

# **ENZİMATİK TABANLI BAKTERİYEL BİYOSENSÖR**

## **ENZYME BASED BACTERIAL BIOSENSOR**

**Miray İzgen CANVER**

**Prof. Dr. Necdet SAĞLAM**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.


2018

**Miray İzgen Canver'in hazırladığı "Enzimatik Tabanlı Bakteriyel  
Biyosensör" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından BİYOMÜHENDİSLİK  
ANABİLİM DALI' nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.**

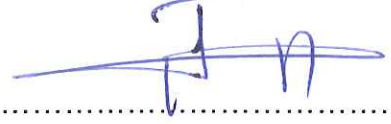
Prof. Dr. İbrahim Vargel  
Başkan



Prof. Dr. Necdet Sağlam  
Danışman



Prof. Dr. Uğur Tamer  
Üye



Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı  
Üye



Yrd. Doç. Dr. Mesut Şam  
Üye



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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun 31.01.2021 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

31. / 01. / 2018

  
(İmza)

Miray İzgen Canver

## ETİK

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

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

beyan ederim.

31 / 01 / 2018

MİRAY İZGEN CANVER

## Özet

# ENZİMATİK TABANLI BAKTERİYAL BİYOSENSÖR

**Miray İzgen CANVER**

**Yüksek Lisans, Biyomühendislik Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM**

**Ocak 2018**

Bu tezin amacı kolorimetrik bakteri tayini yapmaktır. Kolorimetrik biyosensör oluşturmak, daha kesin veriler elde etmeye olanak sağlar. Biyosensörler düşük maliyet, kısa analiz süresi, yüksek seçicilik ve kolaylık açısından geleneksel yöntemlere kıyasla daha avantajlıdır.

Analit olarak  $\beta$ -galaktosidaz ( $\beta$ -gal) seçilmiştir. Bu enzim, laktoz fermantasyonu yapan bakterilerde bulunur ve önemli bir fekal bakteri indikatörüdür. Bakteriler karbon kaynağı olarak glikoz kullanırlar. Fakat glikozun bulunmadığı ortamlarda bakteri karbon kaynağı olarak laktozu kullanır. Bakterinin laktozu metabolize etmesi için  $\beta$ -gal enzimine ihtiyacı vardır.  $\beta$ -gal enziminin varlığının saptanabilmesi ve kolorimetrik bir okuma yapılabilmesi için kromojenik substrat kullanılmıştır. Laktozun yapısına benzerliği yüzünden substrat olarak O-Nitrofenol- $\beta$ -D-galaktopironozid (ONPG) kullanılmıştır. ONPG renksiz olup, ONPG'nin  $\beta$ -gal ile hidrolizi sonucunda galaktoz ve 2-nitrofenol açığa çıkmaktadır. 2-nitrofenol sarı renkli olup  $\beta$ -gal'ın varlığının ve aktivitesinin görsel kanıtı olmaktadır.

Kolorimetrik okumanın yanında verilerimiz SERS ölçümleri ile desteklenmiştir. SERS ölçümleri sırasında 2-nitrofenol hedef molekül olarak seçilmiş ve 2-

nitrofenol sinyalleri saptanmıştır. 2-nitrofenol,  $1380\text{ cm}^{-1}$ 'de karakteristik Raman sinyaline sahiptir. Bu sinyal kullanılarak kalibrasyon grafiği ( $R^2 = 0,9103$ ) oluşturulmuştur.

Üretilen sistem gerçek örneklere uygulanmıştır. Gerçek örnek olarak peynir seçilmiş ve peynir örneğine *E. coli* eklenmiştir. Toplam analiz süresi 2 saatten az sürmektedir. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda geliştirilen yöntemin düşük *E. coli* konsantrasyonunu tespit edilebildiği gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kolorimetrik, Biyosensör, Bakteri Tayini

## **Abstract**

### **ENZYME BASED BACTERIAL BIOSENSOR**

**Miray İzgen CANVER**

**Master of Science, Department of Bioengineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM**

**January 2018**

The objective of the project is to provide colorimetric bacteria detection. Creating colorimetric biosensors gives us an opportunity to get more precise data. Biosensors have advantages over traditional ones such as low cost, short time of analysis, high selectivity and simplicity.

Our analyte was chosen as  $\beta$ -gal. This enzyme is present in lactose fermented bacteria and it is a great fecal bacteria indicator. Bacteria use glucose as their carbon sources but in some cases, like in environments where glucose is not found, bacteria use lactose. In order to metabolize lactose bacteria needs  $\beta$ -gal enzyme. To detect  $\beta$ -gal presence and to create colorimetric change a chromogenic substrate was used. O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) was used as a substrate due to structural similarities with lactose. ONPG is colorless. Hydrolysis of ONPG with  $\beta$ -gal causes to produce galactose and 2-Nitrophenol. 2-nitrophenol is the compound which is yellow and provides visual evidence of  $\beta$ -gal presence and activity.

Besides colorimetric reading, our data is supported with SERS. During SERS 2-nitrophenol is chosen as the target molecule and 2-Nitrophenol signals are

detected. 2-Nitrophenol has characteristic Raman signal at the wavelength 1380  $\text{cm}^{-1}$ . Calibration graph ( $R^2 = 0,9103$ ) is drawn focusing on that point.

The system produced was applied to real samples. Cheese was chosen as a real sample and *E. coli* was spiked with cheese. Total time of analysis completed less than 2 hours. The results that were obtained from both spiked and not-spiked samples show promising results where the developed biosensor can detect even the lowest concentrations of *E. coli*.

**Key Words:** Colorimetric, Biosensor, Detection of Bacteria



## TEŞEKKÜR

Tezimin ortaya çıkması için bana fırsat sunan, çalışmalarımnda bana yol gösteren, en önemlisi bana her zaman güvenen ve beni destekleyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Necdet SAĞLAM'a;

Bana laboratuvarını açan, tez çalışmalarımın planlanmasında, yürütülmesinde ve sonuçlanmasında bana yardım eden, bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan sayın hocam Prof. Dr. Uğur TAMER'e;

Tez çalışmalarım için gereksinim duyduğum bakteri kültürlerini bana temin eden sayın Prof. Dr. Demet Çetin'e;

Deneysel çalışmalarımnda beni yalnız bırakmayan ve benden yardımını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Hasan İLHAN'a, tez yazım sürecimde karşılaştığım sorunları çözmemde bana destek olan Sayın Arş. Gör. Hilal TORUL'a;

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nin değerli akademisyenlerinden Sayın Arş. Gör. Esin Nagihan KASAP, Arş. Gör. Üzeyir DOĞAN ve Arş. Gör. Merve ERYILMAZ'a;

Akademik hayatta başarılı olabileceğime inanan ve lisans döneminde kazandığım değerli arkadaşlarım Berfin SEYRAN'a ve Tuba DEMİR'e, çalışmalarımnda yardımına ihtiyaç duyduğum her zaman yanımda olan arkadaşım Şükran ALPDEMİR'e, yüksek lisans eğitimim sırasında tanıştığım ve hayatımda önemli bir yer edinen arkadaşım Merve GİZER'e, çok uzaklarda olmasına rağmen bana yardım eli uzatmış mektup arkadaşım Chrischi'ye, yine uzak mesafelerde olmasına rağmen manevi desteğini eksik etmeyen ve yüksek lisansta kazandığım değerli arkadaşım Vahid NASIRIMAREKANI'ye, hiçbir zaman sağladığı desteği tam olarak anlayamadığı ama her dar anımda yanımda olan ve kısa sürede kardeşim oldu diyebileceğim Saliha Nur TANIŞ'a;

Proje ve burs desteği için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna;

Aldığım her kararda beni desteklemekten vazgeçmeyen, varlıklarıyla beni her zaman güçlü hissettiren, sahip olduğuma her zaman şükredeceğim sevgili anneme, babama ve ablama en içten teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ŞEKİLLER .....	viii
ÇİZELGELER .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Bakteri .....	3
2.1.1. Hücre Duvarları.....	4
2.1.2. Sitoplazmik Zar .....	4
2.1.3. <i>Escherichia coli</i> .....	6
2.1.4. Bakteri Tayin Yöntemleri .....	8
2.1.4.1. Kültür ile Tayin .....	8
2.1.4.2. Membran Filtrasyon Yöntemi .....	8
2.1.4.3. Mikroskopik Sayımlar .....	8
2.1.4.4. İmmunolojik Yöntem .....	9
2.1.4.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Tayin .....	9
2.1.4.6. Biyosensörler .....	9
2.2. Beta – Galaktosidaz .....	11
2.3. <i>ortho</i> -Nitrofenil- $\beta$ -galaktozid (ONPG) .....	14

2.4. Raman Spektroskopisi .....	15
2.4.1. Raman'ın Temeli .....	15
2.4.2. Raman Sinyal Şiddetini Arttırma Yolları .....	16
2.4.3. Yüzeyi Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi .....	17
2.5. Kolorimetri .....	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	21
3.1. Kimyasal Maddeler .....	21
3.2. Çözeltiler .....	21
3.3. Kullanılan Mikroorganizmalar .....	21
3.4. Cihazlar ve Gereçler .....	22
3.5. Yöntem .....	23
3.5.1. Optimizasyon Deneyleri .....	24
3.5.1.1. ONPG Optimizasyonu .....	24
3.5.1.2. Çözücü Optimizasyonu .....	24
3.5.2. SERS .....	24
3.5.3. Kolorimetrik .....	25
3.5.4. Gerçek Örnek Denemesi .....	25
4. Bulgular .....	27
4.1. Optimizasyon Çalışmaları .....	27
4.1.1. Deneysel Maddelerin Optimizasyonu .....	27
4.1.1.1. ONPG Optimizasyonu .....	27
4.1.1.2. Çözücü Optimizasyonu.....	28
4.2. SERS Sonuçları .....	30
4.3. Kolorimetrik Bulgular.....	32

4.4. Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması .....	34
4.5. Validasyon Deneyleri .....	37
5. Sonuç ve Tartışma .....	38
6. Kaynaklar .....	40
Özgeçmiş .....	49

## Şekiller

### Sayfa

Şekil 2.1. Bakterilerin özelliklerine göre sınıflandırılması .....	3
Şekil 2.2. Gram-pozitif (a) ve Gram-negatif (b) bakterilerinin şematik hücre duvarı çizimleri .....	5
Şekil 2.3. rRNA sıralanmasına göre oluşturulmuş filogenetik evrim ağacı. 3 temel domainden oluşan ağaç; bakteri, arkeleri ve ökaryotları göstermektedir. Her domainde birkaç organizma grubu gösterilmiştir.....	6
Şekil 2.4. <i>E. coli</i> 'nin bölünmesinin şematik diyagramı.....	7
Şekil 2.5. Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması.....	10
Şekil 2.6. $\beta$ -gal reaksiyonu.....	11
Şekil 2.7. $\beta$ -galaktosidaz, 4 alt biriminin birleşmiş halinin gösterimi.....	12
Şekil 2.8. B-galaksidozun hücre içindeki aktivitelerin şematik gösterimi. Bu enzim ile laktoz, galaktoz ve glikoza hidrolize edilir. Aynı zamanda allolaktoz oluşumu sağlanabilir. Laktozun varlığında allolaktoz sentezlenir ve böylelikle allolaktoz lac represöre bağlanır. Lac operonunun afinitesi azalır. Böylelikle lacZ geninin ürünü olan $\beta$ -galaktosidazın sentezi mümkün kılınır.....	12
Şekil 2.9. Laktozun <i>E. coli</i> kültürüne eklenmesi. Laktoz eklenmesi $\beta$ -gal'ın artışına neden olur. Enzim miktarındaki artış büyüyen kültürdeki hücrelerin sayısındaki artış ile paraleldir.....	13
Şekil 2.10. Lac operonunu içeren bir <i>E.coli</i> kromozomunun diyagramı.....	14
Şekil 2.11. ONPG'nin hidrolizi sonucu galaktoz ve ONP eldesi.....	14
Şekil 2.12. Raman saçılmasının mekanizması.....	16
Şekil 2.13. Yüzeyde güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi.....	17
Şekil 2.14. Basitleştirilmiş insan koni yanıt eğrileri.....	18
Şekil 2.15. CIE renk uzayı.....	20

Şekil 3.1. Raman Cihazı (solda) ve İTK (İnce Tabaka Kromatografi) plaka üzerinde SERS örnekleri (sağda).....	25
Şekil 3.2. Stomacher Cihazı (solda), ringer solüsyonu içerisinde homojenize edilmiş peynir (sağda).....	26
Şekil 4.1. Farklı derişimlerde (0,01 – 0.17 M), ONPG varlığında elde edilen SERS spektrumu .....	28
Şekil 4.2. Tolüen ve lizozime ait SERS spektrumları .....	29
Şekil 4.3. Lizozim ve tolüene ait renk değişimleri .....	30
Şekil 4.4. Farklı bakteri derişimlerinden elde edilmiş 2 – Nitrofenole ait SERS spektrumları .....	31
Şekil 4.5. Farklı bakteri konsantrasyon derişimlerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi .....	32
Şekil 4.6. $\beta$ -gal tarafından indüklenmiş renk değişimi .....	32
Şekil 4.7 Farklı dilüsyonlardaki <i>E. coli</i> 'lere ait $\Delta E^*$ değeri.....	32
Şekil 4.8. Peynir ekstraksiyonu sonucunda oluşan renk değişimi.....	35
Şekil 4.9. $10^3$ 'e ait PBS ve peynir örneklerine ait SERS karşılaştırması.....	35
Şekil 4.10. $10^5$ 'e ait PBS ve peynir örneklerine ait SERS karşılaştırması.....	36

## Çizelgeler

### Sayfa

Çizelge 2.1. Görülebilir ışık spektrumundaki renkler.....	19
Çizelge 4.1 Peynir ve PBS örneklerine ait $1380\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısında bulunan SERS şiddeti ve $\Delta E^*$ (toplam renk farkı) değerleri .....	37
Çizelge 4.2. Gerçek örneklerde elde edilmiş geri kazanım değerleri .....	37

## Simgeler ve Kısaltmalar

### Simgeler

°C	Celcius Derece
Gr	Gram
µm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
M	Molar
MPa	Megapaskal
mW	Milivat
Nm	Nanometre
rpm	Revolutions per Minute; Dakikada Devir Sayısı

### Kısaltmalar

2-NP	2-nitrofenol
β-gal	Beta - Galaktosidaz
CFA	Colonization Factor Antigen; Kolonizasyon Faktör Antijenleri
CIE	Internation Commision on Illumination; Uluslararası Aydınlanma Komisyonu
CRPG	Klorofenol Kırmızı β-D galaktopiranozid; Chlorophenol Red β-D-galactopyranoside
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay



EMS	En Muhtemel Sayı
IPTG	İzopropiltiogalaktozid
Kob	Koloni Oluşturan Birim – Colony Forming Unit (cfu)
NAG	N-asetilglukozamin
NAM	N-asetilmuramik asit
NIR	Near – Infared; Yakın Kızılötesi
ONP	<i>ortho</i> -nitrofenol
ONPG	<i>ortho</i> -Nitrofenil- $\beta$ -galaktozid
PBS	Phospat Buffered Saline; Fosfat Tamponu
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polimeraz Zincir Tepkimesi
RGB	Red - Green - Blue; Kırmızı - Yeşil - Mavi
rRNA	Ribozomal RNA
SERS	Surface Enhanced Raman Spectroscopy; Yüzeyi Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi
Spp	Species; Türler
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
UV	Ultraviyole

## 1. Giriş

Çoğu bakteri insanlara zararsız ya da hatta yararlı olabileceği halde bir kısmı patojeniktir. İnsanla simbiyotik bir ilişki içinde olan ve insan bağırsaklarında konaklayan pek çok bakteri de mevcuttur. Bulaşıcı ve hastalıklara sebep olan bakteri türlerinin yaklaşık sayısı 100'den az olarak tahmin edilmektedir.

Tıp, gıda güvenliği, toplumsal sağlık ve güvenlik açısından bakteriyel patojenlerin tespit edilmesi önem arz etmektedir. Bakteriyel enfeksiyonlar pek çok hastalık ve ölüme sebebiyet vermektedir. Dünya Sağlık Örgütü (The World Health Organization, WHO), 2004'te enfeksiyon ve parazit kaynaklı hastalıklardan kaynaklı ölümleri en yüksek ikinci ölüm nedeni olarak belirlemiştir [1, 2]. Bunu alt solunum yolu hastalıkları ve diyareik hastalıklar takip etmiştir. Antibiyotiklere erişim olduğu halde enfeksiyonların, patojenlerin yanlış tespiti veya tanılarının geç yapılması günümüzün en büyük sorunudur [1]. Bakteri enfeksiyonu tanısı yapılmasına rağmen bakteri tayinin hızlı yapılmaması ve dolayısıyla uygun antibiyotik kullanılmaması sonucu pek çok hasta sepsise maruz kalmakta ve bu durum ölümlerle sonuç bulmaktadır [3].

Bakterilerin patojenik olan suşları tetanoz, tifo, difteri, frengi ya da cüzzam gibi pek çok hastalığa sebep olmakta ve ölüme sebebiyet vermektedir. Kan dolaşıma bulaşmış bir bakteri hayati tehlike oluşmasına sebep olur. Hızlı patojen tayini en iyi ve uygun anti-enfektif tedavinin uygulanmasına yardımcı olacaktır. Kan dolaşımına bakteri karışmış bir hastanın kan örneklerinde ki bakteri oranı düşüktür ve bakterilerin tespit edilmesi zor olmaktadır. Bu yüzden klinikte hızlı bir tayin hayati önem taşımaktadır. Bu yüzden düşük konsantrasyondaki bakterilerin hızlı tayinin yapılması gerekmektedir.

En çok bilinen ve fekal bir bulaşma göstergesi olan *E. coli*'nin patojenik suşu mevcut olup, hem insanlar için hem de evcil hayvanları için öldürücüdür. İnsanlarda gastroenterit, idrar yolu enfeksiyonları ve neonatal menenjitte sebep olmaktadır. Ayrıca bazı nadir durumlarda hemolitik üremik sendrom oluşmasına da neden olur.

Endüstride üretim sonrası ürünün bakteri kontaminasyonuna maruz kalıp kalmadığı, özellikle gıda sektöründe, katı bir kontrol sürecine tabi tutulur. Çeşitli bakteri tayin metotları laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları;

kültüre ederek, immünolojik yaklaşımlarla, microarray, kütle spektrometresi vb. Bütün bu sistemlerin kendi içinde avantajları olsa da yüksek maliyet ve uzman bir operatöre ihtiyaç duyulması büyük bir dezavantaj oluşturmaktadır.

