiliğinden düzenleme tekniği ile bağlanmıştır. Eşit miktarda (1 mL) alınan Au@Ag ve Ag@Au bimetalik nanoparçacıklar, 50 mM 5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile 18 saat inkübe edilmiştir. Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalı yüzeyin oluşumundan sonra DTNB’nin yapısında bulunan karboksilik asit grubu, MES tamponun içerisinde hazırlanan 50 mM NHS – 200 mM EDC (1 mL) karışımı ile 40 dakika boyunca etkileştirilmiştir. Daha sonra antijen-antikor afinitesinden yararlanılarak sırasıyla avidin ve biyotin işaretli antikor DTNB ile işaretlenen nanoparçacıklara bağlanmıştır. Polistirenle kaplı ITO yüzey, avidin ve biyotin işaretli antikor ile bağlandıktan sonra, *E. coli* ile 40 dakika inkübe edilmiştir. DTNB ile bağlanan antikor, *E. coli* bağlanmış yüzey ile etkileştirilmiştir. Hazırlanan yüzeyler yıkanarak spesifik olmayan bağlanmadan ileri gelen safsızlıklar PBS ile uzaklaştırıldıktan sonra YGRS ölçümleri alınmıştır.



Şekil 3.7 5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB)' in kimyasal yapısı

3.6.3 ATR-FTIR analizleri

ATR-FTIR analizleri Harrick marka ATR (attenuated total reflectance/azaltılmış toplam yansıma) aksesuarı eşliğinde Bruker-Tensor 27 marka FTIR cihazından yararlanılmıştır. Deneyle, DTGS (Deuterated triglycine sulfate /döteryumlanmış triglisin sülfat) dedektör ve Ge (Germanyum) kristal kullanılarak oda sıcaklığında yapılmıştır. Spektrumlar, 4000-600 cm^{-1} aralığında ve 256 tarama sayısında alınmıştır.

ATR-FTIR analizlerinde camsı karbon (GC) yüzeyler kullanılmıştır. Burada kullanılan GC elektrotlar Tokai GC-20 markadır. Elektrotlar, P-4000 zımpara kağıdı ile zımparalandıktan sonra sırasıyla 0.1 μm ve 0.05 μm tanecik boyutuna sahip alümina süspansiyonları (Baikowski Int. Corp.,USA) ile parlatılmıştır. Yüzeyler temizlenirken 10'ar dakikalık ara sonikasyonlar uygulanmıştır. Ara sonikasyonlarda saf su ve aktif karbonla muamele edilen asetonitril kullanılmıştır.

ATR-FTIR analizlerinde YGRS çalışmalarında kullanılan yöntem uygulanmıştır. Öncelikle GC yüzeyleri polistiren ile kaplanmıştır. GC yüzeylerine toluende hazırlanan 0.025 mg/mL'lık polistiren çözeltisinden 50 μL damlatılarak bir gece boyunca kurutulmaya bırakılmıştır. Hazırlanan yüzeylerde karakterizasyonun belirleyici olması açısından kullanılan nanoparçacık yüzeylerinde kendiliğinden düzenlenen tabaka oluşturmak için MUA yerine raman işaretleyicisi DTNB kullanılmıştır. Eşit miktarda (1 mL) alınan Au@Ag ve Ag@Au bimetalik nanoparçacıklar, 50 mM DTNB ile 18 saat inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra DTNB'nin yapısında bulunan karboksilik asit grubu, MES tamponun içerisinde hazırlanan 50 mM NHS – 200 mM EDC (1 mL) karışımı ile 40 dakika boyunca etkileştirilmiştir. Daha sonra antijen-antikor afinitesinden yararlanılarak sırasıyla avidin ve biyotin işaretli antikor DTNB ile işaretlenen nanoparçacıklara bağlanmıştır. Polistirenle kaplı ITO yüzey, avidin ve biyotin işaretli antikor ile bağlandıktan sonra, *E. coli* ile 40 dakika inkübe edilmiştir. DTNB ile bağlanan antikor, *E. coli* bağlanmış yüzey ile etkileştirilmiştir. Hazırlanan yüzeyler yıkanarak spesifik olmayan bağlanmadan ileri gelen safsızlıklar PBS ile uzaklaştırıldıktan sonra ATR-FTIR ölçümleri alınmıştır.

3.7 Elektrokimyasal Çalışmalar

Tez önerisinde belirtilen elektrokimyasal çalışmalar aşağıdaki gibi yürütülmüştür. Tez kapsamında belirtilen Au@Ag ve Ag@Au bimetallik nanoparçacıkların elektrokimyasal davranışlarını kıyaslamak için öncelikle sentezlenen monometallik Au ve Ag nanoparçacıkların elektrokimyasal davranışları incelenmiştir.

Bimetallik nanoparçacıkların çözülmesiyle her iki metalin de çözelti ortamına alınması amaçlandığından her iki metalin birlikte ve ayrı ayrı incelenmesinin uygun olacağı düşünülmüştür. Elektrokimyasal çalışmalarda çapı 0.8 cm ve derinliği 1 cm olan 96 kuyucuklu polistiren mikroplate kullanılmıştır. Dönüşümlü voltametri ve kare dalga sıyırma voltametri deneyleri laboratuvarımızda bulunan Gamry 300 marka (Gamry, USA) cihaz ile gerçekleştirilmiştir. Deneylerde, çalışma elektrodu olarak karbon kalem elektrot (Tombo marka, 0.7 H), referans elektrot olarak gümüş tel ve karşıt elektrot olarak platin tel kullanılmıştır.

3.7.1 Elektrokimyasal çalışmalarda kullanılan seyreltilmiş kral suyu çözeltisinin hazırlanması

Seyreltilmiş kral suyu çözeltisi, hacimce 3:1 oranında hazırlanan HCl-HNO₃ karışımının saf su ile 10 kat seyreltilmesiyle elde edilmiştir.

3.7.2 Elektrokimyasal olarak *E. coli* tayini

Polistiren kuyucuklarda hazırlanan immünoessey protokolünün *E. coli* sayısına karşı duyarlılığı kare dalga sıyırma voltametrisi (SWSV) kullanılarak incelenmiştir. Bunun için hazırlanan kuyucuğa ortamdaki bimetallik nanoparçacığı çözmek için uygun asit çözeltisi bırakılmıştır. Bu işlemten sonra asidik ortamda yükseltgenen metal öncelikle uygun potansiyelde belirli bir süre elektrot yüzeyine biriktirilmiş, daha sonra sıyırma pikine bağlı olarak akım miktarı *E. coli* sayısına bağlı olarak grafiğe geçirilmiştir.

Elektrokimyasal immünoessey uygulamalarında Ag@Au ve Au@Ag bimetalik nanoparçacıklar ayrı ayrı asitlerde çözülerek uygun potansiyelerde biriktirilmiştir. Bu deneyler aşağıdaki şekilde yürütülmüştür:

Ag@Au nanoparçacıkların kullanıldığı immünoessey protokolü için:

- a) Öncelikle kullanılan kalem elektrodun çözeltiye daldırılan kısmı seyreltilmiş kral suyu içerisinde kronoamperometri yardımıyla 1.4 V'da 360 s aktive edilmiştir. Bu işlemle elektrodun hem tekrarlanabilirliği hem de hassasiyeti arttırılmıştır.
- b) Ag@Au bimetalik nanoparçacıklar seyreltilmiş kral suyunda çözülmüştür. Metalik durumda bulunan altın, asidik ortamda iyonlaşarak Au(III)'e yükseltgenmiştir.
- c) Çözeltide bulunan Au(III) iyonları -0.2 V'da kalem elektroda 600 s süreyle biriktirilmiştir. Biriktirme işleminden sonra elektrot çözeltiden çıkartılmış ve içerisinde seyreltilmiş kral suyu içeren destek çözeltisine alınmıştır.
- d) Elektrot yüzeyine biriken altın, destek çözeltisi içerisinde 0 V ile 1.2 V arasında sıyrılmıştır.
- e) Sıyırma akımından yararlanılarak sıyrılan altının miktarı *E. coli* sayısına bağlı olarak grafiğe geçirilmiştir.

Analizlerde SWSV için kullanılan değişkenler şu şekildedir: Frekans 15 Hz, puls genişliği 50 mV ve adım genişliği 2 mV'tur. Paralel yapılan deneyler için her defasında yeni biriktirme çözeltisi ve yeni bir kurşun kalem elektrot yüzeyi kullanılmış ve aynı deney şartları uygulanmıştır.

Au@Ag nanoparçacıkların kullanıldığı immünoessey protokolü için:

- a) Öncelikle kullanılan kalem elektrodun çözeltiye daldırılan kısmı seyreltilmiş kral suyu içerisinde kronoamperometri yardımıyla 1.4 V'da 360 s aktive edilmiştir. Bu işlemle elektrodun hem tekrarlanabilirliği hem de hassasiyeti arttırılmıştır.

- b) Au@Ag bimetallik nanoparçacıklar 0.1 M nitrik asit içerisinde çözülmüştür. Metalik durumda bulunan gümüş, asidik ortamda iyonlaşarak Ag(I)'e yükseltgenmiştir.
- c) Çözeltide bulunan Ag(I) iyonları -0.35 V'da kalem elektroda 600 s süreyle biriktirilmiştir. Biriktirme işleminden sonra elektrot çözeltiden çıkartılmış ve içerisinde 0.1 M nitrik asit içeren destek çözeltisine alınmıştır.
- d) Elektrot yüzeyine biriken gümüş destek çözeltisi içerisinde -0.1 V ile 0.5 V arasında sıyrılmıştır.
- e) Sıyırma akımından yararlanılarak sıyrılan gümüşün miktarı *E. coli* sayısına bağlı olarak grafiğe geçirilmiştir.

3.7.3 Gerçek numunede *E. coli* tayini

Çalışmanın bu bölümünde geliştirilen yöntemin gerçek numunede uygulanabilirliği incelenmiştir. Bunun için Ankara Üniversitesi Kimya Bölümü'ndeki musluk suyundan alınan örneklerde *E. coli* tayini yapılmış ve elde edilen sonuçlar kültürel sayım yönteminin sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

Ankara Üniversitesi Kimya Bölümü'ndeki musluk suyundan alınan örnek uygun pH değerine getirildikten sonra içerisine LB Broth besiyerinde hazırlanan *E. coli* saf kültüründen inoküle edilmiştir. Su örneklerinden ve PBS içerisinde hazırlanan ardışık dilüsyonlarından SMAC-Agar besiyerine yüzeye yayma yöntemi ile inokülasyon yapıldıktan sonra besiyerleri 45°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda besiyerinde gelişen koloniler sayılarak su örneklerindeki *E. coli* sayısı belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu kısımda Bölüm 3’de anlatıldığı şekilde yürütülen bimetalik nanoparçacıkların sentezlenmesi ve antikorlar ile bağlanması, immünoessey protokolünün oluşturulması ve karakterizasyonu, elektrokimyasal biyosensörün parametreleri ve kullanılabilirliği ile ilgili deneysel çalışmalardan elde edilen veriler yorumları ile birlikte aşağıdaki alt başlıklarda ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Bimetalik nanoparçacıkların sentezi ve karakterizasyonu son yıllarda ilgi çekici bir duruma gelmiştir. Bu tez çalışmasında Au@Ag ve Ag@Au bimetalik nanoparçacıklar sentezlenerek bunların immünoessey yöntemiyle *E. coli* analizlerinde kullanılması hedeflenmiştir. Bu analizin elektrokimyasal olarak kalem elektrotta gerçekleştirilmesi literatüre yenilik getirmesi açısından faydalı olmuştur. Elde edilen sonuçlardan tasarlanan biyosensör uygulamasının kolay hazırlanma ve hızlı sonuç verme özellikleri nedeniyle diğer analiz yöntemlerinden daha avantajlı olduğu görülmüştür.

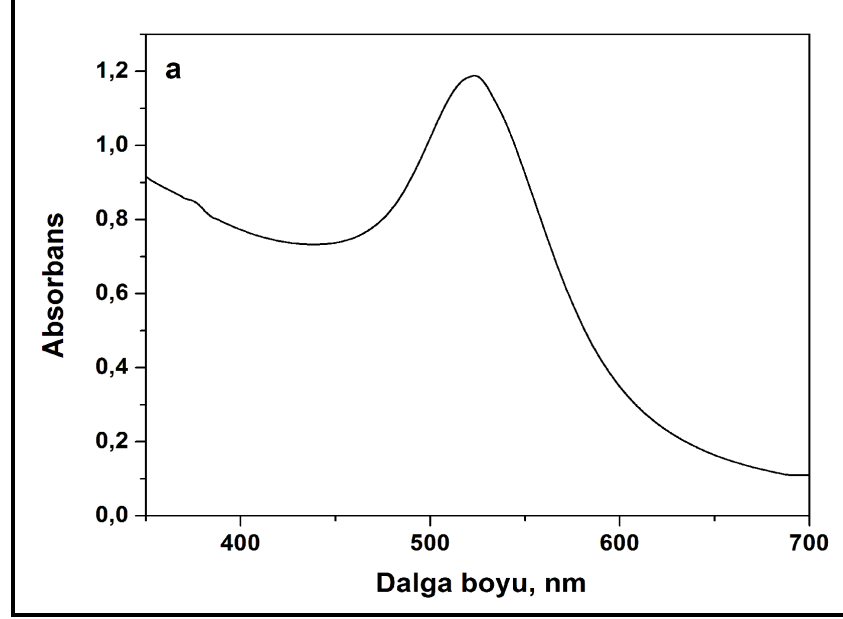
4.1 Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

Tez çalışmasında sentezlenen sitrat ile termal indirgeme yöntemi ile sentezlenen nanoparçacıkların karakterizasyonları UV-Vis spektroskopisi (UV-Vis) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

4.1.1 UV-Vis ile karakterizasyon

Bu çalışmada monometalik altın (Au), monometalik gümüş (Ag), altın çekirdek-gümüş kabuk (Ag@Au) ve gümüş çekirdek-altın kabuk (Au@Ag) olmak üzere dört farklı nanoparçacık sentezlenmiştir. Monometalik altın ve monometalik gümüş nanoparçacıklar, bimetalik nanoparçacıkların eldesinde çıkış maddeleri olarak kullanılmıştır. Sentezlenen monometalik ve bimetalik nanoparçacıkların spektroskopik

karakterizasyonu UV-Vis spektroskopisi kullanılarak yapılmıştır. Sentezlenen nanoparçacıkların her birinin absorpsiyon ölçümleri 300-700 nm dalga boyu arasında gerçekleştirilmiştir. Bu teknik ile sentezlenen bimetalik nanoparçacıkların yapısında bulunan metallere göre yüzey plasmon bandlarındaki kaymalar incelenmiştir.

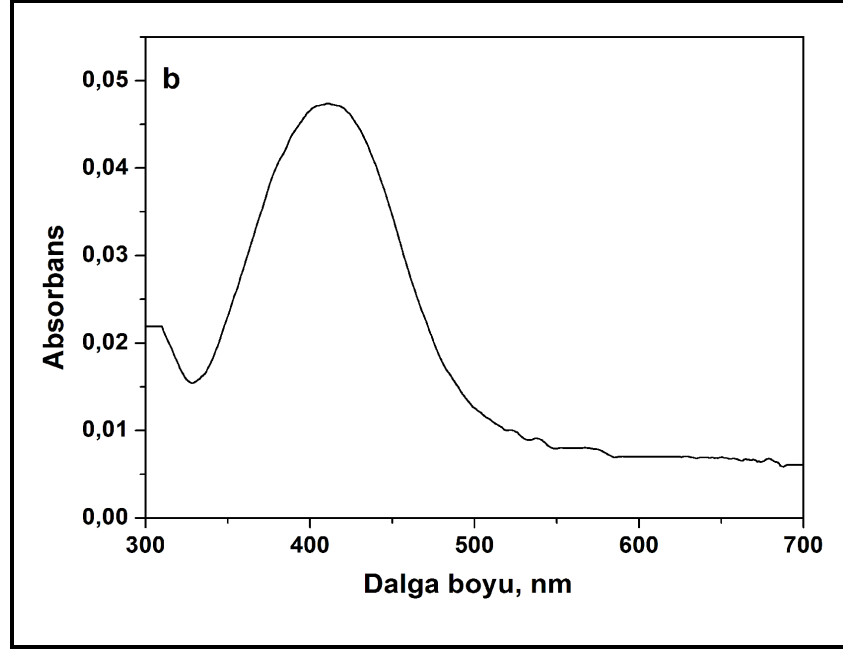


Şekil 4.1 Sentezlenen monometalik altın nanoparçacıkların UV-Vis spektrumu

Bimetalik nanoparçacıkların sentezlenmesinde çıkış maddesi olarak kullanılan altın nanoparçacıkların UV-Vis absorpsiyon spektrumu şekil 4.1’de verilmiştir. Spektrumdan görüldüğü üzere şarap kırmızısı renginde olan altın kolloidlerinin absorpsiyon bandı 520 nm’de gözlenmektedir. İlk aşamada UV-Vis spektroskopisi tekniğinin kullanıldığı karakterizasyon çalışmalarında elde edilen sonuçların literatürdeki çeşitli çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür. Benzer şekilde Li ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada sitrat indirgenmesi ile elde edilen altın nanoparçacıkların absorpsiyon bandı 520 nm’de bulmuşlardır (Li vd. 2007). Manivannan ve Ramaraj’ın biyosensör uygulamalarında kullandıkları monometalik altın nanoparçacıklarının da bulunan sonuçla uygun olduğu gözlenmiştir (Manivannan ve Ramaraj 2009).

Çalışmada sentezlenen monometalik gümüş nanoparçacıkların UV-Vis spektrumu şekil 4.2’de gösterilmiştir. Spektrumda 410 nm’de görülen absorbans bandı gümüş

nanoparçacıkların sitrat indirgemesi yöntemiyle doğru bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir. UV-Vis spektroskopisi ile elde edilen bu sonuçlar literatür ile uyumluluk göstermektedir (Yang vd. 2008).

