

***E. coli* TAYİNİ İÇİN ALTIN SELÜLOZ NANOFİBRİL
MATERYAL GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPING GOLD CELLULOSE NANOFIBRIL
MATERIAL for *E. coli* DETECTION**

SALİHA NUR TANIŞ

PROF. DR NECDET SAĞLAM

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2019

SALİHA NUR TANIŞ'ın hazırladığı "**E. coli** Tayini İçin Altın Selüloz Nanofibril Materyal Geliştirilmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

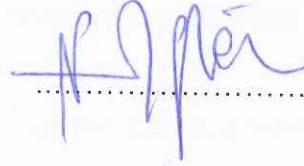
Prof. Dr. Uğur TAMER

Başkan



Doç. Dr. Necdet SAĞLAM

Danışman



Prof. Dr. Mustafa TÜRK

Üye



Dr. Öğr. Üyesi Mesut ŞAM

Üye



Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Doğan AŞIK

Üye



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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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 değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

24/07/2019

Saliha Nur Tanış

SALIHA NUR TANIŞ

YAYINLANMA 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.

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

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

24 / 07 / 2019

SALIHA NUR TANIŞ

ÖZET

***E. coli* TAYİNİ İÇİN ALTIN SELÜLOZ NANOFİBRİL MATERYAL GELİŞTİRİLMESİ**

Saliha Nur TANIŞ

**Yüksek Lisans, Biyomühendislik Bölümü
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM
Haziran 2019, 73 sayfa**

Tez kapsamında Raman teknikleri ve Raman haritalandırma yöntemi kullanılarak *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterisi için tayin yöntemi geliştirilmiştir. Öncelikle altın çubuk nanopartiküller sentezlenmiş ve yüzeyine, yüzeyde zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi (SERS) etiket molekülü olan DTNB (5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit) tutturulmuş ve *E. coli* bakterisine özgü antikorlarla etkileştirilerek modifiye edilmiştir. Sonrasında selüloz nanofibril çözeltisine Altın (III) klorür çözeltisi (HAuCl_4) eklenmiş ve yüksek sıcaklıkta etkileşime bırakılmıştır. Süre sonunda altın çözeltisi nano boyuta geçmiştir. Hazırlanan bu çözelti kurutularak su içeriği uzaklaştırılmış ve sonuçta kağıt benzeri altın selüloz nanofibril bir yüzey elde edilmiştir. Elde edilen yüzey, *E. coli* bakterisine özgü antikorlarla etkileştirilerek modifiye edilmiştir. Modifiye altın selüloz nanofibril yüzeylerle farklı konsantrasyonlarda *E. coli* çözeltileri etkileştirilmiş ve *E. coli* bakterilerinin yüzeye tutunmaları sağlanmıştır. *E. coli* bağlı altın selüloz nanofibril yüzeyler altın çubuk nanopartiküllerle etkileştirilmiş ve SERS ölçümleri alınmıştır. Geliştirilen yöntemle elde edilen doğrusal aralık; $1,5 \times 10^1$ - $1,5 \times 10^5$ kob/mL bakteri olarak hesaplanmıştır. Tayin limiti 2 kob/mL bakteri olarak belirlenmiştir. Analiz süresi; modifiye altın selüloz nanofibril yüzeyle bakteri etkileşim süresi 30 dakika

ve modifiye yüzeye tutturulmuş bakteri ile modifiye altın çubuk nanopartikül etkileşim süresi 30 dakika olmak üzere toplamda 1 saattir. Geliştirilen yöntemin Raman haritalandırma yöntemi kullanılarak hedef molekülün (DTNB) yüzey üzerindeki dağılım yoğunluğu görsel olarak gösterilerek elde edilen sonuçlar desteklenmiştir. Son olarak geliştirilen tayin yöntemi, biyolojik örnek olarak marul üzerinde test edilmiştir. Tez kapsamında geliştirilen yöntemin düşük konsantrasyonlarda *E. coli* bakterisini tayin edebildiği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakteri tayini, *E. coli*, SERS, Raman Haritalandırma, Selüloz Nanofibril, Altın Çubuk Nanopartikül

ABSTRACT

DEVELOPING GOLD CELLULOSE NANOFIBRIL MATERIAL for *E. coli* DETECTION

Saliha Nur TANIŞ

Master of Science, Bioengineering Department

Advisor: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM

June 2019, 73 pages

In this thesis, a method for the detection of *Escherichia coli* (*E. coli*) bacteria was developed using Raman techniques and Raman mapping methods. Firstly, gold nanorod particles were synthesized and subsequently surface functionalized with a strengthened DTNB (5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)) molecule which is a tagging molecule for surface enhanced Raman spectroscopy (SERS). They were then modified by interacting with antibodies specific to *E. coli* bacteria. Afterwards, into a cellulose nanofibril solution, Gold (III) chloride solution (HAuCl₄) was added and was allowed to interact at a high temperature. By the end of the interaction period, the gold solution had become nano-sized. This solution was dried to remove the water content, resulting in a paper-like gold cellulose nanofibril hybrid surface. The resulting surface was modified by interacting with antibodies specific to *E. coli*. Modified gold cellulose nanofibril surfaces were interacted with different concentrations of *E. coli* solutions and *E. coli* bacteria were attached to the surface. *E. coli* bound gold cellulose nanofibril surfaces were interacted with gold nanorod and SERS measurements were taken. The linear range obtained by the developed method was calculated as $1.5 \times 10^1 - 1.5 \times 10^5$ cfu/mL bacteria. The limit of detection was determined as 2

cfu/mL bacteria. Analysis period: the time of interaction between the bacteria and the modified gold cellulose nanofibril surface was 30 minutes and the modified gold nanorod particle interaction time with bacteria attached to the modified surface was 30 minutes, resulting in the total interaction time being 1 hour. By using the Raman mapping method of the developed technique, the distribution density of the target molecule (DTNB) on the surface was shown visually and subsequently the results were found to be supported. Finally, this newly developed determination method was first tested on lettuce as a biological sample. It has been shown that the method developed within the scope of the thesis can detect *E. coli* bacteria at low concentrations.

Key Words: Bacteria detection, *E. coli*, SERS, Raman Mapping, Cellulose Nanofibril, Gold Nanorod

TEŞEKKÜR

Kendisiyle çalışma fırsatı bulduğum, tez çalışmalarımı yürütebilmek için bana destek veren ve bilgi birikimi ile akademik hayatıma değer katan tez danışmanım saygıdeğer Prof. Dr. Necdet SAĞLAM'a;

Tez çalışmalarımı yürütebilmem için bana laboratuvarını açan, deneysel süreçlerin planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde bana bilgi birikimiyle yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. Uğur TAMER'e;

Tez çalışmalarım için bakteri kültürlerini laboratuvarından temin ettiğim Sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI'ya ve başta Emine Kübra TAYYARCAN olmak üzere tüm laboratuvar çalışanlarına;

Tezimin ortaya çıkmasında büyük yardımlarını gördüğüm sayın Arş. Gör. Hasan İLHAN'a ve Arş. Gör. Burcu GÜVEN'e ve tezimin şekillenmesinde büyük katkıları olan, her zaman sevgiyle anacağım Arş. Gör. Hilal TORUL'a;

İhtiyaç duyduğum her an benden yardımlarını esirgemeyen Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nin akademisyenlerinden sayın Arş. Gör. Esin Nagihan KASAP'a, Arş. Gör. Merve ERYILMAZ'a, Arş. Gör. Üzeyir DOĞAN'a ve Prof. Dr. Zekiye SULUDERE'ye;

Yüksek lisans eğitimimde tanıştığım; özverisine, yardımseverliğine, zekasına ve esprilerine hayran olduğum, tezimin ortaya çıkmasında en büyük destekçim ve her zaman yanımda olmasını isteyeceğim sevgili dostum Miray İzgen CANVER'e;

Hayattaki en büyük şansım, beni benden çok düşünen, tez çalışmalarımın zorlu dönemlerinde bile bana katlanabilen; anneme, babama, kardeşime, teyzeme, kuzenime, dedelerime, arkadaşlarıma ve tüm aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Bakteriler	4
2.1.1. Sitoplazamik Yapı	5
2.1.2. Hücre Duvarı	6
2.2. Escherichia coli	6
2.3. Bakteri Tayin Yöntemleri	7
2.3.1. Kültür Temelli Metotlar	8
2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	9
2.3.3. Akım Sitometrisi	10
2.3.4. Biyosensörler	11
2.4. Raman Spektroskopisi	12
2.4.1. Raman Haritalandırma Yöntemi	12
2.4.2. Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi	13
2.5. Nanoselüloz	14
2.5.1. Selüloz Nanokristal	17
2.5.2. Bakteriyel Nanoselüloz	17
2.5.3. Selüloz Nanofibril	18
2.5.4. Nanoselülozun Yüzey Modifikasyonları	19
2.6. Altın Nanopartiküller	20
2.6.1. Altın Çubuk Nanopartiküller	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23

3.1. Kimyasal Maddeler.....	23
3.2. Çözeltiler	23
3.3. Altın Selüloz Nanofibril Yüzeyin Hazırlanması	25
3.4. Altın Çubuk Nanopartikül Sentezi	27
3.5. Altın Selüloz Nanofibril Yüzeylerin Modifikasyonu	29
3.6. Modifiye Altın Selüloz Nanofibril Yüzeyin Bakteri ile Etkileştirilmesi....	32
3.7. <i>E. coli</i> Bağlı Altın Selüloz Nanofibril Yüzeylerle Modifiye Altın Çubuk Nanopartiküllerin Etkileştirilmesi.....	32
3.8. Altın Çubuk Nanopartiküllerin Modifikasyonu	33
3.9. Kullanılan Mikroorganizmalar	35
3.10. Cihazlar ve Gereçler	36
3.11. Yöntem.....	38
3.11.1. Optimizasyon Deneyleri.....	38
3.11.1.1. Selüloz Nanofibril Çözeltisine Eklenen H _{Au} Cl ₄ Çözeltisi Konsantrasyonunun Optimizasyonu	38
3.11.1.2. Altın Çubuk Nanopartikül Miktarının Optimizasyonu	39
3.11.1.3. Modifiye Selüloz Nanofibril Yüzeyle <i>E. coli</i> 'nin Etkileşim Süresi Optimizasyonu.....	39
3.11.2. Geliştirilen Yöntemin Seçiciliğinin Test Edilmesi.....	40
3.11.3. SERS Ölçümleri.....	40
3.11.4. Raman Haritalandırması	41
3.11.5. Biyolojik Örnek Denemesi.....	41
3.11.6. SEM Görüntüsü İçin Örneklerin Hazırlanması	43
4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR VE BULGULAR	44
4.1. Altın Çubuk Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	44
4.2. Optimizasyon Deneyleri	48
4.2.1. Selüloz Nanofibril Çözeltisine Eklenen H _{Au} Cl ₄ Çözeltisi Konsantrasyonunun Optimizasyonu	48
4.2.2. Altın Çubuk Nanopartikül Miktarının Optimizasyonu.....	49
4.2.3. Modifiye Selüloz Nanofibril Yüzeyle <i>E. coli</i> 'nin Etkileşim Süresi Optimizasyonu.....	50
4.3. Geliştirilen Yöntemin Seçiciliğinin Test Edilmesi	52
4.4. SERS Sonuçları ve Kalibrasyon Eğrisi.....	53

4.5. Raman Haritalandırması.....	57
4.6. Biyolojik Örnek Denemesi	59
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	60
6. KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Karşılaştırmalı ribozomal RNA dizileme yöntemine göre ayrılmış soy hattı.....	4
Şekil 2.2. Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin hücre duvarı yapıları.....	5
Şekil 2.3. Kültür yöntemiyle tayin	9
Şekil 2.4. PCR'ın basamakları.....	10
Şekil 2.5. Florasan ve optik işaretleyicilerle akım sitometri yöntemiyle bakteri tayini.....	10
Şekil 2.6. Biyosensörlerin çalışma prensibi.....	12
Şekil 2.7. Raman (solda) ve SERS (sağda) teknikleri	13
Şekil 2.8. Tekli selüloz zincirin tekrar eden yapısı, 1-4 bağlantısının yönü ve molekül içi hidrojen bağı.....	14
Şekil 2.9. Selüloz nano malzemelerin sınıflandırılması	15
Şekil 2.10. Selüloz nanofibrilin kristal ve amorf bölgelerinin kuramsal konfigürasyonu.....	16
Şekil 2.11. Altın nanopartikül sentez yöntemleri: a) Turgeevich metodu b) Brust metodu	21
Şekil 3.1. Au selüloz nanofibril yüzeylerin modifikasyon işleminin şematik gösterimi.....	30
Şekil 3.2. Au çubuk nanopartiküllerin modifikasyon işleminin şematik gösterimi.....	33
Şekil 3.3. Altın selüloz nanofibril yüzeyin ve altın çubuk nanopartikülün modifikasyonları sonucunda geliştirilen bakteri tayin yönteminin şematik gösterimi.....	35
Şekil 4.1. Altın çubuk nanopartiküllerin UV-GB absorpsiyon spektrumu.....	44
Şekil 4.2. Altın çubuk nanopartiküllerin TEM görüntüsü.....	45
Şekil 4.3. Selüloz nanofibril yüzeyin TEM görüntüleri a) selüloz nanofibril yüzey ve ağısı yapısı b) altın selüloz nanofibril yüzey c) Modifiye altın selüloz nanofibril yüzeye tutunmuş <i>E. coli</i> bakterisi d) Modifiye altın selüloz nanofibril yüzeye tutunmuş <i>E. coli</i> bakterisi.....	47

Şekil 4.4. Artan miktarlarda eklenen H ₂ AuCl ₄ çözeltisinin sabit <i>E. coli</i> derişimlerinde elde edilen SERS sinyallerinin oransal olarak karşılaştırılması a)50 µL H ₂ AuCl ₄ çözeltisi b)100 µL H ₂ AuCl ₄ çözeltisi c)150 µL H ₂ AuCl ₄ çözeltisi d)200 µL H ₂ AuCl ₄ çözeltisi e)250 µL H ₂ AuCl ₄ çözeltisi.....	49
Şekil 4.5. Artan miktarlarda altın çubuk nanopartikül çözeltisinin sabit <i>E. coli</i> derişimlerinde <i>E. coli</i> ile etkileştirilmiş altın selüloz nanofibril yüzeyden elde edilen Raman sinyallerinin oransal olarak karşılaştırılması a)50µL altın çubuk nanopartikül çözeltisi b)100 µL altın çubuk nanopartikül c)150 µL altın çubuk nanopartikül çözeltisi d)200 µL altın çubuk nanopartikül çözeltsi e)250 µL altın çubuk nanopartikül çözeltisi.....	50
Şekil 4.6. Artan sürelerde modifiye altın selüloz nanofibril yüzey ile etkileşime bırakılan sabit <i>E. coli</i> derişimlerinde elde edilen Raman sinyallerinin oransal olarak karşılaştırılması a)1 dakika b)15 dk c)30 dk d)45 dk e)60 dk.....	51
Şekil 4.7. <i>M. luteus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. coli</i> ve kör numune kullanılarak gerçekleştirilen deneylerden elde edilen SERS sinyal şiddetlerinin karşılaştırılması.....	52
Şekil 4.8. Artan <i>E. coli</i> konsantrasyonuna karşı DTNB etiket molekülünden elde edilen SERS spektrumları ve sinyal şiddetleri a) kör b) $1,5 \times 10^1$ c) $1,5 \times 10^2$ d) $1,5 \times 10^3$ e) $1,5 \times 10^4$ f) $1,5 \times 10^5$ g) $1,5 \times 10^6$ h) $1,5 \times 10^7$	54
Şekil 4.9. $1,5 \times 10^1$ - $1,5 \times 10^7$ kob/mL <i>E. coli</i> bakterisinin doğrusal olmayan kalibrasyon eğrisi.....	55
Şekil 4.10. Farklı <i>E. coli</i> ($1,5 \times 10^1$ - $1,5 \times 10^5$ kob/mL) konsantrasyonlarına karşı DTNB molekülünün 1330 cm^{-1} bandından elde edilen SERS sinyal şiddetlerinin gösterildiği kalibrasyon eğrisi.....	56
Şekil 4.11. Farklı <i>E. coli</i> konsantrasyonlarında DTNB molekülünün 1330 cm^{-1} bandından elde edilen sinyaller kullanılarak elde edilen Raman haritalandırma görselleri a) kör b) $1,5 \times 10^1$ c) $1,5 \times 10^2$ d) $1,5 \times 10^3$ e) $1,5 \times 10^4$ f) $1,5 \times 10^5$	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Eklenen ve bulunan <i>E. coli</i> bakteri sayısı.....	59
--	----