Daha hızlı ve ideal bir analiz sağlamak için biyosensörler geliştirilmektedir. Biyosensörler; analitik cihazlar olup, varolan biyomatrikslerinin (enzim, antikor, mikroorganizmalar) üzerinde fiziksel ya da kimyasal modifikasyonlar yapıp okuma yapılmasını sağlayacak başka bir sinyal türüne dönüştüren yapılardır [4]. Yapılan okumalar sinyal büyüklüğü kullanılan analite bağlıdır. Spesifik biyolojik bir element, örneğin enzim, spesifik bir analiti tanır ve tepkime sonrası oluşan biyomolekülün okuması tercih edilen dönüştürücü sayesinde yapılır.

Beta-galaktosidaz ( $\beta$ -gal), bir hidroliz enzimi olup glikozit bağlarını kırarak monosakkarit oluşumunu sağlar.  $\beta$ -gal, laktozun galaktoz ve glikoza parçalanmasını ve böylelikle enerji üretiminin sağlanmasında rolü vardır. Organizmalar için önemli bir enzimdir. *E. coli* gibi laktoz fermantasyonu yapabilen bakterilerde gözlemlenen bir enzimdir. *E. coli* kromozomu üzerinde bulunan *lacZ* geni tarafından kodlanır.

*Ortho*-Nitrofenil- $\beta$ -galaktozid (ONPG); kolorimetrik ve spektrometrik bir substrat olup  $\beta$ -gal enziminin aktivitesini belirlemek için kullanılır. Ortamda  $\beta$ -gal mevcut ise ONPG'yi hidrolize eder ve galaktoz ve *ortho*-nitrofenol (2-nitrofenol, ONP) oluşur. ONPG renksiz bir madde olmasına karşın;  $\beta$ -gal tarafından yıkıldığında sarı renkli olan *ortho*-nitrofenolü oluşturur.

Tez kapsamında en düşük konsantrasyonlardaki *E. coli*'lerin kolorimetrik olarak tayininin yapılması hedeflenmiştir. Kolorimetrik tayinler SERS (Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi) ile desteklenmesi hedeflenmiştir. Çalışmada SERS ile ONPG'nin yıkım ürünü olan 2-nitrofenol sinyallerine bakılmıştır. Bu sayede  $\beta$ -gal varlığı saptanmıştır.

Yapılan bu çalışma ile daha hassas ve hızlı tayin yapmaya uygun bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir.

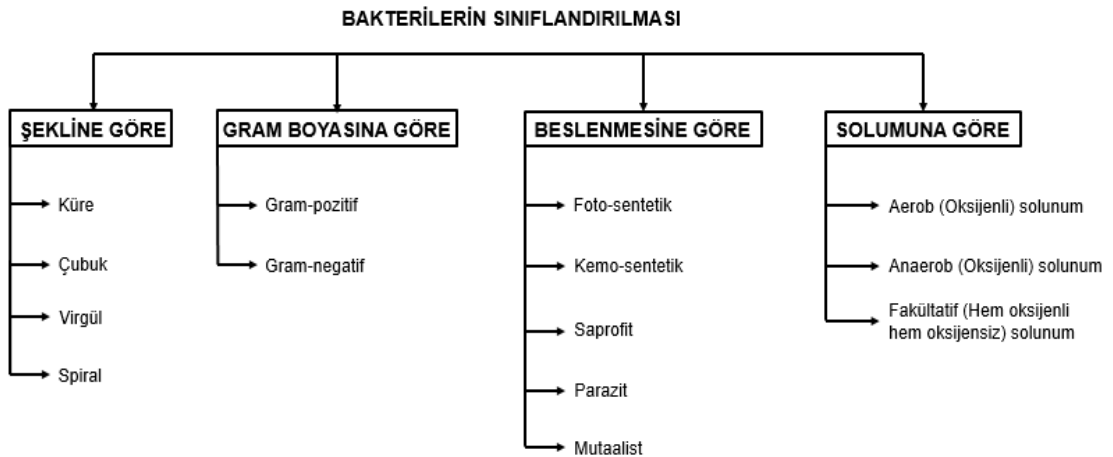
## 2. Genel Bilgiler

### 2.1. Bakteri

Bakteriler prokaryotik hücre yapısına sahip tek hücreli mikroorganizmalardır. Bu canlılarda sitoplazma hücre duvarı ile çevrenir. Nükleotid çekirdek zarı içinde olmadan serbest bir şekilde için sitoplazma içinde bulunur ve mitokondri ya da membran ile çevirili olan hiçbir organel içermezler [5]. Küçük boyutlara sahip olan bakteriler; 1-5 mikrometre( $\mu\text{m}$ ) uzunluğunda olup, yaklaşık 1  $\mu\text{m}$  enine sahiptirler [6].

Bakteriler eşeysiz üreme sonucu ürerler. Bölünme başladıktan sonra hücresel bileşenler iki bakteriye de yetecek miktarda üretilir [7]. Genetik materyali (DNA, Deoksiribo Nükleik Asit) ikilenir ve her bir kopya hücre duvarının farklı noktalarına bağlanırlar. Bu süre boyunca hücre büyümeye ve uzamaya başlar. İki DNA arasındaki mesafe artar ve bakteri orijinal boyutuna ulaştıktan sonra hücre duvarı merkezden bölünmeye başlar [6, 8]. Bu koşullar sağlandıktan sonra bölünme gerçekleşir ve her bölünme sonrası 2 yeni bakteri olur. Bu iki bakteri genetik açıdan birbirlerinin aynısıdır. Bakterilerde üreme süresi genetik ve stres etkenlerine (besin, sıcaklık vb.) göre değişkenlik gösterir [8, 9].

Bakterilerde kendi içlerinde şekillerine, beslenmelerine, solunum şekillerine ya da gram boyasına göre sınıflandırılırlar (Şekil 2.1) [5, 6].



**Şekil 2.1.** Bakterilerin özelliklerine göre sınıflandırılması

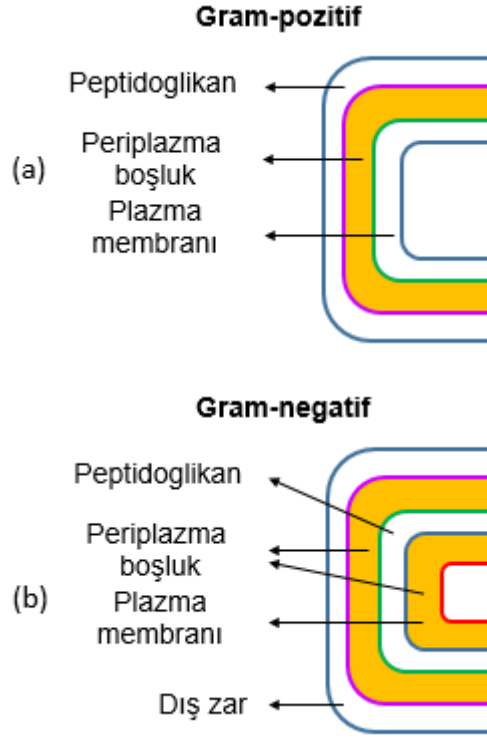
### **2.1.1. Hücre Duvarları**

Hücre duvarı; hücrenin şeklinin oluşmasını ve bir arada kalmasını sağlayan, dayanıklılık sağlayan bir yapıdır. Bakterilerin yaklaşık % 90'ı hücre duvarına sahiptirler [10]. Bakteriler hücre duvarı yapısına göre iki alt başlıkta sınıflandırılır. Bunlar gram-pozitif ve gram-negatiftir.

Hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakteriler hücre duvarlarında polisakkarit olan peptidoglikan vardır. Bu yapı N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuramik asit (NAM) gibi iki şeker türeviden oluşur ve aynı zamanda yapısında 4 çeşit amino asit vardır [5, 6, 11]. Bunlar L-alanin, D-alanin, D-glutamik asit ve diaminopimelik asit (DAP) çapraz bağlar kurarak peptidoglikan yapısını oluştururlar. Peptidoglikan gram-pozitif bakterilerde daha kalın gözlemlenir. Gram-negatif bakterilerde hücre duvarı gram-pozitif bakterilere göre daha çok katmandan oluşur (Şekil 2.2) [12]. Gram-negatif bakteriler peptidoglikana ek olarak sitoplazmik zar ve dış zara da sahiptirler.

### **2.1.2. Sitoplazmik zar**

Sitoplazma jelse yapıya sahip olup içinde ağırlıklı olarak sudan oluşur. İçinde ribozom, nükleotid, plazmid, enzimler, çeşitli tuzlar ve organik moleküller içerirler. Sitoplazma sitoplazmik zar tarafından çevrelenir. Bu yapı yaklaşık 8 nanometre (nm) kalınlığındadır ve hasar oluşması durumunda hücrenin bütünlüğü bozulur [6]. Sitoplazma dağılır. Bu yapı gram-negatif bakterilerde gözlemlenir.



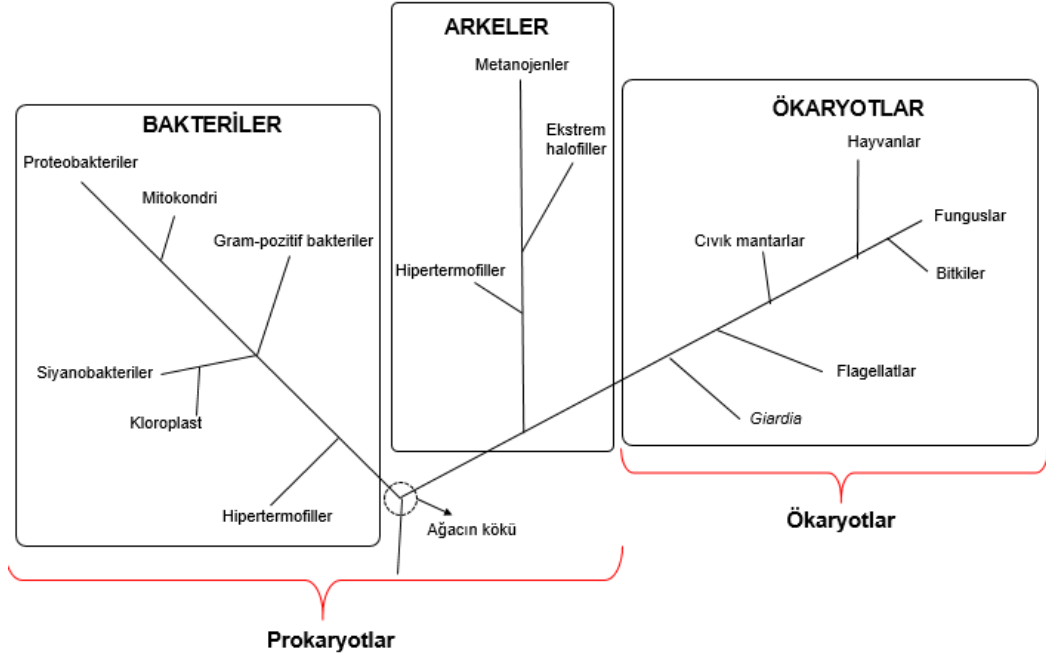
**Şekil 2.2.** Gram-pozitif (a) ve Gram-negatif (b) bakterilerinin şematik hücre duvarı çizimleri

Gram boyama yöntemiyle bakterinin hücre duvarı yapısına göre sınıflandırma sağlanır. Boyanın hücre içinde kalıp kalmamasına göre gram-pozitif ya da gram-negatif olduğu anlaşılır. Boyama esnasında kristal viyole boyası kullanılır [5, 6]. Boya bakteriye damlatıldıktan sonra hücre içerisinde kristal viyole-iyot yapısı oluşur. Kristal viyole-iyot çözünmeyen bir yapıya sahiptir ve alkol yıkaması akabinde bu yapı gram-negatif bakterilerde ortamdan uzaklaşabilir [6, 13]. Fakat gram-pozitif bakteriler alkol yıkaması sonrası hücre duvarlarında su kaybı gerçekleşir. Bu su kaybı sonrası duvar üzerindeki porlar kapanır ve boya uzaklaştırılmaz. Boya hücre dışına çıkamaz. İşlem sonunda elde edilen renge bağlı olarak sınıflandırılma sağlanır.

Eğer bakteri gram-pozitif ise mor-mavi renk, gram-negatif ise pembe-kırmızı renk gözlemlenir [14].

Filogenetik olarak ribozomal RNA (rRNA) sıralanmasına göre 3 farklı soy hattı tanımlanmıştır [6, 15]. Bakteriler evrimsel süreçte bilinen en eski canlı grubu olup, diğer prokaryot türlerine göre bu süreçte farklılık göstermişlerdir (Şekil 2.3) (6, 15, 16). Bakteri domaini morfolojik ve fizyolojik açıdan farklı pek çok alt grubu

bünyesinde bulundurur. Bakteriler doğal ortamlarından alınıp izole edilerek rRNA dizi analizine göre tanımlanmaları yapılmıştır ve bu tanımlama sonucu bakteriler cinslerine ayrıştırılmıştır [17]. Bunlardan en bilineni ve üzerine en çok çalışılanı enterik bir bakteri olan *Escherichia coli* dir [18].



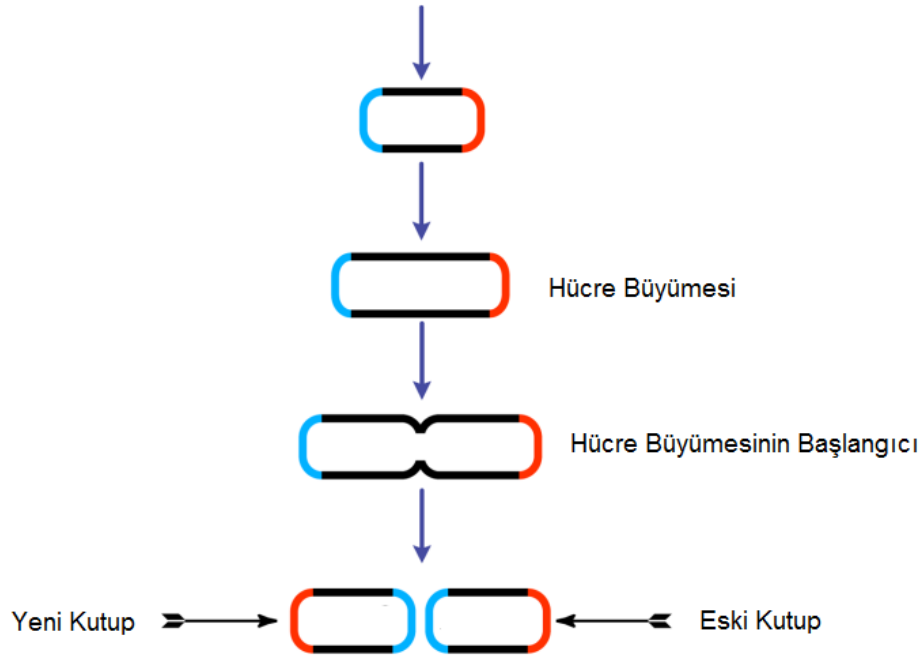
**Şekil 2.3.** rRNA sıralanmasına göre oluşturulmuş filogenetik evrim ağacı. 3 temel domainden oluşan ağaç; bakteri, arkeleri ve ökaryotları göstermektedir. Her domainde birkaç organizma grubu gösterilmiştir.

### 2.1.3. *Escherichia coli*

*Enterobacteriaceae* familyasından olan *Escherichia coli* (*E. coli*) bugüne kadar en iyi tanımlanan mikroorganizmadır. *E. coli* çubuk şekilli, spor oluşturmeyen gram-negatif bakterilerdir [19]. Yaklaşık 2  $\mu\text{m}$  uzunluğunda ve 0.25-1.0  $\mu\text{m}$  çapa sahiptir [20]. *E. coli* fakültatif anaerob olmasından dolayı hem daha hızlı hem de her ortamda rahat bir şekilde üreyebilirler. Bu bakteri oksijenin tükeltmesini sağlayarak bağırsak için oksijensiz olmasını sağlar [6]. *E. coli* şekil olarak çubuk bir şekle sahip olduğu için uzunlukları iki katına çıkararak ve uygun ölçüye gelince ortadan bölünerek çoğalırlar (Şekil 2.4) [21]. Bu döngüyü uygun bir ortamda yaklaşık olarak 20 dakikada tamamlayabilirler. Yani 7 saatte yaklaşık 2,097,152 bakteri üretilen *E.coli* birkaç saat sonra bu sayıyı ikiye katlayıp patojenik bir türünün bütün vücuda yayılmasını ve istila etmesine yetecek kadar bakteri üretebilir [22]. Enterik bir bakteri olan *Escherichia coli* insan ve diğer

sıcakkanlı memelerin bağırsağında bulunurlar. Bağırsak florasında 500 çeşitten fazla bakteri yaşamakta olup yaklaşık gram başına  $10^{10}$ - $10^{11}$  hücre düşmektedir [23]. *E.coli* sindirim kanalı boyunca dominant olarak gözlemlenir.

Normal koşullar altında *E.coli* çekumda başlayarak kolon boyunca bulunur, bu floranın bir parçasıdır. Patojenik olmayan pek çok *E. coli* suşu aynı anda burada bulunur ve kommensal olarak bağırsakta yaşar. Fakat enterotoksik suşları ince bağırsakta kolonize olur [6, 24]. Burada kolonizasyon faktör antijenleri (CFA, Colonization Factor Antigen) sayesinde tutunarak fimbriyal proteinleri üretir. Bu bölgede *E. coli* çoğalır ve başta diyare olmak üzere çeşitli hastalıklara sebebiyet verir.



**Şekil 2.4.** *E. coli*'nin bölünmesinin şematik diyagramı [21]

*E. coli*'nin pek çok suşu olup arasında patojenik özelliğe sahip suşları da mevcuttur. Bu patojenik suşlar 2011'de 5 yaş altı 6.9 milyon çocuktan ishal kaynaklı dünya çapında %9.9'unun ölümüne sebebiyet vermiştir [24].

*E. coli* hücre dışında bir müddet hayatta kalabilme özelliğine sahip olduğu için fekal bir kirlilik tespiti için indikatör özelliği taşıyan bir bakteridir [25, 26]. *E. coli* tayini yapmak için pek çok yöntem mevcuttur. İndol, metil kırmızısı, glukozdan



gaz çıkışı,  $\beta$ -galaktosidaz, mukat kullanımı, fenil, tartarat kullanımı testleri ile tespit edilebilirler [6, 27].