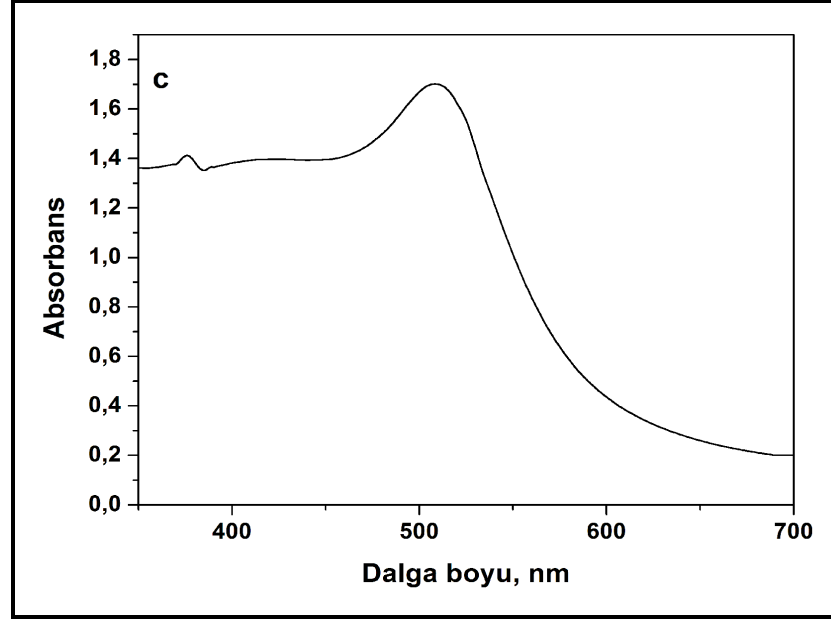


Şekil 4.2 Sentezlenen monometalik gümüş nanoparçacıkların UV-Vis spektrumu

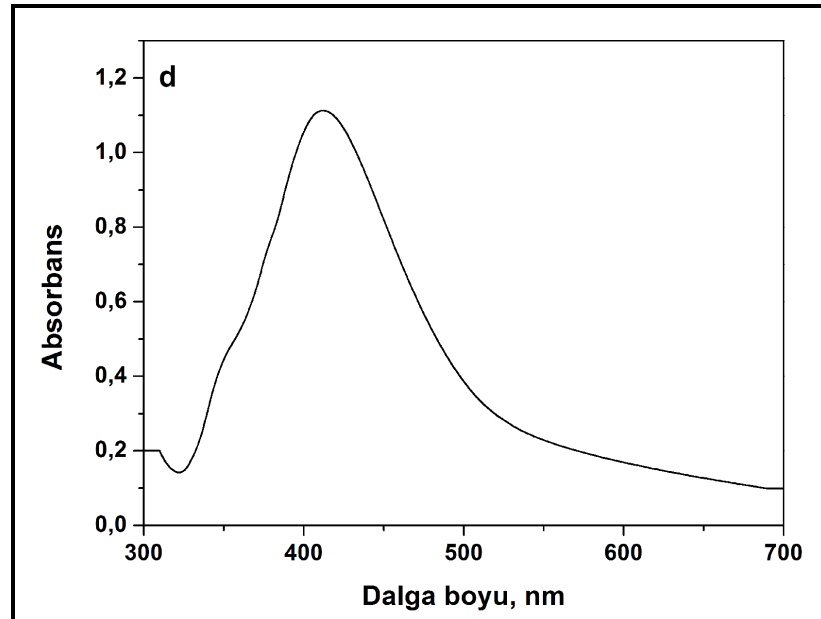
Altın nanoparçacıkların gümüşle kaplanması ile elde edilen Au@Ag bimetalik nanoparçacıkların UV-Vis spektrumu şekil 4.3’de verilmiştir. Monometalik altının gümüşle kaplanması ile pembe olan çözelti renginin dereceli olarak değişerek sarımsak kırmızı rengi aldığı ilk aşamadaki görülen değişim olmuştur. Gözle görülen bu değişiklik, UV-Vis spektroskopisinde de gözlenmiştir. Kolloidal altın çözeltisine Ag(I) iyonlarının eklenmesiyle 520 nm’de gözlenen absorbans bandının 416 nm’ye kaydığı görülmüştür. Bu bandın mavi bölgeye kayması, Au nanoparçacıkların Ag ile kaplandığını işaret etmektedir. Ayrıca bu bölgede tek bir plasmon bandının gözlenmesi ortamdaki gümüşle kaplanmayan metalik halde altın nanoparçacığın kalmadığını göstermektedir (Pande vd. 2007, Yang vd. 2008).

Aynı yöntem kullanılarak gümüş nanoparçacıklar altın ile kaplanarak Ag@Au bimetalik nanoparçacıklar elde edilmiş ve bu çözeltilere ait UV-Vis spektrumu şekil 4.4’de gösterilmiştir. Sarı renkli olan gümüş nanoparçacıklara ait absorbans bandı (Şekil 4.2)

410 nm’de gözlenirken, Ag@Au bimetalik nanoparçacıkların absorbansı 508 nm’de gözlenmiştir. 410 nm’de bulunan bu bandın kırmızıya kayması gümüş nanoparçacıkların altın ile kaplandığını göstermektedir. Ayrıca bu bölgede tek bir bandın gözlenmesi ortamdaki metalik halde gümüş nanoparçacık kalmadığını göstermektedir (Pande vd. 2007, Yang vd. 2008).



Şekil 4.3 Sentezlenen Ag@Au bimetalik nanoparçacıkların UV-Vis spektrumu



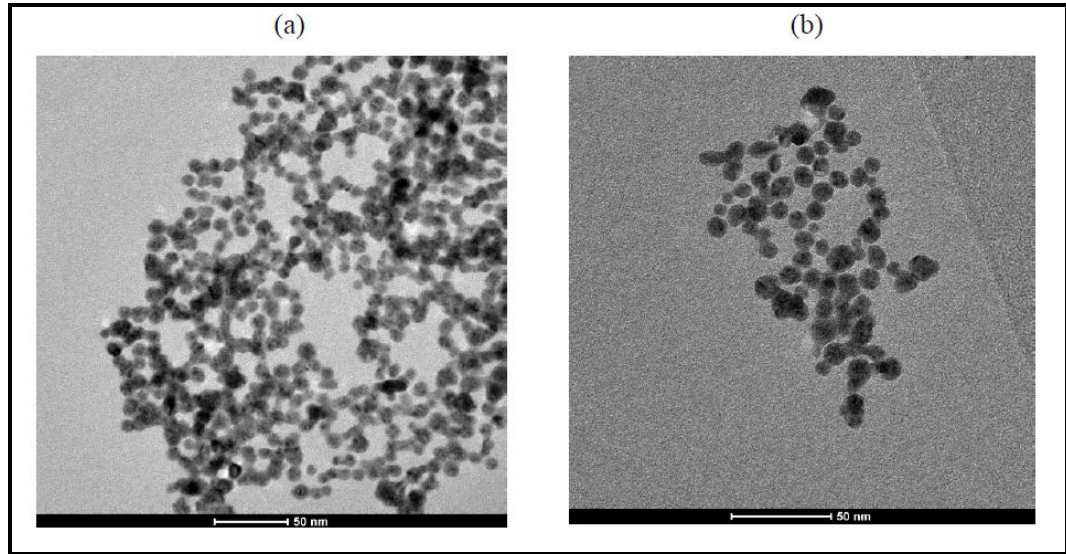
Şekil 4.4 Sentezlenen Au@Ag bimetalik nanoparçacıkların UV-Vis spektrumu

UV-Vis deneyleri sonucunda elde edilen spektrumlardan monometalik ve bimetalik nanoparçacıkların doğru bir şekilde sentezlendiği ve bu sonuçların literatür tarafından desteklendiği görülmüştür. Ayrıca Au@Ag ve Ag@Au bimetalik nanoparçacıkların UV-Vis spektrumlarından alınan sonuçlarla nanoparçacıkların kabuğun özelliğini yansıttığı anlaşılmıştır.

4.1.2 TEM ile karakterizasyon

Çalışmada kullanılan Ag@Au ve Au@Ag etiketli bimetalik nanoparçacıkların UV-Vis spektroskopisi ile karakterizasyonunun ardından mikroskobik karakterizasyonu geçirimli elektron mikroskobu (TEM) yöntemi ile yapılmıştır. TEM nano boyutlarda görüntü alınmasını sağlayan bir cihazdır. Sentezlenen nanoparçacıkların boyutları ve şekilleri TEM görüntüleri aracılığıyla belirlenmiştir.

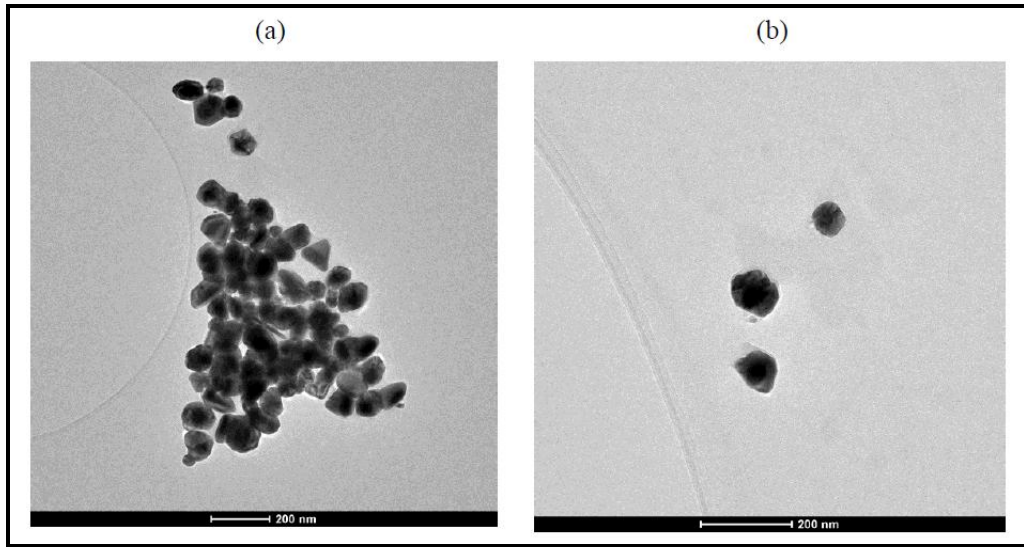
TEM ölçümleri Jem Jeol 2100F marka cihaz ile gerçekleştirilmiştir. Bimetalik nanoparçacıkların TEM görüntüleri 200 kV hızlandırma gerilimi altında alınmıştır. Örnekler, karbon film ile kaplanmış bakır grid üzerine damlatıldıktan sonra argon gazıyla oda sıcaklığında kurutulmuş ve daha sonra görüntüleme işlemi yapılmıştır.



Şekil 4.5.a.b Sentezlenen Ag@Au bimetalik nanoparçacıkların farklı bölgelerden alınan TEM görüntüleri

Şekil 4.5.a.b'de, sentezlenen Ag@Au bimetalik nanoparçacıkların TEM görüntüleri verilmiştir. Elde edilen görüntülerden, nanoparçacıkların boyutlarının ve şekillerinin homojen dağıldıkları görülmektedir. Ayrıca sentezlenen Ag@Au bimetalik nanoparçacıkların çekirdek kısımlarının koyu, kabuk kısımlarının açık renkte olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen bimetalik nanoparçacıkların boyutları yaklaşık olarak 12 nm'dir.

Şekil 4.6.a.b'de sentezlenen Au@Ag bimetalik nanoparçacıkların TEM görüntüleri verilmiştir. Au@Ag bimetalik nanoparçacıkların TEM görüntüleri incelendiğinde değişik dağılımlarda küresel ve pramidal yapılar gözlenmiştir (Rodriguez-Gonzalez vd. 2005). Benzer şekilde elde edilen nanoparçacıkların çekirdek kısımlarının koyu renkli, kabuk kısımlarının ise açık renkli olduğu görülmektedir. Elde edilen Au@Ag bimetalik nanoparçacıkların boyutları 60-70 nm arasında değişmektedir.



Şekil 4.6.a.b Sentezlenen Au@Ag bimetalik nanoparçacıkların TEM görüntüleri

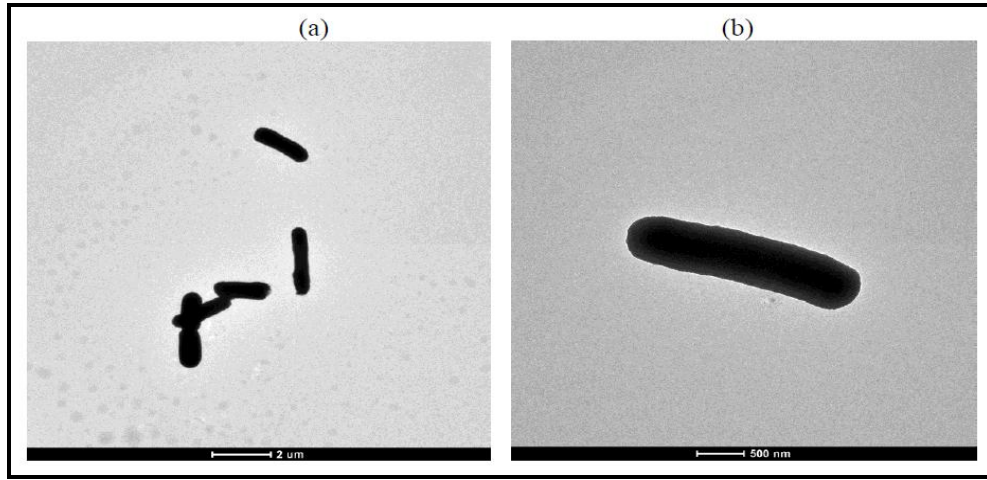
4.2 Au@Ag ve Ag@Au Bimetalik Nanoparçacık İşaretli Antikorların *E. coli* ile Etkileşiminin TEM ile Karakterizasyonu

Au@Ag ve Ag@Au bimetalik nanoparçacıkların sentezlenmelerinin ardından yüzeylerine sırasıyla kendiliğinden düzenlenme ve avidin-biyotin etkileşimi ile

antikorlar bağlanmıştır. Elde edilen Au@Ag ve Ag@Au bimetalik nanoparçacık işaretli antikorların *E. coli* ile etkileşimleri TEM görüntüleri alınarak incelenmiştir.

TEM ölçümleri FEI marka cihaz ile gerçekleştirilmiştir. Bimetalik nanoparçacık işaretli antikorlarla etkileştirilen *E. coli* bakterisinin TEM görüntüleri 120 kV hızlandırma gerilimi altında alınmıştır. Örnekler, karbon film ile kaplanmış bakır grid üzerine damlatıldıktan sonra argon gazıyla oda sıcaklığında kurutulmuş ve daha sonra görüntüleme işlemi yapılmıştır.

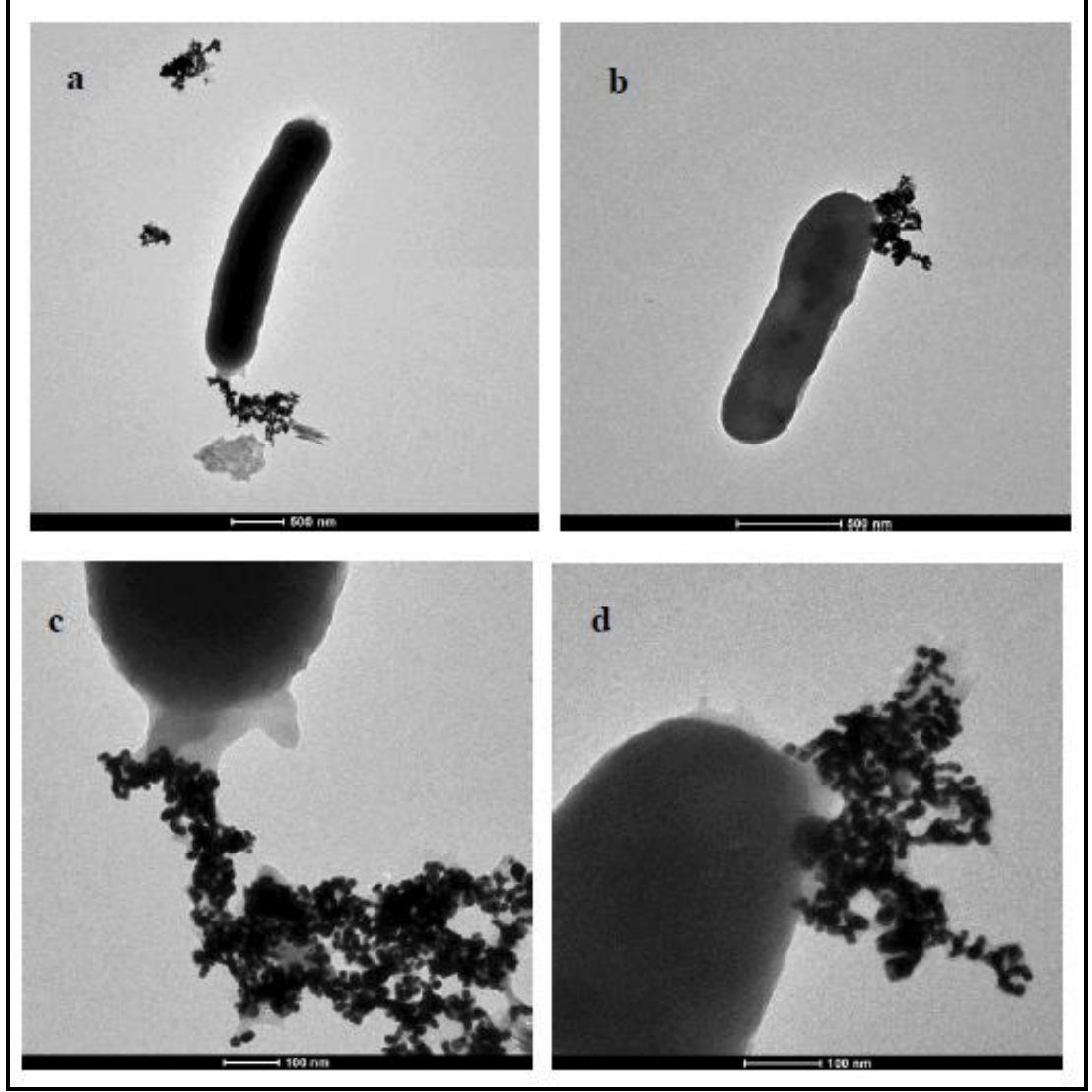
Öncelikle şekil 4.7.a.b'de yalın *E. coli* bakterisinin TEM görüntüsü verilmiştir. Şekil 4.7 incelendiğinde *E. coli*'nin çubuk yapıda ve boyutunun yaklaşık 2 µm olduğu görülmektedir. *E. coli*'nin TEM analizlerinde gözlenen yapısı literatürdeki çeşitli çalışmalarla da desteklenmektedir (Poortinga vd. 2002, Hamal vd. 2010, Kundu ve Liang 2011).