RESİMLER DİZİNİ

Resim 2.1. CNC süspansiyonu (%12 katı içerik) (solda) ve TEM görüntüsü (sağda).....	17
Resim 2.2. Selüloz nanofibril jel formu (%3 katı içerik).....	19
Resim 3.1. Altın selüloz nanofibril çözeltisi.....	26
Resim 3.2. Kurutulmuş altın selüloz nanofibril yüzey.....	27
Resim 3.3. Seed çözeltisi.....	28
Resim 3.4. Altın çubuk nanopartikül çözeltisi.....	29
Resim 3.5. Altın Selüloz Nanofibril Yüzeyler.....	32
Resim 3.6. Soldan sağa sırasıyla 50, 100, 200, 250, 300 μ L H _{Au} Cl ₄ çözeltisi eklenmiş selüloz nanofibril çözeltileri.....	39
Resim 3.7. Raman Spektroskopi Cihazı.....	41
Resim 3.8. Stomacher cihazı (solda), PBS çözeltisi içinde homojenize edilmiş marul çözeltisi (sağda).....	42

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

MΩ.cm	Direnç
°C	Derece Celsius
λ	Uyarma Dalga Boyu
σ	Regresyon Katsayısının Standart Sapması
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
dk	Dakika
gr	Gram
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mW	Miliwatt
nm	Nanometre
pH	Potansiyel Hidrojen
rpm	Revolution per Minute; Dakikadaki Devir Sayısı
R ²	Regresyon Katsayısı
S	Kalibrasyon Eğrisinin Eğimi

Kısaltmalar

11-MUA	11-Merkaptoundekanoik asit
BNC	Bakteriyel Nanoselüloz
BSA	Sığır Serum Albümin
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CCD	Charge Coupled Device: Kemilüminesans Kamera
CNC	Selüloz Nanokristal
CNF	Selüloz Nanofibril
CTAB	Heksadesiltrimetil Amonyum Bromür
DKID ₅₀	Doku Kültürü İnfektif Doz

DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DTNB	(5,5'-Dithobis (2-nitrobenzoik asit)
<i>E. aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodimid hidroklorür
FT-Raman	Fourier Dönüşümlü Raman
<i>G. xylinus</i>	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>
HAuCl ₄	Hidrojen Tetrakloro Aurat; Altın (III) Klorür
Kob	Colony Forming Unit (cfu); Koloni Oluşturan Birim
LB Besiyeri	Luria-Bertani Besiyeri
LOD	Limit of Detection; Tayin Limiti
LOQ	Limit of Quantification; Ölçüm Limiti
MES	2-(N-morfolino) etanesulfonik asit
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
NHS	N-hidrosisülfosüksinimid tuzu
PBS	Phosphate Buffered Saline; Fosfat Tamponu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu; Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribozomal RNA
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SERS	Surface Enhanced Raman Spectroscopy; Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi
Spp	Species; Türler
TAPPI	Kağıt Hamuru ve Kağıt Endüstrisi Teknik Birliği
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TEMPO	(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il) oksil
UV-GB	Ultraviyole Görünür Bölge

1.GİRİŞ

Bakteriler; ekolojik dengenin korunması için kilit canlılardır ancak bazı türleri insanlarda ciddi hastalıklara sebebiyet verirler. Bunlardan bazıları; bubonik veba (*Yersinia pestis*), tüberküloz (*Mycobacterium tuberculosis*), kolera (*Vibrio cholerae*), streptokok enfeksiyonu (*Streptomyces*) şarbon (*Bacillus anthracis*) ve gıda zehirlenmesidir (*Escherichia coli*'nin ve *Salmonella*'nın belirli türleri) [1]. Patojen olan bu bakteriler dokulara zarar vererek ya da salgıladıkları bakteriyel ürünler olan endotoksin ve ekzotoksinlerle insan sağlığını tehdit etmektedirler [2]. Ancak tüm bakteriler insanlarda hastalık oluşturmaz; aksine vücutta normal olarak yerleşik bulunan bakteriler besinlerin sindiriminde yardımcı rol oynar, bir takım büyüme faktörlerini salgırlar, patojen mikroorganizmalara karşı vücudu korurlar ve immün yanıt oluşumunu tetiklerler. Bu bakteriler, normal olarak kolonize oldukları vücut bölgelerinde zararsız ve hatta yararlı iken doğal ortamlarından farklı bölgelere yayıldıklarında enfeksiyona sebep olma potansiyeline sahiptir. Örneğin *Escherichia coli* (*E. coli*) insanların mide ve bağırsaklarında doğal olarak yaşayan enterik bir bakteridir ancak *E. coli* ile kontamine olmuş su, meyve, sebze ya da süt gibi gıdaların tüketilmesi sonucu gastrointestinal hastalıklara sebebiyet verebilir [3, 4]. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 verilerine göre dünyada her yıl gıda ve su kaynaklı ishalli hastalıklar tahminen 2 milyon kişinin ölümüne sebep olmaktadır [5].

İnsan sağlığının korunması amacıyla su ve gıda kaynaklarının güvenilirliğinin test edilmesi için pek çok bakteri tayin yöntemi geliştirilmiştir. Bakteri tayininde klasik/geleneksel yöntemler uzun sürede gerçekleştirilen, zahmetli ve el becerisi gerektiren yöntemlerdir. Hızlı ve hassas tanı hasta hayatı için kritik öneme sahip olduğundan son yıllarda çok daha pratik yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları; floresans, yüzey plazmon rezonansı, enzim bağlı bağışıklık testi (ELISA), immünoşansör tabanlı yöntemler, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), kuartz kristal mikrobals (QCM), amperometri ve yüzeyde zenginleştirilmiş

Raman spektrometrisi (SERS) gibi hızlı ve hassas yöntemlerdir. SERS; altın, gümüş gibi metal yapıların yüzeyleri üzerinden birkaç Angstrom mesafe kadar uzağında bulunan moleküllerin elastik olmayan foton saçılmasına dayanır. Belirli dalga boyunda gönderilen ışın ile metal yüzeyin etkileşmesi sonucu metal yüzey üzerinde kuvvetlenmiş bir elektromanyetik alan oluşur. Oluşan bu alan sonucu saçılmalara ait sinyaller kuvvetlendirilmiş bir şekilde elde edilir ve daha hassas ölçümlerin yapılması sağlanır. Bu tez çalışmasında SERS yöntemi; yüksek duyarlılığa sahip olduğu, tekrarlanabilir sonuçlar verdiği, hassas ve hızlı tayine olanak sağladığı ve saha içinde de kullanılabildiği için seçilmiştir. Hassasiyeti ve seçiciliği yüksek SERS ölçümleriyle alınan sinyalleri, 10^3 ila 10^6 kez artırabilen lokalize yüzey plazmonları oluşturan nano yapılar kullanılır [6].

Ayrıca bu tez çalışmasında temel bilimlerde, mühendislik alanında ve medikal sektörde oldukça sık kullanılan ve gelişen teknoloji ile araştırma alanını gün geçtikçe arttıran nanoteknolojik ürünlerden de faydalanılmıştır. Nanoteknoloji; nanometre boyutunda olan materyal ve aletlerin sentezi ve karakterize edilmesi ile ilgili bir bilim dalıdır. Nanoteknolojinin geliştirilmesi ve uygulanmasının artması; potansiyel yenilenebilir biyomateryallerin kullanımını arttırırken tedarik zincirinin maliyetini azaltacak dolayısıyla çevresel açıdan baktığımızda orman ürünleri açısından gelişebilecek sistemsel rekabetin azalması yönünde büyük bir fayda sağlayacaktır.

Günümüzde biyomalzemelerin araştırılması ve kullanılması konusundaki çalışmalar oldukça artmış durumdadır. Son zamanlarda gelecek vaad eden nanoselüloz malzemeler de bu konuda ilgi çekici hale gelmiştir. Tıptan mühendisliğe kadar geniş bir alanda kullanım potansiyeline sahip olan ve nanoselülozun bir çeşidi olarak sınıflandırılmış selüloz nanofibriller bu tez çalışmasında kullanılan materyaldir. Kolay temin edilebilir, ucuz, biyobozunur olması sebebiyle bakteri tayininde kullanıldıktan sonra bertaraf edilebilen selüloz nanofibril, modifikasyon işlemleri sayesinde bakteri tayininde kullanılabilir bir özellik kazanmıştır.

Bu tez çalışmasında seçilen materyal olan selülöz nanofibril ise lignoselülozik kaynaklardan üretilen ve kimyasal ve fiziksel özellikleri sayesinde son ürüne

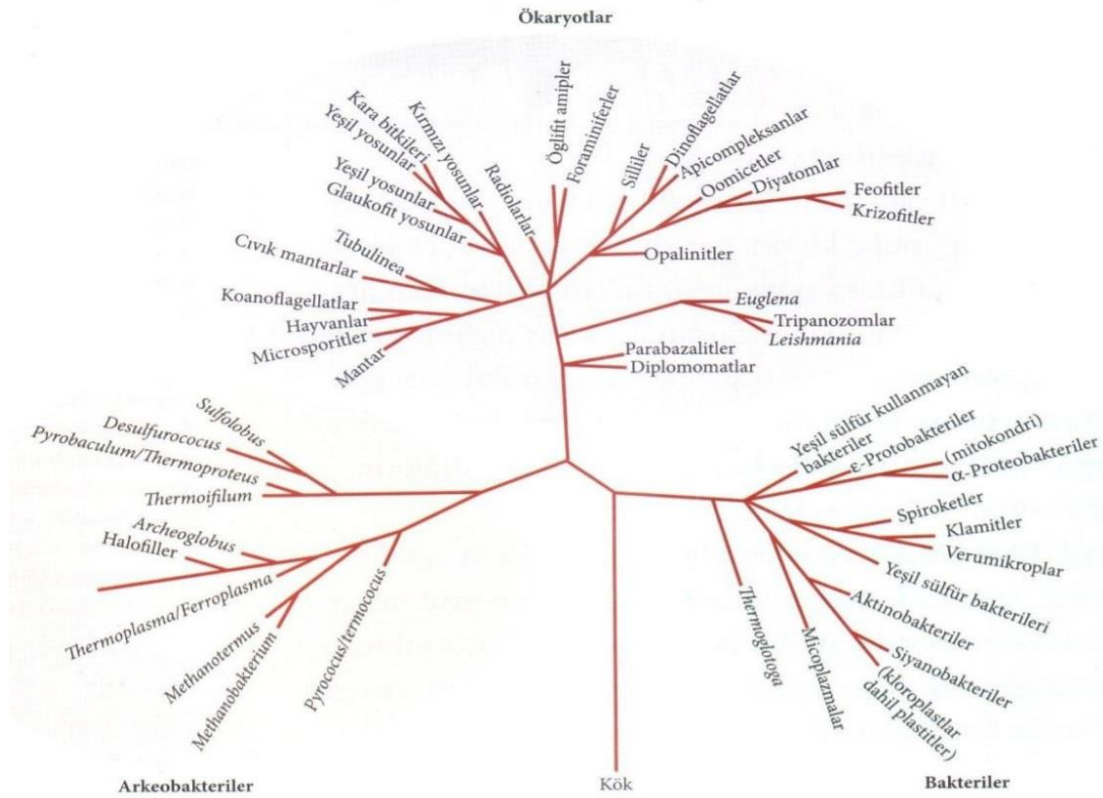
olumlu donanımlar kazandıran bir hammadde kaynağıdır [7]. Ayrıca esnek, tek kullanımlık ve kullanılıp atılabilen bir malzeme olması dolayısı ile de bakteri tayininde gelecek vaad eden bir materyal olduğunu söylemek mümkündür. SERS substratı olarak kullanımıyla ilgili literatürde artan sayıda çalışmalar mevcuttur. Ayrıca, gümüş ve altının nano boyuta indirgenmiş partikülleri de SERS ölçümlerinde sinyal şiddetini arttırmak ve yüzey modifikasyonlarını sağlamak amacıyla kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında; altın çubuk nanopartiküller sentezlenmiş ve daha sonra altın nanoçubuklar SERS sinyalleri alabilmek için DTNB (5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) molekülleri ile etiketlenmiştir. *E. coli*'ye spesifik olacak şekilde modifikasyon işlemleri yapıldıktan sonra miktar optimizasyonları da yapılmıştır. Selülöz nanofibril malzeme Altın (III) klorür çözeltisi (HAuCl₄) ile etkileştirilip *E. coli*'ye özgü olacak şekilde modifiye edilmiştir. Bu sayede bakteri tayininde kullanılmak üzere tek kullanımlık ve esnek yapıda bir yüzey elde edilmiştir. Bu yüzeyden elde edilen SERS sinyal şiddetleri yardımıyla kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Ayrıca SERS yönteminde haritalandırma metoduyla elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Daha sonra bilinen miktarlarda *E. coli*'nin eklendiği marul numunelerinde geliştirilen yöntem uygulanarak *E. coli* miktarları hesaplanmış ve LB katı besiyerinde sayımı yapılarak elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Böylelikle geliştirilen yöntemin gerçek numunelere uygulanabilirliği ve güvenilirliği gösterilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bakteriler

Canlılar; son bilimsel gelişmelerle birlikte karşılaştırmalı ribozomal RNA dizileme yöntemiyle filogenetik olarak 3 ayrı soy hattına ayrılmaktadır. Bu soy hatları yani domainler; Arkealar (Archea), Bakteriler (Bacteria) ve Ökaryalar (Eukarya) olarak adlandırılmıştır [8] (Şekil 2.1).

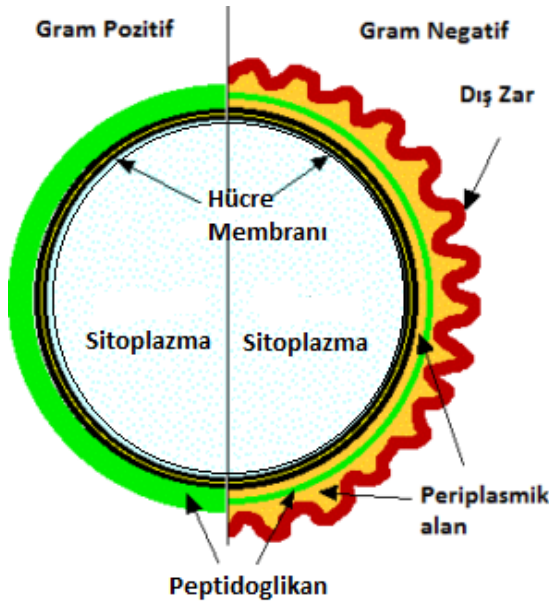


Şekil 2.1. Karşılaştırmalı ribozomal RNA dizileme yöntemine göre ayrılmış soy hattı [9].