## **2.1.4. Bakteri Tayin Yöntemleri**

### **2.1.4.1. Kültür ile Tayin**

Bu yöntem altın standart olarak kabul gören bir yöntemdir. Kullanılan en eski metottur. Doğruluk oranı yüksek olan bir metot olmasına rağmen süre yönünden sıkıntılı olan bir yöntemdir. Kültürden istenilen sonucu elde etmek için yaklaşık 18 ile 24 saat arası beklenilmek zorundadır [27]. Katı ya da sıvı besi ortamında kültür yapılabilir. Katı besi yerinde yapılan tayinler agarlı besi yerinde ekimi yapılan canlıların koloni oluşumunun gözlemlenmesi üzerine dayanır. Her canlı türü için 1 koloninin oluşması beklenir. Fakat eğer örneğimizde bulunduğu halde sonradan hasar alıp koloni oluşturamayan canlılarda olabilir. Bu yüzden tüm mikroorganizmaların tespiti sağlanamamış olur. Sıvı besi yeri ise kullanımı da yani en muhtemel sayı (EMS) ile tayin de koliform grup bakterilerin tayinin de özellikle tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntemde 3 sıvı besi yerine ardışık olarak seyreltilmiş 3 seyreltiden ekim gerçekleştirilir. Akabinde elde edilen sonucun istatistiksel olarak oluşturulmuş çizelgeden okunması esasına dayanır [28].

### **2.1.4.2. Membran Filtrasyon Yöntemi**

Bu teknik özellikle su ve diğer sıvı örneklerinin analizini gerçekleştirirken kullanılır. Eldeki sıvı örnek membran filtreden geçirilir ve bu filtrasyon sonrası mikroorganizmalar filtre üzerinde kalır. Akabinde filtre besi yerinin içine yerleştirilir. Burada uygun koşullar sağlandığında koloni oluşur ve tayin gerçekleştirilir. Bu yöntem ile yaklaşık olarak filtre 24 saat inkübasyona bırakılır. Yavaş bir tayin yöntemidir.

### **2.1.4.3. Mikroskopik Sayımlar**

Bu yöntem ile özel lamların üzerinde direk mikroskop altında sayım yapılır. Bu yöntem ile hem canlı hem de cansız bütün organizmalar sayılır. Bu yöntemin tercih edilmemesindeki en büyük dezavantajdır bu. Thoma, Howard ya da Breed lamları ile sayım gerçekleştirilir [29]. Her birinin kullanım amacı farklıdır. Örneğin; Breed lamı ile çiğ sütteki mikroorganizma sayısı belirlenirken Howard küf incelemeleri için tercih edilir.

#### **2.1.4.4. İmmünolojik Yöntem**

Bu yöntem daha kültüre kıyasla daha hızlı ve daha az pahalı bir yöntemdir. Polimeraz zincir tepkimesine (Polymerase Chain Reaction - PCR) geçilmeden önce kullanılan bir yöntemdir [30]. En bilinen immunoserolojik yöntem iste ELISA'dır (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Antijen-antikor etkileşimine dayanan bir analiz yöntemidir. Örneğin içine eklenen bir antijen, örnek içindeki özgül antikor ile etkileşime girer. Böylelikle tayin yapılır. Tam tersi şekilde de işler. Antikor ile antijen tayini de yapılabilir. Antikor ve antijen etkileşimi spesifik bir olay olmasına rağmen bazen birbirine benzeyen gruplar arasında da birleşme olabilir [30, 31]. Buna çapraz reaksiyon denir. Bu yöntemin en önemli dezavantajı çapraz reaksiyonun gerçekleşmesidir. Yani daha hassas bir tayin yapılamayabilir.

#### **2.1.4.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Tayin**

PCR ile pek çok patojenin genleri çoğaltılabilir. Her gen için spesifik primer bölgesi geliştirilir ve bu primerler ile agaroz jel üzerinde yürütme yapılır. PCR'ın en büyük avantajı kültür ve immunoserolojik yöntemlere göre daha hızlı olmasıdır. Çapraz kontaminasyon, hücre tahribi, nükleik asit ekstaksiyonunda oluşabilecek sorunlar ya da inhibitör içerikleri yüzünden gerçekleşemeyen reaksiyonlar dolayısıyla bu yöntemde çok başarılı kabul edilmez [31].

#### **2.1.4.6. Biyosensörler**

Bakteriler çeşitli çevrelerde bulunabilirler. Örneğin; Toprak, su, atık su ya da hayvan bağırsağında vb. Bakterilerin patojenik suşlarının varlığı insan/hayvan sağlığı, gıda güvenliği ve çevre güvenliği açısından zararlıdır [1,4]. Bu yüzden hızlı ve güvenilir bakteri tayini önem arz etmektedir. Pek çok bakteri tayin metodu vardır. Diğer metotlara kıyasla daha ucuz, seçiciliği yüksek, daha hassas ve hızlı sonuç elde edilebilen bir seçenektir [19]. Biyosensörlerin kullanımının kolay olmasının yanı sıra nükleik asit temelli ya da immunolojik sistemlerin aksine numuneyi çoğaltmaya ya da zenginleştirmeye ihtiyaç duymaz. Biyosensörler ile PCR'ın oluşturduğu bazı sorunların üstesinden gelinebilir [31]. Özellikle son yıllarda gıda güvenliği uygulamaları kullanımında yaygınlaşan bir sistemdir.

Hedef bazlı çalışmayı sağlayan bir metottur. Biyosensörler bünyesinde bir mikroorganizma, doku, hücre, enzim, antikor, nükleik asit ya da bakteriyofaj gibi

bir biyoreseptör element içerir ve bu sayede hedef analitin elektrokimyasal ya da optik tayini sağlanır [32, 33] (Şekil 2.5).



**Şekil 2.5.** Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması

Biyosensörler analitik bir cihaz olup 2 temel elementten oluşmaktadır. Bunlar biyoreseptörler ve dönüştürücüdür. Hedef analitin tanımlamasından sorumlu olan biyoreseptörler; biyolojik materyal olan enzim, antikor, nükleik asit ya da hücre reseptörleri vb. olabilir [4,19]. Ayrıca biyolojik olarak üretilen materyal olan aptamer ya da rekombinant antikorlar olabilirler. Son olarak bu biyoreseptörler sentetik ve sistemi mimik edebilecek baskılı polimerler ya da sentetik katalizörler olabilir.

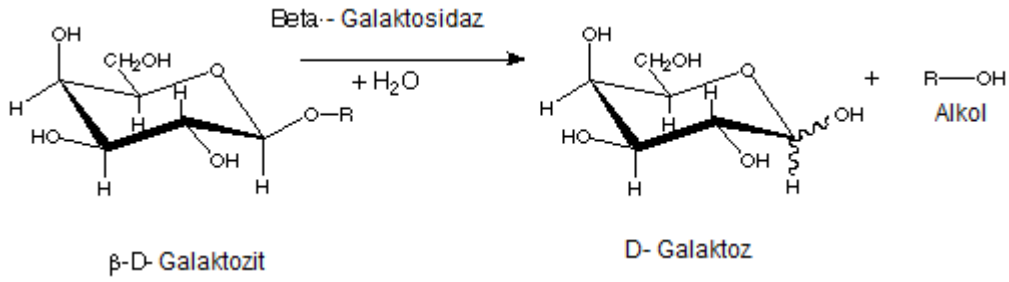
Biyoreseptörler tarafından algılanan analit bir dönüştürücü ile elektrik sinyaline dönüştürülür ve okuma optik, elektrokimyasal ya da manyetik vb. olarak ölçülebilir [30, 31].

Biyosensörlerin çalışma prensibi hedef molekölü yani analiti tanımak üzerine kuruludur. Hedef biyolojik materyal (örneğin; peptitler, lektin, antikor ya da aptamerler vb.) tanınır ve okunabilir bir sinyale dönüştürülür [30]. Biyosensörler biyolojik materyali saptayacak bir sensör-algılayıcı, dönüştürücü, sinyal yükseltici ve sinyal işleyici sisteminin birleşmesiyle oluşturulan bir sistemdir. Sinyaller analit konsantrasyonu ile orantılıdır. Biyosensörlerin performansı tepki süresi, algılama limiti, gürültü oranı ile ilişkilidir. Performansı etkileyen bu parametreler biyolojik elementi saptayan algılayıcı - sensör, dönüştürücü ve sinyal yükseltici ile ilişkili olup, geliştirilen sistemde ilk dikkat edilip geliştirilmesi gereken önemli bileşenlerdir [27, 30, 31].

Biyosensörler sayesinde pahalı laboratuvar ekipmanlarına ihtiyaç ortadan kalkar. Ayrıca diğer pek çok deneysel basamak ortadan kalktığı için zamandan tasarruf sağlanmaktadır. Düşük hacimli örneklerle çalışmaya imkan sağlar ve daha az kimyasalla çalışarak maliyetin düşmesini de sağlar. En önemli faydası ise eş zamanlı sonuç alınabilir bir sistem olmasıdır. Diğer sistemlere kıyasla, örneğin; kültür, beklemeden sonuç alınabilir.

## 2.2. Beta - Galaktosidaz

Beta - Galaktosidaz ( $\beta$ -gal) yani bir diğer adıyla laktaz,  $\beta$ -D-galaktozitin su varlığında galaktoz ve alkole hidrolizini katalize eder (Şekil 2.6) [34, 35]. Bu hidroliz tepkimesi sırasında glikozit bağları kırılır ve monosakkarit elde edilmiş olur. Bu enzim birçok mikroorganizmada, bitkide ve hayvanda mevcuttur.  $\beta$ -gal farklı substratlar üzerinde etkisi vardır. Örneğin; laktoz, gangliozyd GM1 ve çeşitli glikoproteinler bulunur.

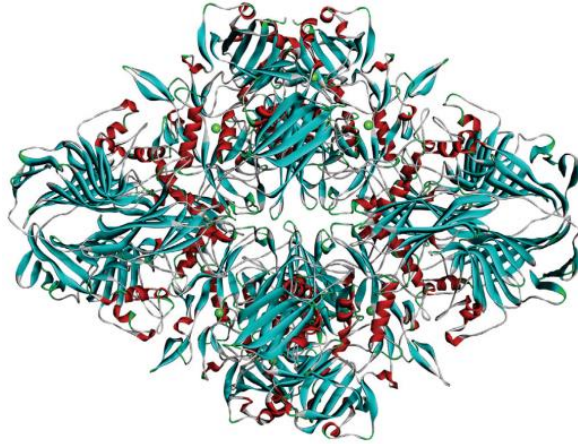


Şekil 2.6.  $\beta$ -gal reaksiyonu

Laktoz disakkarittir. Sadece sütte bulunur.  $\beta$ -gal ile laktoz monosakkaritlerine yani glikoz ve galaktoze hidrolize olur [36]. Vücudumuzda laktozu kullanabilmemiz için laktozun hidrolizine ihtiyaç duyarız. Laktoz direk olarak ince bağırsaktan emilimi sağlanamaz.  $\beta$ -gal ile ince bağırsakta glikoze ve galaktoz yıkımı sağlanır ve akabinde ince bağırsaktan bu monosakkaritlerin emilimi yapılır [37]. Bu yıkım bağırsaklarımızda bulunan probiyotik bakteriler ve ince bağırsak yüzeyindeki  $\beta$ -galaktosidazlar tarafından sağlanmaktadır [38, 39]. Bu enzimin eksikliğinde ya da işlevini tam gerçekleştiremediği durumda kişi laktoz intoleransı geliştirir yani laktoz sindirilemez [40].

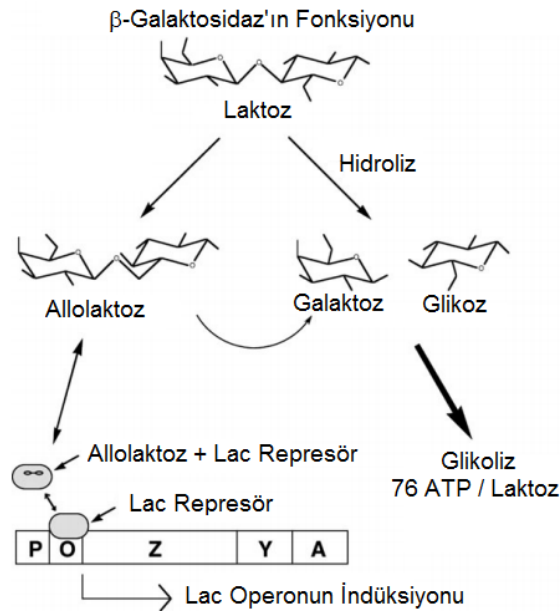
$\beta$ -gal'in moleküler ağırlığı 540,000'dir ve her biri bağımsız bir aktif bölge olan 135,000 moleküler ağırlığa sahip olan 4 alt birimden oluşmuştur (Şekil 2.7) [41,

42].  $\beta$ -gal, 4 özdeş polipeptit zincirinden oluşan bir tetrameridir ve bu zincirlerin her biri 1023 amino asit içerir [43, 44]. Her bir monomer içinde; 1023 amino asit, 5 domain oluşturur [45].



**Şekil 2.7.**  $\beta$ -galaktosidaz, 4 alt biriminin birleşmiş halinin gösterimi [45]

$\beta$ -gal 3 enzimatik aktiviteye sahiptir. Laktozu hidrolize edip glikoz ve galaktoz oluşturmaktadır. Ayrıca laktozun izomeri olan allolaktoza dönüştürülmesini sağlar. Son olarak bu allolaktoz monosakkaritlere ayrılabilir. Allolaktoz, Lac Z represörüne bağlanır ve hücrelerin içerisindeki  $\beta$ -gal oranını ayarlayacak pozitif bir geri bildirim döngüsü yaratır (Şekil 2.8) [36, 46].

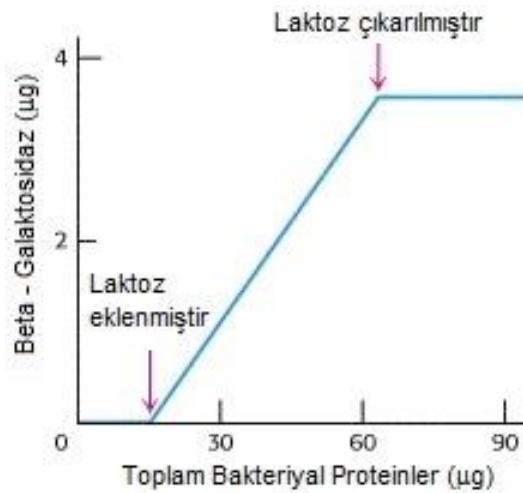


**Şekil 2.8.** B-galaksidozun hücre içindeki aktivitelerin şematik gösterimi. Bu enzim ile laktoz, galaktoz ve glikoza hidrolize edilir. Aynı zamanda allolaktoz oluşumu sağlanabilir. Laktozun varlığında allolaktoz sentezlenir ve böylelikle allolaktoz lac represöre bağlanır. Lac operonunun afinitesi azalır. Böylelikle lacZ geninin ürünü olan  $\beta$ -galaktosidazın sentezi mümkün kılınır. [36]

Laktoz tek başına lac operonunu ekspresyonunu başlatamaz. Bunu laktozun izomeri olan allolaktoz sağlar. Allolaktoz, glikoz ve galaktozun  $\alpha$ -1,4'teki bağlantısı yerine  $\alpha$ -1,6 bağlantısının oluşmasıyla oluşur [46, 47]. Allolaktoz lac operonun indükleyicisidir. Allolaktoz, indüksiyondan önce ortamda bulunan  $\beta$ -gal molekülü tarafından düşük seviyelerde üretilen  $\beta$ -gal reaksiyonunun yan ürünüdür. Laboratuvar ortamında  $\beta$ -gal ekspresyonunu indüklemek için iste izopropiltiogalaktozid (IPTG) gibi uyarıcılardan yararlanır [47].

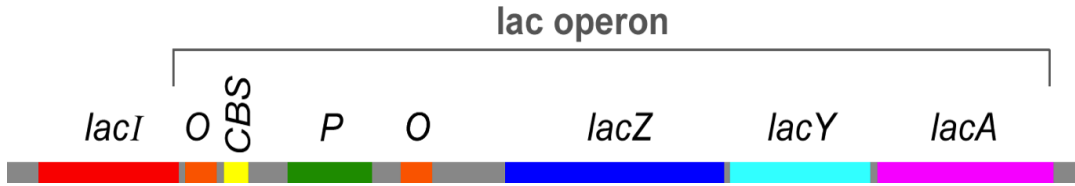
Doğada yaygın olarak bulunabilen bu enzim çeşitli mikroorganizmalardan izole edilebilmektedir. Bunların başında *E. coli* gelir. *E. coli* doğada pek çok farklı şekerle karşılaşır. Bunlardan bazıları laktoz ve glikozdur. *E. coli*'nin temel karbon ve enerji kaynağı glikozdur [48]. Glikozun bulunmadığı ortamlarda laktoz gibi disakkaritleri karbon kaynağı olarak kullanmak zorunda kalır. Laktozu metabolize etmesi gerektiğinde  $\beta$ -gal enzimini kullanır [47].

*E. coli*, glikoz ya da gliserol gibi bir karbon kaynağından yararlanarak besleniyor ve büyüyorsa bu ortamda 10 molekülden daha az  $\beta$ -gal bulunacaktır. Bu karşılık, aynı hücre laktoz içeren bir ortamda yetiştirildiğinde birkaç bin  $\beta$ -gal molekülü oluşacaktır. Laktozlu bir ortamda kültüre edilmiş *E. coli*'ler  $\beta$ -gal oranını yükseltecektir (Şekil 2.9) [47, 49].