Şekil 4.7.a.b *E. coli*'nin TEM görüntüleri

Şekil 4.8'de ise bimetalik nanoparçacıklarla işaretlenen antikorla bağlı *E. coli*'nin TEM görüntüsü verilmiştir. TEM görüntüsü incelendiğinde, *E. coli*'nin belirli kısımlarından nanoparçacıklarla etiketlenen antikora bağlandığı görülmektedir. Antijenin özgüllüğünü belirleyen ve antijenin kendi özgül antikorları ile birleşmesini sağlayan bu kısımlara epitop adı verilmektedir. *E. coli* iki epitopundan antikora bağlanmıştır. Görüntü incelendiğinde ikinci bağlandığı noktada görüntüleme öncesi yapılan işlemler nedeniyle

antikorun epitoptan ayrıldığı görülmüştür. TEM sonuçları, *E. coli*'nin nanoparçacıklarla etiketlenen antikorlara epitoplardan bağlandığını doğrulamaktadır.



Şekil 4.8 İmmünessey yoluyla bimetalik nanoparçacıklarla bağlanan *E. coli*'nin TEM görüntüsü (a,b,c ve d)

4.3 Spektroskopik Karakterizasyon

Tez çalışmasında hazırlanan immünessey yüzeylerinin karakterizasyonu için XPS, SERS ve ATR-FTIR teknikleri kullanılmıştır. Bu teknikler ile elde edilen sonuçlar alt bölümlerde detaylı bir şekilde anlatılmıştır.

4.3.1 XPS ile karakterizasyon

X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS) yüzey karakterizasyonlarında sıklıkla kullanılan ve malzemelerin elementel kompozisyonunu spektroskopik olarak belirleyen tekniklerden birisidir. Bu tez çalışmasında oluşturulan immünessey protokolünün elementel karakterizasyonu XPS kullanılarak takip edilmiştir.

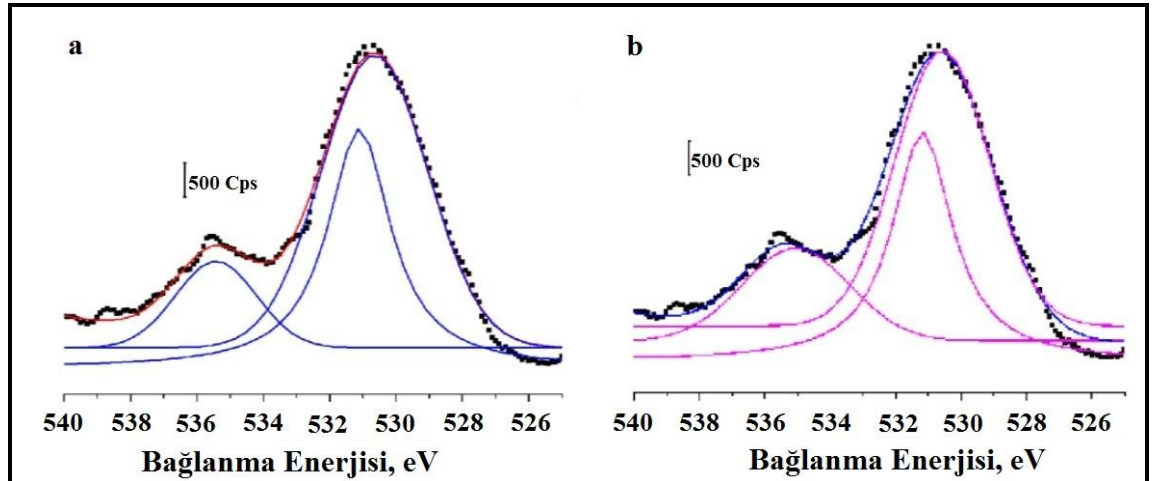
XPS analizleri polistiren ile kaplanmış ITO yüzeylerde alınmıştır. İmmünessey protokolünü doğru bir şekilde karakterize edebilmek için bu yüzeylere kuyulara yapılan işlemlerin aynısı uygulanmıştır. Bunun için ITO yüzeyler önce polistiren ile kaplanmış ve kuyuda hazırlanan protokolün zeminin oluşması sağlanmıştır. Daha sonra elde edilen polistiren kaplı ITO elektrot (PS-ITO) yüzeyine basamak basamak immünessey protokolü inşa edilmiştir.

XPS çalışmalarında kullanılan bimetalik nanoparçacık etiketli antikorların hazırlanması Bölüm 3.3'de ayrıntılı bir şekilde verilmiştir. Polistirenle kaplı ITO yüzey sırasıyla avidin ve biyotin işaretli antikor (birincil antikor) ile bağlandıktan sonra, *E. coli* ile etkileştirilmiştir. Bu basamağın sonunda elde edilen yüzey *E. coli*-PS/ITO olarak adlandırılmıştır. Daha önce hazırlanmış olan bimetalik nanoparçacık işaretli ikincil antikor, *E. coli* bağlanmış yüzeye (*E. coli*-PS/ITO) bırakılarak bir süre etkileştirilmiştir. Hazırlanan yüzeyler yıkanarak spesifik olmayan bağlanmadan ileri gelen safsızlıklar PBS ile uzaklaştırıldıktan sonra XPS ölçümleri alınmıştır. Aynı işlemler hem Au@Ag hem de Ag@Au bimetalik nanoparçacıkların kullanıldığı protokoller için gerçekleştirilmiştir. Bu basamak sonunda elde edilen yüzeyler Au@Ag-*E. coli*-PS/ITO ve Ag@Au-*E. coli*-PS/ITO olarak adlandırılmıştır.

Hazırlanan Au@Ag-*E. coli*-PS/ITO ve Ag@Au-*E. coli*-PS/ITO yüzeylerinin XPS spektrumunda immünoessey yapısından ileri gelen karbon, oksijen, azot ve bimetalik nanoparçacıklardan ileri gelen Au ve Ag pikleri taranmıştır. Bu spektrumlar OriginPro 8.1 programı kullanılarak 30:70 oranında Gaussian-Lorentzian fonksiyonu ile simüle edilmiştir.

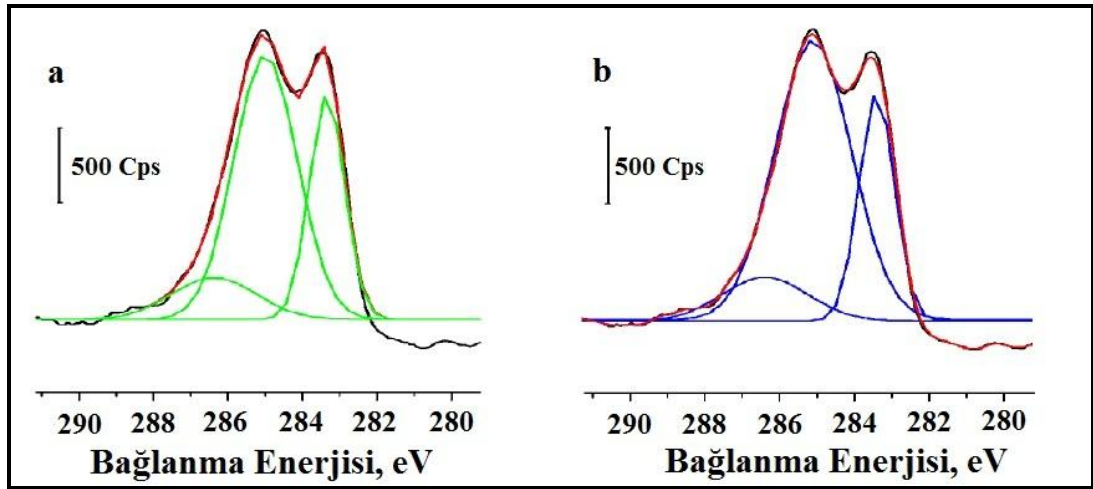
Şekil 4.9-4.12’de hazırlanan Au@Ag-*E. coli*-PS/ITO ve Ag@Au-*E. coli*-PS/ITO yüzeylerinin sırasıyla O_{1s}, C_{1s}, N_{1s} ve Ag_{3d} bölgesine ait kısmi tarama spektrumları verilmiştir.

Şekil 4.9.a.b’de hazırlanan Ag@Au-*E. coli*-PS/ITO ve Au@Ag-*E. coli*-PS/ITO yüzeylerinin O_{1s} bölgesi incelendiğinde üç farklı O_{1s} piki görülmüştür. Bu pikler her iki spektrumda sırasıyla 530.6 eV, 531.15 eV ve 535.5 eV’da gözlenmiştir. 530.6 eV’da görülen pikin kullanılan ITO yüzeyin yapısında bulunan SnO₂ ve InO₃ metal oksitlerinden kaynaklanan oksijenden ileri geldiği düşünülmektedir (Wang 2009). Spektrumda 531.15 eV’da görülen pik, immünoessey protokolündeki amit grubuna bağlı karbonil oksijeninden (HN-C=O) kaynaklanmaktadır (Ruiz-Taylor 2001). 535.5 eV’daki pik, hidroksit (C-OH) ve asetal (C-O-C) yapısından kaynaklanan O-C grubuna ait olup, antijen-antikor-*E. coli* kompleksinden ileri geldiği düşünülmektedir.



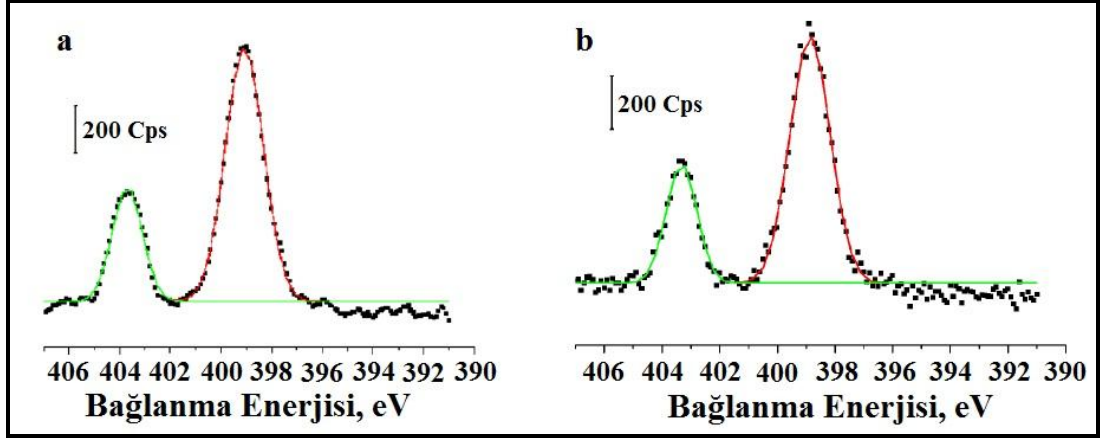
Şekil 4.9 Oksijenin XPS Spektrumu a. Ag@Au-*E. coli*-PS/ITO, b. Au@Ag-*E. coli*-PS/ITO

Ag@Au-*E. coli*-PS/ITO ve Au@Ag-*E. coli*-PS/ITO yüzeylerinin C_{1s} bölgesine ait olan spektrumları Şekil 4.10'de gösterilmiştir. Spektrumlar simüle edildiğinde üç farklı C_{1s} piki olduğu görülmüştür. Karbon atomuna ait üç farklı 1s pikinin bağlanma enerjileri sırasıyla 283.4 eV, 285.0 eV ve 286.3 eV olarak bulunmuştur. Spektrumlarda 283.4 eV'da gözlenen pikin immünoeseyin zeminini oluşturan polistirene ait C-(C,H) bağından ileri geldiği düşünülmektedir. 285.0 eV'da ortaya çıkan pikin ise antijen-antikor kompleksinin polistiren yüzeye bağlanmasıyla ortaya çıkan C-(O,N) bandına ait olduğu düşünülmektedir (Kim 2006). Ayrıca 286.3 eV'da görülen C=O piki amit bandının varlığını desteklemektedir (Dufrene 1997).

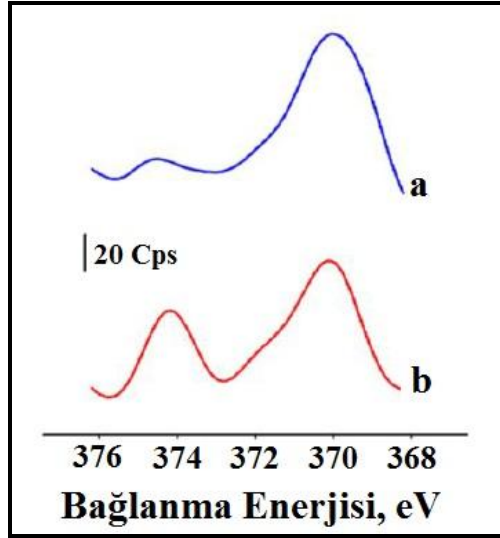


Şekil 4.10 Karbonun XPS Spektrumu a. Ag@Au-*E. coli*-PS/ITO b. Au@Ag-*E. coli*-PS/ITO

Ag@Au-*E. coli*-PS/ITO ve Au@Ag-*E. coli*-PS/ITO yüzeylerinin simüle edilmiş N_{1s} bölgesine ait spektrumları Şekil 4.11'de gösterilmiştir. N_{1s} pikinin immünoesey protokolündeki avidin ve biyotin yapılarında bulunan nitrojen içerikli fonksiyonel gruplardan (amidler ya da aminler) kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu spektrumlarda her iki yüzeyde de 399.1 eV ve 403.7 eV'da olmak üzere iki tane N_{1s} pik gözlenmiştir. Spektrumda 399.1 eV band enerjisinde görülen azot pikinin, amin (-NH₂) ya da amid (-NH-C=O) fonksiyonel grubuna ait olduğu düşünülmektedir (Lo 1999). 403.7 eV'da gözlenen pikin ise hidrojen protonlanmış amin, serbest amin ve bazı yükseltgenmiş türlere ait olabileceği düşünülmüştür (Graf 2009).



Şekil 4.11 Azotun XPS Spektrumu a. Ag@Au-*E. coli*-PS/ITO b.Au@Ag-*E. coli*-PS/ITO



Şekil 4.12 Gümüşün XPS Spektrumu a. Ag@Au-*E. coli*-PS/ITO b. Au@Ag-*E. coli*-PS/ITO

Ag@Au-*E. coli*-PS/ITO ve Au@Ag-*E. coli*-PS/ITO yüzeylerinin simüle edilmiş Ag_{3d} bölgesine ait spektrumları Şekil 4.12’de gösterilmiştir. Bu spektrumlarda Ag_{3d} pikinin varlığı immunessey protokolündeki *E. coli* bakterisi ile etkileşip bağlanan bimetalik nanoparçacık işaretli antikorlardan kaynaklanmaktadır. Gümüşe ait Ag 3d_{5/2} ve Ag 3d_{3/2} pikleri sırasıyla 368.5 eV ve 374.6 eV’ da görülmektedir. Şekil 4.12.a’da Ag@Au bimetalik yapıda çekirdek gümüş olduğundan, Ag/Au molar dağılım oranı daha azdır. Bu nedenle çekirdek gümüş olduğunda gümüşe ait Ag 3d_{5/2} pik alanında azalma

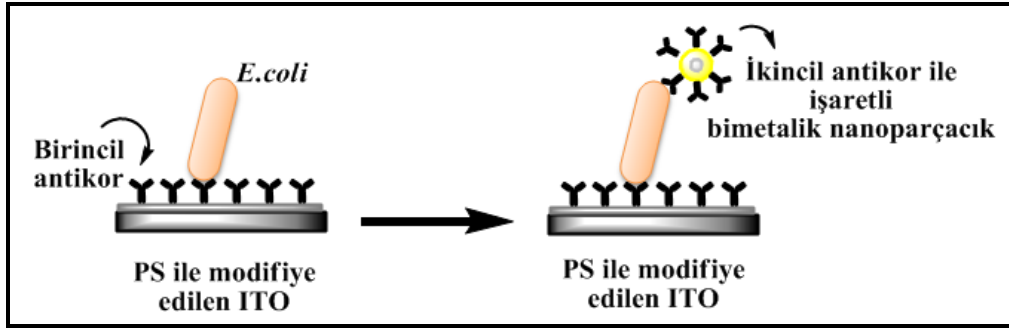
sözkonusu olmuştur. Görülen pikler bimetalik nanoparçacıkla işaretli antikorların *E. coli* ile başarılı bir şekilde bağlandığını ispatlanmaktadır.

4.3.2 YGRS ile karakterizasyon

YGRS tekniği özellikle nanoparçacıkların kullanıldığı yüzeylerin karakterizasyonlarında kullanılan ana tekniklerden biridir. Bu çalışmada güçlü Raman sinyali veren Raman işaretleyicisi DTNB ile hazırlanan bimetalik nanoparçacıkların kullanıldığı immünoessey yüzeylerin karakterizasyonu YGRS kullanılarak yapılmıştır. YGRS çalışmalarında ITO yüzeyler kullanılmıştır. İmmünoessey protokolünü doğru bir şekilde karakterize edebilmek için bu yüzeylere kuyulara yapılan işlemlerin aynısı uygulanmıştır. Bunun için ITO yüzeyler önce polistiren ile kaplanmış ve kuyuda hazırlanan protokolün zeminin oluşması sağlanmıştır. Daha sonra elde edilen polistiren kaplı ITO elektrot (PS-ITO) yüzeyine basamak basamak immünoessey protokolü inşa edilmiştir.