Arkealar ve Bakteriler prokaryot hücre tipine sahip canlılardan oluşurlar. Prokaryotik hücreler; plazma zarı ile çevrili, çekirdek zarından yoksun ve nispeten basit yapılı organizasyonlardan oluşurlar. Bilinen prokaryotların büyük kısmını oluşturan bakteriler tek hücrelidir. Bakterilerin zarla çevrili organelleri yoktur,

onları çevrelerine karşı koruyan hücre duvarlarında peptidoglikan bulunur. Hücre duvarı olmayan bakteriler de mevcuttur ve bu dezavantajı hipertonic ortamda ya da konak hücrenin içinde yaşamını sürdürerek giderirler. 70S ribozomu kullanırlar. Boyutları genellikle 1-10 µm arasındadır.

Bakteriler hücre duvarı yapısına göre kalın peptidoglikan tabaka içerenler gram pozitif; ince peptidoglikan tabaka ve üzerini örten dış zarlı olanlar gram negatif olmak üzere 2 farklı şekilde adlandırılır [1, 3] (şekil 2.2). Bakteriler morfolojik olarak 3 temel şekilden birine sahip olabilir; küresel (kok), çubuk (basil/rod) ya da kavisli (virgöl/vibrio, spiral ya da spiroket) [4].



Şekil 2.2. Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin hücre duvarı yapıları [10].

2.1.1. Sitoplazmik Yapı

Bakteri hücrelerinin sitoplazmasında; proteinler, enzimler, karbonhidratlar, amino asitler, ribozomlar, besleyici granüller metabolitler, lipidler ve DNA kromozomu gibi yapılar bulunmaktadır. Nükleoid denilen bölgede bulunan bakteri kromozomu dairesel, tek ve çift iplikli bir yapıdadır. Sitoplazmadaki plazmidler; birçok bakteride çift iplikli, dairesel, kendi kromozomları dışında bulunan DNA molekülleridir. Plazmidler gram negatif bakterilerde daha çok bulunmaktadır ve bakterinin yaşamı için elzem değildirler. Ancak bakteriler; bünyelerinde

bulundurdukları plazmidler sayesinde pek çok karakteristik özelliklerini kazanır ve antibiyotiklere karşı dirençli hale gelir.

2.1.2. Hücre duvarı

Bakterilerin hücre duvarı bakteriyi çepeçevre saran bir kılıftır ve şekerlerin ve aminoasitlerin bir polimeri olan peptidoglikan tabaka içerir. Bu tabaka farklı bakteri türlerine göre 10-25 nm değerleri arasında değişebilir. Bakteriler, Gram Boyama denilen bir teknikle mikroskop altında görüntülenebilen boyanma özelliklerine göre 2 gruba ayrılırlar.

Gram pozitif bakterilerin duvarındaki kalın peptidoglikan tabakası kristal viyole ve iyot ile boyanır ve sonrasında alkolle yıkanır. Bol miktarda bulunan peptidoglikan, boyayı tuttuğu için alkolle yıkansa bile mor renkte kalmaya devam eder. Sonrasında safranin gibi bir boyaya maruz kalsa bile mor rengi değişmez. Gram negatif bakteriler ise daha ince bir peptidoglikan tabaka içerdiğinden kristal viyole ve iyotla boyanıp alkolle yıkandığında mor renk kolaylıkla yıkanıp gider. Safranin gibi bir boyayla boyandığında ise boyayı tutar ve kırmızı renkte görünür. Böylece mikroskop altında incelendiğinde farklı tipteki bakteriler ayırt edilmiş olur [3].

2.2. Escherichia coli

Tek bir *E. coli* bakterisi 25×10^{-14} gr kuru ağırlığa sahiptir. Tek kromozomlu, çift sarmallı, yaklaşık 2 μm uzunluğunda, 0.5 μm eninde ve yaklaşık 5 milyon baz çifti içeren dairesel deoksiribonükleik asit (DNA) yapısındadır. Çubuk şekilli bir bakteri olan *E. coli* çevrede, yiyeceklerde ve normal şartlarda memelilerin bağırsağında bulunan enterik bir bakteridir [1, 3, 4].

Bu bakteri türü gram negatif bir bakteridir. Gram negatif bir bakteri olduğu için endospor oluşturmazlar. Dolayısıyla gıdaların iyi pişirilmesi ya da pastörizasyonu sağlandığında *E. coli* canlılığını koruyamaz [11, 12]. İnsanlar; bağırsaklarında bulunan bu bakteri ile mutualist bir yaşam şekli sürmektedir. Pek çok *E. coli* suşu zararsız olmasına ve sağlıklı bir sindirim sistemi göstergesi olmasına rağmen patojenik suşları mevcuttur. Bu patojenik suşlar pek çok hastalığa sebebiyet vermektedir. Genelde ilk etkisini diyare olarak göstermektedir. Diyare harici bazı

E. coli suşları ise idrar yolu enfeksiyonlarına, solunum yolu hastalıklarına ve zatürreye sebebiyet vermektedir [13]. Günümüzde Dünya Sağlık Örgütü tarafından açıklanan raporlarda *E. coli* kaynaklı hastalıklardan ölüm oranı oldukça yüksektir. Özellikle 2018'den beri Amerika Birleşik devletleri (ABD) pek çok eyaletinde Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) ile başa çıkmaya çalışmaktadır [14]. *E. coli* O157:H7 en önemli STEC serotipidir. Bu bakteri suşu yiyecekler aracılığı ile insanlara bulaşmaktadır. Örneğin; az pişmiş et ürünleri, çiğ süt ya da kontamine olmuş sebze-meyvelerden geçebilir. STEC kaynaklı hastalıkların başlıca maruldan geçtiği gözlenmiştir. ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezine göre bilinen ilk ölüm Kaliforniya'da gerçekleşmiştir. Bu olayın akabinde 25 eyalette daha benzer durumların gözlemlendiği kaydedilmiştir. STEC toksin üretebilmektedir ve bu ürettiği toksin ise Shigella dizanterisine benzerdir. STEC 7 ile 50 °C'de üreyebilmektedir. Optimum üreme ısısı ise 37 °C'dir [14], yani memeli bir hayvanın vücut ısısı, en iyi üreyebildiği aralıktır. STEC asidik besinlerin varlığında da üreme gösterebilmektedir. pH'ı 4,4 olan ortamlarda ve düşük su varlığında da üreyebilmektedir. STEC yaklaşık 70 °C'lik bir ısıya ulaşan pişirme süreciyle yok edilebilir. STEC kaynaklı hastalık semptomlarında karın ağrısı, diyare ve hatta kanlı diyare gözlemlenir. Bunlara ek olarak çoğunlukla ateş ve kusma belirtileri de gözlemlenir. Bu bakterinin inkübasyon süresi yaklaşık olarak 3 ile 8 gün arasında gözlemlenmektedir. Çoğunlukla hastalar 10 gün içinde iyileşirken, küçük yaş ya da ileri yaş grubundaki insanları kötü etkilemekte ve hayatı tehdit edici boyutlara ulaşabilmektedir. Bu durumun ilerlemesi durumunda hemolitik üremik sendromu gözlemlenir ve bu sendromun sonu akut böbrek yetmezliği, hemolitik anemi ve trombopeniye doğru ilerler [13].

E. coli aynı zamanda içme suyunun mikrobiyolojik açıdan kalitesinin kontrolünde kullanılan önemli bir indikatördür. *E. coli* fekal koliform grubunun üyesidir ve diğer fekal koliformlardan daha spesifik bir kirlilik gösterir. İki ana özellik *E. coli*'yi fekal kontaminasyon belirleyicisi olarak kullanmaya yöneltmiştir; *E. coli* için geliştirilmiş test metotlarının daha da geliştirilmesi ve bazı fekal koliformların fekal orijinli olduğunun saptanması [15].

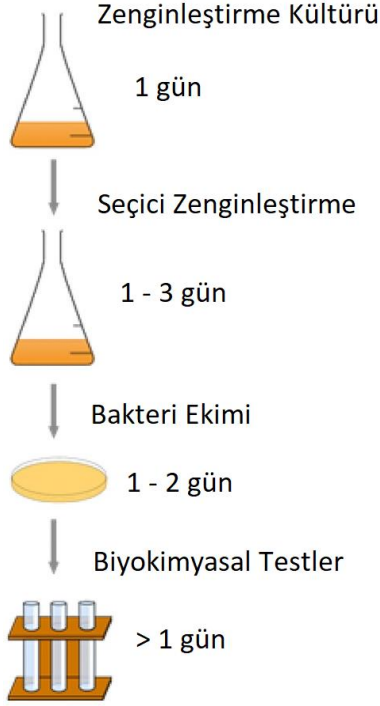
2.3. Bakteri Tayin Yöntemleri

Günümüzde patojenleri saptamak için yüksek seçicilik ve yüksek duyarlılık sağlayan geleneksel yöntemler kullanılır. Bununla birlikte bu yöntemler uzun deneysel protokolleri, doğru örnekleme periyodunu geciktirmekte ve uzman gereksinimini de beraberinde getirmektedir [16]. Yanlış örnekleme oluşması durumunda ise organizma yanlış tanımlanır ve bu pek çok sorunu da beraberinde getirir. Günümüzde ise biyosensörler bakteri tayini için çok sık tercih edilen yöntemler arasına girmektedir. Fakat henüz seçicilik ve maliyet açısından hala istenilen noktaya ulaşamamıştır.

2.3.1. Kültür Temelli Metotlar

Kültür temelli yöntemler mikroorganizmaların tayininde kullanılan en eski metot olduğu gibi altın standart olarak kabul edilen metottur. Hem başarı oranı yüksektir hem de yüksek maliyet gerektirmez. Fakat bu metodu avantajsız kılan yönü yavaşlığıdır. Bazı bakteriler *E. coli*'nin aksine yavaş kültür sürelerine sahiptir. Bu süre ise yaklaşık 18 ile 24 saat arasında değişmektedir [17]. Sürenin uzaması ölümcül sonuçlara sebep olabilmektedir. Bakteriyel patojenlerin tespiti için geleneksel kültür yöntemleri, var olan bakterilerin çoğaltılmasına dayanır. Temel olarak bir kültür sırasında numune homojenize edilir, canlı bakteri konsantrasyonunun az olması durumunda canlı patojenler zenginleştirilir ve hedef patojenler seçici bir besi yeri kullanılarak ayrıştırılır. Bu prosedürleri ise biyokimyasal testler takip eder. Biyokimyasal testler sonucu hedefin varlığı kesinleştirilir (Şekil 2.3) [18].

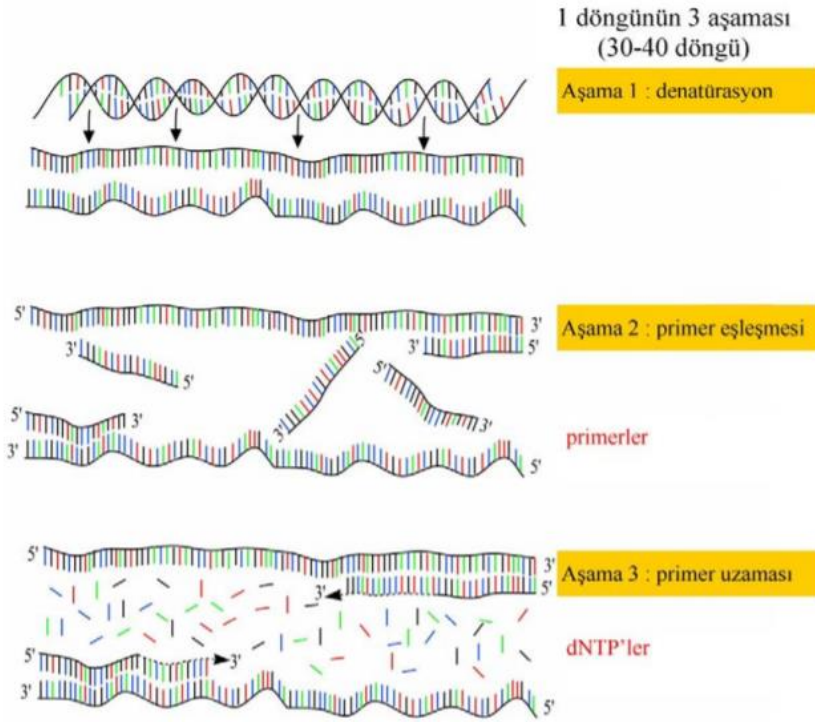
Kültür temelli tayin metodu için en yüksek başarı oranına ve yüksek maliyete sahip bilinen örnek *E. coli*'nin O157:H7 suşudur. Bu suş sorbitolün fermentasyonu ilkesine dayandırılarak Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) ile kültüre edilir. Bununla birlikte bu yöntemdeki en önemli dezavantaj, yavaş geri dönüş alma süresidir. Ayrıca O157 ve O157 STEC dışı sorbitol ile fermente olabilen diğer serotiplerin de ortaya çıkmasına sebep olup yanlış pozitif değerlerin gözlenmesine sebep olabilmektedir [17].



Şekil 2.3. Kültür yöntemiyle tayin [18].

2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

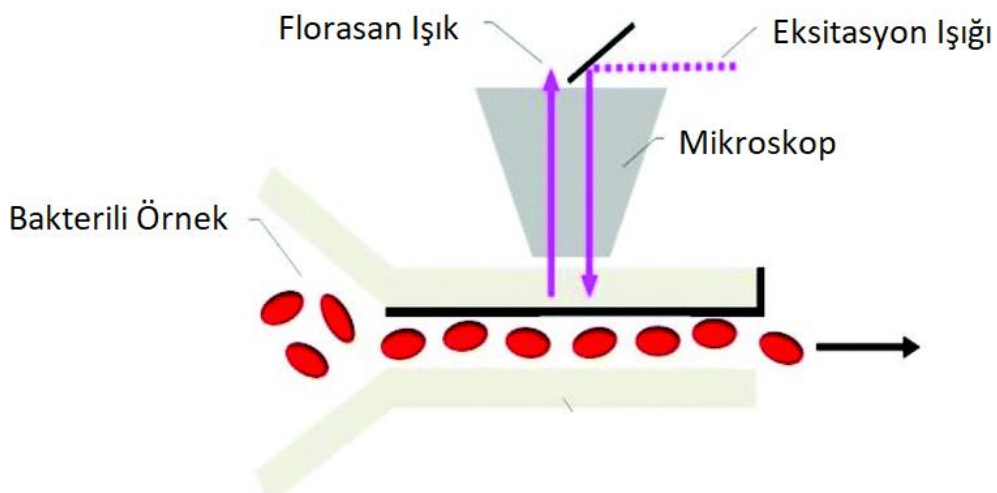
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) nükleik asitlerin amplifikasyonuna dayanan, 1980'lerde geliştirilen bir yöntemdir. Temelde bu metot kısa DNA dizilerinin izolasyonu, amplifikasyonu ve ölçümüne dayanır. Diğer geleneksel yöntemlere kıyasla daha az zaman kaybına sebep olur. PCR yaklaşık olarak 5 saat ile 24 saat içinde sonuç alınmasını sağlayan bir yöntemdir. 3 temel adımdan oluşur; denatürasyon, primer eşleşmesi ve primer uzaması (Şekil 2.4). Heterojen dağılım ve düşük patojen konsantrasyon varlığındaki durumlarda bu yöntem en uygun tayin yöntemi değildir. Tayin limitleri genellikle 10^4 - 10^5 militre başına koloni oluşturan birimdir (kob/mL) [18]. Düşük konsantrasyonlarda tayin sağlıklı bir şekilde gerçekleştirilemediği için, uygulama öncesi uygun hücre yoğunluğunu elde etme için kültürel zenginleştirme de esastır. Bu da zaman kaybına sebep olmaktadır. PCR temelli bir tayinin başarıya ulaşması için yüksek verim ve kalitede nükleik asit elde etmek ve 10^3 - 10^4 kob/mL arasında bakteriye ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 2.4. PCR'ın basamakları [19].