**Şekil 2.9.** Laktozun *E. coli* kültürüne eklenmesi. Laktoz eklenmesi  $\beta$ -gal'ın artışına neden olur. Enzim miktarındaki artış büyüyen kültürdeki hücrelerin sayısındaki artış ile paraleldir. [47]

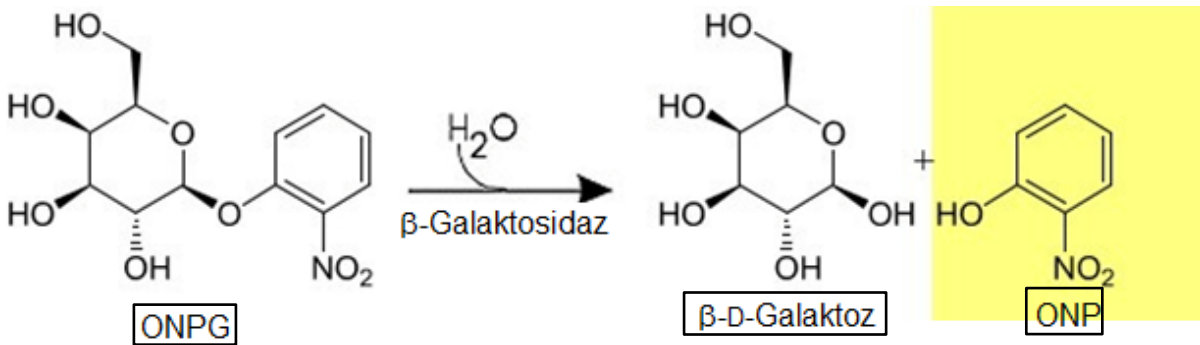
*E. coli* her şekeri metabolize etmek için farklı enzimlere ihtiyaç duyar. Laktoz metabolizması için 3 farklı enzime ihtiyaç duyar ve bu enzimlerin hepsi lac operonunda bulunur. Bunlar lacZ, lacY ve lacA'dır (Şekil 2.10) [50, 51]. LacZ laktozu hidrolize eden  $\beta$ -gal enzimini kodlar. LacY ise laktozu hücre içine almayı sağlayan permeazların sentezinde rol alır. LacA'nın laktoz metabolizması üzerindeki etkisi tam olarak çözülememiştir. *E.coli* lac operonunun transkripsiyonunu sadece laktoz varlığında aktive eder.



**Şekil 2.10.** Lac operonunu içeren bir *E. coli* kromozomunun diyagramı [50]

### 2.3. *ortho*-Nitrofenil- $\beta$ -galaktozid (ONPG)

ONPG,  $\beta$ -gal aktivitesinin saptamak için kullanılan bir substrattır. Normalde bu madde renksizdir. Ama  $\beta$ -gal varlığında, ONPG hidrolize uğrar ve reaksiyon sonunda galaktoz ve *ortho*-nitrofenol (ONP) elde edilir (Şekil 2.11) [52, 53]. Reaksiyon sonrası ortamda sarı renk gözlemlenir. Bu rengi veren *ortho*-nitrofenoldür. Sarı rengin gözlemlenmesi demek tepkimenin başarılı bir şekilde gerçekleştiğinin göstergesidir.



**Şekil 2.11.** ONPG'nin hidrolizi sonucu galaktoz ve ONP eldesi [52]

ONPG laktoz fermantasyonu yapabilen her bakteri grubu tarafından yıkılabilir. Eğer besi yerinde ya da sıvı örneğinde  $\beta$ -galaktosidaz yönünden pozitif bir bakteri varsa, bu bakteri ONPG'yi hidrolize eder ve sarı ONP'yi ürün olarak görürüz [53].

ONP bileşği ışığı 420 nm ışığı absorbe eder [54]. ONPG pozitif bakterilere örnek olarak *E.coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp* vb. gösterilebilir. Bazı bakteri türleri, laktoz fermantasyonu yapmayan bakteriler, permeaz ve  $\beta$ -gal'a sahip olmadıkları için ONPG yıkılamaz. Dolayısıyla ONPG negatiftirler. Tepkime sonucu sarı renk gözlemlenemez. Bu bakterilerden bazıları; *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Proteus spp*, *Providencia spp* vb. [52].

## **2.4. Raman Spektroskopisi**

Spektroskopi temel olarak moleküldeki titreşimleri saptamak için kullanılan bir yöntem olup, Raman günümüzde en çok kullanılan spektroskopi yöntemlerinden biridir. Molekülleri oluşturan atomlar açılarının değişmesinden ötürü titreşim hareketi gösterirler. Raman spektroskopisi, monokromatik ışınların elastik olmayan saçılmalarının lazer kaynağı olarak kullanılıp, saçılan bu ışınların ölçümüne dayanan bir tekniktir [55]. Monokromatik ışını absorbe edemeyen moleküller saçılma gösterirler. Yüksek şiddette monokromatik ışına yapan lazer numune ile etkileşim içine girince, monokromatik ışıktaki fotonların frekansının değişmesi olayına esnek olmayan saçılma denir.

Lazerden çıkan fotonlar numune tarafından absorbe edilir ve daha sonra yeniden saçılır. Geri yansıyan, saçılan fotonların frekansı monokromatik ışının orijinal haline kıyasla frekansı azalır ya da artar. Buna Raman etkisi denir. Bu frekanstaki değişim moleküllerin titreşimi ya da diğer düşük frekanslı geçişler hakkında bilgi sağlar. Raman spektrometresi ile hem kantitatif hem de kalitatif analizler yapmak için kullanıla bilinir. Raman spektrometresi katı, sıvı ya da gaz örnekleri üzerine kullanıla bilinir.

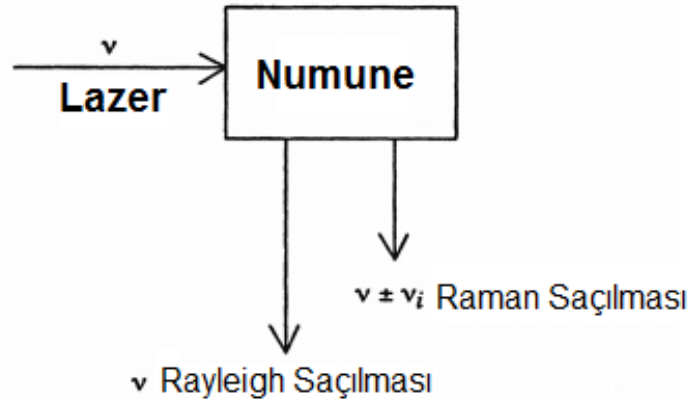
### **2.4.1. Raman Spektroskopisi**

Tipik bir Raman deneyinde, uyarıcı kaynak lazerdir ve saçılan ışığın analizi spektrometre ve tek foton seviyesine yakın hassasiyetli bir detektör tarafından yapılır [19]. Raman spektroskopisi temelini ultraviyole (UV), görünür ve yakın kızılötesinin (Near – Infared, NIR) sebep olduğu elektron kutuplaşmasıyla oluşturur [56]. Raman etkisi temel olarak elektrik alanda oluşan moleküler polarizasyon sonucu oluşan moleküler deformasyonlardır [55]. Bu periyodik deformasyonlar sonucu molekül karakteristik titreşimler gösterir.



Raman saçılması moleküldeki titreşimdeki değişime seviyelerine göre değişiklik gösterir. Belirli bir frekanstaki monokromatik lazer ışığı molekülü harekete geçirir ve onları osilasyon yapan dipollere dönüştürür.

Bir molekül  $\nu$  frekasında bir ve bir lazerden çıkan monokromatik bir ışık ile etkileşim içine girer ise, o zaman bu olay ışını tarafından molekülde indüklenen elektron kutuplaşması nedeniyle frekans  $\nu$  (Rayleigh Saçılımı) ışığı ve frekans  $\nu \pm \nu_i$  (Raman saçılımı) dağılır (Şekil 2.12) [55, 57]. Burada  $\nu_i$  molekülün titreşim frekansını temsil eder [57].



**Şekil 2.12.** Raman saçılmasının mekanizması [57]

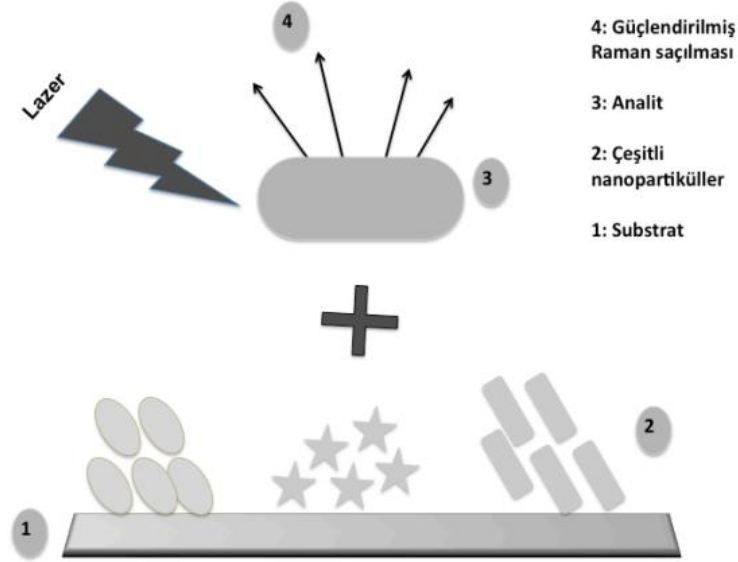
Her molekül kendi içinde karakteristik bağ yapısına sahip olduğu için farklı titreşimlere sahiptirler. Raman spektrometresi ile her molekülün parmak izi vardır [58].

#### **2.4.2. Raman Sinyal Şiddetini Arttırma Yolları**

Raman sinyalleri genellikle düşük olup, Raman spektroskopisi çeşitli tekniklerle geliştirilir. Raman sinyal şiddetini arttırmak için; örnek hazırlama, numunenin aydınlatılmasının ya da ışığın saçılımının tespiti için değişik yollara gidilmiş ve pek çok farklı yol keşfedilmiştir. Yüzeyi güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS) bu sebeple geliştirilmiş yöntemlerden biridir.

### 2.4.3. Yüzeysel Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi

Yüzeysel güçlendirilmiş Raman spektroskopisi yüzeysel duyarlı bir tekniktir. Raman saçılımını metal yüzeysel adsorbe olan moleküller veya plazmonik manyetik silika nanotüp gibi yapıları kullanarak Raman saçılımını güçlendiren bir tekniktir (Şekil 2.13) [59, 60].



Şekil 2.13 Yüzeysel güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi [60]

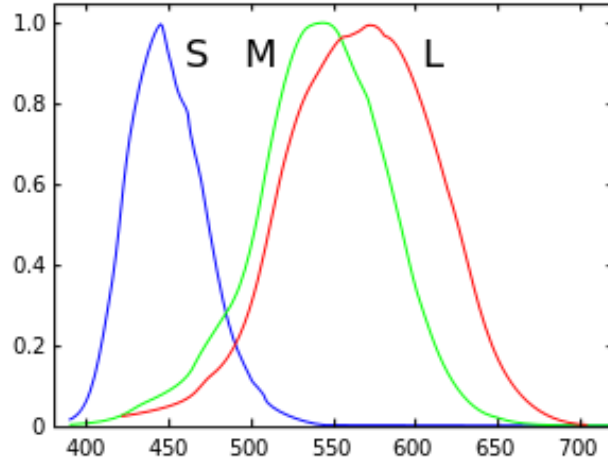
Raman spektrometresinde düşük Raman saçılması yüzünden düşük bir hassasiyete sahip bir ölçüm gerçekleşir [61]. SERS ile Raman saçılımının kesitinde  $10^6$  katı şiddet artışı olduğu bilinmektedir [62]. Bu artış  $10^{10}$  ile  $10^{11}$ 'e kadar çıkabilir [63, 64]. Yani bu teknik ile tek bir molekül saptanabilir [65, 66]. Bu artış faktörünü açıklamak için 2 temel katkının ürünüyle anlaşılabilir. Bunlar; elektromanyetik güçlendirme mekanizması ve kimyasal güçlendirme mekanizması. Raman saçılımı indüklenen dipol momentinin karesi ile doğru orantılıdır [67]. Bu durum Raman polarizasyonunun ve elektromanyetik alanının büyüklüğünün ürünüdür.

Elektromanyetik teori lokalize olmuş yüzeysel plazmonlarının uyarılmasını önerir. Kimyasal teori ise yük-transfer komplekslerinin oluşmasını önerir [68]. Kimyasal teori sadece yüzeysel kimyasal bağ oluşturan formlar için geçerlidir. Yani bu teori sinyal güçlenmesini her durumda açıklayamaz. Fakat elektromanyetik teori

molekül yüzey tarafından fiziksel olarak soğurulduğu zamanlarda da geçerlidir [69, 70].

## 2.5. Kolorimetri

Kolorimetri insanın renk algılamasına denk, fiziksel olarak tanımlamak ve ölçmek için kullanılan bir yöntemdir [71, 72]. Renk algısı, insanda gözdeki koni hücreleri tarafından sağlanmaktadır [73]. Işık spektrumunda olan elektromanyetik radyasyon ile insan gözündeki koni hücrelerinin uyarılması sonucunda renk algısı oluşur. Işıktaki dalga boyuna göre farklı renkler algılanır. Normal bir görüşe sahip bir insan gözü ışığı algılayan 3 farklı koni hücrelerine sahiptir. 3 farklı spektral hassasiyet zirvelerini algılar. Bunlar; kısa ("S", 420 nm – 440 nm), orta ("M", 530 nm – 540 nm), ve uzun ("L", 560 nm – 580 nm) (Şekil 2.14) [74].



**Şekil 2.14.** Basitleştirilmiş insan koni yanıt eğrileri [74]

Elektromanyetik radyasyon kendi dalga boyu ve yoğunluğu ile karakterize edilir (Çizelge 2.1) [75, 76]. Dalga boyu görülebilir bir spektrum içerisinde ise, yani 390 nm ile 700 nm arasında bu görülebilir bir ışıktır [77, 78]. Çoğu ışık kaynağı farklı dalga boyunda yayar.

Renkler	Dalga Boyu Aralığı
Kırmızı	~ 700–635 nm
Turuncu	~ 635–590 nm
Sarı	~ 590–560 nm
Yeşil	~ 560–520 nm
Cyan	~ 520–490 nm
Mavi	~ 490–450 nm
Mor	~ 450–400 nm

**Çizelge 2.1.** Görülebilir ışık spektrumundaki renkler

CIE (Internation Commision on Illumination; Uluslararası Aydınlanma Komisyonu) 1931 renk uzayları renklerin algılanmasında tanımlanmış ilk numerik oluşum olup, elektromanyetik görünür spektrumlardaki temel renklerin insan görüşünde algılanmasıyla renklerin tanımlanmasına dayanan bir kantitatif olarak tanımlama yapan bir oluşumdur [79].

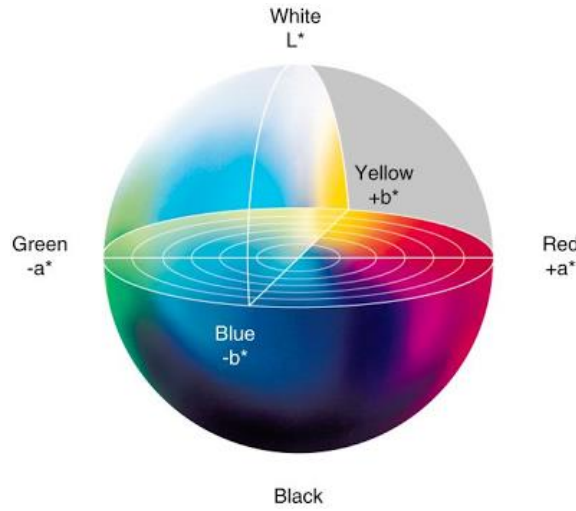
RGB renk modeli eklemeli bir renk modeli olup kırmızı, mavi ve yeşil renklerinin farklı kombinasyonlarının bir araya getirilerek üretilen geniş bir renk yelpazesinin oluşturulmasına dayanır [80]. RGB (red – green - blue, kırmızı – yeşil – mavi) modelinin 3 temel rengin baş harflerinin birleştirilmesiyle adlandırılmıştır. RGB renk modelinin temel amacı algılamak, simgeleme – gösterme ve elektronik sistemlerdeki şekillerin gösterimi sağlamaktır [81, 82, 83]. RGB'nin eklemeli modellemesi kırmızı, yeşil ve mavi ışık huzmelerini ve ışık spektrumlarını bir araya getirerek final renk spektrumunu oluşturur [84, 85]. RGB renk modeli ile renge ne kadar kırmızı, yeşil ve mavi dâhil olduğu saptanır.

CIELAB renk ölçeği tek formlu bir renk ölçeğidir. Tek renk ölçeğinde, renk uzayında çizilen noktalar arasındaki farklar çizilen renkler arasındaki görsel farklılıklara karşılık gelir. CIELAB renk alanı küp şeklinde düzenlenmiştir. L\* eksenini yukarıdan aşağıya doğru gösterilmiştir. a\* ve b\* ise yatay düzlemde gösterilmiştir. L\* eksenini için maksimum değer 100 ve minimum değer 0'dır. 100, mükemmel yansıtma difüzörünü olduğunu belirtirken; 0 değeri siyahı temsil eder.

A\* ve b\* eksenleri için belirli bir sayısal sınır yoktur. Pozitif a\* değeri kırmızı rengini temsil eder; negatif a\* değeri ise yeşili sembolize eder. Pozitif b\* değeri ise sarıyı; negatif b\* değeri ise maviyi sembolize eder. (87)

CIE sistemi tritimus değerini kullanarak renklerdeki koyuluk oranını, renk oranını ve saturasyon belirlenebilir. Sistem bunu belirlemek için L\*, a\* ve b\* şeklinde 3 koordinatlı bir sistem oluşturmuştur [51]. Nesnenin koyuluk oranı L\* koordinatı ile kromatik bileşenleri ise a\* ve b\* kartezyenleri ile belirlenmektedir (Şekil 2.15) [87]. Rengin saptanması için  $\Delta E_0^*$  eşitliği (eşitlik 1) kullanılır.

$$\Delta E_0^* = \sqrt{(L_x^* - L_o^*)^2 + (a_x^* - a_o^*)^2 + (b_x^* - b_o^*)^2} \quad \text{Eşitlik (1)}$$



**Şekil 2.15.** CIE renk uzayı [52]

### 3. Materyal ve Yöntem

#### 3.1. Kimyasal Maddeler

Deneylerde kimyasal olarak;

- Sigma – Aldrich (St. Lois, A.B.D)'den 2-Nitrofenol  $\beta$ -D-Galaktopiranozid, Tavuk yumurtasından elde edilmiş lizozim, Sodyum klorür (NaCl), Disodyum fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), Potasyum fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Potasyum klorür (KCl), Sodyum fosfat dibazik ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), Sodyum bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), Kalsiyum Klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) ve Beta – merkaptoetanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ ) (BME) temin edilmiştir.
- Merck (Darmstadt, Almanya)'ten Tolüen ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ ), Sodyum fosfat monobazik ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) ve Magnezyum sülfat ( $\text{MgSO}_4$ ) temin edilmiştir.
- Bütün çözeltiler, ultra saf su (18 M $\Omega$ , cm ) ile hazırlanıp kullanılmıştır.