YGRS çalışmalarında, immünoessey protokolünün karakterizasyonunun belirleyici olması açısından, bimetalik nanoparçacık etiketli antikorların hazırlanmasında kendiliğinden düzenlenen tabaka oluşturulmak için MUA yerine raman işaretleyicisi DTNB kullanılmıştır. Bölüm 3.3'de bimetalik nanoparçacık işaretli antikorların hazırlanması ayrıntılı bir şekilde verilmiştir. Polistirenle kaplı ITO yüzey sırasıyla avidin ve biyotin işaretli antikor (birincil antikor) ile bağlandıktan sonra, *E. coli* ile etkileştirilmiştir. Bu basamağın sonunda elde edilen yüzey *E. coli*-PS/ITO olarak adlandırılmıştır. Raman işaretleyici molekül olan DTNB ile hazırlanan bimetalik nanoparçacık işaretli ikincil antikor, *E. coli* bağlanmış yüzeye (*E. coli*-PS/ITO) bırakılarak bir süre etkileştirilmiştir. Hazırlanan yüzeyler yıkanarak spesifik olmayan bağlanmadan ileri gelen safsızlıklar PBS ile uzaklaştırıldıktan sonra YGRS ölçümleri alınmıştır. Benzer işlemler hem Au@Ag hem de Ag@Au bimetalik nanoparçacık için gerçekleştirilmiştir. Bu basamak sonunda elde edilen yüzeyler Au@Ag-*E. coli*-PS/ITO ve Ag@Au-*E. coli*-PS/ITO olarak adlandırılmıştır.

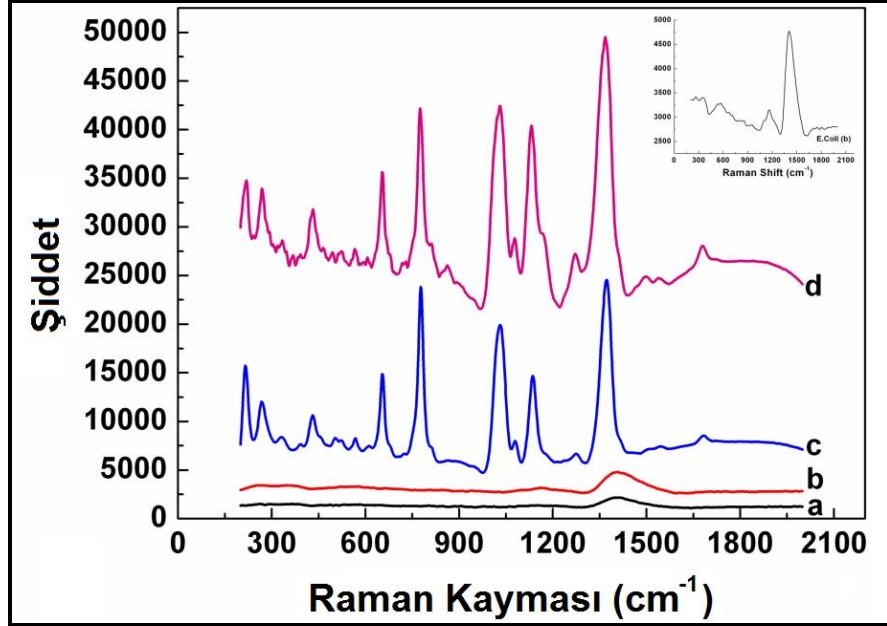
Şekil 4.13’da *E.coli*-PS/ITO, Au@Ag-*E.coli*-PS/ITO ve Ag@Au-*E.coli*-PS/ITO yüzeylerinin hazırlanışı şematik olarak gösterilmiştir. DTNB ile kendiliğinden düzenlenen tabaka oluşturan bimetalik nanoparçacıkların *E. coli* ile bağlanıp bağlanmadığı YGRS analizleriyle incelenmiştir. Yapılan deneylerde DTNB’nin yapısında bulunan nitro grubuna ait bandlardan yararlanılmıştır.



Şekil 4.13 DTNB’nin kullanıldığı nanoparçacıklarla etiketlenen *E. coli* ile nanoparçacıklarla etiketlenmeden alınan *E. coli* yüzeylerinin YGRS deneyleri için şematik gösterimi

PS/ITO (a), *E.coli*-PS/ITO (b), Ag@Au-*E.coli*-PS/ITO (c) ve Au@Ag-*E.coli*-PS/ITO (d) yüzeylerinin yüzey güçlendirilmiş raman spektrumları şekil 4.14’de verilmiştir. Şekil 4.14 incelendiğinde polistiren kaplı ITO yüzey (a) ve *E. coli* bağlanmış yüzeyde (b, inset olarak verilen spektrum) 1410 cm^{-1} de bir pik görülmektedir. Bu pikin polistirenin yapısında bulunan CH_2 titreşimine ait olduğu düşünülmektedir. Ag@Au ve Au@Ag bimetalik nanoparçacıklar üzerinde oluşturulan DTNB tabakasına ait bandlar ile immünoessey oluşumu şekil 4.14c.d’de gösterilen spektrumlardan takip edilmiştir. DTNB’nin yapısında bulunan nitro grubuna ait band, *E. coli*’ye bağlanan Ag@Au ve Au@Ag varlığını göstermektedir. İmmünoessey protokolünün hazırlandığı yüzeylerde 1368 cm^{-1} ’de gözlenen şiddetli band nitro (NO_2) grubunun simetrik gerilme titreşimine aittir (Şekil 4.14.c.d). DTNB’nin Raman spektrumunda nitro gerilimleri 1342 cm^{-1} ’de gözlenmektedir. Hazırlanan protokolda ise bu band 1368 cm^{-1} ’de ortaya çıkmıştır. 1368 cm^{-1} ’de gözlenen bu bandın DTNB’nin bimetalik nanoparçacıklar ile etiketlenmesinden ve immünoessey etkileşimi sonucu kaydığı düşünülmektedir.

Elde edilen sonuçlar Yazgan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmayla da desteklenmektedir. (Yazgan 2010).



Şekil 4.14 Yüzeylerin SERS Spektrumu

a. PS/ITO, b. *E.coli*-PS/ITO (aynı zamanda inset olarak verilen spektrum), c. Ag@Au-*E.coli*-PS/ITO, d. Au@Ag-*E.coli*-PS/ITO.

Şekil 4.14.c.d'deki spektrumlar incelendiğinde 1076 cm^{-1} 'de gözlenen bandın C-S grubuna ait titreşim bandı olduğu düşünülmektedir (Zheng 2002). 267 ve 218 cm^{-1} 'de görülen bandlar metal-S titreşimine aittir. Gümüş-kükürt bandı güçlü kovalent karaktere sahiptir. Bu nedenle metal-molekül ara yüzeyinde yük transferi oluşmaktadır (Johansson 2000). Çekirdekdeki altın atomları yük transferiyle yüzeydeki gümüş atomlarının etkisini güçlendirir, bimetalik nanoparçacıklar arasındaki bu yük transferi bileşenlerin elektronegativitesi ile ilgilidir. Altın gümüşten daha elektronegatifdir, bu nedenle Au@Ag nanoparçacıkların hem iç hem de dış kısmında güçlü plazmonlar oluşur. Bu da kabuğun gümüş olması durumunda (Şekil 4.14.d) daha güçlü bir yüzey güçlendirilmiş raman etkisinin görülmesine neden olmaktadır (Yang 2008). Geliştirilen bu elektrokimyasal biyosensör YGRS esaslı bir teknik geliştirilmesinin de mümkün olabileceği işaret etmektedir.

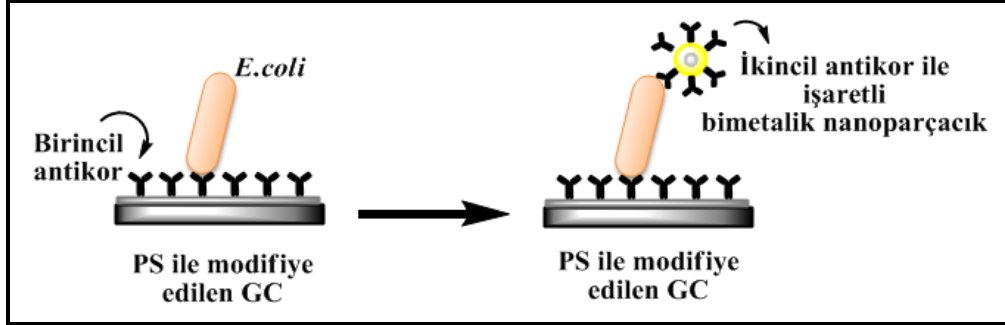
4.3.3 ATR-FTIR ile karakterizasyon

ATR-FTIR spektroskopisi yüzey analizlerinde sık kullanılan bir tekniktir. Bu teknik ile yüzeye zarar vermeden hızlı bir şekilde analiz sonucu elde edilebilmektedir. Bu tez çalışmasında yapılan ATR-FTIR analizlerinde yüzey olarak camsı karbon (GC) elektrotlar kullanılmıştır. Hazırlanan immünoessey protokolünü doğru bir şekilde karakterize edebilmek için polistiren kuyulara yapılan işlemlerin aynısı GC yüzeyler üzerinde uygulanmıştır. Bu sebeple GC yüzeyler öncelikle polistiren ile kaplanmış ve kuyuda hazırlanan protokolün zeminin oluşması sağlanmıştır. Daha sonra elde edilen polistiren kaplı GC elektrot (PS/GC) yüzeylerin üzerine basamak basamak immünoessey protokolü inşa edilmiştir.

ATR-FTIR analizlerinde YGRS çalışmalarına benzer olarak hazırlanan yüzeylerde karakterizasyonun belirleyici olması açısından, bimetalik nanoparçacık etiketli antikörlerin hazırlanmasında kendiliğinden düzenlenen tabaka oluşturulmak için MUA yerine raman işaretleyicisi DTNB kullanılmıştır. Bimetalik nanoparçacık işaretli antikörler Bölüm 3.3'de anlatıldığı şekilde basamak basamak hazırlanmıştır. Polistirenle kaplı GC yüzey sırasıyla avidin ve biyotin işaretli antikör (birincil antikör) ile bağlandıktan sonra, *E. coli* ile etkileştirilmiştir. Bu basamağın sonunda elde edilen yüzey *E. coli*-PS/GC olarak adlandırılmıştır. Raman işaretleyici molekül olan DTNB ile hazırlanan bimetalik nanoparçacık işaretli ikincil antikör, *E. coli* bağlanmış yüzeye (*E. coli*-PS/GC) bırakılarak bir süre etkileştirilmiştir. Hazırlanan yüzeyler yıkanarak spesifik olmayan bağlanmadan ileri gelen safsızlıklar PBS ile uzaklaştırıldıktan sonra ATR-FTIR ölçümleri alınmıştır. Benzer işlemler her iki bimetalik nanoparçacık için gerçekleştirilmiştir. Bu basamak sonunda elde edilen yüzeyler Au@Ag-*E. coli*-PS/GC ve Ag@Au-*E. coli*-PS/GC olarak adlandırılmıştır.

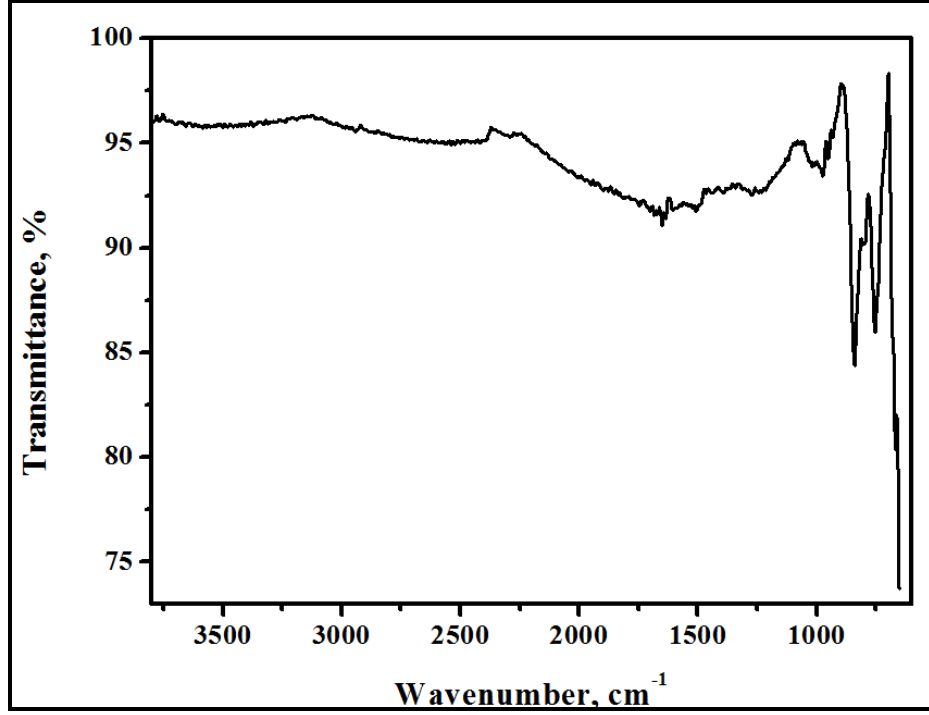
E. coli-PS/GC, Au@Ag-*E. coli*-PS/GC ve Ag@Au-*E. coli*-PS/GC yüzeyleri şekil 4.15'de şematik olarak gösterilmiştir. ATR-FTIR analizlerde DTNB ile kendiliğinden düzenlenen tabaka oluşturan bimetalik nanoparçacıkların *E. coli* ile bağlanıp

bağlanmadığı takip edilmiştir. Yapılan deneylerde DTNB'nin yapısında bulunan nitro grubuna ait titreşim bandlarından yararlanılmıştır.



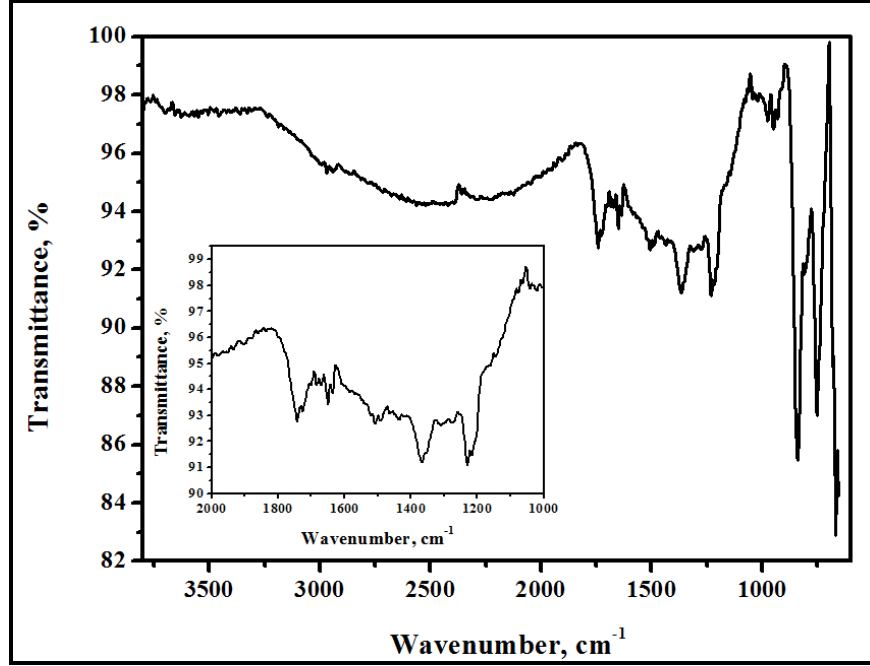
Şekil 4.15 DTNB'nin kullanıldığı nanoparçacıklarla etiketlenen *E. coli* ile nanoparçacıklarla etiketlenmeden alınan *E. coli* yüzeylerinin ATR-FTIR analizleri için şematik gösterimi

Şekil 4.16-4.18'de *E.coli*-PS/GC, Ag@Au-*E.coli*-PS/GC ve Au@Ag-*E.coli*-PS/GC yüzeylerinin ATR-FTIR spektrumları gösterilmiştir. Ag@Au ve Au@Ag bimetallik nanoparçacıklar üzerinde oluşturulan DTNB tabakasına ait bandlar ile immünoessey oluşumu spektrumlarından takip edilmiştir. Bu çalışmalarda DTNB molekülünün tercih edilmesinin sebebi kullanılan yüzeyin ve bakterinin yapısında olan gruplardan farklı bir grubun yapısında bulunmasıdır. DTNB'nin yapısında bulunan nitro grubuna ait olan titreşim bandları, bimetallik nanoparçacık ile işaretlenen antikorun bakteriye bağlandığını kanıtlanmaktadır. Bu bandlar Şekil 4.16'de sadece birincil antikor ile etkileştirilen *E. coli* (*E.coli*-PS/GC) yüzeyinde görülmemektedir.

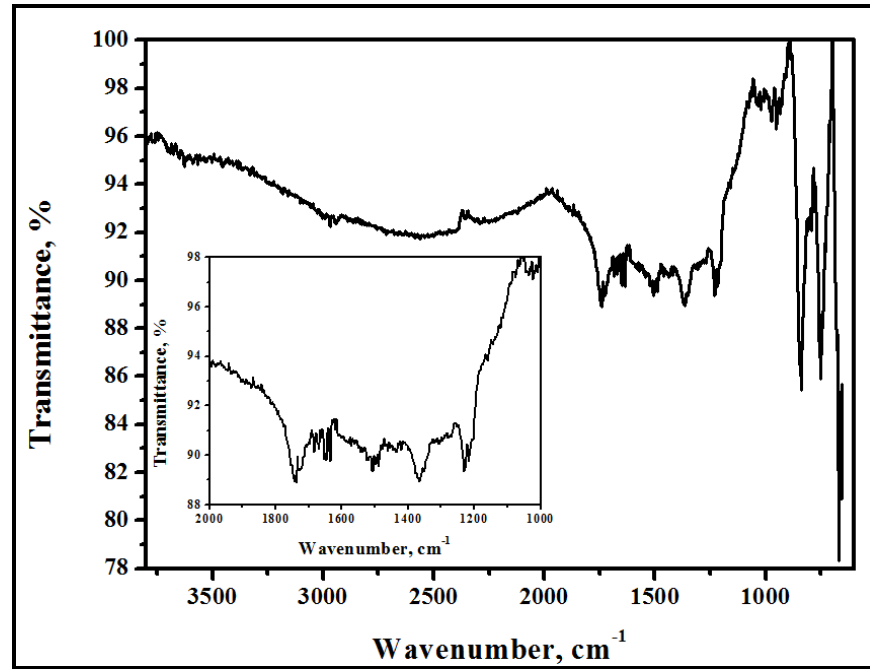


Şekil 4.16 *E.coli*-PS/GC yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu

Şekil 4.17'de Ag@Au bimetalik nanoparçacığın kullanıldığı Ag@Au-*E.coli*-PS/GC yüzeyinin spektrumu incelendiğinde 1506 cm⁻¹ ve 1363 cm⁻¹'de nitro gruplarına ait asimetric ve simetric gerilmeler gözlenmektedir. Benzer şekilde Şekil 4.18 incelendiğinde Au@Ag-*E.coli*-PS/GC yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumunda nitro grubuna ait asimetric ve simetric bandlar 1508 cm⁻¹ ve 1367 cm⁻¹'de görülmektedir. Elde edilen spektrumlardan işaretli nanoparçacıkla etiketli ikincil antikorun *E. coli* bakterisine başarılı bir biçimde bağlandığı görülmektedir.