2.3.3. Akım Sitometrisi

Akım sitometrisi optik bir tayin yöntemi olup kompleks matrisler içerisindeki hücreleri saptamak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde numune, cihazda akışın gerçekleştiği alandan geçen bir sıvıya enjekte edilir ve akış üzerinden okuma gerçekleştirilir (Şekil 2.5).



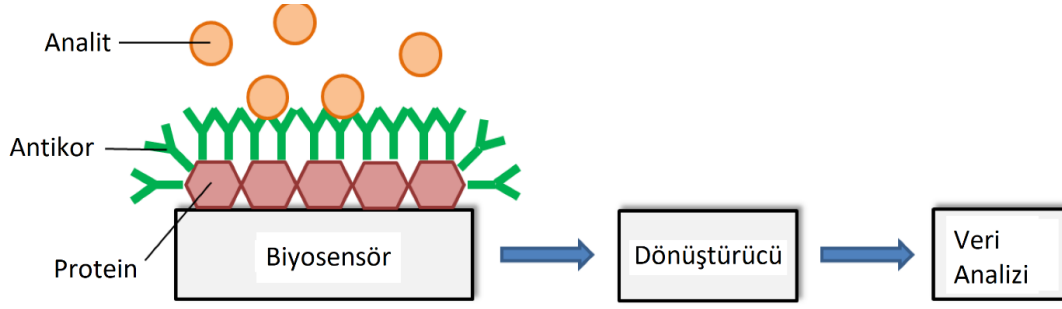
Şekil 2.5. Florasan ve optik işaretleyicilerle akım sitometri yöntemiyle bakteri tayini [20].

Mikroorganizmanın tayininin temel prensibi şöyledir; mikroorganizmalar sıvı bir matriks içinde askıda kalır. Lazer odaklı ışık kaynağından bu sıvı geçirilir. Bu gerçekleştiğinde ise ışık hem saçılır hem de mikroorganizma tarafından absorbe edilir. Bu yöntem sayesinde kısa sürede hızlı ve hassas bir ölçüm sağlanmış olur. Düşük konsantrasyondaki örneklerin bile ölçümünü hassas bir şekilde gerçekleştirmeye uygun bir metottur. Bu yöntemin en büyük dezavantajı ise aynı işaretleyicileri eksprese edecek bakterileri ayırmakta zorluk çekilmesidir. Aynı zamanda büyük ölçülerde veri elde edileceği için bunların analizi de zor olmaktadır.

2.3.4. Biyosensörler

Biyosensörler bakteri tayin metotları arasında en yeni yöntem olup daha iyi tayin limitine sahip bir metottur. Geleneksel yöntemlere kıyasla daha az manipülasyonla tayin gerçekleştirilebilir. Ayrıca bir uzmana ihtiyaç duyulmadan da tayinin yapılmasına olanak sağlar. Biyosensörlerin tayin metodu 3 temel adıma dayanır (Şekil 2.6). Öncelikle biyolojik bir molekül yakalanır. Yakalanan bu molekül bir sinyale dönüştürülür ve son olarak da sinyalin bir cihaz aracılığı ile eş zamanlı olarak okuması yapılır. Bu metoda dair en büyük sorun ise matriks varlığında elde edilen sonuçların etkilenmesidir.

Pek çok analit için biyosensör geliştirilmiştir. Biyosensörler; geniş bir spektrumda iyon ve küçük moleküllerden nükleik asit ve proteinlerin okumasını sağlamaktadır. Bakteriyel bir okuma için iki tip biyosensör geliştirilmiştir. Birinci tip hiçbir işleme gerek duyulmadan direk bakterinin varlığında tespitin yapılabilirdiği sistemler ve diğer tip ise bakterinin modifikasyonuna ya da lizis gibi hücreyi parçalayacak işlemlere tabi tutularak bakterinin bir birleşenini hedef alarak tayinini yapan biyosensörlerdir. İkinci tip biyosensörlerde bu bileşenler DNA, RNA ya da enzim gibi proteinler olabilir. Bu yöntemin sebep olduğu en büyük dezavantaj ise ek işlemlere ihtiyaç duyulması ve maliyeti arttırmasıdır [21].



Şekil 2.6. Biyosensörlerin çalışma prensibi [22].

2.4. Raman Spektroskopisi

Raman spektroskopisi, moleküllerin titreşimli modlarının elektromanyetik radyasyonla etkileşimlerinden kaynaklanan Raman etkisine dayanmaktadır. Raman spektroskopisi kullanılarak, çok bileşenli bir ortamdaki moleküllerin tanımlanması kolayca gerçekleştirilebilir. Raman kaymaları; fonksiyonel grup ve grubun bağlı olduğu molekül yapısı ile doğrudan ilişkilidir. Buna rağmen bu etki oldukça zayıftır; yaklaşık bir milyondan biri Raman saçılımıdır (esnek olmayan saçılma). Bir Raman spektrumunda, titreşim frekansları uyarma frekansına göre ölçülür ve sinyal yoğunluğu $1/\lambda^4$ ile orantılıdır. λ ; uyarma dalga boyudur. Sinyal şiddeti ve dalga boyu arasındaki bu ilişki nedeniyle, kısa dalga boylu bir lazer kullanımı tercih edilmektedir [23].

2.4.1 Raman Haritalandırma Yöntemi

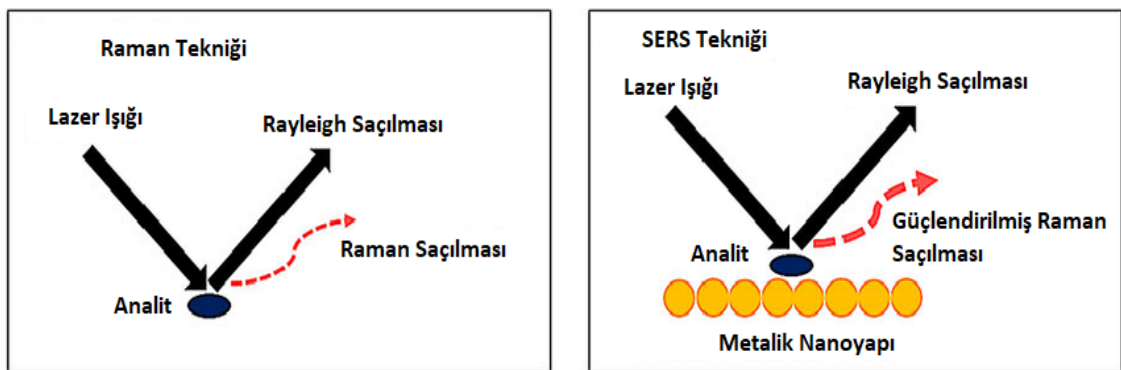
Raman haritalandırma yönteminde bir bileşenin bölgesel dağılımı, bir Raman mikroskobu yardımıyla iki boyutlu olarak elde edilebilmektedir. Verilerin gösterilmesinin güçlü ve görsel bir yolu olmasının yanı sıra parametrelerin konumla nasıl değiştiğini hızlıca görmenin görsel bir yoludur [23, 24]. Haritalandırma tekniği gelişmiş bir yarı otomatik veri toplama tekniği olarak da tanımlanabilir. Tanımlanan alanın her pikselinde yüzlerce spektrum otomatik olarak toplanabilir ve daha sonra belirlenmiş bir zirvenin yoğunluğuna dayalı olarak yapay renkli görüntüler üretmek için entegre edilebilir [25].

2.4.2. Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi

Yüzeyde zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi (SERS) moleküler parmak izi özgülüğünü potansiyel tek molekül duyarlılığını birleştirir. Bu nedenle, SERS tekniği, moleküllerin kimyasal ve biyokimyasal analitik alanındaki iz miktarlarının saptanmasında kullanılan bir araçtır [26].

Raman'ın temelinde iki tip güçlendirme mekanizması vardır. Bunlar elektromanyetik ve kimyasal güçlendirmelerdir. Yüzey plazmonları belirli bir nanopartikülün varlığında plazmon absorbe profiline rezonant bir uyarma dalga boyuyla uyarılır. Metal yüzey zamanla azalan karakter gösteren güçlü bir elektromanyetik alanla indüklenir. Metalik yüzeye yakın bir molekülün Raman modları büyük oranlarda artış gösterir. Çünlü Raman şiddeti elektromanyetik alanının karesiyle orantılıdır. Bir Hertz dipolünün emisyon özelliklerinin bir sonucu olarak, Raman her yönden yayılan ışığı mikroskop objektifi aracılığı ile toplar ve saptar (Şekil 2.7).

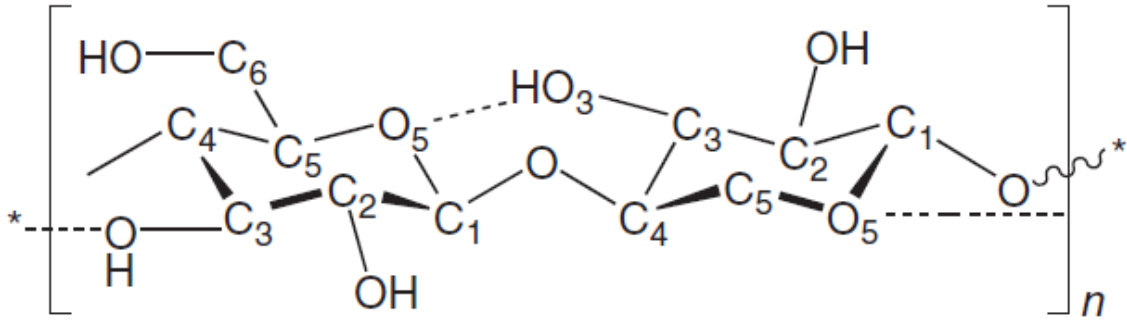
Çeşitli yollarla güçlendirme mekanizmasına katkıda bulunabilir. Bunlar çeşitli nanopartikül ve moleküler kimyasal bir etkileşimin oluşturulmasıyla geliştirilebilecek kimyasal etkileşimlere dayandırılabilir, nanopartikül arasındaki yük transfer durumundan kaynaklanan rezonant uyarılmayla sinyal güçlendirme ya da bir molekülün daha yüksek bir elektronik durumunun uyarılması nedeniyle oluşan Raman rezonansının artırılmasıyla sağlanabilir [26].



Şekil 2.7. Raman (solda) ve SERS (sağda) teknikleri [27].

2.5. Nanoselüloz

Selüloz, β -1,4- glikozidik bağlarla birbirine bağlı olan anhidro-D-glikoz birimlerinden oluşan lifli, yenilenebilir ve yeryüzünde en fazla bulunan doğal bir polimerdir (Şekil 2.8). Tekrarlayan 2 anhidro-D-glikoz birimi sandalye konformasyonuna sahiptir. Kimyasal formülü $(C_6H_{10}O_5)_n$ ($n < 20,000$) şeklindedir. Moleküller arası ve molekül içi hidrojen bağlarına sahiptir. Molekül içi hidrojen bağları selüloza stabil bir yapı sağlar ve su, etanol, eter ve seyreltik mineral asitleri gibi çözücülerde çözünmez ya da az çözünür özellik kazandırır. Sodyum hidroksit çözeltisinde ise çözünürlüğü azdır. Bu polimer; bitkilerin ana yapısal bileşenidir ve deniz hayvanları, algler, mantarlar, bakteriler, omurgasızlar ve amipler tarafından da üretilebilir [23, 28-30].

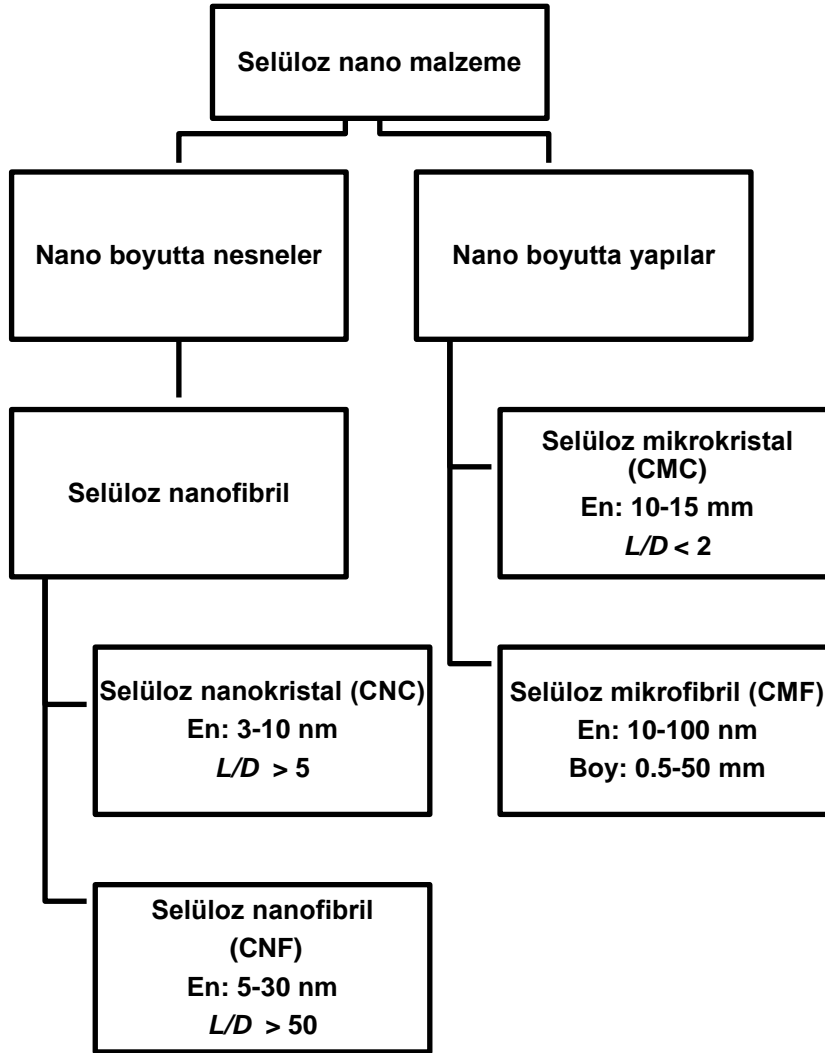


Şekil 2.8. Tekli selüloz zincirin tekrar eden yapısı, 1-4 bağlantısının yönü ve molekül içi hidrojen bağı [23].

Biyolojik olarak yenilenebilir polimer bazlı nano malzemeler arasında, “nanoselüloz ve selüloz nano kompozitleri”; biyobozunur, biyouyumlu ve biyodönüşümlü özelliklerinin yanı sıra çevre dostu olma, kolay işleme ve uygun maliyetli olma gibi özel avantajları nedeniyle ayrıcalıklı bir yer tutmaktadır. Bu nano malzemeler, ilgili birçok farklı uygulama için en etkileyici malzemelerden biri olarak ortaya çıkmaktadır. Optik, ve kozmetik ürünlerin paketlenmesi, otomotiv, inşaat ve biyotıp gibi pek çok sektörde kullanımları ümit vadetmektedir [23].