#### 3.2. Çözeltiler

Fosfat tamponu (PBS) hazırlamak için önce; 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  çözeltileri karıştırılarak pH'sı 7,4 olan PB tamponu hazırlanmıştır. Daha sonra tampon içerisine 8 g/L NaCl ve 0,2 g/L KCl olacak şekilde tuz ilavesi yapılmıştır.

Z tamponu hazırlamak için; 850 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 620 mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 75 mg KCl, 120.36 mg  $\text{MgSO}_4$  sırasıyla eklenmiştir. Çözeltiyi tamamlamak için ve  $\beta$ -gal enzimini stabilize etmesi için 350  $\mu\text{l}$  BME eklenmiştir. pH 7.0 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Ringer solüsyonu hazırlanmak için; 4,45 gr NaCl, 0,15 gr KCl, 0,3 gr  $\text{CaCl}_2$  ve 0,1 gr  $\text{NaHCO}_3$  sırasıyla eklenmiştir. pH 7.2 olarak ayarlanmıştır.

ONPG çözeltisi için; 50 mg ONPG 1 mL Z tamponunun içinde çözülmüştür.

Lizozim çözeltisi için; 25 mg lizozim pH'ı 8 olan 1 mL PBS çözeltisi içinde çözdürülmüştür.

#### 3.3. Kullanılan Mikroorganizmalar

*E. coli* (K12) Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir. Deneyler süresince kullanılan *E. coli*'ler Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü'den temin edilmiştir. Bakteriler laktozlu besi yerinde çoğaltılmıştır.

*E. coli* K12 inokulumu 18-24 saatlik inkübasyonun ardından +4 °C'da muhafaza edilmekte olan petriye tek düşmüş bir koloniden (veya -80 °C stoğundan wire loop ile) alınarak, tercihen kapaklı falcon tüp içerisinde bulunan oda sıcaklığındaki sıvı besiyeri içerisinde süspansiyon edilir. Süspansiyon 16-18 saat süreyle 37 °C'da çalkalayıcı su banyosunda inkübe edilir, bu süre ardından 1'e 10 seyreltilerek hücre konsantrasyonu UV spektrofotometre ile fotometrik olarak tespit edilir. 600nm'deki OD (optik yoğunluk, optical density) değeri ~ 0.4 - 0.6 aralığında olan süspansiyondan (1 OD =  $1 \times 10^9$  kob) sıvı besiyeri ile seyreltme yoluyla,  $1 \times 10^6$  kob/1mL (kob: koloni oluşturan birim) konsantrasyonda ekime hazır *E. coli* süspansiyonları hazırlanır.

Besiyerleri, tercihen 90 mm'lik tek kullanımlık steril petriyer içerisine hazırlanır. Besiyeri 13 gram laktoz besi yeri 1 litre distile su içerisinden çözündürülerek hazırlanmıştır. Bir manyetik karıştırıcı ile besiyerinin gerekli tartımının oda sıcaklığında distile su içerisinde tamamen dağılması sağlandıktan sonra, çözelti otoklavda su buharı ile doyurulmuş ortamda, 121 °C ve 1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile sterilize edilir. Otoklavdan alınan besiyeri 40 – 45 °C'a kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılarak soğutulduktan sonra, steril petriyer içerisine 25 mL/petri olarak dökülür, steril ortamda petri kapakları açık şekilde besiyerinin soğuyarak katılaşması sağlanır. Kapakları kapatılan ve şirinklenen besiyerleri kullanıma kadar +4 °C'da muhafaza edilir.

Bakteriler 1 gecelik kültürden sonra PBS tamponunun içerisine alınarak 0,5 Mc Farland yoğunluğuna ( $1,5 \times 10^8$  kob/mL) getirilmiştir. Elde edilen süspansiyonun, PBS ile 3 kere yıkandıktan sonra  $10^1$ 'den  $10^8$ 'e seri dilüsyonları hazırlanmıştır.

### **3.4. Cihazlar ve Gereçler**

- Raman spektroskopisi (DeltaNu ExamineR Inc. Laramie, WY, A.B.D & Qimaging MicroPublisher-RTV-5.0, Kanada): Raman mikroskobu 785 nm lazer kaynağı, numune için hareketli lamel haznesi ve CDD dedektörü ONPG'nin yıkım ürünü olan 2-nitrofenol (ortho – nitrophenol, 2 – nitrofenol, ONP) tespiti için kullanılmıştır. Ölçüm süresi 35 saniye olup, 10X objektif, 30 µm lazer spot alanı, 150 mW lazer gücü ayarlanmıştır.

- Vakumlu etüv (SHANGHAI YIHENG TECHNICAL Co, LTD, DZF – 6030A, Şangay, Çin): 37 °C, 0.09 MPa basınçta yaklaşık 1 saat boyunca bakterili çözeltideki etanolü uçurmak için kullanılmıştır.
- Ultrasonik banyo (SONOREX RK 156, BANTELIN Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Almanya): Çözeltileri hazırlarken homojen bir karışım sağlamak amacıyla kullanılmıştır.
- pH metre (SENOVA LABTECH Co.,Ltd., PEN TYPE SX-610, Şangay, Çin): Tampon çözeltilerin hazırlanması sırasında kullanılmıştır.
- Santrifüj aleti (SIGMA, 2-16P, Osterode, Almanya): Bakterilerin çöktürülmesi için kullanılmıştır.
- Eppendorf Isıtıcı (TECHNE, DB-2D, İngiltere): ONPG içeren bakteri olan çözeltilerin renk dönüşümü sırasında optimum sıcaklıkta, 37 °C, tutmak için kullanılmıştır.
- Hassas terazi (SHIMADZU Inc., Kyoto, Japonya)
- İTK silika jel (60, F254, Merck, Darmstadt, Almanya): Örneklerin üzerine damlatılıp SERS ölçümlerinin yapıldığı yüzey
- Deiyonize su cihazı (MILLIPORE SIMPLICITY 185, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya)
- Mikropipet (1-10, 10-100, 100-1000 µl)

### 3.5. Yöntem

Çalışmada laktoz fermente edebilen bakterilerin tespiti için hızlı ve düşük konsantrasyonlarda kolorimetrik tespit yapılması için yöntem sunulmuştur. ONPG'nin *E. coli*'de bulunan beta-galaktosidaz enzimi ile ONP'ye yıkımını sağlayıp; kolorimetrik bir değişim gözlenilmesi hedeflenmiştir.

Bakterilerin, laktozu fermantasyon kabiliyeti  $\beta$ -gal enziminin varlığına bağlıdır. Eğer ortamda  $\beta$ -gal pozitif yani laktoz fermantasyonu yapabilen bir bakteri varsa bakteri ONPG substratını yıkacak ve ürün olarak sarı renkli 2 – nitrofenol elde edilecektir.

İlk aşamada  $10^8$ 'den  $10^1$ 'e kadar olan bütün *E. coli* konsantrasyonları santrifüj ile 10000 rpm'de 10 dakika çöktürülmüştür. Supernatant geriye sadece 500 µl bakterili çözelti kalana kadar atılmıştır. Bakteri duvarını parçalamak ve  $\beta$ -gal enzimi açığa çıkartmak için tolüen kullanılmıştır. Tüpler vortekslenmiştir. Bakteri



ve tolüen çözeltisi iyice karıştırıldıktan sonra tolüenin uçması için vakumlu etüve konulmuştur. Bakteri – tolüen çözeltisi 37 °C'de 1 saat tutulmuştur.

Son olarak bütün bakteri konsantrasyonlarına ONPG (50 mg/mL; 0,17 M) solüsyonu eklenmiştir. Renk değişimi gözlenene kadar bakteri ve ONPG içeren eppendorflar ısıtıcı blok üzerinde 37 °C'de bekletilmiştir. Bütün konsantrasyonlarda 2 saatten az bir sürede renk değişimi gözlenmiştir.

### **3.5.1. Optimizasyon Deneyleri**

#### **3.5.1.1. ONPG Optimizasyonu**

Deneyler süresince kromojenik substrat olarak ONPG kullanılmıştır. ONPG'nin yıkımı ile 2-NP elde edilir. Deneyler süresince ONPG, Z tampon içerisinde çözdürülmüştür. Tüm konsantrasyonlarda renk değişiminin görülmesi ve SERS şiddetlerinin gözlemlenebilmesi için kullanılan için tercih edilen tercih edilen ONPG konsantrasyonları 4 (0,01 M), 15 (0,04 M), 20 (0,06 M), 30 (0,09 M), 40 (0,13 M) ve 50 (0,17 M) mg/mL'dir. Optimizasyon süresince  $1,5 \times 10^8$  konsantrasyonundaki *E. coli* kullanılmıştır. Bakteriler tolüen ile parçalandıktan sonra sırasıyla bütün ONPG konsantrasyonları eklenmiştir.

#### **3.5.1.2. Çözücü Optimizasyonu**

Beta-galaktosidaz enziminin açığa çıkması için bakteri duvarının parçalanması gerekmektedir. Bakteri duvarının parçalanması için en uygun çözücünün seçilmesi için optimizasyon yapılmıştır. Deneyler süresince  $1,5 \times 10^8$  konsantrasyonundaki *E. coli* kullanılmıştır. Lizozim enziminin en iyi pH çalışma aralığı 8.0'dir. Lizozimi çözdürmek için pH'ı 8.0 olan PBS kullanılmıştır. 25 mg lizozim 1 mL PBS içerisinden çözdürülmüştür.  $10^8$  konsantrasyonundaki bakterilerden birine lizozim ve diğerine tolüen eklenmiştir. Tüpler vortekslenmiştir. Eklendikten sonra üzerine optimizasyonlar sonucu elde edilen ONPG oranına göre (0,17 M), ONPG eklenmiştir.

### **3.5.2. SERS**

$10^1$ - $10^8$  arasındaki bakteri konsantrasyonları 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant 500 µl kalana kadar atılmıştır. Akabinde tolüene eklenmiştir. Ortamdan tolüeni uzaklaştırmak için 37 °C'deki vakumla etüve konulmuştur. Bakteri-tolüen çözeltisi yaklaşık 1 saat etüve tutulmuştur. Daha sonra optimizasyonlar sonucu belirlenen ONPG miktarı, 0,17 M, bütün bakteri

konsantrasyonuna eklenmiştir. Renk değişimi gerçekleşene kadar eppendorflar ısıtıcı blok üzerinde 37 °C'de bekletilmiştir. Örneklerin okuması SERS'te gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 3.1.** Raman cihazı (solda) ve İTK (ince tabaka kromatografi) plaka üzerinde SERS örnekleri (sağda)

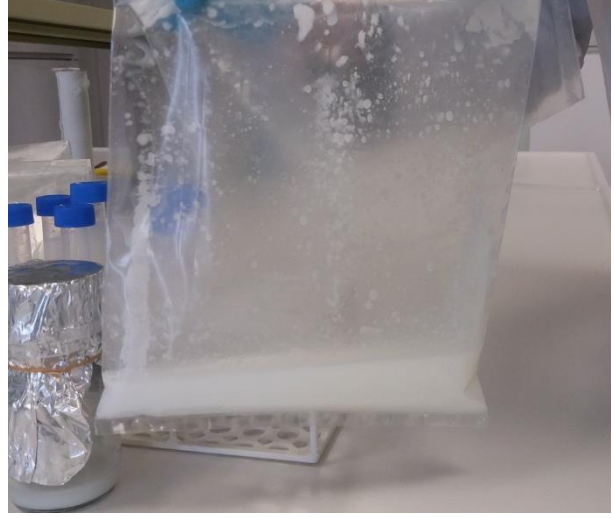
Raman ile ONPG'nin yıkım ürünü olan 2-NP sinyalleri saptanmıştır. Renk değişimi gerçekleşen örneklerden ince tabaka kromatografi plakası (İTK plaka) üzerine 5 µl damlatılmıştır. Raman ölçümünün yapıldığı program NuSpec ve mikroskop için kullanılan görüntüleme programı ise QCapture Pro 6.0'dır. Raman ölçümleri sırasında 10X objektif kullanılmıştır. Ölçüm süresi olarak 35 saniye olarak belirlenmiştir. Ölçümlerde 30 µm lazer spot alanı ve 150 mW lazer gücü ayarlanmıştır.

### 3.5.3. Kolorimetrik

Isıtıcı blok üzerinden alınan  $10^1$ - $10^8$  arasındaki bakteri konsantrasyonlarını içeren örneklerin renk değişimi eşitlik 1 kullanılarak hesaplanmıştır. Kolorimetrik okuma ON Color Measure programı kullanılarak RGB değerleri ölçülmüş ve tritimus değerleri saptanmıştır.

### 3.5.4. Gerçek Örnek Denemesi

Gerçek örnek üzerinde de deneme yapılmıştır. Gerçek örnek denemelerinde peynir kullanılmıştır. Peynir ekstrakte edilmiştir. 10 gramlık peynir numunesi ve steril 100 mL ringer solüsyonu ile steril Stomacher poşetinin içine konulur. Stomacher cihazı ile karışım 5 dakika boyunca homojen olana kadar parçalanır (Şekil 3.2). Homojen hale gelen karışım steril bir tüpe aktarılır.



**Şekil 3.2.** Stomacher Cihazı (solda), ringer solüsyonu içerisinde homojenize edilmiş peynir (sağda)

Gerçek örnek üzerine bakteri spike (bakteri eklenmesi) edilmiştir. Gerçek örnek denemeleri  $10^3$  ve  $10^5$  konsantrasyonundaki bakterilerle gerçekleştirilmiştir.  $10^3$  ve  $10^5$  konsantrasyonundaki bakteriler 10 dakika 10000 rpm devirde çöktürülmüştür. Supernatant atılmıştır. Bakterilerin üzerine homojenize olmuş peynir çözeltisi eklenmiştir. Elde edilen bakterili peynir çözeltisine optimizasyonlar sonucu belirlenen oranda, 50 mg/mL (0,17 M), ONPG eklenmiştir. Kolorimetrik gözlem ON Color Measure ile yapılmış ve SERS ölçümleri alınmıştır.

## 4. Bulgular

### 4.1. Optimizasyon Çalışmaları

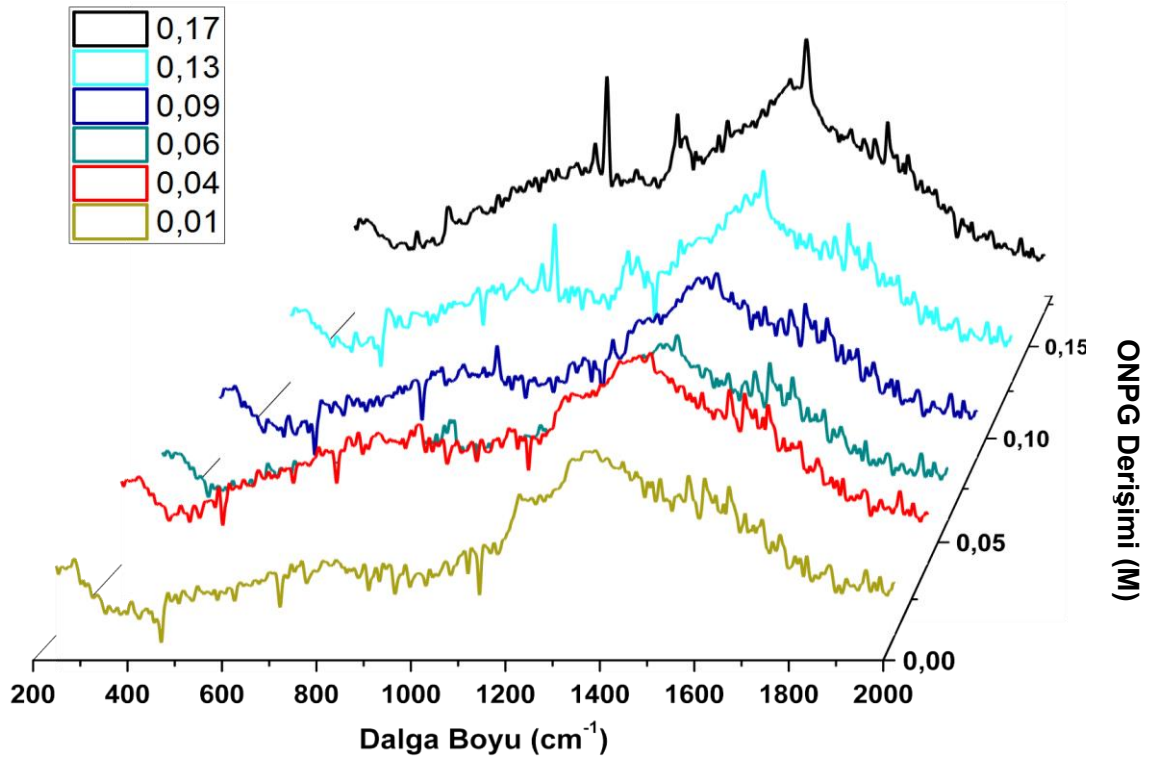
#### 4.1.1. Deneysel Maddelerin Optimizasyonu

Deneysel süresince kromojenik substrat olarak ONPG kullanılmıştır. Bakterilerde bulunan  $\beta$ -gal enzimi aracılığı ile bu substrat hidrolize olur, yıkılır. Yıkılmanın sonucunda renk değişimi gözlemlenir. Bu hidroliz tepkimesinin ürünü olan 2 - nitrofenol sarı renge sebep olan maddemiz ve hedef analittir. ONPG miktarının belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

##### 4.1.1.1. ONPG Optimizasyonu

$\beta$ -gal enzimi bakterilerde laktozun ve basit galaktozidlerin yıkımını sağlayan bir enzimdir.  $\beta$ -gal varlığı laktoz fermantasyonu yapan bakterilerin varlığının göstergesidir. Bu enzimin varlığının tayini için ONPG substrat olarak seçilmiştir. ONPG,  $\beta$ -gal enzimi tarafından hidrolize edilen substrat olup; yıkımı sonucu sarı renkli 2-NP gözlemlenir.

ONPG Sigma'dan temin edilmiş olup, Z tampon içinde çözündürülmüştür. Ependorfların içine konulan ONPG ve Z tamponu sonikatör kullanılarak homojen hale getirilmiştir. Optimizasyon çalışmaları süresince  $10^8$  kob/mL'deki bakteriler kullanılmıştır. Bütün bakteri konsantrasyonlarında renk dönüşümünün gözlemlenmesi ve anlamlı SERS sinyallerinin gözlemlenebileceği ONPG miktarı optimize edilmiştir. Optimizasyon için tercih edilen ONPG konsantrasyonları 4 (0,01 M), 15 (0,04 M), 20 (0,06 M), 30 (0,09 M), 40 (0,13 M) ve 50 (0,17) mg/mL'dir. ONPG optimizasyonuna ait SERS spektrumları şekil 4.1'de verilmiştir.