Şekil 4.17 Ag@Au-*E.coli*-PS/GC yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



Şekil 4.18 Au@Ag-*E.coli*-PS/GC yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu

4.4 Elektrokimyasal Çalışmalar

Tez önerisinde belirtilen elektrokimyasal çalışmalar aşağıdaki şekilde yürütülmüştür. Tez kapsamında belirtilen Au@Ag ve Ag@Au bimetallik nanoparçacıkların elektrokimyasal davranışlarını kıyaslamak için öncelikle sentezlenen monometallik Au ve Ag nanoparçacıkların elektrokimyasal davranışları incelenmiştir.

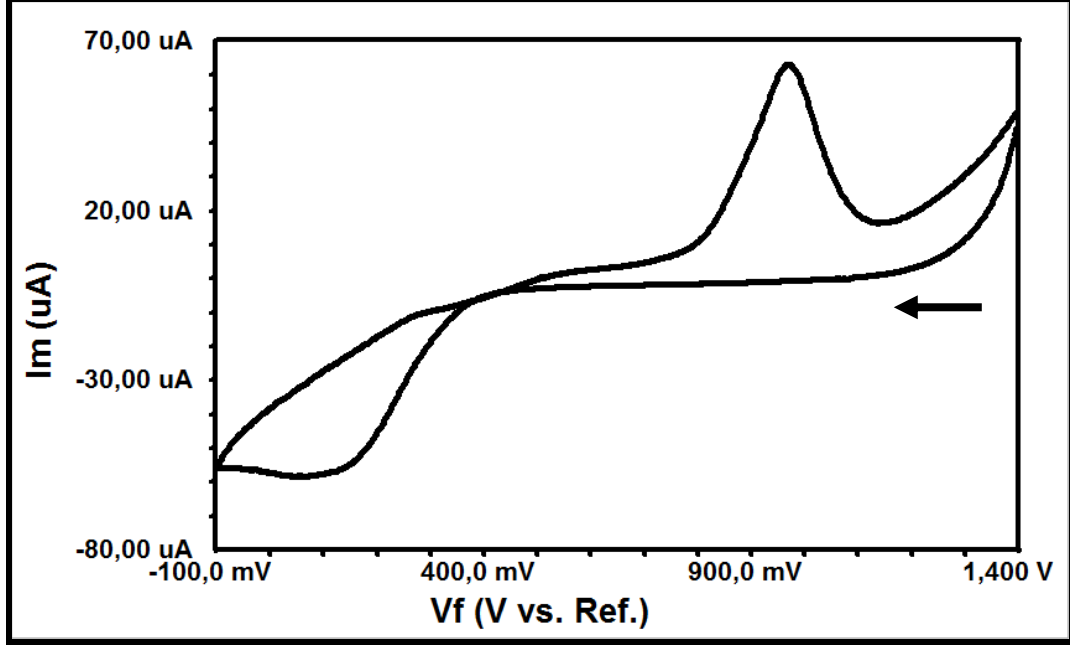
Bimetallik nanoparçacıkların çözülmesiyle her iki metalin de çözelti ortamına alınması amaçlandığından her iki metalin birlikte ve ayrı ayrı incelenmesinin uygun olacağı düşünülmüştür. Elektrokimyasal çalışmalarda çapı 0.8 cm ve derinliği 1 cm olan 96 kuyucuklu polistiren mikropate kullanılmıştır. Dönüşümlü voltametri ve kare dalga sıyırma voltametrisi deneyleri laboratuvarımızda bulunan Gamry 300 marka cihaz ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda, çalışma elektrodu olarak kalem elektrot (Tombo marka, 0.7 H), referans elektrot olarak gümüş tel ve karşıt elektrot olarak platin elektrot kullanılmıştır. Her ölçümde çözeltiye giren toplam kalem ucu 9 mm'dir. Bu uzunlukta bir kalem ucu 22.74 mm² aktif elektrot yüzeyine karşılık gelmektedir. Her deneyde yeni elektrot yüzeyi kullanılmıştır.

4.4.1 Altın ve gümüşün dönüşümlü voltametri ile biriktirme potansiyellerinin belirlenmesi

Altın metalinin sınırlı sayıda çözücüde çözünmesi sebebiyle öncelikle altın nanoparçacıkların en iyi çözüldüğü ortam araştırılmış ve metalik altının Au³⁺ 'e en iyi yükseltgendiği ortamın kral suyu olduğuna karar verilmiştir. Bu sebeple altın nanoparçacıklar seyreltilmiş kral suyu içerisinde çözüldükten sonra elektrokimyasal deneyler gerçekleştirilmiştir.

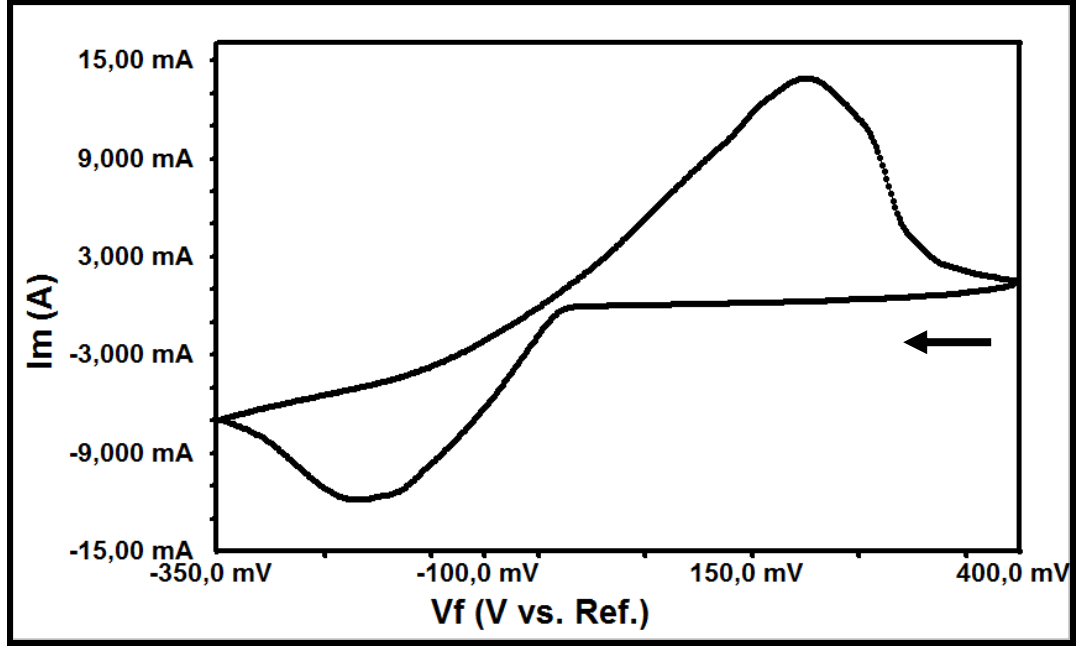
Altının potansiyel aralığını ve biriktirme potansiyelini belirlemek için, önce 1 mM HAuCl₄'ün seyreltilmiş kral suyunda hazırlanan çözeltisinin kalem elektrotta dönüşümlü voltamogramı alınmıştır. Potansiyel aralığı 1.4/-0.1 V olarak belirlenmiş olup, potansiyel hızı 200 mV/s seçilmiştir. Bu parametrelerle elde edilen voltamogram

şekil 4.19’da görülmektedir. Bu voltamogramdan altın nanoparçacıkların kral suyunda çözüldükten sonraki biriktirme potansiyeli -0.2 V olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.19 Seyreltilmiş kral suyunda hazırlanan HAuCl_4 'ün dönüşümlü voltamogramı. Tarama hızı: 200 mV/s, Ag/Ag^+ 'ya karşı

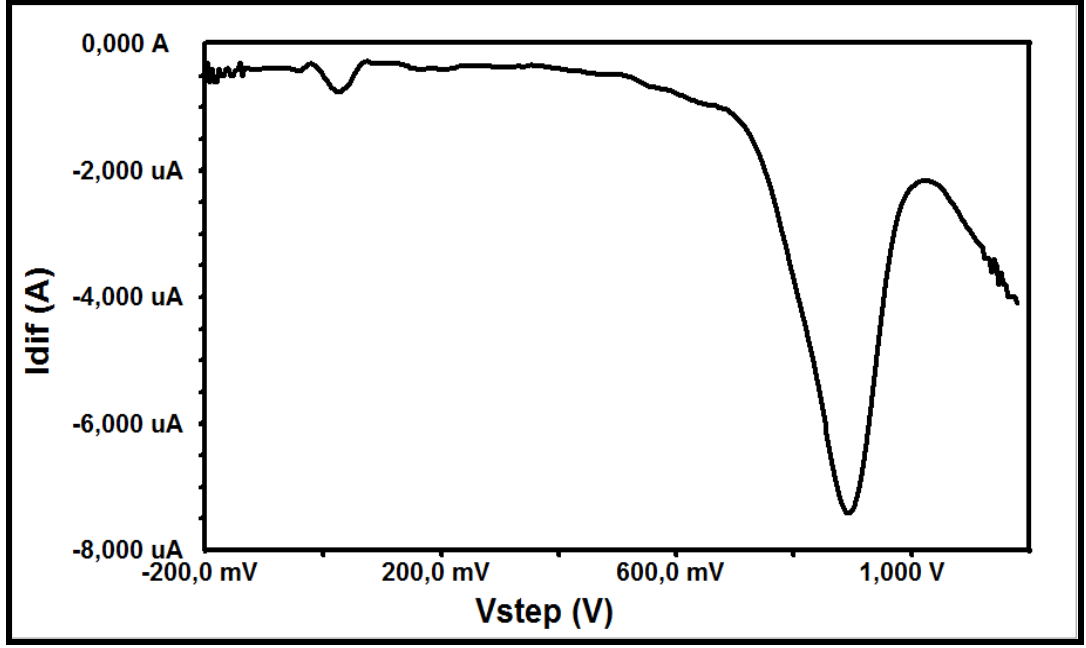
Altının potansiyel aralığı ve biriktirme potansiyeli belirlendikten sonra gümüş için aynı çalışma gerçekleştirilmiştir. Yapılan ön denemeler sonucunda kral suyunun gümüş nanoparçacıkları kısmen çözdüğü görülmüştür. Bu sebeple gümüşün çalışma ortamı nitrik asit olarak seçilmiştir. Gümüşün potansiyel çalışma aralığı ve biriktirme potansiyeli, 0.1M nitrik asitte hazırlanan AgNO_3 'ün dönüşümlü voltametri deneyleri ile belirlenmiştir. Şekil 4.20’de, -0.35 ile 0.4 V arasında 200 mV/s’deki AgNO_3 'ün dönüşümlü voltamogramı görülmektedir. Bu voltamogramdan Ag(I) 'in metalik gümüşe indirgeniği potansiyel diğer bir adıyla biriktirme potansiyeli -0.35 V olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.20 0.1 M HNO₃ içerisinde hazırlanan AgNO₃'ün dönüşümlü voltamogramı. Tarama hızı: 200 mV/s, Ag/Ag⁺ya karşı

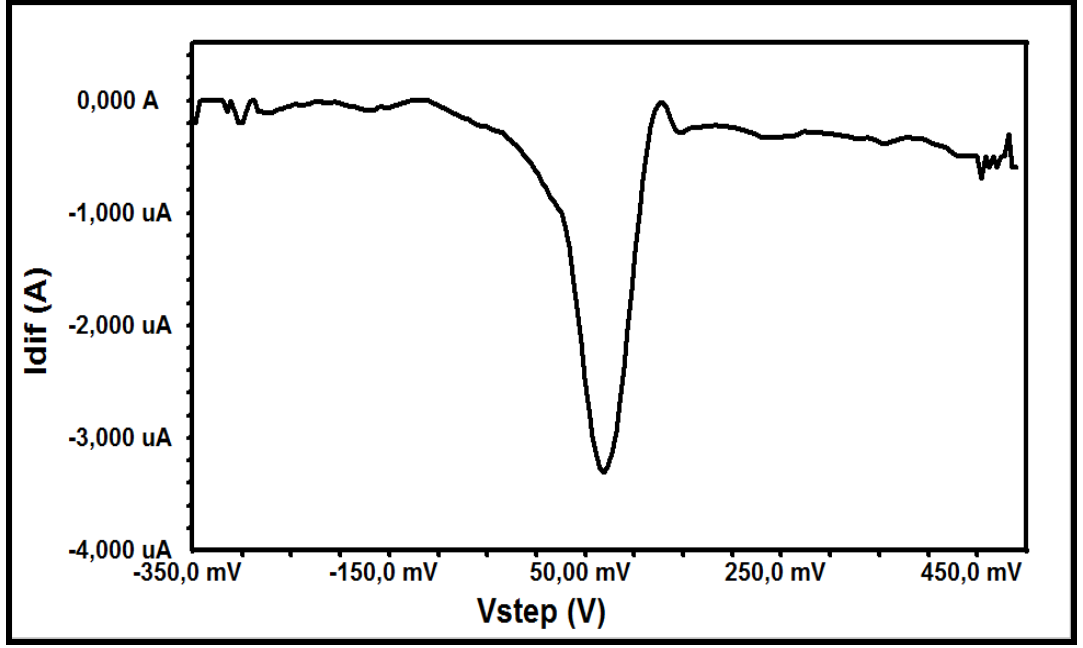
4.4.2 Altın ve gümüşün kare dalga sıyırma voltametri ile sıyırma potansiyellerinin belirlenmesi

Altın ve gümüşün biriktirme potansiyelleri belirlendikten sonra kare dalga sıyırma voltametri ile sıyırma potansiyelleri belirlenmiştir. Altının sıyırma potansiyelini belirlemek için, önce altın nanoparçacıklar çözünür duruma getirilmiş daha sonra kare dalga sıyırma voltametri ile bu potansiyel belirlenmiştir. Çözünmüş durumdaki altın, -0.2 V'da kalem elektrotta 120 s biriktirilmiştir. Biriktirilen altın daha sonra -0.2 ile 1.4 V aralığında pozitif yönde bir potansiyel taraması ile yüzeyden sıyırılmıştır. Şekil 4.21'de altının kalem elektrottan sıyırma voltamogramı görülmektedir. Bu voltamogramdan kalem elektrot yüzeyinden altının sıyırma potansiyeli 0.89 V olarak bulunmuştur.



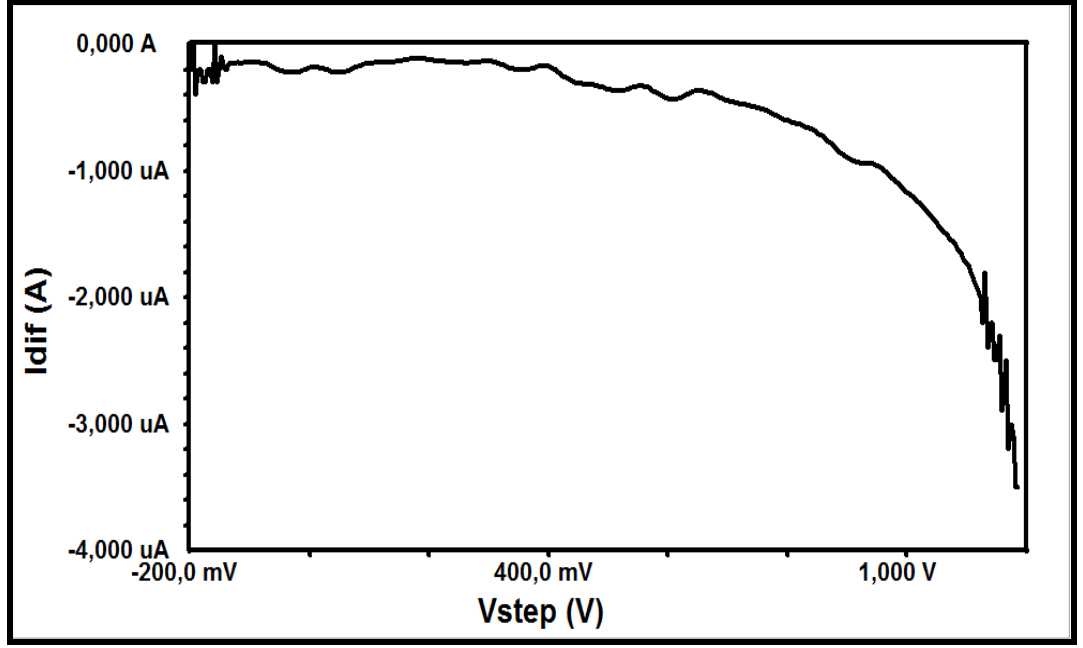
Şekil 4.21 Seyreltilmiş kral suyunda altının sıyırma voltamogramı

Gümüşün sıyırma potansiyelini belirlemek için, önce gümüş nanoparçacıklar çözünür duruma getirilmiş daha sonra kare dalga sıyırma voltametri ile bu potansiyel belirlenmiştir. Gümüş, -0.35V'da kalem elektrotta 120 s biriktirilmiştir. Biriktirilen gümüş daha sonra -0.35 ile 0.5 V aralığında pozitif yönde bir potansiyel taraması ile yüzeyden sıyırılmıştır. Şekil 4.22'de gümüşün kalem elektrottan sıyırılma voltamogramı görülmektedir. Bu voltamogramdan gümüşün sıyırılma potansiyeli 0.069 V olarak bulunmuştur.