Selüloz; “yukarıdan aşağıya üretim” yöntemiyle mikro ve nano ölçekli malzemelere dönüştürülebilir [31]. Dönüştürülen bu nanoselüloz çeşitleri, selülozik kaynak ve işleme koşullarına bağlı olarak; şekilleri, ebatları, fonksiyonları ve hazırlama yöntemlerine göre farklı alt kategorilerde

sınıflandırılabilir. Nanoselüloz çeşitleri için farklı isimlendirmeler mevcut olduğundan Kağıt Hamuru ve Kağıt Endüstrisi Teknik Birliği (TAPPI) nanoselüloz malzemenin büyüklüğüne göre selüloz nano malzeme WI 3021 için standart terimler ve tanımlar önermiştir [32]. Her bir alt gruba uygulanan adlandırma, kısaltma ve boyutlar şekil 2.9’da gösterilmiştir.



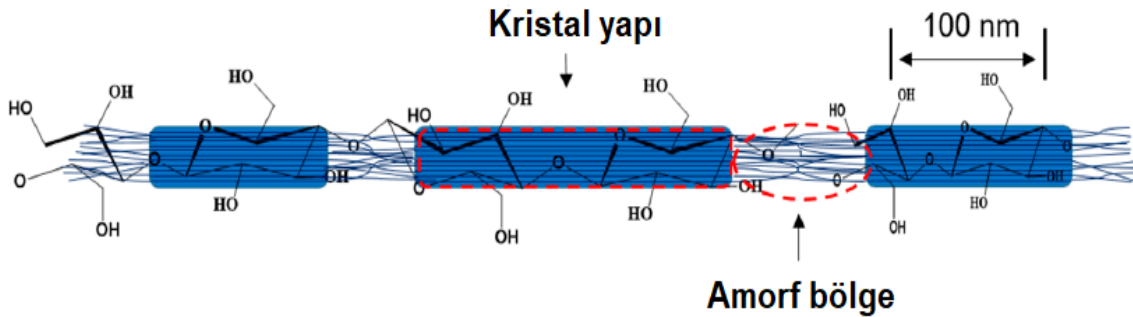
Şekil 2.9. Selüloz nano malzemelerin sınıflandırılması.

Yüksek kimyasal işlevsellikleri; yüzeydeki biyopolimerler ile kolayca değiştirilebilen ve selüloz türevleri üreten veya farklı malzemelere aşılama yapılabilen, oldukça fazla bulunan birincil ve ikincil hidroksillerden (selüloz alkoller olarak adlandırılır) kaynaklanmaktadır [33]. Bu OH grupları, elektrostatik olarak (hidrojen bağlarıyla) birbirlerini çekebilir ve zincirlerin düzenli bir yapı oluşturmasına neden olur [34]. Hidrojen bağları, selüloz nanopartiküller ve diğer

malzemelerin birbirine bağlanmasında kilit role sahiptir [35] örneğin hibrit kompozit ve kağıt üretiminde [36], çevre ve su ile ilgili alanlarda [37], enerji depolama aygıtlarında [38] ve biyomedikal uygulamalarda [39].

Bitişik halkaların oksijen ve hidrojen atomları arasındaki elektrostatik çekimler, molekül içi hidrojen bağıny uyarır, polar çözücülerde zayıf çözünürlüğe sebep olmasına ek olarak, daha stabilize glikozidik bağlantı motiflerine ve doğrusal zincir konfigürasyonuna neden olur. Aynı zamanda, zincirler arası hidrojen bağları (polimer zincirleri arasında meydana gelen), van der Waals kuvvetleri ile birlikte, mikron ölçeğinde toplanabilen selüloz temel fibriller olarak bilinen paralel dizilimi sağlamaktadır. [40]

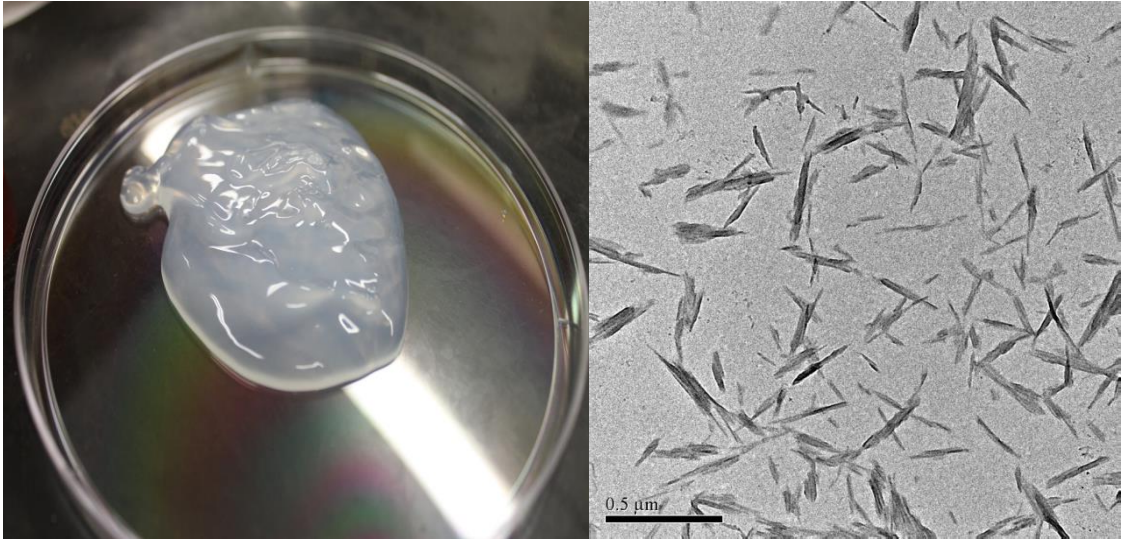
Selüloz fibrilleri içinde kristal (çok düzenli) ve amorf (düzensiz) iki ayırt edici bölge bulunmaktadır (şekil 2.10). Çeşitli teknikler kullanılarak bu selülozik maddeden selüloz nanokristaller (CNC) ve selüloz nanofibriller ayrılabilir. Kimyasal işlemlerle kristal alanların izolasyonu yoluyla CNC üretilmektedir. Diğer yandan mekanik işlemlerle de selüloz nanofibril (CNF) üretilebilir. CNF ve CNC üretiminde kullanılan yukarıdan aşağıya yaklaşımının aksine bakteriyel nanoselüloz (BNC); bazı gram negatif bakteri türleri tarafından doğal olarak aşağıdan yukarıya yaklaşımla sentezlenmesi yönüyle diğer iki tipten farklıdır [41]. Ayrıca selüloz nanomateryallerin tüm çeşitleri selüloz nanopartiküller olarak da adlandırılabilir [40]. Nanoselülözün; kristal nanoselüloz, selüloz nanofibril ve bakteriyel nanoselüloz olmak üzere üç ayrı genel çeşidi bulunmaktadır.



Şekil 2.10. Selüloz nanofibrilin kristal ve amorf bölgelerinin kuramsal konfigürasyonu [40].

2.5.1. Selüloz Nanokristal

CNC; ağaç/bitki lifi selülozunun amorf bölgelerinden, selüloz mikrofibril ya da nanofibrilden izole edilerek elde edilebilir [42]. Resim 2.1’de CNC süspansiyonu ve TEM görüntüsü verilmiştir [43]. İzolasyon prosedürü, fibrillerin düzensiz bölgeleri boyunca çapraz hidroliz yoluyla asidik atak tepkimesine dayanır ve asit hidrolizine dirençli yüksek kristalli alanlar bırakır [44]. CNF'lere kıyasla CNC'ler daha düşük en boy oranlarına (100-500 nm uzunluğunda ve 10-50 nm genişliğinde) ve kimyasal işlem durumuna bağlı olarak, yüksek derecede kristallik derecesine sahiptir (%50-90) [30, 45]. Daha kaliteli ve verimli üretim için CNC izolasyonunu optimize etmek adına farklı selülozik kaynaklar üzerinde çalışmalar yapılmaktadır [44, 45]. Örneğin çeşitli asitler arasından, hidroklorik ve sülfürik asit bu amaç için yaygın olarak kullanılmaktadır [46, 47]. Sülfürik asitle yapılan hidroliz sırasında, negatif yüklü sülfat grupları, hidroksi esterleşmesi ile selüloz zincirine eklenmektedir.



Resim 2.1. CNC süspansiyonu (%12 katı içerik) (solda) ve TEM görüntüsü (sağda) [43].

2.5.2. Bakteriyel Nanoselüloz

Bitkisel selülozdan farklı olarak BNC; lignin, hemiselüloz, pektin veya bitki özü bileşiklerden yoksundur ve hayvansal kökenli bileşenler içermeyen saf formda üretilir [48]. Anhidro-D-glikoz birimleri ve çeşitli bakteri selüloz fibrilleri, iç ve dış hidrojen bağları vasıtasıyla kristal bir yapı oluşturmak üzere birbirleriyle yakın etkileşime girer, suda tamamen çözünmeyen ancak hidratlanabilen liflerin

sıkışmasına sebep olur [49]. İnce nanofibriller, birim başına geniş bir yüzey alanına sahip olan 20-100 nm çapa sahiptir; BNC'nin hidrofilitik yapısı ile birlikte bu özellik, su emme kapasitesinin yüksek olmasına, daha iyi yapışmaya ve artan nem içeriğine neden olur [50]. Bu özellikler, çözünmezliği, hızlı biyobozunurluğu, gerilme mukavemeti, elastikiyeti, dayanıklılığı, toksik ve alerjik olmaması gibi farklı fiziksel ve mekanik özellikleri ile birleştiğinde BNC'yi yapay cilt olarak yanık ve diğer dermal yaralanmaların tedavisinde kullanılabilir yapmakta ve katma değeri yüksek olan birkaç ürünün üretimi için ideal kılmaktadır [51-53].

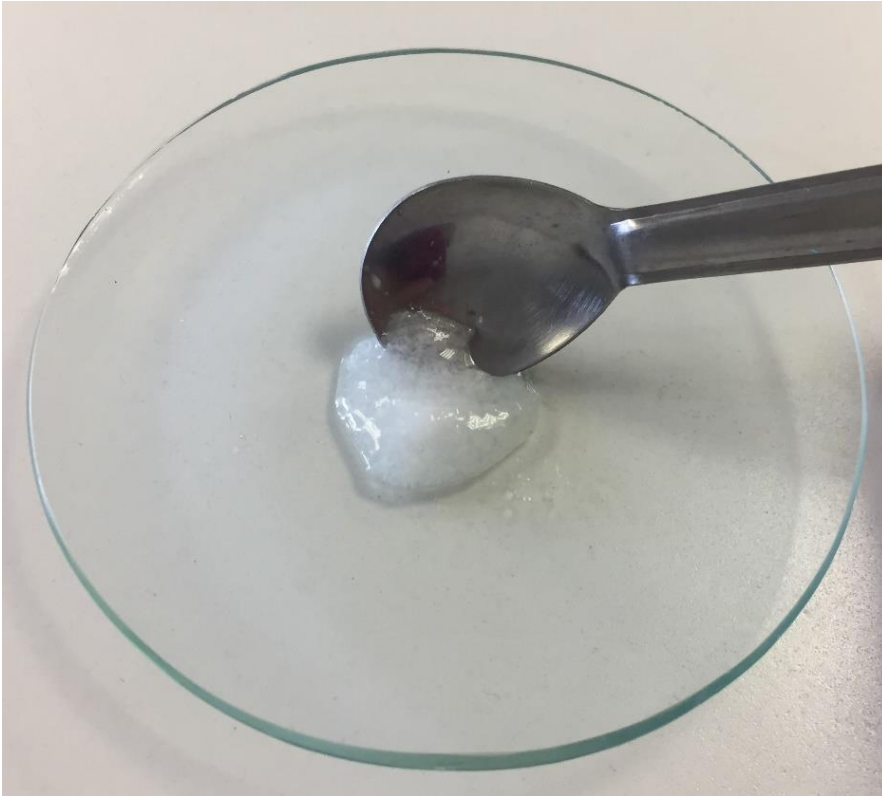
BNC, esas olarak *Gluconacetobacter xylinus* tarafından sentezlenen yüksek kristalli bir doğrusal glikoz polimeridir. Her ne kadar BNC üretimi esas olarak *G. xylinus*'ta çalışılmış olsa da diğer *Gluconacetobacter* türleri, *Rhizobium* spp. *Agrobacterium tumefaciens* ve gram pozitif *Sarcina ventriculli* gibi mikroorganizmalar da BNC biyopolimerini sentezleyebilmektedir [54, 55]. Mikroorganizmalar kullanarak BNC iki farklı ortamda üretilebilir; hava-sıvı ara yüzünde kalın, deri benzeri beyaz bakteriyel selüloz topağının birikmesine neden olan statik kültürde [56] ve içinde selülozun dağılmış bir şekilde sentezlendiği, topaklar veya asılı lifler oluşturan karışık kültürde [57, 58].

2.5.3. Selüloz Nanofibril

CNF yüksek en boy oranına sahip nano ölçekli fibrillerdir; genişlikleri 5 ila 30 nm arasında değişmektedir (uzunlukları birkaç mikrometredir) ve hidrojen bağları ile indüklenen selüloz zincir istiflemesi sonucu oluşurlar [59]. Hem kristal hem de amorf bölgelerden oluşan bu CNF'ler; fibrilleri, bütünleyici mikrofiber demetlerinden kuvvetli mekanik fibrilasyon işlemleri yoluyla serbest bırakarak üretilebilir [44, 60]. CNF'nin avantajlı olmasını sağlayan mekanik özellikleri olan biyobozunurluğu, geniş yüzey alanı ve hafifliğiyle ilgili pek çok araştırmalar yapılmıştır. Hidroksil grupları arasındaki hidrojen bağları, basit fibrillerde selüloz zincirlerinin çok düzenli bir şekilde dizilmesini sağlar. Ayrıca lignin veya protein gibi diğer polimerik bileşenlerle sulu ortamda bağ oluşturmak için yapışmayı kolaylaştırır [35, 61].

CNF üretimi, nanofibriller arasındaki oldukça geniş hidrojen bağı etkileşimlerini üreten çok sayıda yüzey hidroksil grubu nedeniyle önemli miktarda enerji tüketir

[62]. Yığılmış fibrilleri ayırmak için enerji tüketen mekanik öğütme işlemi gerektiğinden; alkali [63, 64], radyasyon [63], kimyasal [65, 66] ve enzimatik [67, 68] gibi farklı ön işlem türleri, maliyet ve enerjiyi önemli ölçüde düşürmek için tipik olarak fibrilasyon işleminden önce uygulanır. Sık kullanılan bir üretim tekniği; mekanik öğütme döngülerini azaltmak için kuvvetli mekanik fibrilasyonu mikro-akışkanlaştırma ya da homojenizasyon ile uygulamadan önce TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il) oksil kullanarak pre-oksidasyondur. Elde edilen nanoselüloz fibriller, sudaki düşük katı konsantrasyonlarında (% 1-3) jel benzeri bir görünüm verir (Resim 2.2).



Resim 2.2. Selüloz nanofibril jel formu (%3 katı içerik).