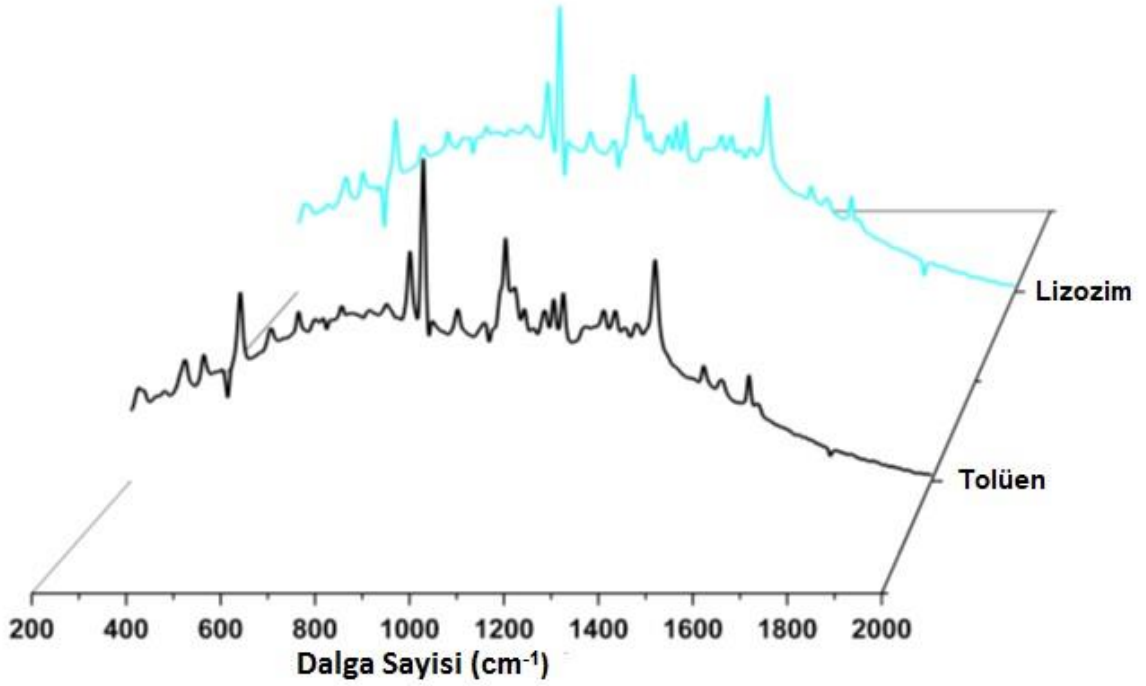


**Şekil 4.1.** Farklı derişimlerde (0,01 – 0,17 M), ONPG varlığında elde edilen SERS spektrumu

Elde edilen verilerin sonucunda, ONPG miktarı arttıkça SERS sinyallerinde de artış olduğu gözlemlenmiştir. Gürültülerin azaldığı gözlemlenmiş ve yıkım ürünü olan 2-NP'ün sinyalleri net bir şekilde gözlemlenmiştir. 50 mg ONPG, 1 mL Z tamponu içinde çözdürülmüştür. Uygun ONPG miktarı 50 mg/mL yani 0,17 molar (M) olarak belirlenmiştir.  $10^8$ 'den  $10^1$ 'e kadar olan bütün bakteri konsantrasyonlarında renk değişimi gözlemlenmiştir ve 2-NP SERS sinyalleri gözlemlenebilmiştir.

#### 4.1.1.2. Çözücü Optimizasyonu

$\beta$ -galaktosidaz laktoz, gangliozid GM1 ve çeşitli glikoproteinlerin yıkımını sağlayan bir hidroliz enzimidir. *E. coli* laktozun bulunduğu ortamlarda laktozu metabolize etmek için  $\beta$ -gal enzimini üretir. Bakterinin enziminin açığa çıkması için bakteri duvarının parçalanması gerekmektedir.  $\beta$ -gal'un yapısının bozulmaması ve hücre duvarının parçalanıp ortamda  $\beta$ -gal gözlenebilmesi için uygun çözücünün bulunması gerekmektedir. Beta-galaktosidazı açığa çıkarmak için bakterinin hücre duvarının parçalanması gerekmektedir. Bu parçalamayı sağlamak için lizozim ve tolüen kullanılmıştır. Lizozim ve tolüen kıyası yapılmıştır.



**Şekil 4.2.** Tolüen ve lizozime ait SERS spektrumları

Deneyler süresince  $1,5 \times 10^8$  konsantrasyonunda ki *E. coli* kullanılmıştır. *E. coli* çözeltisi 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Tüplerin dibinde pellet gözlemlenmiştir. Pelletlere dokunmadan, supernatant 500  $\mu$ l kalıncaya kalana kadar atılmıştır. Akabinde bir tüpe tolüen ve diğerine lizozim çözeltisi eklenmiştir. ONPG optimizasyonu sonucu elde edilmiş ONPG konsantrasyonu, 0,17 M, kullanılmıştır.

Lizozim ve tolüen kullanılarak hazırlanan 2-NP'ye ait SERS spektrumlarında önemli bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.2). Bu iki çözelti ile hazırlanan örneklerde  $\Delta E^*$  değerleri eşitlik 1 kullanılarak tolüen ile hazırlanan örnek için 245.32, lizozim ile hazırlanan örnek için 246.27 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre oluşan ürün renginde önemli bir farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 4.3).

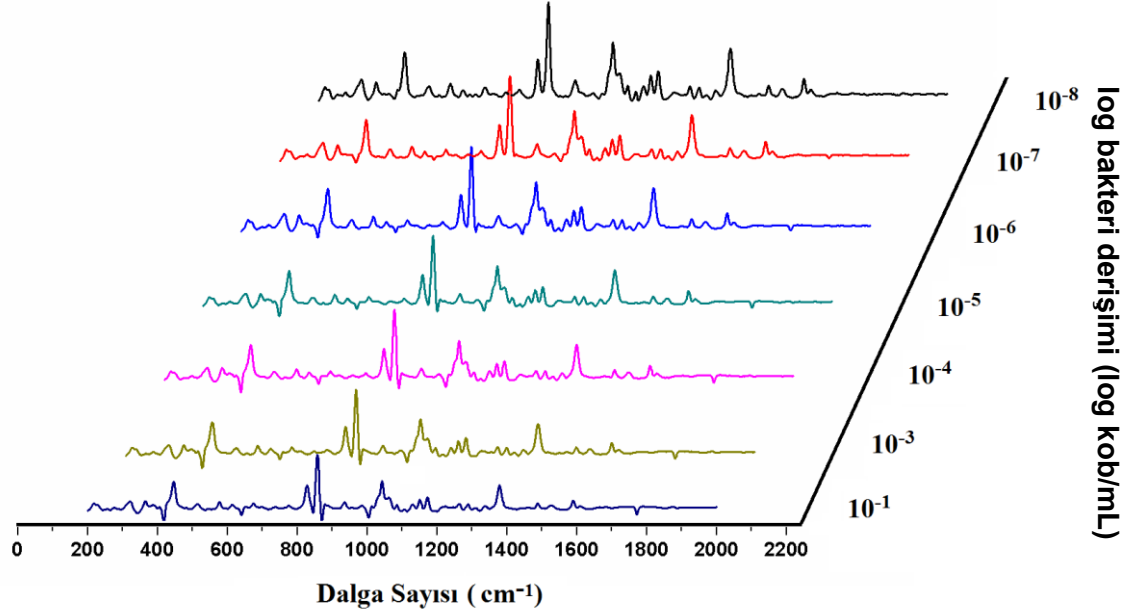


**Şekil 4.3.** Lizozim ve tolüene ait renk değişimleri

#### **4.2. SERS Sonuçları**

Deneyler süresince *E. coli* (K12) kullanılmıştır. *E. coli*  $\beta$ -gal enzimine sahiptir ve ONPG pozitifdir. ONPG yıkımı bir hidroliz tepkimesi sayesinde gerçekleşir. ONPG renksiz bir birleşimdir.  $\beta$ -gal'un ONPG ile tepkimeye girmesi sonucu iki ürün elde edilir. Bu ürünlerden biri galaktoz ve bize gözle görülebilir bir tayin yapmamızı sağlayan renkli bir ürün olan 2-NP'dür.

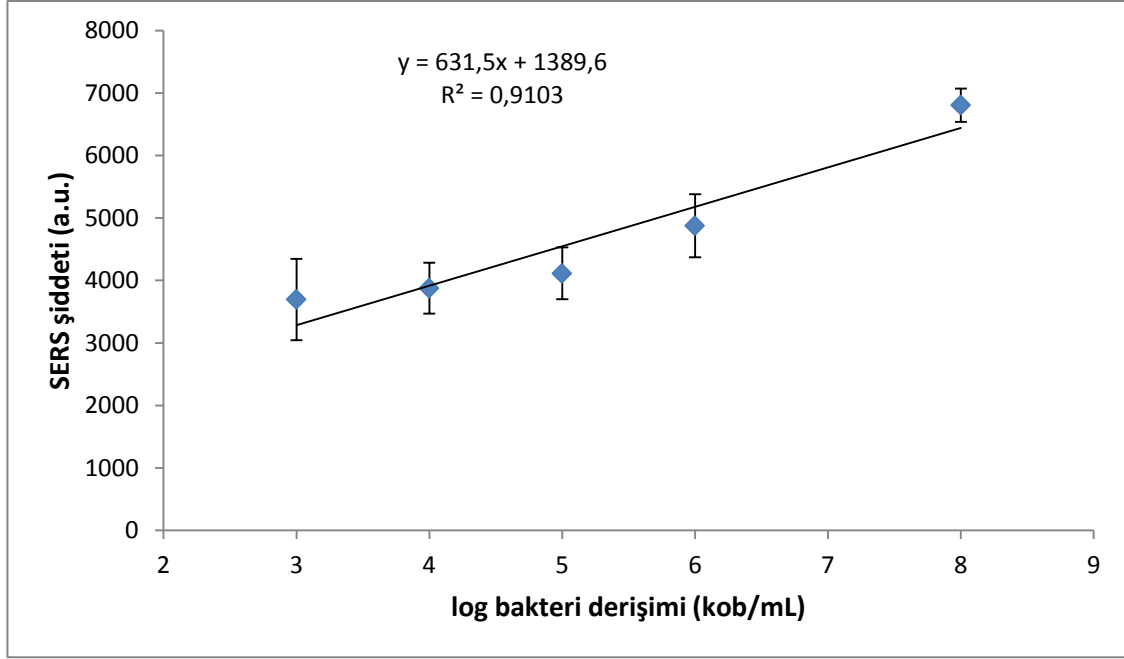
$10^1 - 10^8$  arasındaki bütün *E. coli* konsantrasyonları için SERS ölçümü alınmıştır. Bütün bakteri konsantrasyonları optimizasyon sonucu elde edilen ONPG oranıyla yani 0,17 M ile tepkimeye sokulmuştur. Tepkime sonucu oluşan, ONPG yıkım ürünü olan 2-NP'ün SERS sinyallerine bakılmıştır. SERS spektrumları şekil 4.4'te verilmiştir.



**Şekil 4.4.** Farklı bakteri derişimleriiden elde edilmiş 2 – Nitrofenole ait SERS spektrumları

Optimizasyon çalışması tamamlandıktan sonra yöntemin doğrusal aralığının, duyarlılık ve teşhis sınırı gibi analitik performans verilerinin tespiti için SERS ölçümü sonucu elde edilen veriler ile kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Veriler sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği şekil 4.5'te verilmiştir. Kalibrasyon noktası olarak 1380 cm<sup>-1</sup> noktası seçilmiş, bu noktada doğrusal kalibrasyon grafiği ( $R^2=0,9103$ ) elde edilmiştir.

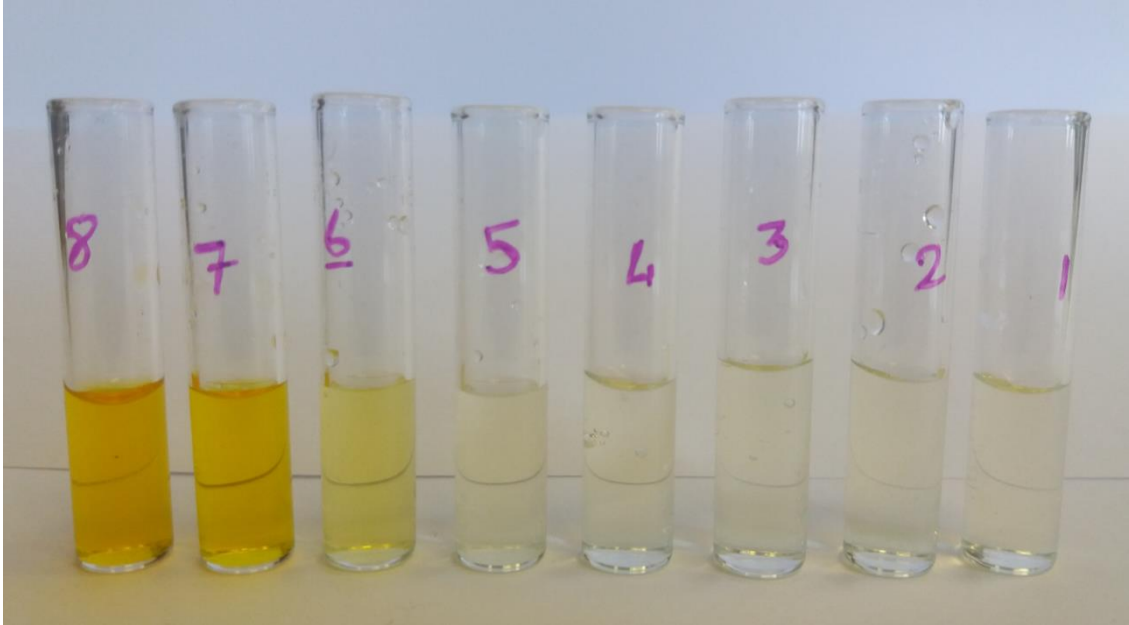




**Şekil 4.5.** Farklı bakteri konsantrasyon derişimlerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi

#### 4.3. Kolorimetrik Bulgular

Şekil 4.6'da farklı konsantrasyonlarda bulunan *E. coli* bakterisinin  $\beta$ -gal enzimi aracılığı ile ONPG'nin hidrolizinin indüklediği renk geçişlerini gösterilmektedir.



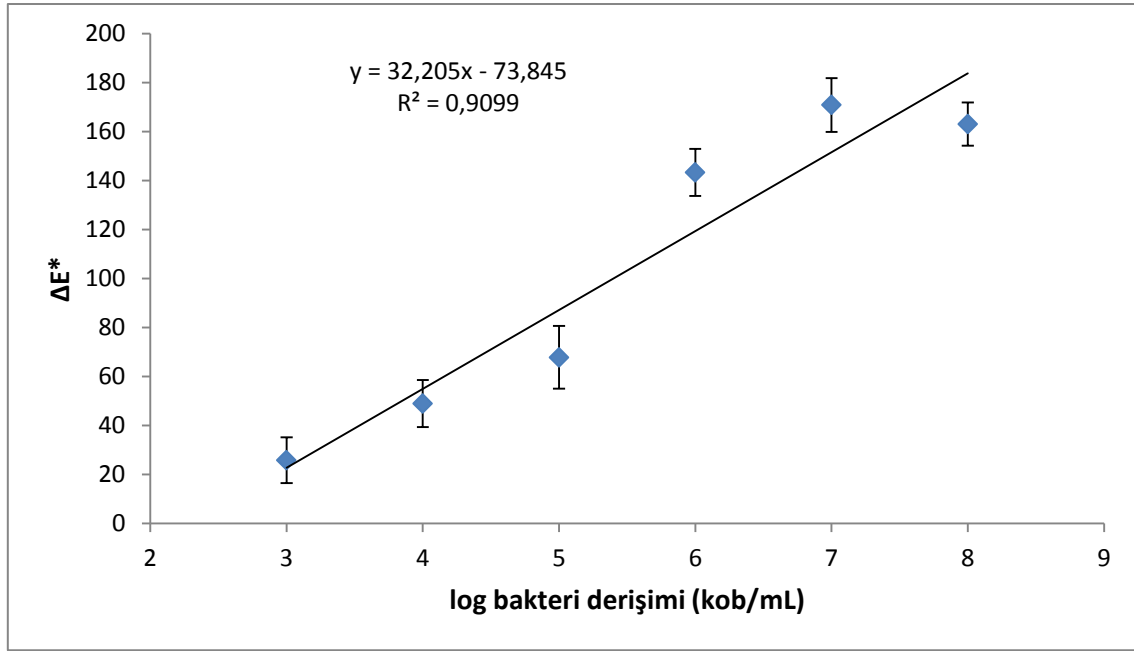
**Şekil 4.6.**  $\beta$ -gal tarafından indüklenmiş renk değişimi

Deneyler süresince kullanılan *E. coli*'ler laktozlu besi yerine ekilmiştir. Ortamdaki laktoz varlığı *E. coli*'nin  $\beta$ -gal enzimi miktarının artmasını sağlamıştır. Farklı dilüsyonlarda bulunan bakterilerde farklı oranlarda  $\beta$ -gal enziminin bulunması beklenmektedir.  $\beta$ -gal enzimidaki farklılık kolorimetrik olarak gözlenebilmektedir. Yüksek derişimlerdeki ONPG'li çözeltide turuncuya yakın bir renk gözlemlenirken düşük konsantrasyonlarda açık sarı rengi gözlemlenmektedir.

İlk ve en hızlı renk değişimi  $10^7$  ve  $10^8$ 'de gözlemlenmiştir. ONPG eklenmesi ile bu iki konsantrasyonda renk değişimi anında gözlenebilmektedir. Diğer konsantrasyonda daha yavaş renk değişimi gözlenmiştir. Bütün konsantrasyonlarda renk değişimi gözlenmiş ve en geç dönüşen konsantrasyonun  $10^1$  olduğu saptanmıştır. Bütün renk değişimi yaklaşık 2 saatten önce tamamlanmaktadır.

Kolorimetrik datalar ON Color Measure programı kullanılarak doğrulanmıştır. Program ile RGB değerleri elde edilmiştir. Programın çalışma prensibi hedef bölgedeki kırmızı, yeşil ve mavi oranını belirlemeye ve her bir renk için değer vermek üzerine kuruludur.