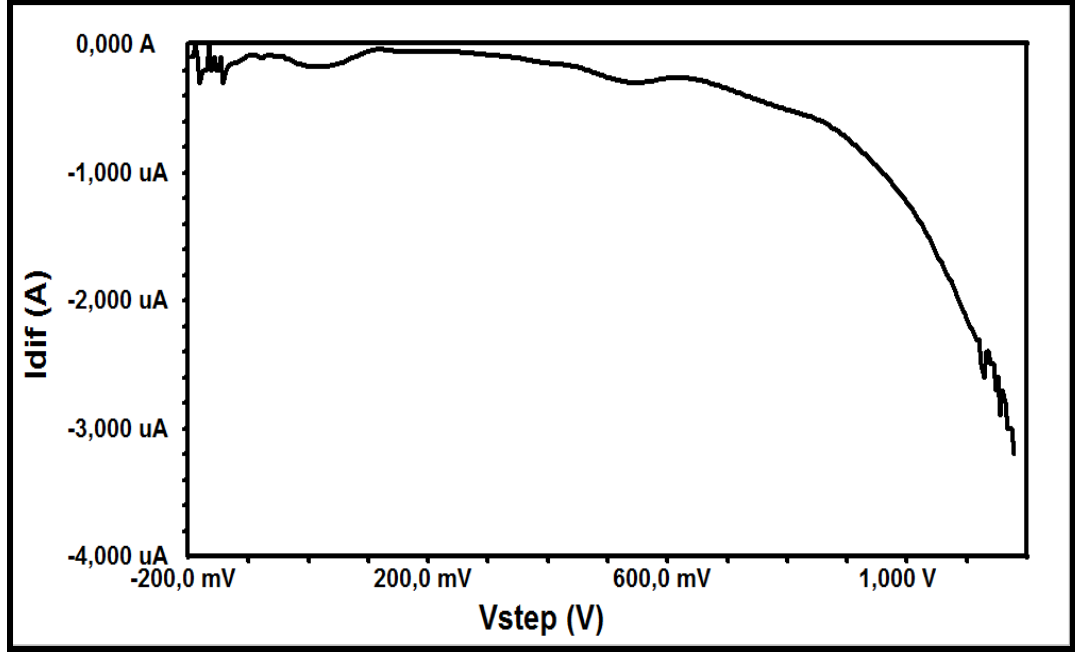
Şekil 4.22 0.1 M nitrik asit çözeltisi içerisinde gümüşün sıyırma voltamogramı

Gümüş nanoparçacıkların seyreltilmiş kral suyu içerisinde kısmen çözünebileceği düşünüldüğünden bu çözelti içerisinde bir ön deneme gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle seyreltilmiş kral suyunda kısmen çözüldüğü düşünülen gümüş -0.35 V'da kalem elektrotta 120 s biriktirilmiştir. Biriken gümüş -0.35 ile 0.5 V arasında kare dalga sıyırma voltametri ile belirlenmeye çalışılmıştır. Şekil 4.23'de görüldüğü üzere beklenen potansiyelde herhangi bir sıyırma piki gözlenememiştir. Bunun sebebinin gümüşün kral suyunda çözünen miktarının alt tayin sınırının altında olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.23 Seyreltilmiş kral suyunda çözünen Ag nanoparçacıkların kare dalga sıyırma voltametri ile sıyırma voltamogramı.

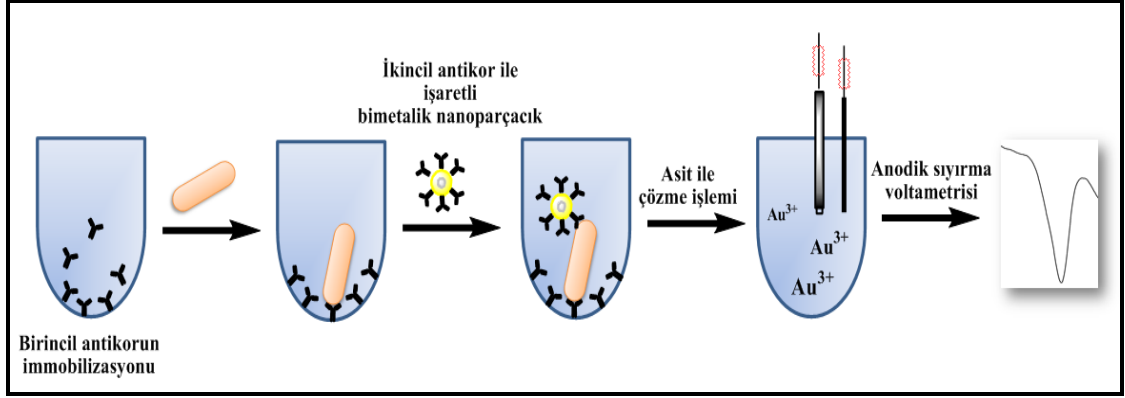
Elektrokimyasal deneylerde referans elektrot olarak kullanılan Ag telin çalışılan potansiyel aralığında girişim yapıp yapmadığını anlamak için, kalem elektroda destek elektrolit ortamında -0.2 V potansiyel uygulanarak biriktirme yapılmıştır. Daha sonra destek elektrolit ortamında (seyreltilmiş kral suyu) -0.2 V ile 1.2 V potansiyel aralığında kare dalga sıyırma voltametri uygulanmıştır. Şekil 4.24’de Ag ve Au’nun çalışıldığı bölgede herhangi bir sıyırılma pikine rastlanılmamış, böylece referans olarak kullanılan Ag telin bir girişim yapmadığı anlaşılmıştır.



Şekil 4.24 Destek çözeltisinin içerisinde sıyırma voltamogramı

4.4.3 Elektrokimyasal biyosensör çalışmaları

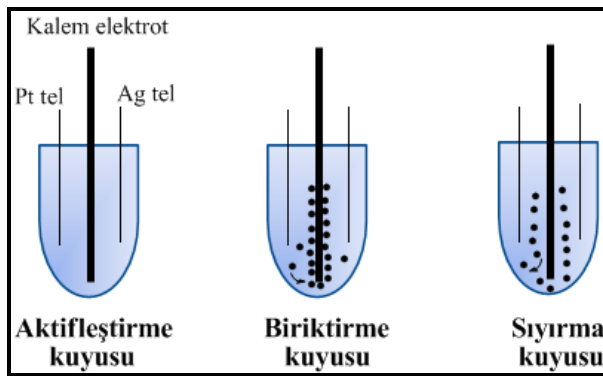
İşaretlemede kullanılan bimetalik nanoparçacıkların yapısında bulunan altın ve gümüşün elektrokimyasal çalışma parametreleri belirlendikten sonra polistiren kuyucuklarda hazırlanan immünoessey protokolünün uygulanabilirliği çalışılmıştır. Belirlenen parametrelere uygun olarak hazırlanan elektrokimyasal biyosensörün performansı incelenmiştir. Polistiren kuyucuklarda hazırlanan immünoessey protokolünün hazırlanması Bölüm 3.5’de detaylı bir şekilde anlatılmış olup, elde edilen yüzeyin şematik gösterimi şekil 4.25’de şematik olarak gösterilmiştir. Elektrokimyasal deneylerin ilk aşamasında immünoessey protokolünün hazırlandığı kuyucuğa işaretlemede kullanılan bimetalik nanoparçacığı çözmek için uygun asit çözeltisi konulmuştur. Bu işlemde sonra asidik ortamda yükseltgenen metal öncelikle uygun potansiyelde belirli bir süre elektrot yüzeyine biriktirilmiş, daha sonra sıyırma pikine bağlı olarak akım miktarı *E. coli* sayısına bağlı olarak grafiğe geçirilmiştir. İki farklı (Au@Ag ve Ag@Au) bimetalik nanoparçacığın kullanıldığı çalışmada nanoparçacıklara uygulanan işlemlerden elde edilen sonuçlar alt başlıklarda ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.



Şekil 4.25 Bimetalik nanoparçacık ile işaretlemenin kullanıldığı elektrokimyasal immünoensörün şematik gösterimi

4.4.3.1 Ag@Au bimetalik nanoparçacıkların kullanıldığı elektrokimyasal biyosensör ile *E. coli* tayini

Elektrokimyasal olarak *E.coli* sayısının tayini için hazırlanan immünoessey protokolü polistiren kuyucuklarda hazırlanmıştır. Ag@Au bimetalik nanoparçacıkların etiket olarak kullanıldığı elektrokimyasal çalışmalarda her deney için üç kuyu kullanılmıştır. İlk kuyuda kullanılan destek elektrolit çözeltisi içerisinde aktiveleme işlemi, ikinci kuyuda biriktirme işlemi ve son kuyuda sıyırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan kuyucukların şematik gösterimi şekil 4.26’de verilmiştir.



Şekil 4.26 Elektrokimyasal çalışmalarda kullanılan üç kuyunun şematik gösterimi

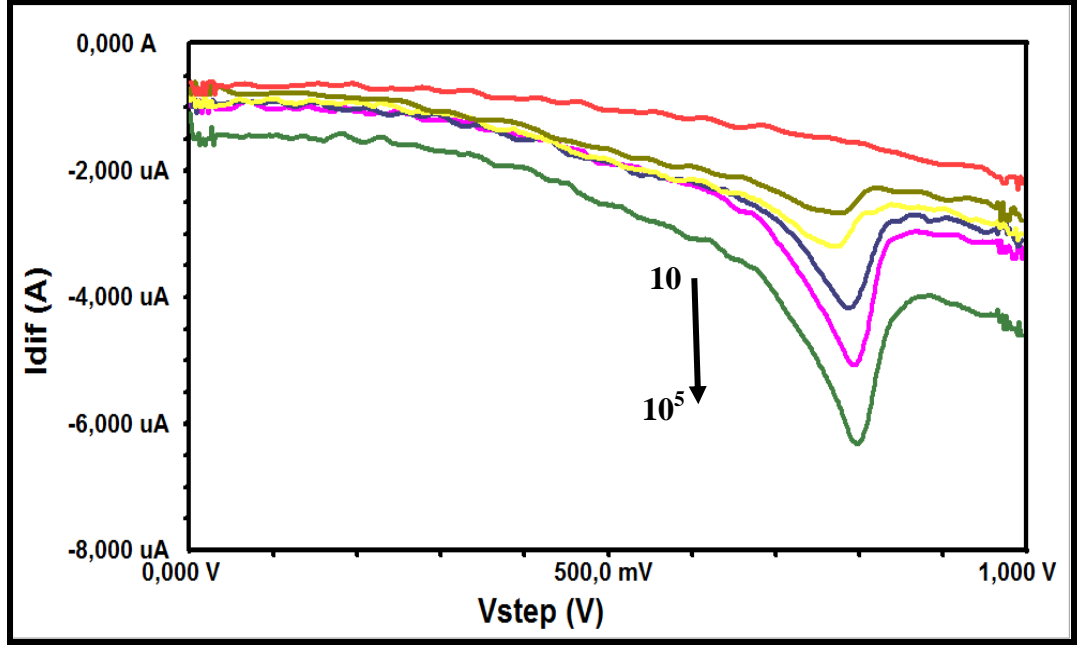
Elektrokimyasal biyosensör çalışmalarında kare dalga sıyırma voltametri kullanılmıştır. Bu teknikte kullanılan parametreler şu şekildedir: Frekans 15 Hz, puls

genişliği 50 mV ve adım genişliği 2 mV'tur. Paralel yapılan deneyler için her defasında yeni biriktirme çözeltisi ve yeni bir kurşun kalem elektrot yüzeyi kullanılmıştır.

İlk önce çalışma elektrodu olarak kullanılan kalem elektrodun çözelti içerisinde kalan kısmı aktifleştirme hücresinde bulunan seyreltilmiş kral suyu içerisinde kronoamperometri yöntemiyle 1.4 V'da 360 s aktive edilmiştir. Asidik özelti içerisinde gerçekleştirilen bu işlem sonucunda kullanılan elektrot yüzeyinin hem tekrarlanabilirliği hem de hassasiyetinin artırılması sağlanmıştır.

Kare dalga sıyırma voltametrisi deneyleri ön denemelerde belirlenen parametreler kullanılarak yapılmıştır. Elektrodun aktifleştirme işleminden sonra Ag@Au nanoparçacıklar seyreltilmiş kral suyu çözeltisinde kimyasal olarak özölmüştür. Metalik durumda bulunan altın Au^{3+} ya yükseltgenmiştir. Çözeltide bulunan altın biriktirme kuyucuğuna alınarak kalem elektrotta -0.2 V'da 600 s biriktirilmiştir.

Biriktirme işleminden sonra elektrot çözeltiden alınarak sıyırma kuyucuğuna konulmuştur. Elektrot yüzeyine biriken altın seyreltilmiş kral suyu içerisinde 0 ile 1.2 V arasında sıyırılmıştır. Şekil 4.27'de çözelti içerisinde bulunan Au^{3+} ün sıyırma potansiyeline karşı sıyırma akımı görölmektedir. Voltamogramda 10^5 ve 10^1 kob/mL dilüsyon aralığında kullanılan *E. coli* sayısı ile değişen Au^{3+} ün sıyırma akımındaki değişim görölmektedir. Kare dalga sıyırma voltametrisi ike kalem elektrotta biriken altının sıyırma potansiyeli 0.8 V olarak gözlenmiştir. Bu voltamogramdan immünoessey protokolünün hazırlanması sırasında kullanılan *E. coli* sayısının artmasıyla altının sıyırma akımında da bir artış olmaktadır.

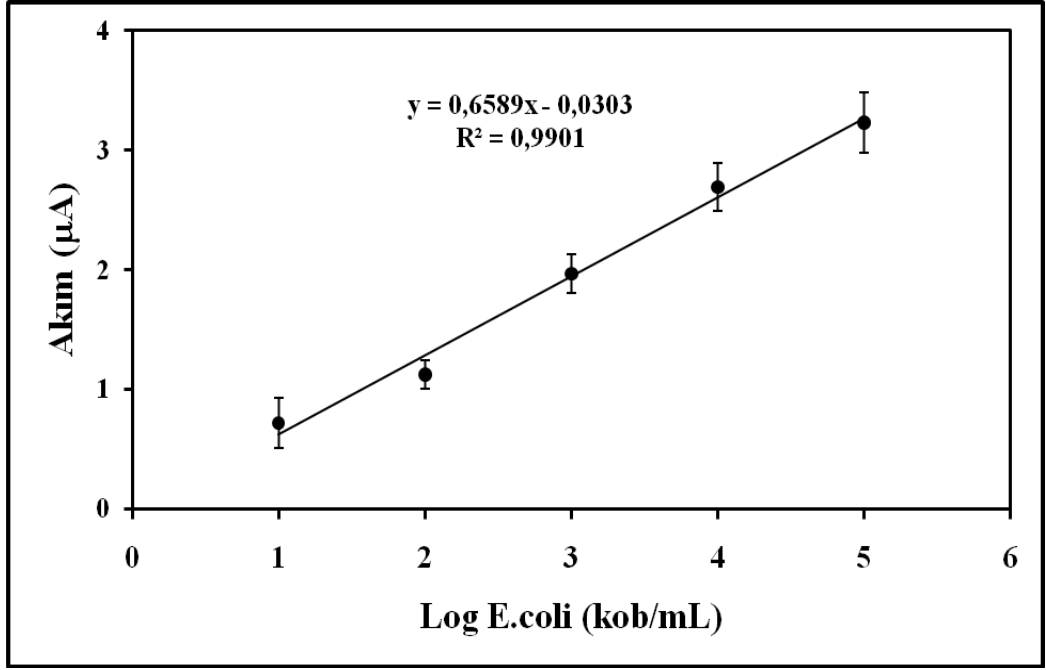


Şekil 4.27 10^5 ve 10^1 kob/ mL dilüsyon aralığında kullanılan *E. coli* ile değişen Au^{3+} 'ün sıyırma voltamogramı

Kalibrasyon grafiğinin oluşturulmasında *E. coli*'nin 10^5 ile 10^1 kob/mL arasındaki ardışık dilüsyonları kullanılmıştır. Şekil 4.28'de çizilen kalibrasyon grafiğinde *E. coli* sayısına karşı sıyırma akımı değerleri gösterilmiştir. Grafikten, *E. coli* sayısının logaritması ile sıyırma akımının arasında doğrusal bir ilişki görülmektedir. *E. coli*'nin tayini için geliştirilen yöntemin kalibrasyon grafiği çizildiğinde elde edilen doğrunun eşitliği aşağıda verilmiştir. Bu grafik incelendiğinde doğrusal çalışma aralığı 10 kob/mL- 10^5 kob/mL olarak belirlenmiştir. Grafiğe ait korelasyon katsayısı (R^2) 0,9901 bulunmuştur.

$$I_p(\mu A) = 0.6589 \log E. coli \text{ (kob/mL)} - 0.0303 (\mu A)$$

Kalibrasyon çalışması sonucunda elde edilen verilerden gözlenebilme sınırı (LOD) değeri hesaplanmıştır. Gözlenebilme sınırı 3 kob/mL olarak bulunmuştur.



Şekil 4.28 *E. coli*'nin Au^{3+} 'nin sıyırma akımına karşı çizilen kalibrasyon grafiği

4.4.3.2 Au@Ag bimetalik nanoparçacıkların kullanıldığı elektrokimyasal biyosensör ile *E. coli* tayini

Elektrokimyasal olarak *E. coli* sayısının tayini için hazırlanan immünoessey protokolü polistiren kuyucuklarda hazırlanmıştır. Au@Ag bimetalik nanoparçacıkların etiket olarak kullanıldığı elektrokimyasal çalışmalarda her deney için üç kuyu kullanılmıştır. İlk kuyuda kullanılan destek elektrolit çözeltisi içerisinde aktifleştirme işlemi, ikinci kuyuda biriktirme işlemi ve son kuyuda sıyırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan kuyucukların şematik gösterimi şekil 4.26'de verilmiştir.