2.5.4 Nanoselülozun Yüzey Modifikasyonları

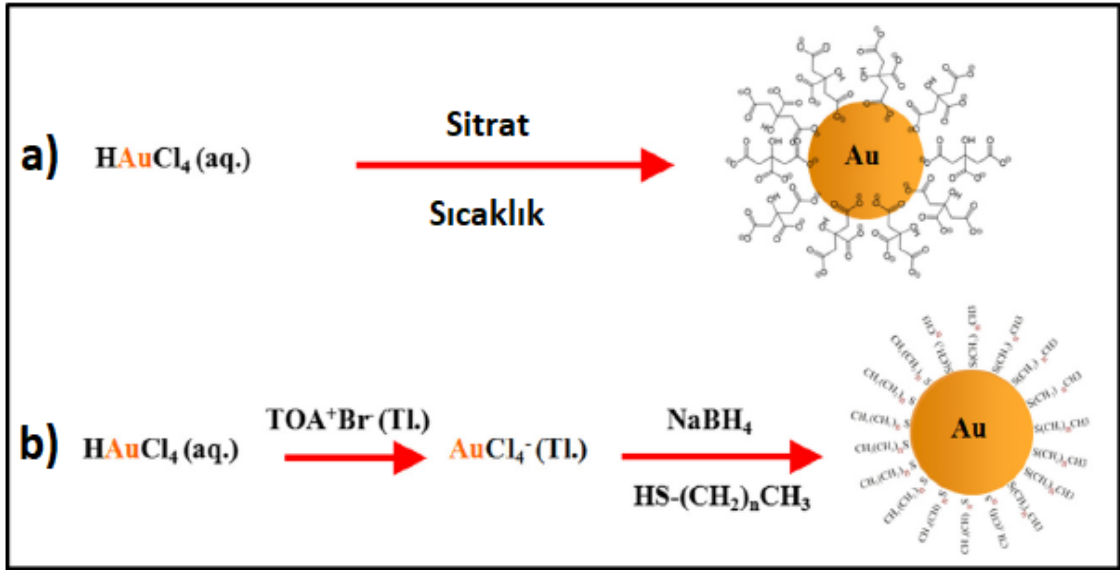
Nanoselüloz malzemelerin yüzey modifikasyonu üzerine yapılan araştırmaların son zamanlarda bilim insanlarının ilgisini çekmiş olduğu görülmektedir [69]. Nanoselüloz yüzeyinde, reaksiyona girebilen oldukça fazla sayıda hidroksil grupları bulunmaktadır. Ayrıca hidrojen bağı, yüzey hidroksil gruplarının reaktifliğini oldukça etkiler. Ek olarak, glikozidik ve lignin fragmanları gibi

safsızlıkların nanoselülozun yüzeyinden giderilmesi, farklı gruplar arasında kabul edilebilir bir yeniden üretilebilirliğin gerçekleştirilebilmesi açısından elzemdir [70]. Termoplastisite özelliği olmaması ve sıradan çözücüler içinde çözünmemesi gibi özellikleri, selülozun uygulamalarını sınırlandırmıştır. Uygulama alanlarını genişletmek amacıyla selüloze kuru ve ıslak haldeyken mekanokimyasal işlemler uygulanmaktadır [71]. Selülozun nano boyutta üretilmesi de uygulama alanlarını oldukça arttıran bir durumdur.

2.6. Altın nanopartiküller

Boyutları 100 nm'den daha küçük olan altın nanoparçacıkları, sadece analitik kimya alanında değil, aynı zamanda genel olarak nanobilim ve nanoteknoloji alanında son on yılda en çok çalışılan sistemlerden biridir. Altın nanopartiküllerin bu denli önemli olmasının sebebi; çok çeşitli teknolojik uygulamalar için kullanılabilecek farklı boyutlarda, şekillerde ve düzeneklerde benzersiz optik, elektriksel, katalitik ve moleküler tanıma özelliklerinden kaynaklanmaktadır [72].

Altın nanopartiküllerin bir çözeltide sentezlenmesinde (ıslak-kimyasal sentez yöntemi) genel yaklaşım, altın öncüsü olarak kloraurik anyonların (AuCl_4) kimyasal indirgenmesini içerir. Bu konuda bildirilen iki yöntem, Turkevich metodu [73]; sulu çözeltide AuCl_4 'ün sitrat indirgemesi ve Brust metodu [74]; sulu çözeltiden bir faz transfer maddesi (tetraositilamonyum bromür (TOABr)) ile transfer edilen organik bir çözelti içinde AuCl_4 'ün borohidrür indirgemesidir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Altın nanopartikül sentez yöntemleri: a) Turgevich metodu b) Brust metodu [75].

2.6.1 Altın Çubuk Nanopartiküller

Altın nanopartiküllerin yüzey özellikleri, boyutları ve şekilleri değiştirilerek kullanım alanları oldukça artırılabilir. Altın çubuk nanopartiküller de çubuk benzeri şekle sahiptir ve boyutları ve şekilleri sebebiyle bilimsel çalışmalarda sıkça kullanılan bir nanomateryaldir. Altın nanorodların; güçlü yüzey plazmon rezonans emilimi sayesinde, küçük miktarlarda altın çubuk nanopartiküllerde bile daha fazla ışık almaları [76, 77], tiyol grubu ve altın nanorod yüzeyinin oluşturduğu güçlü Au-S bağları vasıtasıyla tiyol bileşikleriyle daha kolay modifiye edilebilmeleri gibi avantajları vardır [78]. Bu özellikler, sayesinde altın çubuk nanopartiküllerin yüzeyi, istenilen modifikasyon işlemleriyle modifiye edilip hedefleme yapılabilmesine olanak sağlamaktadır [79].

Altın çubuk nanopartiküllerin kısa ve uzun yüzeylerinde bulunan elektronların salınımından dolayı iki ayrı plazmon bandı görünmektedir [80]. Altın çubuk nanopartiküllerin biyoanalizlerde kullanılmasının sebeplerinden biri de partiküllerin boy/en oranları değiştirilerek istenilen boyutta altın çubuk nanopartikül sentezlenebilmesi ve bu sayede partikülün farklı optik özelliklere sahip olabilmesidir. Işımasız durulma, altın çubuk nanopartiküllerde boy/en oranı arttıkça azalmaktadır. Bu durum, Raman verimliliğinin artmasına sebep olmaktadır. Altın çubuk nanopartiküllerin altın küre nanopartiküllere kıyasla saçılma

verimliğinin yüksek olması altın çubuk nanopartiküllerin Raman spektroskopisinde tercih edilmesini sağlamaktadır [81].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler

Sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl), sodyum fosfat dibazik (Na_2HPO_4), potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4), sodyum hidroksit (NaOH), hegzadesiltrimetil amonyum bromür (CTAB), 11-Merkaptoundekanoik asit (11-MUA), hidrojen tetrakloro aurat (HAuCl_4), N-(3-Dimetilaminopropil) – N' – etilkarbodimid hidroklorür (EDC), N-hidroksisülfosüksinimid tuzu (NHS), sıgır serum albümin (BSA), (5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), 2- (N – Morfolino) ethanosülfonik asit, 4-Morfolinoethonosülfonik asit monohidrat ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$), %99.9 Etanol (EtOH), askorbik asit, 2- (N-morfolino) etanesülfonik asit (MES) Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, Amerika Birleşik Devletleri) temin edildi. Gümüş nitrat (AgNO_3) ve sodyum borohidrür (NaBH_4) Merck'ten (Darmstadt, Almanya) temin edildi. Biyotinlemiş anti *E. coli* poliklonal antikor Fitzgerald Inc. 'ten (Kuzey Acton, MA, Amerika Birleşik Devletleri) temin edildi. Avidin, Thermo Scientific'ten (Rockford, IL, Amerika Birleşik Devletleri) temin edildi. Selüloz Nanofibril (CNF), katı madde oranı %3, Revolution Araştırma Inc. 'ten (Orono, ME, Amerika Birleşik Devletleri) temin edildi. İlgili çözeltiler hazırlanırken deiyonize su kullanıldı (18,2 MΩ.cm).

3.2. Çözeltiler

Deneyle sırasında kullanılan çözeltiler;

Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS): pH değeri 7,4 olan fosfat tamponu NaCl, KCl, Na_2HPO_4 ve KH_2PO_4 tuzları kullanılarak hazırlanmıştır. Tuzlar deiyonize su kullanılarak çözülmüştür. 100 mL için Na_2HPO_4 'ten 1,42 gr, KH_2PO_4 'ten 1,36 gr, NaCl 0,8 gr, KCl'den 0,02 gr tartılıp 100 mL deiyonize su içinde çözdürülüp pH'ı 7,4 olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan çözelti 0,1 M'dir. pH'ı ayarlamak için 1 M'lık NaOH çözeltisi kullanılmıştır.

MES Tamponu: 2 – N – morfolinoetanosülfonik asit hidrat (MES monohidrat) deiyonize su içinde çözdürülmüştür. Çözelti pH'sı 6,5 olacak şekilde ayarlanmıştır. MES monohidrattan 1,0662 gr tartılıp 100 mL deiyonize su içerisinde çözdürülmüştür. 0,05 M MES tamponu elde edilmiştir. pH'ı ayarlamak için 1 M'lık NaOH çözeltisi kullanılmıştır.

NaOH Çözeltisi: pH'sı ayarlamak için NaOH çözeltisi hazırlanmıştır. 2 gr NaOH tartılıp, 50 mL deiyonize su içinde çözdürülmüştür. 1 M NaOH çözeltisi elde edilmiştir.

Hidrojen Tetrakloro Aurat (HAuCl₄) Çözeltisi: HAuCl₄'ün stok şişesinden 35 µL alınarak 10 mL deiyonize suyla falcon tüpünde homojenize edilerek 0,01 M HAuCl₄ çözeltisi elde edilmiştir.

Soğuk Sodyum Borohidrür (NaBH₄) Çözeltisi: 1,9 mg NaBH₄ soğutulmuş 5 mL deiyonize suda çözdürülüp 0,01 M NaBH₄ çözeltisi hazırlanmıştır.

Gümüş Nitrat (AgNO₃) çözeltisi: 8,45 mg AgNO₃ 5 mL deiyonize suda çözdürülüp 0,01 M gümüş nitrat çözeltisi hazırlanmıştır.

Askorbik Asit Çözeltisi: 88 mg askorbik asit 5 mL deiyonize suda çözdürülüp, 0,1 M askorbik asit çözeltisi hazırlanmıştır.

Hekzadesiltrimetil- Amonyum Bromür (CTAB) Çözeltisi: 1,84 g CTAB 50 mL deiyonize suda ısıtıcılı manyetik karıştırıcı yardımıyla 50 °C'yi aşmayacak şekilde manyetik balık yardımıyla yavaş bir şekilde köpük oluşturulmadan çözdürülmüştür. 0,1 M CTAB çözeltisi elde edilmiştir.

Nanoçekirdek (Seed) Çözeltisi: Sırasıyla HAuCl₄, CTAB ve NaBH₄ çözeltileri karıştırılarak hazırlanmıştır. 0,01 M HAuCl₄ çözeltisinden 250 µL, 0,1 M CTAB çözeltisinden 7,5 mL ve 0,01 M olan soğutulmuş NaBH₄ çözeltisinden 600 µL eklenip karıştırılmıştır. NaBH₄ çözeltisinin de eklenmesiyle oluşan seed çözeltisi açık çay rengi olmaktadır. Renk değişimi gözlemlendikten sonra 30 °C'lik su banyosunda seed çözeltisi 30 dakika bekletilir.

11-MUA: Altın selüloz nanofibril yüzeylerin modifikasyonu sırasında kullanılmak üzere 11-MUA çözeltisi hazırlanmıştır. 4,37 gr 11- merkaptoundekonik asit 1 mL saf etanol içinde çözülmüştür. Elde edilen MUA çözeltisi 20 mM'dır.

EDC/NHS: 5,75 mg NHS ve 19,17 mg EDC, 1mL pH'ı 6,5 olan MES içinde sonikatör yardımıyla çözdürülmüştür.

BSA: Spesifik olmayan etkileşimleri önlemek amacıyla BSA çözeltisi hazırlanmıştır. 50 mg BSA 1 mL PBS içinde çözdürülmüştür.

Avidin Çözeltisi: 1 mg avidin 1 mL MES tamponu içerisinde çözdürülmüştür.

Biyotinli Anti *E. coli* Antikor Çözeltisi: 5 mg/mL anti *E. coli* antikor stok çözeltisinden 2 µL alınıp, 100 µL PBS çözeltisiyle homojenize edilerek hazırlanır. Çözelti 0,1 mg/mL derişimindedir.

DTNB: 7,93 mg DTNB 1 mL saf etanol içinde çözdürülerek hazırlanmıştır. Elde edilen çözelti 20 mM'dır.

SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) görüntüleri elde edebilmek için bakterileri sabitlemek amacıyla aşağıdaki çözeltiler kullanılmıştır:

Gluteraldehit Çözeltisi: PBS tamponu ile %2,5'lük gluteraldehit çözeltisi hazırlanmıştır. Modifiye edilmemiş ve modifiye edilmiş altın selüloz nanofibril yüzeyle etkileştirilmiş *E. coli*, modifiye edilmiş altın selüloz nanofibril yüzeyle etkileştirilmiş *E. coli*'ye bağlanan altın çubuk nanopartikül örnekleri kullanılmıştır. Yüzeyler, ayrı ayrı hazırlanan çözeltide oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir. Süre sonunda yüzeyler önce PBS tamponu sonra da deiyonize su ile yıkanmıştır. Böylece yüzeylerin kurutulması sırasında tuzların kristalleşmesi önlenmiştir.

Paraformaldehit Çözeltisi: PBS tamponu ile %4'lük çözelti hazırlanmıştır. Modifiye edilmemiş ve modifiye edilmiş altın selüloz nanofibril yüzeyle etkileştirilmiş *E. coli*, modifiye edilmiş altın selüloz nanofibril yüzeyle etkileştirilmiş *E. coli*'ye bağlanan altın çubuk nanopartikül örnekleri kullanılmıştır. Yüzeyler, ayrı ayrı hazırlanan çözeltide oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir. Süre sonunda yüzeyler önce PBS tamponuyla sonra da deiyonize su ile yıkanmıştır. Böylece yüzeylerin kurutulması sırasında tuzların kristalleşmesi önlenmiştir.

Metanol – Aseton Çözeltisi: Metanol ve asetonun 1:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Modifiye edilmemiş ve modifiye edilmiş altın selüloz nanofibril yüzeyle etkileştirilmiş *E. coli*, modifiye edilmiş altın selüloz nanofibril yüzeyle etkileştirilmiş *E. coli*'ye bağlanan altın çubuk nanopartikül örnekleri kullanılmıştır. Yüzeyler, ayrı ayrı hazırlanan çözeltide oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. Süre sonunda yüzeyler önce PBS tamponu sonra da deiyonize su ile yıkanmıştır. Böylece yüzeylerin kurutulması sırasında tuzların kristalleşmesi önlenmiştir.