Renk farkı boş (blank) çözelti ve numenin kıyası ile gerçekleştirilir. Boş çözelti olarak PBS kullanılmıştır.  $\Delta E^*$ , numunenin ve standardın  $L^*$ ,  $a^*$  ve  $b^*$  farklarını hesaba katan bir değerdir. Toplam renk farkı eşitlik 1'deki denklem ile hesaplanmıştır. Elde edilen değerler ile kalibrasyon grafiği ( $R^2 = 0,9099$ ) elde edilmiştir (Şekil 4.7).



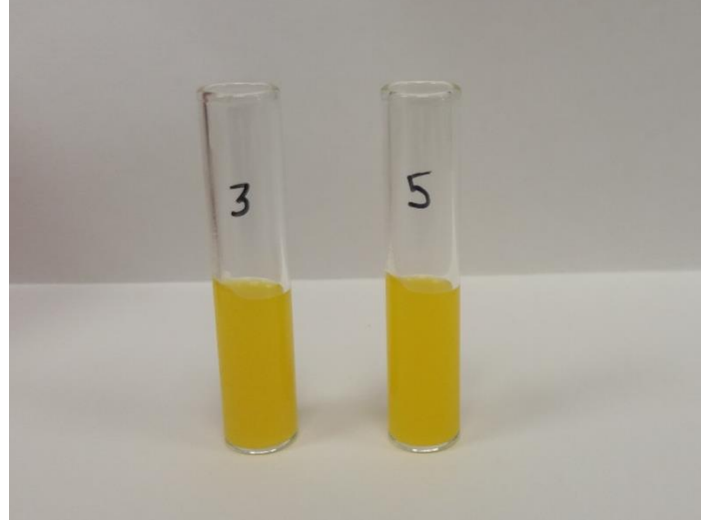
**Şekil 4.7.** Farklı dilüsyonlardaki *E. coli*'lere ait  $\Delta E^*$  değeri

#### 4.4. Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması

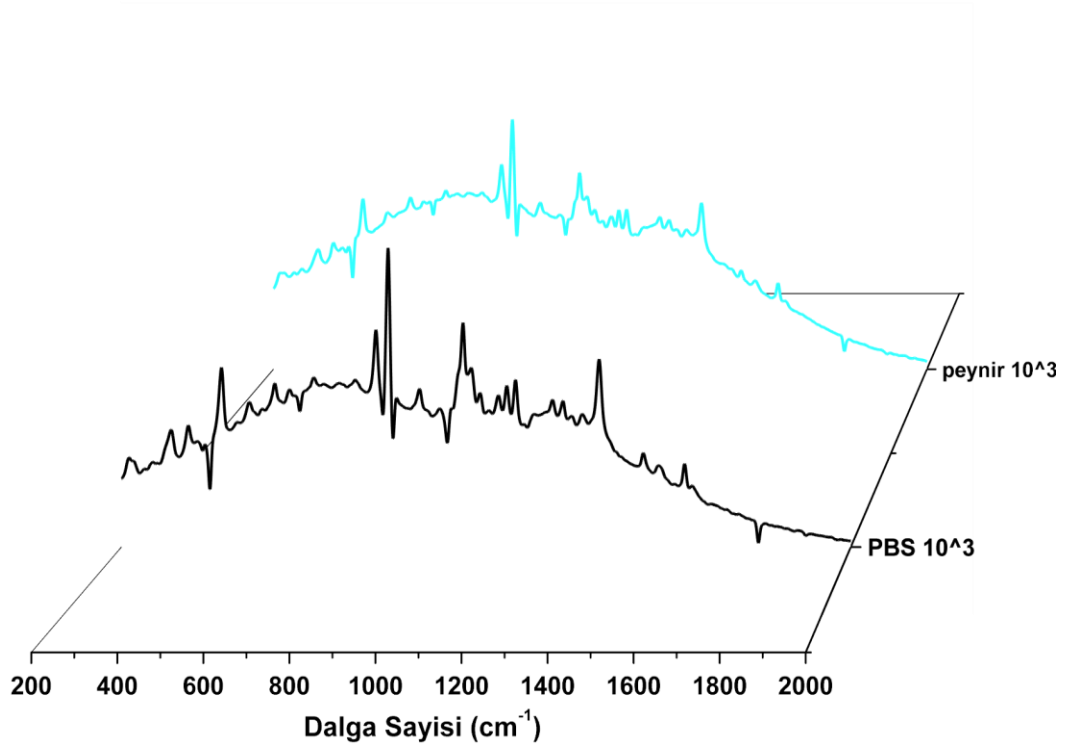
Gerçek örnek denemelerinde peynir kullanılmıştır. Peynir ekstrasyonunu sırasında ringer solüsyonu kullanılmıştır. 1:10 oranında peynir - ringer solüsyonu kullanılmıştır. Parçalamak ve örneği homojen hale getirmek için Stomacher cihazı kullanılmıştır. 10 gram peynir örneği 100 mL ringer solüsyonu Stomacher poşetine konulmuştur. 5 dakika boyunca Stomacher cihazında bırakılan numune işlem sonrasında homojen hale gelmiştir. İşlem süresinde steril ortamda çalışılmıştır. Kullanılan solüsyonlar ve Stomacher poşeti sterilidir.

Kullanılan *E. coli*'ler ekim ve sayımı Gazi Üniversitesi biyoloji bölümü tarafından gerçekleştirilmiştir. Temin edilen bakteriler laktozlu besiyerine ekilmiştir. Gerçek örnek denemeleri süresince  $10^3$  ve  $10^5$  konsantrasyonları kullanılmıştır. Bakteriler 10000 rpm'de 10 dakika çevrilmiştir ve üstte kalan supernatant uzaklaştırılmıştır. Bakterilerin üzerine Stomacher ile homojenize edilmiş peynir ekstrasyonu eklenmiştir. Bakteri duvarının parçalanması için tolüene eklenmiştir. Bu sayede bakterinin parçalanması ve  $\beta$ -gal'un açığa çıkması sağlanmıştır. Tolüenin uçması için tüpler vakumlu etüve konmuştur. Tolüen ortamdan uzaklaştıktan sonra ONPG karışımı eklenmiştir. Daha önceki örneklerde olduğu gibi 0,17 M ONPG kullanılmıştır.

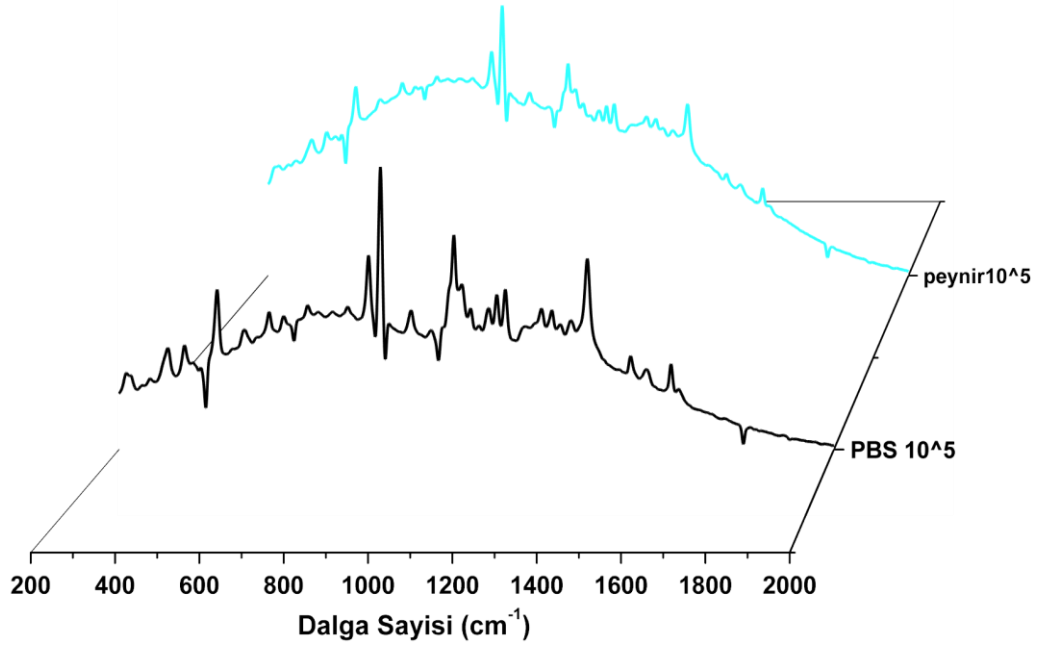
ONPG eklendikten sonra renk değişimi 20 dakika içinde gözlemlenmiştir. Renk değişiminin tampon ortamına kıyasla daha hızlı bir renk dnşmnn gözlenmesi matriks etkisi yüzünden olduğu tahmin edilmektedir. Aynı zamanda tampon ortamına kıyasla  $10^3$  ve  $10^5$ 'te daha yoğun bir renk değişimi gözlemlenmektedir (şekil 4.8).



**şekil 4.8.** Peynir ekstraksiyonu sonucunda oluşan renk değişimi



**şekil 4.9.**  $10^3$ 'e ait PBS ve peynir rneklarine ait SERS karşılaştırması



**Şekil 4.10.**  $10^5$ 'e ait PBS ve peynir örneklerine ait SERS karşılaştırması

SERS yöntemi için;  $10^3$  kob/mL bakteri için PBS tamponunda gerçekleştirdiğimiz deneyde  $1380 \text{ cm}^{-1}$  dalga sayısında bulunan SERS şiddetlerinin ortalaması ( $n=3$ )  $3422 \text{ cm}^{-1}$  iken peynir örneklerindeki sinyal şiddeti ortalaması  $3084,724 \text{ cm}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.9).  $10^5$  kob/mL bakteri için PBS tamponunda gerçekleştirdiğimiz deneyde ise sinyal şiddetlerinin ortalaması ( $n=3$ )  $3878,333 \text{ cm}^{-1}$  iken peynir örneklerindeki sinyal şiddeti ortalaması  $3896,768 \text{ cm}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.10).

Kolorimetrik yöntemde ise;  $10^3$  kob/mL bakteri için PBS tamponunda gerçekleştirdiğimiz deneyde  $\Delta E^*$  ortalaması ( $n=3$ )  $91,1566$  iken peynir örneklerindeki  $\Delta E^*$   $221.221$  olarak hesaplanmıştır.  $10^5$  kob/mL bakteri için PBS tamponunda gerçekleştirdiğimiz deneyde ise  $\Delta E^*$  ortalaması ( $n=3$ )  $116,4613$  iken peynir örneklerindeki  $\Delta E^*$   $227.192$  olarak hesaplanmıştır.

	SERS şiddeti (a.u.) ( $1,5 \times 10^3$ kob/mL)	$\Delta E^*$ ( $1,5 \times 10^3$ kob/mL)	SERS şiddeti (a.u.) ( $1,5 \times 10^5$ kob/mL)	$\Delta E^*$ ( $1,5 \times 10^3$ kob/mL)
<b>Peynir</b>	3422	91,156	3878,333	116,461
<b>PBS</b>	3084,724	221,221	3896,768	227,192

**Çizelge 4.1** Peynir ve PBS örneklerine ait  $1380 \text{ cm}^{-1}$  dalga sayısında bulunan SERS şiddeti ve  $\Delta E^*$  (toplam renk farkı) değerleri

Yukarıda verilen sinyallerden hareketle SERS ve  $\Delta E^*$ 'ye ait kalibrasyon denklemleri kullanılarak geri kazanım değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

<b><i>E. coli</i> (kob/mL)</b>					
	<b>Yöntem</b>	Eklene	Bulunan	Eklene	Bulunan
<b>Peynir</b>	SERS	$3,7 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$0,1 \times 10^3$	$9 \times 10^3$
<b>Peynir</b>	Kolorimetrik	$3,7 \times 10^3$	$3,72 \times 10^3$	$0,1 \times 10^3$	$5,75 \times 10^3$

**Çizelge 4.2** Gerçek örneklerde elde edilmiş geri kazanım değerleri

#### 4.5. Validasyon Deneyle

Geliştirilen yöntemin seçiciliği tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ) değerleri ile tespit edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri; 0,17 M ONPG içeren bakterili örneklerdeki 2-NP'e ait (Şekil 4.3),  $1380 \text{ cm}^{-1}$  noktasından elde edilmiş bağıl SERS şiddetinin kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliğini kullanarak hesaplanmıştır.

LOD ve LOQ değerleri aşağıda verilmiş olan eşitlikleri kullanarak hesaplanmıştır.

$$\text{LOD} = (k_1 \times sb) / b \quad \text{Eşitlik (2)}$$

$$\text{LOQ} = (k_2 \times sb) / b \quad \text{Eşitlik (3)}$$

Eşitlik 2 ve eşitlik 2'de kullanılan sb değeri regresyon bağımsız teriminin standart sapmasını, b değeri ise kalibrasyon eğrisinin eğimini ifade etmektedir.  $k_1$  değeri 3 ve  $k_2$  değeri ise 10 alınarak hesaplamalar yapılmıştır. Eşitlik 2 ve eşitlik 3 sonucu elde edilen LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 10 ve  $10^3$  olarak hesaplanmıştır.

## 5. Sonuç ve Tartışma

Bakterilerin hızlı ve doğru bir şekilde tayin edilmesi günümüzde önem arz eden bir konudur. *E. coli*'nin pek çok suşu olduğu bilinmektedir. Patojenik olan ve olmayan suşlarının hepsi hayatta kalma konusunda diğer bakterilere kıyasla daha dayanıklıdır. Örneğin; *E. coli*'nin patojenik O157 : H7 suşu en tehlikeli suşudur. Kanlı ishale ve sonunda hemolitik üremik sendromuna, ölüme sebep olur [89]. Direnci yüksektir. O157 : H7 pH'ı 2.5 olan ortamlarda bile hayatta kalabilen bir suştur [89]. Konak olmaksızın hayatta kalma potansiyeli yüksek olan bu organizma, aynı zamanda fekal kirlilik indikatörü olma özelliği taşımaktadır. Bu çalışmada *E. coli* tespiti kapsamında çalışılmış ve tayin süresinin kısaltılması, aynı zamanda bütün bakteri konsantrasyonlarında bakterinin tespit edilebilmesi hedeflenmiştir.

Patojen tayininde 2 temel ölçüt vardır. Birincisi, çevre testlerinde ya da klinik uygulamalarda bir algılama sınırı (limit of detection, LOD) gereklidir. İkinci en önemli kıstas ise okumanın yapılacağı araç pahalı olmamalıdır [90].

Günümüzde bakteri tayininde en çok tercih edilen kültür ile bakteri tayini hassas olmasına karşın çok basamaklı ve uzun bir metottur. Bakterinin çoğaltılması için besi yerlerine ihtiyaç duyulur ve minimum 8 ile 24 saat arası süreye ihtiyaç duyulur [31]. Bunlara ek olarak ortama ekilen bakterilerin ürememesi sebebiyle tam tespit edilememesi gibi handikapları olan bir metottur. İşlem süresini kısaltmaya ve uzman yardımına ihtiyaç duyulmadan yapılan tayinlere ihtiyaç artmakta ve bu alanda geliştirilen uygulamalar artmaktadır.

Çalışmanın amacı kolorimetrik bir okuma sağlayarak bakteri tayini sağlamaktır. Kolorimetrik okuma yapılabilmesi için renksiz bir madde olan ONPG'nin  $\beta$ -gal enzimi tarafından hidrolize olması gerekmektedir. ONPG'nin hidrolizi sonucu sarı renkli olan 2-NP oluşur. Çözeltide var olan bakterinin  $\beta$ -gal enzimi ile kolorimetrik tayin yapılması ve bütün bakteri konsantrasyonlarında gözle görülebilir renkli bir değişim yakalanması için ONPG optimizasyonu yapılmıştır. 0,01 M, 0,04 M, 0,06 M, 0,09 M, 0,13 M ve 0,17 M ONPG derişimi denenmiştir. En düşük konsantrasyon olan 0,01 M'de sadece  $10^7$  ve  $10^8$ 'de renk değişimi gözlenmiştir. Diğer konsantrasyonlarda renk değişimi gözlenememiştir. Gözlemlenen renk değişimi yavaş oluşmakta ve rengi açık sarı olmaktadır. Renk değişimi

gözlemlenmediği gibi SERS'te de yanıt alınamamış ve 2-NP saptanamamıştır. 0,17 M ONPG'de bütün konsantrasyonlarda renk değişimi gözlenmiş ve maksimum renk değişimi 2 saati aşmadığı gözlemlenmiştir. Renk değişimi, diğer konsantrasyonlardaki renk değişimine kıyasla daha koyu sarı rengin olduğu gözlemlenmiştir.  $10^7$  ve  $10^8$ 'de turuncuya yakın renk gözlemlenmiş ve ONPG eklendikten sonra anında renk gözlemlenmiştir. 0,17 M ONPG ile SERS sinyali bütün konsantrasyonlarda gözlemlenebilmiştir.

Beta-galaktosidazı açığa çıkartmak için bakteri duvarının parçalanması gerekmektedir. Uygun çözücünün belirlenebilmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Lizozim ve tolüende denemeler yapılmıştır. İki çözücü kıyaslandığında renk dönüşümünde ve SERS sinyallerinde bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Belirlenen ONPG miktarı ile bütün bakteri konsantrasyonlarında renk değişimi gözlenmiştir. Renk değişimini belirlemek için ON Color Measure programı kullanılmış ve bu program ile RGB oranları saptanmıştır. Buradan elde edilen RGB değerleriyle toplam renk farkı,  $\Delta E^*$ , belirlenmiştir. Elde edilen dataların doğruluğu SERS ölçümü ile teyit edilmiştir. Optimize edilen ve elde edilen ONPG konsantrasyonuna göre yöntemin analitik performansı karakterize edilmiştir. Geliştirilen analiz yönteminin peynir örneklerinde de kullanılabilirliği test edilmiştir.

Bakteri tayininde önemli parametrelerden bir tanesi de analiz süresi ve tayin edilen bakterinin miktarıdır. Geliştirilen yöntem ile yüksek konsantrasyondaki bakteriler anında tespit edilebilmiştir. Bunlara ek olarak  $10^1$ - $10^8$  arasındaki bütün bakteriler maksimum 2 saat içinde tespit edilebilmiştir. Gerçek örnek denemelerinde daha hızlı bir renk değişimi gözlemlenmiştir. 20 dakika içinde renk değişiminin net bir şekilde başladığı görülmüştür. Diğer çalışmalara kıyasla  $10^1$  gibi düşük konsantrasyonlarda bile bakterinin tespit edilebildiği gösterilmiştir. Örneğin; Ji ve arkadaşları pozitif yüklü amin-uçlu polyamidoamine dendrimerlerini kullanarak bakterileri yakaladıklarını ve  $1 \times 10^4$  hücre/mL tespit edebildiklerini göstermiştir [91].