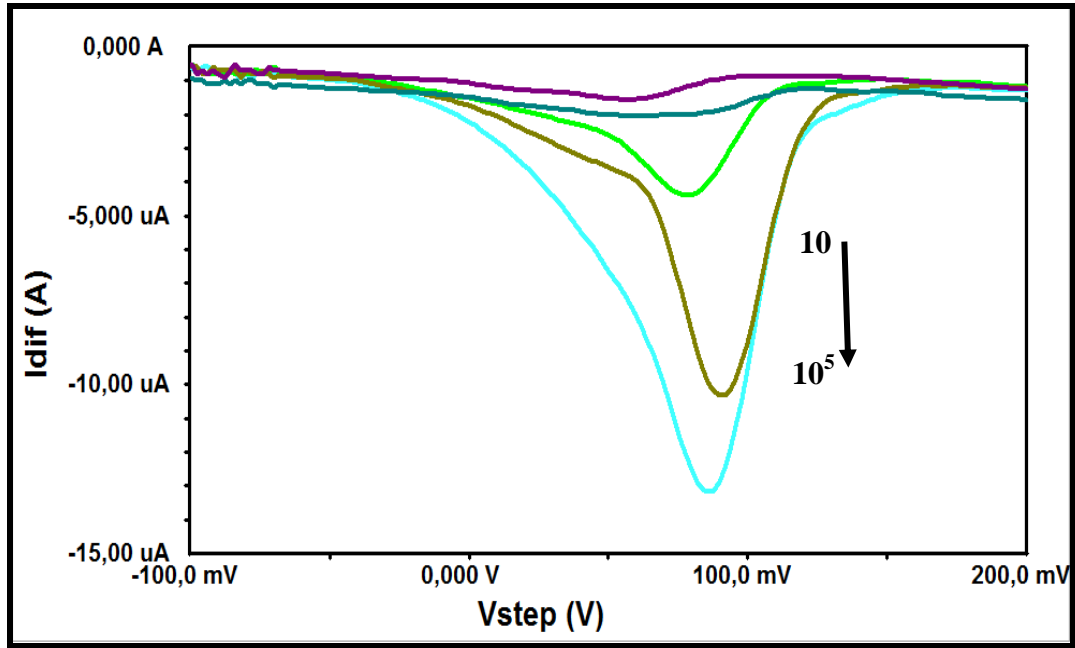
Elektrokimyasal biyosensör çalışmalarında kare dalga sıyırma voltametri kullanılmıştır. Bu teknikte kullanılan parametreler şu şekildedir: Frekans 15 Hz, puls genişliği 50 mV ve adım genişliği 2 mV'tur. Paralel yapılan deneyler için her defasında yeni biriktirme çözeltisi ve yeni bir kurşun kalem elektrot yüzeyi kullanılmıştır.

Öncelikle çalışma elektrodu olarak kullanılan kalem elektrodun çözelti içerisinde kalan kısmı aktifleştirme hücrelerinde bulunan seyreltilmiş kral suyu içerisinde

kronoamperometri yöntemiyle 1.4 V'da 360 s aktive edilmiştir. Asidik çözelti içerisinde gerçekleştirilen bu işlem sonucunda kullanılan elektrot yüzeyinin hem tekrarlanabilirliği hem de hassasiyetinin artırılması sağlanmıştır.

Kare dalga sıyırma voltametri deneyleri ön denemelerde belirlenen parametreler kullanılarak yapılmıştır. Elektrodun aktifleştirme işleminden sonra Au@Ag nanoparçacıklar 0.1 M hazırlanan nitrik asit çözeltisinde kimyasal olarak çözülmüştür. Metalik durumda bulunan gümüş Ag^+ 'e yükseltgenmiştir. Çözeltide bulunan Ag^+ , biriktirme kuyucuğuna alınarak -0.35 V'da 600 s biriktirilmiştir.

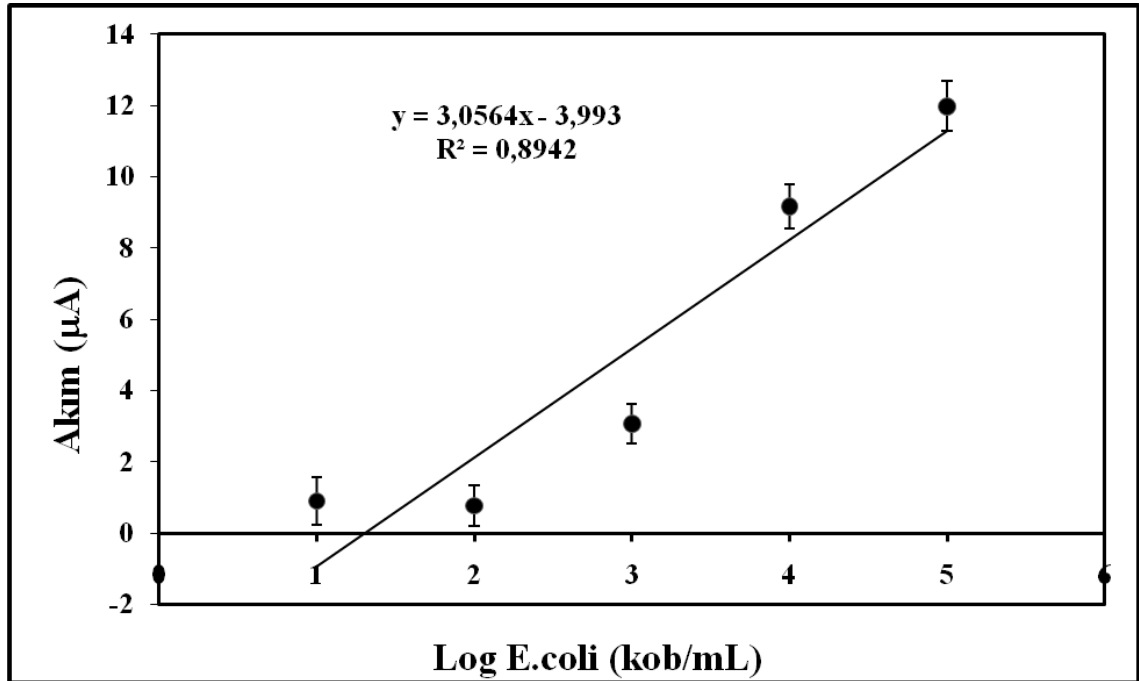
Biriktirme işleminden sonra elektrot çözeltiden alınarak sıyırma kuyucuğuna alınmıştır. Elektrot yüzeyine biriken gümüş 0.1 M HNO_3 içerisinde -0.1 ile 0.3 V arasında sıyırılmıştır. Şekil 4.29'da çözelti içerisinde bulunan Ag^+ 'in sıyırma potansiyeline karşı sıyırma akımı görülmektedir. Voltamogramda 10^5 ve 10^1 kob/mL dilüsyon aralığında kullanılan *E. coli* ile değişen Ag^+ 'in sıyırma akımındaki değişim görülmektedir. Bu voltamogramdan immünoessey protokolünün hazırlanması sırasında kullanılan *E. coli* sayısının artmasıyla gümüşün sıyırma akımında da bir artış olmaktadır.



Şekil 4.29 10^5 ve 10^1 kob/ mL dilüsyon aralığında kullanılan *E. coli* ile değişen Ag^+ 'in sıyırma voltamogramı

10^5 ile 10^1 kob/mL arasında *E. coli* içeren dilüsyonlar kullanılarak yapılan deneyler sonucunda gümüşün sıyırma akımına karşı *E. coli* sayısının logaritması grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.30'de çizilen kalibrasyon grafiğinde *E. coli* sayısının logaritmasına karşı gümüşün sıyırma akımı değerleri gösterilmiştir. Bu grafik incelendiğinde, *E. coli* sayısının logaritması ile sıyırma akımının arasında iyi bir doğrusal ilişki gözlenmemektedir. Geliştirilen yöntemin kalibrasyon grafiği çizildiğinde elde edilen doğrunun eşitliği aşağıda verilmiştir. Grafiğe ait korelasyon katsayısı (R^2) 0,8942 bulunmuştur.

$$I_p(\mu A) = 3.0564 \log E. coli \text{ (kob/mL)} - 3.993 (\mu A)$$



Şekil 4.30 *E. coli*'nin Ag^{+} 'nin sıyırma akımına karşı çizilen kalibrasyon grafiği

4.4.3.3 Au@Ag ve Ag@Au bimetalik nanoparçacıklarla hazırlanan elektrokimyasal biyosensörlerin karşılaştırılması

E. coli'nin elektrokimyasal yöntemle tayini için hazırlanan protokollerden etiket olarak Ag@Au bimetalik nanoparçacıkların kullanıldığı protokolün, Au@Ag bimetalik nanoparçacıkların kullanıldığı protokolden daha uygun ve tekrarlanabilir olduğu gözlenmiştir. Bu durumun çeşitli nedenleri olabilir. Bunlar:

Kolay hazırlanabilmeleri ve yüksek homojenliğinin yanı sıra altın nanoparçacıklar biyolojik moleküllere karşı (antijen, antikor veya DNA, RNA gibi) çok iyi bir biyoyumluluk göstermektedir. Bu sebeple kabuk kısmı altın olan Ag@Au bimetalik nanoparçacıklar immünoessey çalışmalarında rahatlıkla kullanılabilirler. Kabuğun altın olduğu durumlarda antikorların bağlanmasının hızlı olması ve bunun yanı sıra hazırlanan protokolün uzun süre boyunca kalıcı olması bu tür nanoparçacıkların tercih edilmesine neden olmaktadır. Au@Ag çekirdek-kabuk nanoparçacıklar da gen analizlerinde ve antikor-antijen tayininde kullanılmaktadır fakat gümüşün biyoyumlu bir malzeme olmadığı bilinmektedir. Bunun yanı sıra Au@Ag çekirdek-kabuk bimetalik nanoparçacıkların uygulamaları henüz iyi bir biçimde açıklanamamıştır ancak genel olarak biyokonjuge gümüş yüzeylerin, biyokonjuge altın yüzeylere göre daha az kararlı oldukları literatürde yer almaktadır. Bu sebepten ötürü monometalik gümüş veya kabuğun gümüş olduğu çalışmalarda biyolojik molekül kararlı bir şekilde bağlayabilmek için birden fazla tiyol molekülü içeren ara bağlayıcılar kullanılmaktadır (Lim vd. 2008). Çalışmada altının kabuk olarak kullanıldığı bimetalik nanoparçacıktan elde edilen sonuçların verimli olmasının altın kabuk ile etkileşimin daha sağlam olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Elektrokimyasal biyosensör çalışmalarında Au@Ag bimetalik nanoparçacıklar istenilen sonucu vermemesine rağmen yüzey güçlendirilmiş raman spektroskopisinin kullanıldığı biyosensör çalışmasında bu nanoparçacıklar kullanılabilir. Altın yüzeyler görünür bölgede Ag'den daha düşük bir güçlendirme etkisi göstermektedir. Yapılan çalışmalarda altın nanoparçacık üzerine biriktirilen gümüşün monometalik altından daha yüksek sinyal verdiği gösterilmiştir. Bu çalışmada da YGRS çalışmalarında Au@Ag bimetalik

nanoparçacıkların Ag@Au bimetalik nanoparçacıkların kullanıldığı protokole göre daha yüksek sinyal verdiği görülmüştür.

Ayrıca gümüş nanoparçacıkların, diğer tuzları ile kıyaslandığında etkili bir antimikrobiyal etki gösterdiği bilinmektedir. Oldukça büyük yüzey alanlarından ötürü mikroorganizmalar ile daha iyi temas etmektedirler. Nanoparçacıklar hücre duvarına tutanarak bakterinin içine girerler. Bakteri duvarı, sülfür içeren proteinleri ve DNA gibi fosfor içeren bileşikler içerir ve gümüş nanoparçacıklar hücredeki bu proteinler ile etkileşirler. Gümüş nanoparçacık bakteri hücrelerine girdiğinde gümüş iyonlarından DNA'yı korumak için bakterinin merkezinde, bakterinin kümelenmesini sağlayan düşük molekül ağırlıklı bir bölge oluşturur. Nanoparçacıklar öncelikli olarak solunum zincirine, hücre bölünmesine atak yapar ve son olarak hücrenin ölümüne sebep olur. Nanoparçacıklar bakteri hücreleri içerisine gümüş iyonları salarak bakterisidal etkiyi arttırırlar (Li vd. 2009). Bu sebepten ötürü çalışmada kullanılan Au@Ag bimetalik nanoparçacıkların kullanılan biyosensörde tayin edilen *E. coli* miktarının ölü bakterileri de içerdiği düşünülmektedir.

Sentezlenen Au@Ag bimetalik nanoparçacıkların boyutlarının büyüklüğü ve şekli, *E. coli* ile etkileşimini hem bağlanma derecesi hem de antibakteriyel özellik nedeniyle değiştirmiş olabileceği düşünülmektedir.

Elde edilen veriler ışığında Au@Ag NP işaretli immünoessey protokolünde sonuçların tekrarlanabilirliğinin Ag@Au NP immünoessey protokolüne göre iyi olmadığı söylenebilir. Bu aşamada gelinen sonuçlar *E. coli* tayini için Au@Ag bimetalik nanoparçacıklarla oluşturulan immünoesseyde elektrokimyasal yöntem yerine SERS yönteminin kullanılmasına daha elverişli olduğu görülmüştür.

4.4.4 Su örneklerinde *E. coli* tayini

Geliştirilen elektrokimyasal yöntemde Ag@Au ve Au@Ag olmak üzere iki farklı bimetalik nanoparçacık kullanılmıştır. Bu nanoparçacıklarla elde edilen kalibrasyon

grafikleri karşılaştırıldığında, kalibrasyon grafiği daha iyi olan Ag@Au bimetalik nanoparçacıklarla hazırlanan immünoessey protokolünün gerçek numune analizlerinde kullanılmasına karar verilmiştir.

Geliştirilen elektrokimyasal analiz yönteminin gerçek su örneklerinde uygulanabilirliğini tespit etmek için musluk suyundan örnekler alınmıştır. Alınan örneklerde *E. coli* tayini yapılmış ve elde edilen sonuçlar kültürel sayım yöntemi ile karşılaştırılarak çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Ankara Üniversitesi Kimya Bölümü’ndeki musluk suyundan alınan örneklerde hem kültürel sayım sonucunda hem de geliştirilen elektrokimyasal analiz sonucunda *E. coli* tespit edilememiştir. *E. coli* inoküle edilen musluk suyunda ise kültürel sayım yöntemi ile 25 kob/mL, geliştirilen elektrokimyasal yöntemle ise 33 kob/mL bulunmuştur. Her iki yöntemin sonuçları karşılaştırıldığında sonuçların birbirine yakın olması geliştirilen elektrokimyasal yöntemin gerçek su örneklerinde uygulanabileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.1 Su örneklerinde geliştirilen elektrokimyasal analiz yöntemi ve kültürel sayım yöntemiyle elde edilen sonuçlar

Su örnekleri	Kültürel Sayım yöntemi	Geliştirilen elektrokimyasal analiz yöntemi
Ankara Üniversitesi, Kimya Bölümü musluk suyu	0	0
Ankara Üniversitesi, Kimya Bölümü musluk suyu (<i>E. coli</i> inoküle edilen)	25	33

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında,

Ag@Au ve Au@Ag bitemalik nanoparçacıklar sentezlenerek UV-Vis spektroskopisi ve TEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlardan Ag@Au bitemalik nanoparçacıkların boyutu yaklaşık olarak 12 nm, Au@Ag bitemalik nanoparçacıkların boyutu 60-70 nm arasında değişmektedir.

Nanoparçacık etiketli antikorların hazırlanmasında kendiliğinden düzenlenme tekniğinden daha sonraki basamakta avidin-biyotin etkileşiminden yararlanılmıştır. Au@Ag ve Ag@Au bitemalik nanoparçacık işaretli antikorların *E. coli* ile etkileşimleri TEM görüntüleri ile incelenmiş ve bakteri-nanoparçacık etkileşimi bu görüntülerle kanıtlanmıştır.

İmmüoessey protokolünün spektroskopik karakterizasyonu XPS, YGRS ve ATR-FTIR kullanılarak yapılmış, bu analizlerden elde edilen sonuçlardan protokolün doğru bir şekilde oluşturulduğu anlaşılmıştır.

Hazırlanan immüoessey protokolünün elektrokimyasal biyosensörlerde kullanılması için kullanılan bitemalik nanoparçacıkların çözünme ortamları ve elektrokimyasal çalışma parametreleri belirlenmiştir.

Elektrokimyasal deneylerde CV, CA ve kare dalga sıyırma voltametrisinden yararlanılmıştır. Elde edilen sonuçlardan çalışma elektrodu olarak kullanılan kalem elektrodun altın ve gümüşün tayini için uygun elektrot olduğunu göstermiştir.

İmmüoessey yapısında kullanılan bitemalik nanoparçacıklardan Ag@Au'den elde edilen sonuçların daha verimli olmasından dolayı su numunelerinde *E. coli* için bu nanoparçacık kullanılmıştır.