3.3. Altın Selüloz Nanofibril Yüzeyin Hazırlanması

0,6 g selüloz nanofibril tartılıp 3 mL deiyonize su içinde çözdürülmüştür. Hazırlanan çözelti 120 °C dereceye kadar ısıtılmış sıcak su banyosu içine yerleştirilmiştir. Vial içinde hazırlanmış olan bu çözelti, 15 dakika boyunca sıcak su banyosunda bekletilmiştir. 15 dakika sonunda çözelti içine 200 µL HAuCl₄ çözeltisi eklenmiştir. Pipet yardımıyla homojenize edilmiştir. HAuCl₄ çözeltisi

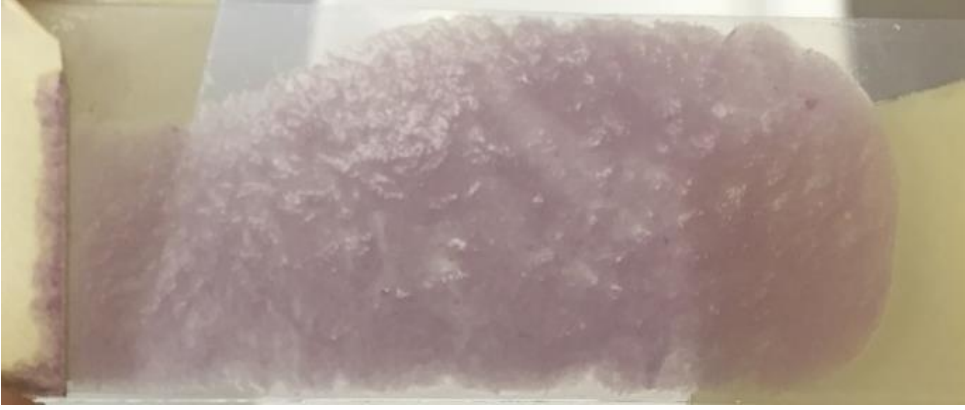
eklendikten sonra homojenize edilen çözelti 30 dakika daha sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Bekletme süresi sonunda normalde sarımsı beyaz olan çözelti pembe renge dönüşünce selüloz nanofibril kullanıma hazır hale gelmiş olmaktadır (Resim 3.1).



Resim 3.1. Altın selüloz nanofibril çözeltisi.

Pembe renge dönüşmesi; selüloz nanofibril çözelti içindeki altın çözeltisinin nano boyuta geçtiğinin bir göstergesidir. Yüksek sıcaklık yardımıyla oluşan nano boyutlu partiküller küre şekline sahiptir.

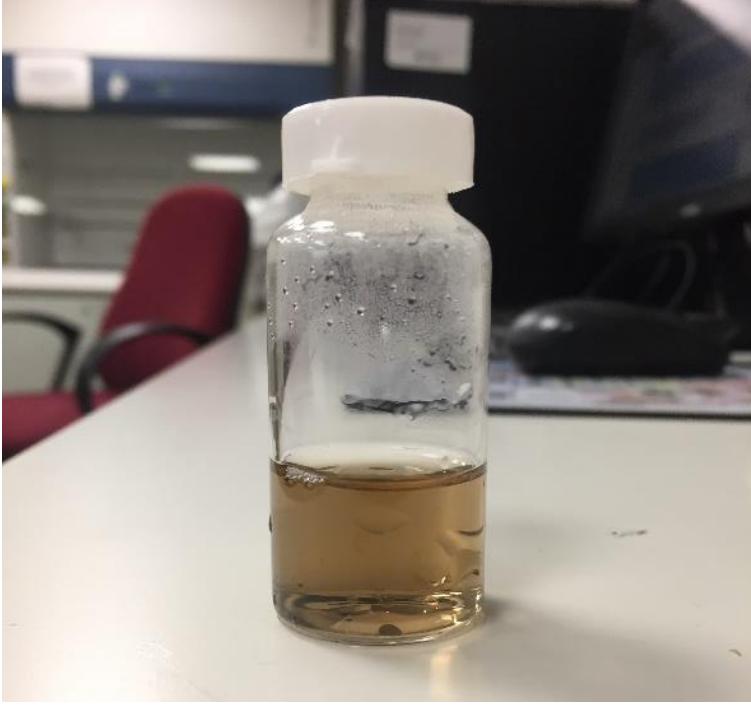
Hazırlanan bu çözelti lam üzerine damlatılarak kurumaya bırakılır. Selüloz nanofibril yüzeyin lam üzerinde daha hızlı kurumasını sağlamak için ısıtıcı tabla üzerinde yaklaşık 40 °C'de kuruması sağlanır. Isıtıcı tabla yardımıyla 10 dakika içinde tamamen bir kuruma sağlanmış olmaktadır (Resim 3.2). Bu işlem sonrasında esnek ve kâğıt benzeri yapıda altın selüloz nanofibril yüzey oluşturulmuş olmaktadır.



Resim 3.2. Kurutulmuş altın selüloz nanofibril yüzey.

3.4. Altın Çubuk Nanopartikül Sentezi

Bu tez çalışmasında altın çubuk nanopartikülleri; SERS substratı olarak kullanılmak amacıyla sentezlenmiştir. Öncelikle nanoçekirdek (seed) çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti sırasıyla; 0,01 M 250 μ L H_{Au}Cl₄ çözeltisi, 0,1 M 7,5 mL CTAB çözeltisi ve 0,01 M 600 μ L NaBH₄ soğutulmuş çözeltisinin karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Güçlü bir indirgeme ajanı olan NaBH₄ çözeltisinin eklenmesiyle seed çözeltisinin rengi açık çay rengi olarak gözlenmiştir (Resim 3.3). Elde edilen seed çözeltisi oda sıcaklığında yarım saat bekletilmiştir.



Resim 3.3. Seed çözeltisi.

Altın çubuk nanopartikül sentezi için sırasıyla; 0,1 M 4,75 mL CTAB çözeltisi, 0.01 M 500 μ L HAuCl_4 çözeltisi, 0,01 M 60 μ L AgNO_3 çözeltisi, 100 μ L askorbik asit çözeltisi ve son olarak da 10 μ L seed çözeltisi karıştırılmıştır. Bu çözelti hazırlanırken askorbik asit eklendikten sonra çözelti renginin şeffaflaştığı gözlenmiştir. Seed çözeltisi eklendikten sonra çözelti, oda sıcaklığında bir saat bekletilmiştir. Süre sonunda çözelti renginin koyu mavi/lacivert renge döndüğü gözlenmiştir. Bu renk değişimi; partiküllerin çubuk şekilli olduğunun belirtisidir (Resim 3.4).

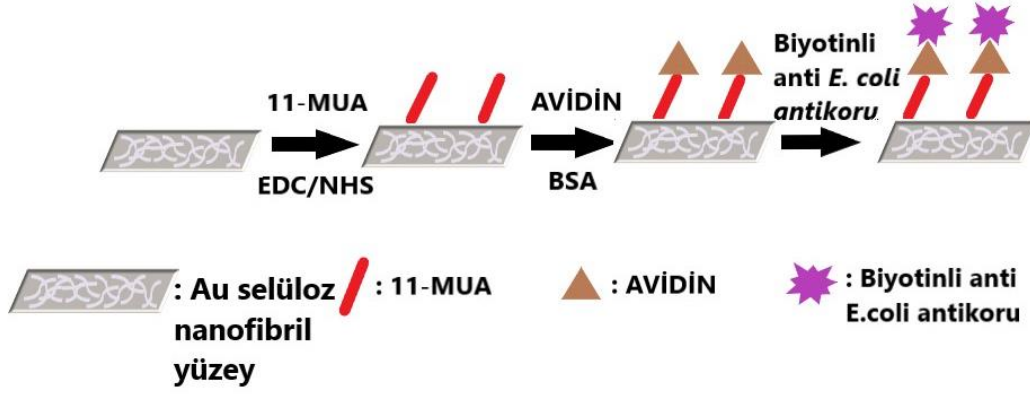


Resim 3.4. Altın çubuk nanopartikül çözeltisi.

Sentezlenen altın çubuk nanopartiküller, santrifüjlenerek CTAB yüzey aktif maddesi gibi fazla reaktifleri uzaklaştırmak için saflaştırılmıştır. Çözelti; altın çubuk nanopartikülleri çöktürmek için 10.000 rpm hızında 30 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda, dipte kalan çökeltiye temas edilmemeye dikkat ederek üstte kalan şeffaf çözelti atılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmış ve her aşamada distile su kullanılarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen altın çubuk nanopartiküllerin karakterizasyonu için TEM (Geçirimli Elektron Mikroskobu) ve UV-GB spektrofotometre cihazları kullanılmıştır.

3.5. Altın Selüloz Nanofibril Yüzeylerin Modifikasyonu

Bu tez çalışmasında tek kullanımlık ve kağıt benzeri bir yüzeyin sentezi ve bu yüzeyin bakteri tayininde kullanılması hedeflenmiştir. Bu amaçla hazırlanan altın selüloz nanofibril yüzeyler; *E. coli* bakterisine özgü antikorlarla spesifik olarak etkileşime girebilmesi için modifikasyon işlemlerine tabii tutulmuştur (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Au selüloz nanofibril yüzeylerin modifikasyon işleminin şematik gösterimi.

Yüzey modifikasyonları; 11-MUA molekülündeki tiyol ve karboksil grupları üzerinden gerçekleştirilir. Tiyol grubu altına bağlanırken karboksil grubu, modifikasyonun ileri basamaklarında NHS ve EDC molekülleriyle aktive edilerek biyotinli anti *E. coli* antikor moleküllerinin yüzeye bağlanması sağlamıştır.

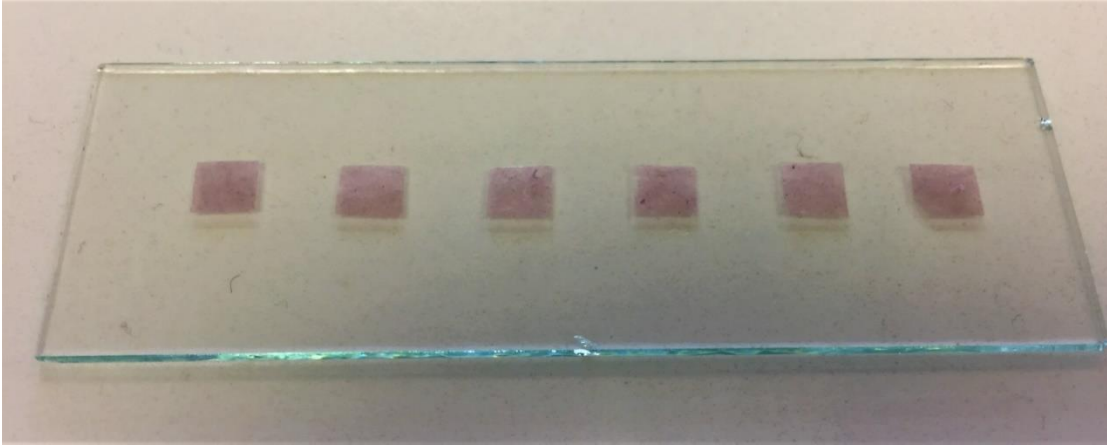
Bu amaçla; 20 mM 1mL 11-MUA çözeltisi saf etanol ile hazırlanmıştır. Bu çözelti ultrasonik banyoda 10 saniye bekletilerek homojen hale getirilmiştir. Eppendorf tüpte hazırlanan bu çözelti içine yerleştirilen altın selüloz nanofibril yüzey, oda sıcaklığında 150 rpm'de 8 saat boyunca karıştırıcıda bırakılmıştır. Böylece altın moleküllerinin yüzeylerine 11-MUA molekülleri kovalent olarak bağlanmış, altın moleküllerin yüzeyinde karboksil grupları meydana gelmiştir. 8 saatin sonunda pH: 6,5 olan MES tamponu ile pipet yardımıyla yüzey 3 kez yıkanmıştır. Yıkama işlemiyle altın moleküllerinin yüzeyine bağlanmayan 11- MUA molekülleri ortamdan uzaklaştırılmıştır.

0,05 M ve pH 6,5 olarak hazırlanmış 1mL MES tamponu içine 19,17 mg EDC ve 5,75 mg NHS kimyasalları tartılıp eklenmiş ve ultrasonik banyoda 10 saniye bekletilerek çözdürülmüştür. Hazırlanan bu çözelti 0,05 M'dir. Bu çözelti içine altın selüloz nanofibril yüzey yerleştirilmiş ve 45 dakika 150 rpm'de çalkalayıcıda bekletilmiştir. NHS ve EDC kimyasalları ile yüzeye bağlanmış moleküllerin karboksil ve amin gruplarının aktive edilmesi sağlanmıştır.

Bu süre sonunda altın selüloz nanofibril yüzey; 1mL 0,05 M (pH: 6,5) olarak hazırlanmış MES tamponu içinde 1 gr avidin çözdürülerek hazırlanmış olan

çözeltiden alınan 100 mL çözelti ve 900 µL 0,05 M pH: 6,5 olarak hazırlanmış MES tamponu karışımının içine yerleştirilmiştir. 45 dakika 150 rpm'de çalkalayıcıda bekletilmiştir. Bu sayede aktif hale gelen amin ve karboksil grupları ile avidin moleküllerinin kovalent bağ ile bağlanmaları gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda altın selüloz nanofibril yüzeye bağlanmamış olan EDC, NHS ve avidin gibi moleküller 3 kez 0,05 M (pH: 6,5) olarak hazırlanmış MES tamponu kullanılarak pipet yardımıyla yıkanarak yüzeyden uzaklaştırılmıştır. Spesifik olmayan etkileşimleri engelleyebilmek adına, avidin ile bağlanmamış aktive edilen grupları kapatacak olan 0,1 M (pH:7,4) olacak şekilde hazırlanmış 1 mL PBS tamponu içinde 50 mg çözdürülmüş BSA ile hazırlanan çözelti içine altın selüloz nanofibril yüzey yerleştirilmiş ve 1 saat boyunca 150 rpm'de çalkalayıcıda bekletilmiştir. Bu süre sonunda yüzey ile etkileşime girmeyen BSA moleküllerini uzaklaştırmak amacıyla PBS tamponu kullanılarak pipet yardımıyla 3 kez yıkama yapılmıştır.

Modifikasyon işleminin son basamağı olarak altın selüloz nanofibril yüzey; 0,1 mg/mL derişimde PBS tamponuyla hazırlanmış biyotinli anti *E. coli* antikor çözeltisinden 100 µL alınmış çözelti içine yerleştirilmiştir. 45 dk boyunca 150 rpm'de çalkalayıcıda karıştırılarak avidin ve biyotinin etkileşime girip güçlü bir non kovalent bağ oluşturması sağlanmıştır. Süre sonunda yüzeyde etkileşime girmeyen fazlalık biyotinli anti *E. coli* antikorlarının uzaklaştırılması amacıyla pipet yardımıyla PBS tamponu kullanılarak 3 kez yıkanmıştır. Sonuç olarak hedef *E. coli* bakterisine özgü yüzey modifikasyonları gerçekleştirilmiş altın selüloz nanofibril yüzey elde edilmiştir. Tek parça yüzey, 6 eşit parçaya kesilerek deneylere hazır hale getirilmiştir (Resim 3.5). Tüm modifikasyon basamakları sırasında yüzey, pens yardımıyla tutulmuştur.



Resim 3.5. Altın selüloz nanofibril yüzeyler.