Kromojenik substrat olarak literatürde klorofenol kırmızı  $\beta$ -D galaktopiranozid (chlorophenol red  $\beta$ -D-galactopyranoside, CRPG) kullanıldığı ve sistemin tüpte değil kağıtta yapıldığı da gözlemlenilmiştir [90]. Geliştirilen sistemde  $\beta$ -gal'un



partikül ile etkileştirilmesinin gerektiği gösterilmiştir. Bu nanopartikül,  $\beta$ -gal'a tersinir olarak bağlanır ve denaturasyon olmaksızın enzimi inhibe eder [90]. Kolorimetrik okuma bu sayede gerçekleştirilir. Sistemin  $10^4$ - $10^8$  arasında denendiği gözlemlenmiştir. Geliştirdiğimiz sistemde bakterinin partiküle ihtiyaç duyulmaksızın ve  $10^{11}$ 'e kadar rahatlıkla tespit edilebildiği gösterilmiştir.

Geliştirilen yöntemin bakteri tayininde kullanılan diğer düzeneklere kıyasla, genel olarak değerlendirildiğinde, düzeneğin oldukça basit olduğu söylenebilir. Planlanan çalışmalarda yöntemin daha verimli ve gerçek numunelerde etkili olabilmesi koşullarının araştırılması hedeflenmektedir. Ayrıca daha düşük hacimlerdeki örneklerle ve daha düşük ONPG konsantrasyonu ile yeni bir sistemin geliştirilmesi planlanmaktadır.

## 6. Kaynaklar

1. Ahmed, A., Rushworth, J. V., Hirst, N. A. & Millner, P. A. Biosensors for whole-cell bacterial detection. *Clinical Microbiology Reviews*, 27, 631–646, **2014**.
2. Adkins, J. A. *et al.* Colorimetric and Electrochemical Bacteria Detection Using Printed Paper- and Transparency-Based Analytic Devices. *Analytical Chemistry*, 89, 3613–3621, **2017**.
3. Carey, J. R. J. *et al.* Rapid identification of bacteria with a disposable colorimetric sensing array. Supporting info. *Journal of the American Chemical Society*, 133, 7571–6, **2011**.
4. Karim, F. & Fakhrudin, A. N. M. Recent advances in the development of biosensor for phenol: A review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 11, 261–274, **2012**.
5. Lodish, H. F. *et al.* *Molecular Cell Biology*. Book 5, **2008**.
6. Michael T. Madigan, J. M. M. *Mikroorganizmaların Biyolojisi*, **2010**.
7. Weiss, D. S. Bacterial cell division and the septal ring. *Molecular Microbiology* 54, 588–597, **2004**.
8. Maier, R. M. *Environmental Microbiology*, **2009**.
9. Angert, E. R. Alternatives to binary fission in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 214–224, **2005**.
10. Shih, Y.-L., Shih, Y.-L., Rothfield, L. & Rothfield, L. The bacterial cytoskeleton. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 729–54, **2006**.
11. Heijenoort, J. v. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* 11, 25R–36R, **2001**.
12. Engelhardt, H. & Peters, J. Structural Research on Surface Layers: A Focus on Stability, Surface Layer Homology Domains, and Surface Layer–Cell Wall Interactions. *Journal of Structural Biology*, 124, 276–302, **1998**.
13. Moyes, R. B., Reynolds, J. & Breakwell, D. P. Differential staining of bacteria: Gram stain. *Current Protocols in Microbiology*, **2009**.
14. Black, J. G. *Microbiology: Principles and Exploration*, **2012**.

15. Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 4576–4579, **1990**.
16. Daubin, V., Gouy, M. & Perrière, G. A phylogenomic approach to bacterial phylogeny: Evidence of a core of genes sharing a common history. *Genome Research*, 12, 1080–1090, **2002**.
17. Pace, N. R. Mapping the Tree of Life: Progress and Prospects. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73, 565–576, **2009**.
18. Koonin, E. V., Puigbò, P. & Wolf, Y. I. Comparison of Phylogenetic Trees and Search for a Central Trend in the 'Forest of Life'. *Journal of Computational Biology*, 18, 917–924, **2011**.
19. Adams, M. R. & Moss, M. O. *Food microbiology*. *Food Microbiology*, **2000**.
20. Yu, A. C. S., Loo, J. F. C., Yu, S., Kong, S. K. & Chan, T. F. Monitoring bacterial growth using tunable resistive pulse sensing with a pore-based technique. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 855–862, **2014**.
21. Stewart, E. J., Madden, R., Paul, G. & Taddei, F. Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. *PLoS Biology*, 3, 0295–0300, **2005**.
22. Anonim. Bacteria. <http://microbiologyonline.org/about-microbiology/introducing-microbes/bacteria> (Ekim, **2017**).
23. Tenaille, O., Skurnik, D., Picard, B. & Denamur, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 207–217, **2010**.
24. Lanata, C. F. *et al.* Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review. *PLoS One* 8, **2013**.
25. Odonkor, S. T. & Ampofo, J. K. *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. *Microbiology Research (Pavia)*, 4, 2, **2013**.
26. Edberg, S. C., Rice, E. W., Karlin, R. J. & Allen, M. J. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Symposium Series Society for Applied Microbiology*, 106S–116S, **2000**.

27. Priyanka, B., Patil, R. & Dwarakanath, S. A review on detection methods used for foodborne pathogens. *Indian Journal of Medical Research*, 144, 327, **2016**.
28. Halkman, A. K. *Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*, **2005**.
29. Anonim. Mikroskopik Sayım. *Milli Eğitim Bakanlığı*. [http://www.megep.meb.gov.tr/mte\\_program\\_modul/moduller\\_pdf/Mikroskopik\\_Sayim.pdf](http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Mikroskopik_Sayim.pdf) (Ekim, **2017**).
30. Law, J. W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan, K.-G. & Lee, L.-H. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, 5, 770, **2014**.
31. Wang, Y. & Salazar, J. K. Culture-Independent Rapid Detection Methods for Bacterial Pathogens and Toxins in Food Matrices. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 183–205, **2016**.
32. Amani, J., Mirhosseini, S. A. & Imani Fooladi, A. A. A review approaches to identify enteric bacterial pathogens. *Jundishapur Journal Microbiology*, 8, e17473, **2015**.
33. Váradi, L. *et al.* Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future. *Chemical Society Reviews*, 46, 4818–4832, **2017**.
34. Hermanson, G. T. Enzyme Modification and Conjugation. in *Bioconjugate Techniques* 951–957, **2013**.
35. Akolkar, S. K., Sajgure, A. D. & Lele, S. S. beta-galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* isolated from fermented ragi (*Eleusine coracana*). *Indian Journal Biotechnology*, 5, 184–188, **2006**.
36. Juers, D. H., Matthews, B. W. & Huber, R. E. LacZ  $\beta$ -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Science* 21, 1792–1807, **2012**.
37. Uyanık, A. Beta-Galaktosidaz Enziminin Mikrobiyal Hücrelerden İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2008**.
38. Salehi, S. *et al.* Intestinal lactase as an autologous beta-galactosidase reporter gene for in vivo gene expression studies. *Human Gene Therapy*, 20, 21–30, **2009**.

39. Yasemin Kılıç, Zehra Nur Yüksekdağ, H. Y. Lactobacillus ve Bifidobacterium Cinsi Bakterin Beta Galaktosidaz Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi. *GIDA*, **2014**.
40. Heaney, R. P. Dairy Intake, Dietary Adequacy, and Lactose Intolerance. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 4, 151–156, **2013**.
41. Fritz Melchers, W. M. The Activation of Mutant beta - Galactosidase by Specific Antibodies. *European Journal of Biochemistry*, 267–72, **1970**.
42. Bartesaghi, A., Matthies, D., Banerjee, S., Merk, A. & Subramaniam, S. Structure of beta-galactosidase at 3.2-Å resolution obtained by cryo-electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 11709–11714, **2014**.
43. Fowler, A. V. & Zabin, I. Amino acid sequence of beta-galactosidase. XI. Peptide ordering procedures and the complete sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, 253, 5521–5525, **1978**.
44. Kalnins, A., Otto, K., Rütger, U. & Müller-Hill, B. Sequence of the lacZ gene of Escherichia coli. *The EMBO Journal*, 2, 593–7, **1983**.
45. Jacobson, R. H., Zhang, X.-J., DuBose, R. F. & Matthews, B. W. Three-dimensional structure of  $\beta$ -galactosidase from E. coli. *Nature*, 369, 761–766, **1994**.
46. Juers, D. H. *et al.* A structural view of the action of Escherichia coli (lacZ)  $\beta$ -galactosidase. *Biochemistry*, 40, 14781–14794, **2001**.
47. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. Biochemistry, *W H Free*. New York., 320–323, **2002**.
48. Bren, A. *et al.* Glucose becomes one of the worst carbon sources for E.coli on poor nitrogen sources due to suboptimal levels of cAMP. *Scientific Reports – Nature*, 6, 24834, **2016**.
49. Vinothkumar, K. R., McMullan, G. & Henderson, R. Molecular mechanism of antibody-mediated activation of  $\beta$ -galactosidase. *Structure* 22, 621–627, **2014**.
50. Anonim. Lac Operon Structure. <http://cubocube.com/dashboard.php?a=1190&b=1301&c=103>, **Ekim, 2017**.
51. Stoebel, D. M., Dean, A. M. & Dykhuizen, D. E. The cost of expression of Escherichia coli lac operon proteins is in the process, not in the products. *Genetics* 178, 1653–1660, **2008**.

52. Acharya, T. ONPG Test (for beta - galactosidase) : Principle, procedure and results. <https://microbeonline.com/onpg-test-beta-galactosidase-principle-procedure-results> (Ekim, **2017**).
53. Anonim. Enzyme Kinetics: Properties of beta - galactosidase. Available at: <http://biology.kenyon.edu/courses/biol10/110pdfs/15bgal.pdf> (Ekim, **2017**).
54. Anonim. Relation between ONP absorption at 420nm and concentration (used for calculation of  $\beta$ -Galactosidase activity). <http://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?id=105140&ver=3> (Ekim, **2017**).
55. Princeton Instruments. Raman Spectroscopy Basics. [http://web.pdx.edu/~larosaa/Applied\\_Optics\\_464-564/Projects\\_Optics/Raman\\_Spectroscopy/Raman\\_Spectroscopy\\_Basics\\_PRINCETON-INSTRUMENTS.pdf](http://web.pdx.edu/~larosaa/Applied_Optics_464-564/Projects_Optics/Raman_Spectroscopy/Raman_Spectroscopy_Basics_PRINCETON-INSTRUMENTS.pdf) (Ekim, **2017**).
56. Singh, R. C. V. Raman and the Discovery of the Raman Effect. *Physics in Perspective*, 4, 399–420, **2002**.
57. Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry (Google eBook). Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*, **2009**.
58. Moura, C. C., Tare, R. S., Oreffo, R. O. C. & Mahajan, S. Raman spectroscopy and coherent anti-Stokes Raman scattering imaging: prospective tools for monitoring skeletal cells and skeletal regeneration. *Journal of The Royal Society Interface*, 13, 20160182, **2016**.
59. Xu, X. *et al.* Near-field enhanced plasmonic-magnetic bifunctional nanotubes for single cell bioanalysis. *Advanced Functional Materials*, 23, 4332–4338, **2013**.
60. Büyükgöz, G. G. Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi ile DNA Hassas Tayini ve Nanopartiküller Arası Mesafelerin Optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2014**.
61. Bumrah, G. S. & Sharma, R. M. Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences* 6, 209–215, **2016**.

62. Stiles, P. L., Dieringer, J. A., Shah, N. C. & Van Duyne, R. P. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1, 601–626, **2008**.
63. Blackie, E. J., Le Ru, E. C. & Etchegoin, P. G. Single-molecule surface-enhanced raman spectroscopy of nonresonant molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 14466–14472, **2009**.
64. Le Ru, E. C., Blackie, E. J., Meyer, M. & Etchegoin, P. G. Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. *The Journal of Physical Chemistry, C* 111, 13794–13803, **2007**.
65. Nie, S. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science*, 275, 1102–1106, **1997**.
66. Le Ru, E. C., Meyer, M. & Etchegoin, P. G. Proof of single-molecule sensitivity in Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) by means of a two-analyte technique. *The Journal of Physical Chemistry, B* 110, 1944–1948, **2006**.
67. Schlücker, S. Surface-enhanced raman spectroscopy: Concepts and chemical applications. *Angewandte Chemie - International Edition* 53, 4756–4795, **2014**.
68. Camden, J. P. *et al.* Probing the structure of single-molecule surface-enhanced Raman scattering hot spots. *Journal of the American Chemical Society*, 130, 12616–12617, **2008**.
69. Kukushkin, V. I., Van'kov, A. B. & Kukushkin, I. V. Long-range manifestation of surface-enhanced Raman scattering. *JETP Letters*, 98, 64–69, **2013**.
70. Sharma, B., Frontiera, R. R., Henry, A.-I., Ringe, E. & Van Duyne, R. P. SERS: Materials, applications, and the future. *Materials Today* 15, 16–25, **2012**.
71. Sharma, G. Digital Color Imaging Handbook. *CRC Press*, **2003**.
72. ABBAS, M. N. Diffuse Reflectance Spectroscopic Determination of Phosphate with Applications of Chromaticity Coordinates and Color Temperature. *Analytical Sciences*, 19, 1303–1308, **2003**.
73. Curcio, C. A., Sloan, K. R., Kalina, R. E. & Hendrickson, A. E. Human photoreceptor topography. *Journal of Comparative Neurology*, 292, 497–523, **1990**.
74. Stockman, A., MacLeod, D. I. A. & Johnson, N. E. Spectral sensitivities of the human cones. *Journal of the Optical Society of America, A* 10, 2491, **1993**.

75. Wallace, M. B., Wax, A., Roberts, D. N. & Graf, R. N. Reflectance Spectroscopy. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America* 19, 233–242, **2009**.
76. Stockman, A. & Brainard, D. H. Color vision mechanisms. *The Optical Society of America Handbook of Optics*, 11.1–11.104, **2010**.
77. Rattani, A. & Derakhshani, R. Ocular biometrics in the visible spectrum: A survey. *Image and Vision Computing* 59, 1–16, **2017**.
78. Bohren, C. F. & Clothiaux, E. E. *Fundamentals of Atmospheric Radiation: An Introduction with 400 Problems. Fundamentals of Atmospheric Radiation: An Introduction with 400 Problems*, **2008**.
79. Smith, T. & Guild, J. The C.I.E. colorimetric standards and their use. *Transactions of the Optical Society*, 33, 73–134, **1931**.
80. Zanjanchi, M. A., Noei, H. & Moghimi, M. Rapid determination of aluminum by UV-vis diffuse reflectance spectroscopy with application of suitable adsorbents. *Talanta* 70, 933–939, **2006**.
81. Weber, K., Thomaschewski, M., Benten, D. & Fehse, B. RGB marking with lentiviral vectors for multicolor clonal cell tracking. *Nature Protocols*, 5, 839–849, **2012**.
82. Berns, R., Billmeyer, F. & Saltzman, M. Principles of color technology. *Journal of Dentistry*, 247, **2000**.
83. Susstrunk, S., Buckley, R. & Swen, S. Standard RGB Color Spaces. *New York*, 127–134, **1999**.
84. Poynton, C. Digital Video and HDTV Algorithms and Interfaces (Book). *Choice: Current Reviews for Academic Libraries*, 40, 1940, **2003**.
85. Yamaguchi, M., Haneishi, H. & Ohyama, N. Beyond Red – Green – Blue ( RGB ): Spectrum-Based Color Imaging Technology. *Journal of Imaging Science and Technology*, 1–15, **2008**.
86. Pascale, D. A review of RGB Color Spaces. [http://www.babelcolor.com/index\\_htm\\_files/A review of RGB color spaces.pdf](http://www.babelcolor.com/index_htm_files/A%20review%20of%20RGB%20color%20spaces.pdf) (Ekim, **2017**).
87. HunterLab, CIE L\*a\*b\* Color Scale, <https://www.hunterlab.se/wp-content/uploads/2012/11/CIE-L-a-b-.pdf> (Kasim, **2017**).
88. Bicchierini, M., Davalli, A., Sacchetti, R. & Paganelli, S. Colorimetric analysis of silicone cosmetic prostheses for upper-limb amputees. *The Journal of Rehabilitation Research and Development*, 42, 655, **2005**.



89. van Elsas, J. D., Semenov, A. V, Costa, R. & Trevors, J. T. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME Journal*, 5, 173–183, **2011**.
90. Miranda, O. R. et al. Colorimetric bacteria sensing using a supramolecular enzyme-nanoparticle biosensor. *Journal of the American Chemical Society*, 133, 9650–9653, **2011**.
91. Ji, J., Schanzle, J. A. & Tabacco, M. B. Real-Time Detection of Bacterial Contamination in Dynamic Aqueous Environments Using Optical Sensors. *Analytical Chemistry*, 76, 1411–1418, **2004**.

## Özgeçmiş

### **Kimlik Bilgileri**

Adı Soyadı : Miray İzgen Canver

Doğum Yeri : Ankara / Türkiye

Medeni Hali : Bekar

E-posta : izgencanver@gmail.com

### **Eğitim Bilgileri**

Lise: Ankara Anıttepe Lisesi, Ankara

Lisans: Fatih Üniversitesi – Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, İstanbul (2008-13)

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi – Biyomühendislik, Ankara (2016 – 2018)

### **Yabancı Dil ve Düzeyi**

Türkçe: Ana Dil

İngilizce: İleri Düzey

Fransızca: Başlangıç Düzeyi

İspanyolca: Başlangıç Düzeyi

### **İş Deneyimi**

-

### **Deneyim Alanları**

Raman Spektroskopisi, Hücre Kültürü

### **Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi**

-

### **Tezden Üretilmiş Yayınlar**

-

### **Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar**

-



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

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

Tarih: 29/01/2018

Tez Başlığı / Konusu: ENZİMATİK TABANLI BAKTERİYEL BİYOSENSÖR

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 49 sayfalık kısmına ilişkin, 29/01/2018 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

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

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

Gereğini saygılarımla arz ederim.

30.01.2019  
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: MİRAY İZGEN CANVER

Öğrenci No: N15225831

Anabilim Dalı: BİYOMÜHENDİSLİK

Programı: BİYOMÜHENDİSLİK

Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Neccet Sağlam