KAYNAKLAR

- Adams, M.R. and Moss, M.O. 1999. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, 398, Cambridge.
- Ahirwal, G.K. and Mitra, C.K. 2010. Gold nanoparticles based sandwich electrochemical immunosensor. Biosensors and Bioelectronics, Vol. 25; pp. 2016–2020.
- Aladağ, N., Trnkova, L., Kourilov, A., Özsöz, M. and Jelen, F. 2010. Voltammetric Study of Aminopurines on Pencil Graphite Electrode in the Presence of Copper Ions. Electroanalysis, Vol. 22(15); pp. 1675 – 1681.
- Albrecht, M.G. and Creighton J.A. 1977. Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. J. Am. Chem. Soc., Vol. 99; pp. 5215-5217.
- Arancibia, V., Alarcon, L. and Sefura, R. 2004. Supercritical fluid extraction of cadmium as Cd-oxime complex from human hair; determination of square-wave anodic or adsorptive stripping voltammetry. Anal. Chim. Acta, Vol. 502; pp. 189-194.
- Bard, A.J. and Faulkner, L.R. 2001. Electrochemical Methods Fundamentals and Applications. John Wiley & Sons, Inc., 833, New York.
- Cai, H., Xu, Y., Zhu, N., He, P. and Fang Y. 2002. An electrochemical DNA hybridization detection assay based on a silver nanoparticle label. Analyst, Vol. 127; pp. 803–808.
- Cai, H., Wang, Y., He, P. and Fang Y. 2002. Electrochemical detection of DNA hybridization based on silver-enhanced gold nanoparticle label. Analytica Chimica Acta, Vol. 469; pp. 165–172.
- Chapelle, F.H. 2001. Ground-Water Microbiology and Geochemistry. John Wiley and Sons, 477, New York.
- Chen, Z-P., Peng, Z-F., Zhang, P., Jin, X-F., Jiang, J-H., Zhang, X-B., Shen, G-L. and Yu, R-Q. 2007. A sensitive immunosensor using colloidal gold as electrochemical label. Talanta, Vol. 72; pp. 1800–1804.
- Conroy, P. J., Hearty, S., Leonard, P. and O’Kennedy, R. J. 2009. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. Seminars in Cell & Developmental Biology, Vol. 20; pp. 10–26.
- Cumpson, P.J. 2000. The Thickogram: a method for easy film thickness measurement in XPS. Surf. Interface Anal., Vol. 29; pp. 403–406.
- Çakır, İ. 2000. Bölüm 1: Koliform Bakteriler ve *E. coli*, Gıda Mikrobiyolojisi ve

Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını, Sim Matbaası, Ankara.

- Demetriades, D., Economou, A. and Voulgaropoulos, A. 2004. A study of pencil-lead bismuth-film electrodes for the determination of trace metals by anodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 519; pp. 167–172.
- Dequaire, M., Degrand, C. and Limoges, B. 2000. An Electrochemical Metalloimmunoassay Based on a Colloidal Gold Label. *Anal. Chem.*, Vol. 72; pp. 5521-5528.
- Dufrene, Y.F., A Van Der Wal, Norde, W., and Rouxhet, P.G. 1997. X-ray photoelectron spectroscopy analysis of whole cells and isolated cell walls of gram-positive bacteria: comparison with biochemical analysis. *Journal of Bacteriology*, Vol. 179 (4); pp. 1023-1028.
- Feldmann, C. and Goesmann, H. 2010. Nanoparticulate Functional Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.*, Vol. 49; pp. 1362–1395.
- Graf, N., Gross, T., Wirth, T., Weigel, W. and Unger, W E.S. 2009. Applications of XPS and ToF-SIMS for surface chemical analysis of DNA microarrays and their substrates. *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol. 393; pp. 1907-1912.
- Guo, S. and Dong, S. 2009. Biomolecule-nanoparticle hybrids for electrochemical biosensors. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 28(1); pp. 96-109.
- Güven, B., Basaran-Akgul, N., Temur, E., Tamer, U. and Boyacı, İ.H. 2011, SERS-based sandwich immunoassay using antibody coated magnetic nanoparticles for *Escherichia coli* enumeration. *Analyst*, Vol. 136; pp. 740–748.
- Güzel, R., Üstündağ, Z., Ekşi, H., Keskin, S., Taner, B., Durgun, Z.G., İşbir Turan, A. A. and Solak, A.O. 2010. Effect of Au and Au@Ag core-shell nanoparticles on the SERS of bridging organic molecules. *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 351; pp. 35–42.
- Hamal, B. D., Haggstrom, J. A., Marchin, G., Ikenberry, M. A., Hohn, K. and Klabunde, K.J. 2010. A Multifunctional Biocide/Sporocide and Photocatalyst Based on Titanium Dioxide (TiO₂) Codoped with Silver, Carbon, and Sulfur. *Langmuir*, Vol. 26(4); pp. 2805–2810.
- Harada, M., Asakura, K. and Toshima, N. 1993. Catalytic activity and structural analysis of polymer-protected gold/palladium bimetallic clusters prepared by the successive reduction of hydrogen tetrachloroaurate(III) and palladium dichloride. *J. Phys. Chem.*, Vol. 97 (19); pp. 5103-5114.

- Jianrong, C., Yuqing, M., Nongyue, H. and Xiaohua, W. 2004. Nanotechnology and biosensors. *Biotechnology Advances*, Vol. 22; pp. 505–518.
- Ji, X. , Xu, S., Wang, L., Liu, M., Pan, K., Yuan, H., Ma, L., Xu, W., Li, J., Bai, Y. and Li, T. 2005. Immunoassay using the probe-labeled Au/Ag core-shell nanoparticles based on surface-enhanced Raman scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, Vol. 257–258; pp. 171–175.
- Johansson, A. and Strafstrom, S. 2000. Interactions between molecular wires and a gold surface. *Chem. Phys. Lett.*, Vol. 322; pp. 301.
- Kara, P., Erdem, A., Girousi, S. and Özsöz, M. 2005. Electrochemical detection of enzyme labeled DNA based on disposable pencil graphite electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 38; pp. 191–195.
- Karadeniz, H., Erdem, A., Caliskan, A., Pereira, C.M., Pereira, E.M. and Ribeiro, J.A. 2007. Electrochemical sensing of silver tags labelled DNA immobilized onto disposable graphite electrodes. *Electrochemistry Communications*, Vol. 9; pp. 2167–2173.
- Kim, Y-S., Cho, J-H., Ansari, S. G., Kim, H-II, Dar, M. A., Seo, H-K., Kim, G-S., Lee, D-S., Khang, G. and Shin, H-S. 2006. Immobilization of avidin on the functionalized carbon nanotubes. *Synthetic Metals*, Vol. 156; pp. 938-943.
- Kundu, S. and Liang H. 2011. Photo-induced formation of size-selective Ag nanoparticles and their interactions with *Escherichia coli*. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Vol. 222; pp. 25– 33.
- Li, D., He, Q., Cui, Y., Duan, L. and Li, J. 2007. Immobilization of glucose oxidase onto gold nanoparticles with enhanced thermostability. *BBRC*, Vol. 355; pp. 488-493.
- Lim, D.-K., Kim, I.-J. and Nam, J.-M. 2008. DNA-embedded Au/Ag core-shell nanoparticles. *Chem. Commun.*, pp. 5312–5314.
- Lo, Y-S., Huefner, N.D., Chan, W.S., Stevens, F., Harris, J.M. and Beebe T.P., Jr. 1999. Specific Interactions between Biotin and Avidin Studied by Atomic Force Microscopy Using the Poisson Statistical Analysis Method. *Langmuir*, Vol. 15; pp. 1373-1382.
- Luppa, P.B. 2001. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, Vol. 314; pp. 1–26.
- Ly, S.Y., Jung, Y.S., Kim, M.H., Han, I.K., Jung, W.W. and Kim, H.S. 2004. Determination of Caffeine Using a Simple Graphite Pencil Electrode with Square-Wave Anodic Stripping Voltammetry. *Microchim. Acta*, Vol. 146; pp. 207–213.

- Manivannan, S. and Ramaraj, R. 2009. Core-shell Au/Ag nanoparticles embedded in silicate sol-gel network for sensor application towards hydrogen peroxide. *J. Chem. Sci.*, Vol. 121(5); pp. 735–743
- Manocha, L.M. 2006. *Composites with Nanomaterials*, Ed: Kurt E, Geckeler ER, American Scientific Publishers, California.
- Martin, J.E. 2001. *Composite Films for Modifying Evanescent Wave Characteristics in Long-Period Grating (Master's Thesis)*, Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
- Mihai, B.S.E, Chunming, N. and Erik, C.S., 2007. US20070122101A1.
- Miner, R.S., Namba, S. and Turkevich, J. 1981. In *Proceedings of the 7th International Congress on Catalysis*, Seiyama, T. and Tanabe, K., Kodansha (eds.), p. 160, Tokyo.
- Nakamura, N., Shigematsu, A. and Matsunaga, T., 1991. Electrochemical detection of viable bacteria in urine and antibiotic selection. *Biosensors Bioelectron.*, Vol. 6(7); pp. 575– 80.
- Pande, S., Ghosh, S. K., Praharaj, S., Panigrahi, S., Basu, S., Jana, S., Pal, A., Tsukuda, T. and Pal, T. 2007. Synthesis of Normal and Inverted Gold-Silver Core-Shell Architectures in β -Cyclodextrin and Their Applications in SERS. *J. Phys. Chem. C*, Vol. 111; pp. 10806-10813.
- Pandey, P., Singh, S.P., Arya, S.K., Gupta, V., Data, M., Singh, S. and Malhotra, B.D. 2007. Application of Thiolated Gold Nanoparticles for the Enhancement of Glucose Oxidase Activity. *Langmuir*, Vol. 23; pp. 3333-3337.
- Polsky, R., Harper, J.C., Wheeler, D.R., Dirk, S.M., Arango, D.C. and Brozik, S.M. 2008. Electrically addressable diazonium-functionalized antibodies for multianalyte electrochemical sensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 23; pp. 757–764.
- Peeters, J.E., Charlier, G.J. and Raeymaekers, R. 1985. Scanning and Transmission Electron Microscopy of Attaching Effacing *Escherichia coli* in Weanling Rabbits. *Vet. Pathol.*, Vol. 22; 54-59.
- Poortinga, A.T., Bos, R., Norde, W. and Busscher, H. J. 2002. Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. *Surface Science Reports*, Vol. 47; pp. 1-32.
- Pournaghi-Azar, M.H., Hejazi, M.S. and Alipour, E. 2006. Developing an electrochemical deoxyribonucleic acid (DNA) biosensor on the basis of

- human interleukine-2 gene using an electroactive label. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 570; pp. 144–150.
- Rai, M., Yadav, A. and Gade, A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, Vol. 27; pp.76–83.
- Rodriguez-Gonzalez, B., Burrows, A., Watanabe, M., Kiely, C. J. and Marzan, L.M. L. 2005. Multishell bimetallic AuAg nanoparticles: synthesis, structure and optical Properties. *J. Mater. Chem.*, Vol. 15; pp.1755–1759.
- Ruiz-Taylor, L.A., Martin, T.L., Zaugg, F.G., Witte, K., Indermuhle, P., Nock, S. and Wagner, P. 2001. Monolayers of derivatized poly(L-lysine) grafted poly(ethylene glycol) on metal oxides as a class of biomolecular interfaces. *PNAS*, Vol. 98(3); pp. 852-857.
- Schmid, G., Lehnert, A., Malm, J.-O. and Bovin, J.-O. 1991. Ligand-Stabilized Bimetallic Colloids Identified by HRTEM and EDX. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, Vol. 30; pp. 874-876.
- Shams, E., Barbei, A. and Soltaninezhad, M. 2004. Simultaneous determination of copper, zinc and lead by adsorptive stripping voltammetry in the presence of Morin. *Anal.Chim. Acta*, Vol. 501; pp. 119-124.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. and Nieman, T.A. 1998. Principles of Instrumental Analysis (Çeviri Editörleri: Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., Enstrümental Analiz İlkeleri) 1. baskı. Bilim Yayıncılık Ltd.Şti, Ankara.
- Sun, N., Mo, W-M. Shen, Z-L and Hu, B-X. 2005. Adsorptive stripping voltammetric technique for the rapid determination of Tobramycin on the hanging mercury electrode. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Vol. 38(2); pp. 256-262.
- Tang, H., Zhang, W., Geng, P., Wang, Q., Jin, L., Wu, Z. and Lou, M. 2006. A new amperometric method for rapid detection of *Escherichia coli* density using a self-assembled monolayer-based bienzyme biosensor. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 562; pp. 190–196.
- Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A and Wilson, G.S. 1999. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 71, 12; pp. 2333-2348.
- Thomas, V., Namdeo, M., Mohan, Y.M., Bajpai, S.K. and Bajpai, M. 2008. Review on Polymer Hydrogel and Microgel Metal Nanomposites: A Facile Nanotechnological Approach. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, Vol. 45; pp. 107–119.
- Turkevich, J. and Kim, G. 1970. Palladium: Preparation and Catalytic Properties of Particles of Uniform Size. *Science*, Vol. 169; pp. 873-879.

- Vestergaard, M., Kerman, K. and Tamiya, E. 2007. An Overview of Label-free Electrochemical Protein Sensors. *Sensors*, Vol. 7; pp. 3442-3458.
- Wang, J. 2000, *Analytical Electrochemistry*, John Wiley and Sons, New York.
- Wang, J., Liu, G., Polsky, R. and Merkoçi, A. 2002. Electrochemical stripping detection of DNA hybridization based on cadmium sulfide nanoparticle tags. *Electrochemistry Communications*, Vol. 4; pp. 722–726.
- Wang, J., Liu, G. and Merkoçi, A. 2003. Particle-based detection of DNA hybridization using electrochemical stripping measurements of an iron tracer. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 482; pp. 149–155.
- Wang, J., Kim, K.H., Kim, S., Kim, Y.S., Li, Q.X. and Jun, S. 2010. Simple quantitative analysis of *Escherichia coli* K-12 internalized in baby spinach using Fourier Transform Infrared spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 144; pp. 147–151.
- Wang, M., Sun, C., Wang, L., Ji, X., Bai, Y., Li, T. and Li, J. 2003. Electrochemical detection of DNA immobilized on gold colloid particles modified self-assembled monolayer electrode with silver nanoparticle label. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Vol. 33; pp. 1117-1125.
- Wang, Q. and Moriyama, H. 2009. [60]-Fullerene and Single-Walled Carbon Nanotube-Based Ultrathin Films Stepwise Grafted onto a Self-Assembled Monolayer on ITO. *Langmuir*, Vol. 25 (18); pp. 10834–10842.
- Wang, Z.L., Liu, Y. and Zhang, Z. 2003. *Material Systems and Applications*. Tsinghua University Press, 3.
- Yang, Q., Liang, Y., Zhou, T., Shi, G. and Jin, L. 2009. Electrochemical investigation of platinum-coated gold nanoporous film and its application for *Escherichia coli* rapid measurement. *Electrochem. Comm.*, Vol. 11; pp. 893-896.
- Yang, Y., Shi, J., Kawamura, G. and Nogami, M. 2008. Preparation of Au–Ag, Ag–Au core–shell bimetallic nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering. *Scripta Materialia*, Vol. 58; pp. 862–865.
- Yazgan, N. N., Boyacı, İ. H., Temur, E., Tamer U. and Topçu, A. 2010. A high sensitive assay platform based on surface enhanced Raman scattering for quantification of protease activity. *Talanta*, Vol. 82; pp. 631-639.
- Zheng, J., Li, X., Gu, R. and Lu, T. 2002. Comparison of the surface properties of the assembled silver nanoparticle electrode and roughened silver electrode, *J. Phys. Chem B*, Vol. 106; pp. 1019.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Haslet EKŞİ

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 18.10.1980

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Özel Arı Lisesi (1997)

Lisans : Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü
(2003)

Yüksek Lisans : Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü
(2006)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Yayımları (SCI ve diğer)

Erdal Dinç, Dumitru Baleanu, Ali Osman Solak, **H. Eksî**, Remziye Güzel, A New Approach to the Characterization of the Nano-Surface Structure by Using Factor Analysis , *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation, In Press.*

R.R. Nigmatullin, I.I. Popov, D. Baleanu, E.Dinç, A.O. Solak, **H. Eksî**, R. Güzel, Application of the linear principle for the strongly-correlated variables: Calculations of differences between spectra, *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation*, 16(2011) 4028-4036.2.

A.A. İ.-Turan, Z. Üstündağ, **H. Eksî**, R. Güzel, A.O. Solak, Spectroscopic and Electrochemical Characterization of Benzoylglycine Modified Glassy Carbon

Electrode: Electrocatalytic Effect towards Dioxygen Reduction in Aqueous Media, *Spectroscopy Letters*, 44 (2011) 158-167.

J. A. Tenreiro Machado, Dumitru Baleanu, Erdal Dinç, Ali Osman Solak, **H. Eksi**, Remziye Güzel, Characterization Approach to Modified Glassy Carbon Electrode Nanofilm System Within Multidimensional Scaling, *J. Comput. Theor. Nanosci.*, 8, 2011, 268-273

A.A. İ.-Turan, E. Kılıç, Z. Üstündağ, **H. Eksi**, A.O. Solak, B. Zorer, Syntheses and modifications of bisdiazonium salts of 3,8-benzo[c]cinnoline and 3,8-benzo[c]cinnoline 5-oxide onto glassy carbon electrode, and the characterization of the modified surfaces, *J Solid State Electrochem*, DOI: 10.1007/s10008-011-1319-6

B. Taner, E. Özcan, Z. Üstündağ, S. Keskin, A.O. Solak, **H. Eksi**, Fabrication of calix[4]pyrrole nanofilms at the glassy carbon surface and their characterization by spectroscopic, optic and electrochemical methods, *Thin Solid Films*, 519 (2010) 289–295

R. Güzel, Z. Üstündağ, **H. Eksi**, S. Keskin, B. Taner, Z.G. Durgun, A.A. I.-Turan, A.O. Solak, Effect of Au and Au@Ag core-shell nanoparticles on the SERS of bridging organic molecules, *Journal of Colloid and Interface Science*, 351 (2010) 35-42

R.R. Nigmatulin, A.P. Alekhin, D. Baleanu, E. Dinç, Z. Üstündağ, **H. Eksi**, A.O. Solak, Analysis of the effect of potential cycles on the reflective IR signals of nitro groups in nanofilms: Application of the fractional moments statistics, *Electroanalysis*, 22 (2010) 419-426

Mehlika Pulat, **H. Eksi**, Ufuk Abbasoglu, “Fluconazole release from hydrogels including acrylamide-acrylic acid-itaconic acid, and their microbiological interactions”, *J.Biomater.Sci.Polymer Edn*, 2008, 19(2):193–205

H. Eksi, Mehlika Pulat, “Determination of swelling behavior and morphological properties of poly (acrylamide-co-itaconic acid) and poly (acrylic acid-co-itaconic acid) copolymeric hydrogels”, *Journal of Applied Polymer Science*, 2006, 102(6) : 5994-5999