3.6. Modifiye Altın Selüloz Nanofibril Yüzeyin Bakteri ile Etkileştirilmesi

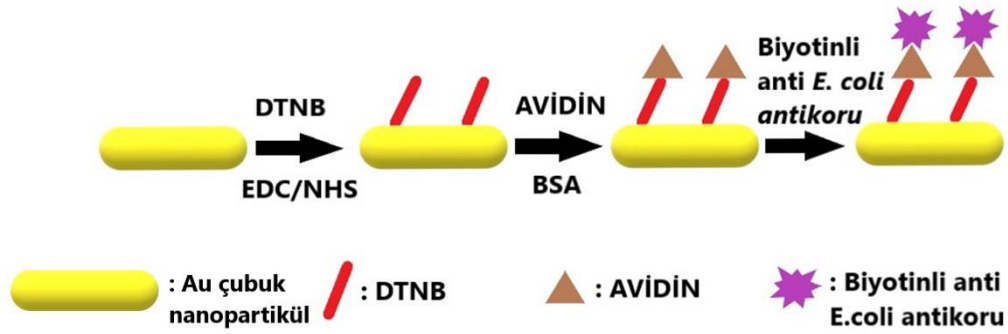
Yüzey modifikasyonları tamamlanmış 6 adet altın selüloz nanofibril yüzey, bakteri içermeyen PBS tamponu da dahil olmak üzere $1,5 \times 10^1$ – $1,5 \times 10^5$ kob/mL derişimdeki birer mL *E. coli* bakterisi içeren çözeltilere ayrı ayrı yerleştirilmiştir. 30 dk boyunca 150 rpm'de çalkalayıcıda bekletilmiştir. Böylece biyotinli anti *E. coli* antikollarının, *E. coli* bakterilerine özgü bölgeleriyle etkileşime geçip bu bölgelere bağlanmasıyla kompleks bir yapı haline gelmeleri sağlanmıştır. Süre sonunda yüzey ile etkileşime girmeyen *E. coli* bakterilerini uzaklaştırmak amacıyla pipet aracılığıyla PBS tamponu kullanılarak 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.7. *E. coli* Bağlı Altın Selüloz Nanofibril Yüzeylerle Modifiye Altın Çubuk Nanopartiküllerin Etkileştirilmesi

6 ayrı eppendorfa eklenmiş 200 μ L modifiye edilmiş altın çubuk nanopartikül çözeltisi içine *E. coli* bakterisinin $1,5 \times 10^1$ – $1,5 \times 10^5$ kob/mL derişimdeki birer mL çözeltileri içinde etkileştirilmiş 6 ayrı altın selüloz nanofibril *E. coli* kompleks yüzey eklenir. Çözeltiler 30 dk boyunca 150 rpm'de bekletilir. Böylece biyotinli anti *E. coli* antikolları bağlanmış altın çubuk nanopartikülleri, altın selüloz nanofibril *E. coli* kompleks yüzeydeki *E. coli* bakterilerine özgü bölgelere bağlanır. Böylece altın selüloz nanofibril yüzey *E. coli* altın çubuk nanopartikül sandviç yapısı oluşur. Etkileşim süresi sonunda yüzey ile etkileşime girmemiş olan modifiye altın çubuk nanopartiküllerini uzaklaştırmak amacıyla PBS tamponu kullanılarak pipet yardımıyla 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilir.

3.8. Altın Çubuk Nanopartiküllerinin Modifikasyonu

Etiket molekül olarak seçilen DTNB'nin SERS sinyali izlenmiştir. Sentezlenen altın çubuk nanopartiküllerin altın selüloz nanofibril yüzeyleriyle etkileşime girmiş *E. coli* bakterilerine özgü bağlanma bölgeleri hazırlamak ve SERS sinyal şiddetini takip edebilmek için seçilen DTNB etiket molekülünü bağlamak amacıyla modifikasyon işlemine tabii tutulmuştur (Şekil 3.1).



Şekil 3.2. Au çubuk nanopartiküllerin modifikasyon işleminin şematik gösterimi.

Bu amaçla 50 mM 1 mL DTNB çözeltisi saf etanol ile hazırlanmıştır. 1 gece boyunca 150 rpm'de karıştırıcıda bekletilmiştir. Böylece hem SERS sinyal takibi için kullanılacak DTNB molekülü altın çubuk nanopartikülleriyle etkileştirilmiş hem de modifikasyon işlemi, altın partiküllerinin DTNB molekülündeki tiyol gruplarıyla etkileşime girmesiyle başlatılabilmektedir.

Süre sonunda altın çubuk nanopartiküller MES tamponu (pH: 6,5) kullanılarak 14,000 rpm'de 9 dakika santrifüj edilerek yıkanmıştır. Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Yıkama işlemiyle altın çubuk nanopartiküllere bağlanmayan fazlalık DTNB molekülleri ortamdan uzaklaştırılmıştır.

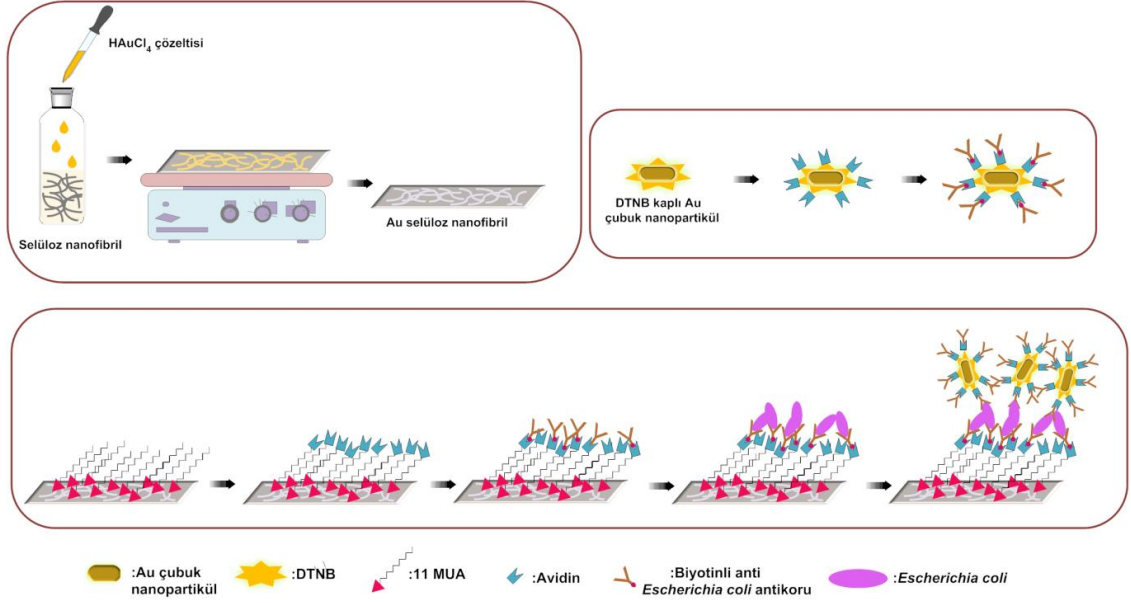
Yıkanan partiküllerin üzerine 0,05 M (pH:6,5) olarak hazırlanmış 1mL MES tamponu içinde 19,17 mg EDC ve 5,75 mg NHS kimyasalları tartılıp eklenmiş ve ultrasonik banyoda 10 sn bekletilerek çözdürülmüş çözelti eklenir. Hazırlanan bu çözelti 0,05 M'dir. Bu çözelti 45 dk 150 rpm'de çalkalayıcıda bekletilmiştir. NHS ve EDC kimyasalları ile yüzeye bağlanmış moleküllerin karbonil gruplarının aktive edilmesi sağlanmıştır. Bu süre sonunda altın çubuk nanopartiküller MES

tamponu (pH: 6,5) kullanılarak 14,000 rpm'de 9 dakika santrifüj edilerek yıkanmıştır. Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Böylece etkileşime girmemiş olan fazlalık NHS ve EDC molekülleri ortamdaki uzaklaştırılmış olur.

Devam eden süreçte altın çubuk nanopartikül üzerine 1mL 0,05 M pH: 6,5 olarak hazırlanmış MES tamponu içinde 1gr avidin çözündürülerek hazırlanmış olan çözüldüden alınan 100 mL çözelti ve 900 µL 0,05 M pH: 6,5 olarak hazırlanmış MES tamponu eklenmiştir. Hazırlanan çözelti 45 dk 150 rpm'de çalkalayıcıda bekletilmiştir. Bu sayede aktif hale gelen karbonil grupları ile avidin moleküllerinin kovalent bağ ile bağlanmaları gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda altın çubuk nanopartiküllerine bağlanmamış olan avidin moleküllerini uzaklaştırmak amacıyla MES tamponu (pH: 6,5) kullanılarak 14,000 rpm'de 9 dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Spesifik olmayan etkileşimleri engelleyebilmek adına altın çubuk nanopartikül üzerine, avidin ile bağlanmamış aktive edilen grupları kapatacak olan 0,1 M pH:7,4 olacak şekilde hazırlanmış 1mL PBS tamponu içinde 50 mg çözündürülmüş BSA ile hazırlanan çözelti eklenmiş ve 1 saat boyunca 150 rpm'de çalkalayıcıda bekletilmiştir. Bu süre sonunda yüzey ile etkileşime girmeyen BSA moleküllerini uzaklaştırmak amacıyla PBS tamponu kullanılarak 14,000 rpm'de 9 dakika santrifüj işlemiyle yıkama yapılmıştır. Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır.

Modifikasyon işleminin son basamağında altın çubuk nanopartiküle; 0,1 mg/mL derişimde PBS tamponuyla hazırlanmış biyotinli anti *E. coli* antikor çözeltisinden 100 µL alınmış çözelti eklenir. 45 dk boyunca 150 rpm'de çalkalayıcıda karıştırılarak avidin ve biyotinin etkileşime girip güçlü bir non-kovalent bağ oluşturması sağlanmıştır. Süre sonunda yüzeyde etkileşime girmeyen fazlalık biyotinli anti *E. coli* antikorlarının uzaklaştırılması amacıyla çözelti, PBS tamponu kullanılarak 14,000 rpm'de 9 dakika santrifüj işlemiyle yıkanmıştır. Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır.

Sonuç olarak hedef *E. coli* bakterisine özgü yüzey modifikasyonları gerçekleştirilmiş altın çubuk nanopartiküller elde edilmiştir. Şekil 3.2'de geliştirilen yöntemin şematize edilmiş görseli verilmiştir.



Şekil 3.3. Altın selüloz nanofibril yüzeyin ve altın çubuk nanopartikülün modifikasyonları sonucunda geliştirilen bakteri tayin yönteminin şematik gösterimi.

3.9. Kullanılan Mikroorganizmalar

Deneyle süresince *E. coli*'nin K12 suşu, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes* bakterileri kullanılmıştır. Bakteriler Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü'nden (Ankara) temin edilmiş ve Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü aracılığıyla tedarik edilerek deneylede kullanılmıştır.

Deneyle süresince bakteriler LB (Luria-Bertani) besiyeri kullanılarak çoğaltılmıştır. LB besiyeri toz halindeki ticari ürününün 30 gr'ı 1 litre deiyonize su ile çözdürülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan besi yeri otoklav kullanılarak sterilize edilmiştir. Besi yerleri 5 mL'lik tüplere bölüştürülüp 121 °C'de 15 dakika olacak şekilde otoklavlanmıştır. Hazırlanan besi yerleri +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Deneylede kullanılacak besi yeri, kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilerek hazır hale getirilmiştir.

LB agar, tez kapsamında kullanılan tüm bakterilerin seçici besi yerine ekiminde ve yüzeye yayma yöntemi ile elde edilen kolonilerin sayım işleminde kullanılmıştır. LB besi yeri gibi LB agarın hazırlanması da LB agarın ticari ürününden 35 gr'ı 1 litre suda çözüp, aynı koşullarda otoklav ile sterilizasyonu sağlanmıştır. Sterilize edilmiş besi yeri, petri kutularına aktarılır. Aktarılan besi

yeri katılaşıma bırakılmıştır ve katılaşıcaak olan besi yerleri ters bir şekilde buzdolabına kaldırılmıştır. Bu hazırlanmış petri kutularının içindeki besi yerleri kullanılmadan önce kurutulmuştur.

Hazırlanan agarlı petri kutularına stoklardaki bakteriler ekilmiştir. İdeal inkübasyon ortamı 37 °C olup, süresi yaklaşık olarak 18-24 saattir. Bakterileri besi yerinden uzaklaştırmak amacıyla stoktan elde edilen 1 mL çözelti 10 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir. Uzaklaştırma işlemi 3 defa PBS tamponunda yıkama sağlanılarak yapılmıştır. Yıkama sonrası elde edilen, besi yeri uzaklaştırılmış bakteriler $1,5 \times 10^1$ – $1,5 \times 10^5$ kob/mL olacak şekilde seyreltilir. Klasik sayım yöntemiyle bakteri sayımı gerçekleştirildiğinde *E. coli* $1,5 \times 10^5$, *M. luteus* $5,8 \times 10^5$, *E. aerogenes* $1,5 \times 10^5$, *B. subtilis* $7,3 \times 10^5$ kob/mL olarak bulunmuştur.

3.10. Cihazlar ve Gereçler

Raman Spektroskopisi (DeltaNu ExamineR Inc. Laramie, WY, Amerika Birleşik Devletleri & Qimaging MicroPublisher-RTV-5.0, Kanada): 785 nm lazer kaynağına sahip, örnekleri mikroskop altında hareket ettirebilmek için hareketli lamel haznesi ve CCD detektörü olan Raman spektroskopisi, DTNB sinyalini tespit ederek optimizasyon deneyleri ve kalibrasyon eğrisini elde etmek için kullanılmıştır. Cihaz parametreleri; 30 µm lazer spot alanı, 20× objektif, 150 mW lazer gücü ve 60 saniye veri toplama süresi olarak ayarlanmıştır. DTNB'nin karakteristik dalga boyu (1330 cm^{-1}) seçilerek *E. coli*'nin farklı konsantrasyonları için ($1,5 \times 10^1$ – $1,5 \times 10^5$ kob/mL) okuma gerçekleştirilmiştir.

Fourier Dönüşümlü (FT) Raman Haritalaması (Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, MA, ABD): Nicolet iS50 spektrometresi 'nin numune bölmesine monte edilmiş bir Raman modülü kullanılarak FT-Raman spektrumları kaydedilmiştir. Eksitasyon kaynağı, bir InGaA dedektörü ile donatılmış yaklaşık 50 mikron spot büyüklüğünde 1064 nm diyot lazerdir. Tüm numunelerin Raman spektrumu oda sıcaklığında toplanmıştır. Lazer gücü 200 mW'a ayarlanmıştır. Numune üzerinden seçilen doğrusal bir hat boyunca 500 µm'lik aralıklarla 3 ayrı noktadan Raman sinyalleri toplanılmış ve haritalandırma yapılmıştır. Spektral haritalar OMNIC™ Atplus programı kullanılarak analiz edilmiştir. (Thermo Electron Co. ,

Wisconsin, ABD). Numunelerin FT-Raman spektrumları 8 cm^{-1} çözünürlük ve her ölçüm noktasında 64 taraması sayısı ile elde edilmiştir.

SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) (Tescan Orsay Holding, Kohoutovice, Çek Cumhuriyeti): Altın selüloz nanofibil yüzeyin ağısı yapısı gösterilmiştir. Yüzeyle etkileştirilmiş olan altın çubuk nanopartiküllerin varlığı gösterilmiştir. Yüzeyle tutunan *E. coli* bakterisi gösterilmiştir.

TEM (Geçirimli Elektron Mikroskobu) (JEOL Ltd., Japonya): Altın çubuk nanopartikül karakterizasyon analizleri JEOL JEM 1400 cihazında yapılmıştır. Ultrasonik Banyo (Sonorex RK 156, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Almanya): Hazırlanan çözeltileri homojenize etmek için kullanılmıştır.

Stomacher (Interscience, Bag Mixer 400P, Saint Nom, Fransa): Biyolojik örnek denemeleri sırasında marulların PBS çözeltisi içinde homojen bir şekilde fiziksel parçalanmasını sağlamak için kullanılmıştır.

pH metre (Senova LabTech Co. Ltd. Pen Type Sx- 610, Şangay, Çin): Hazırlanan çözeltilerin pH'ının ölçülüp ayarlanması için kullanılmıştır.

Çalkalayıcı (N-BIOTEK Co. Ltd. Gyeonggi-do, Kore): Hazırlanan çözeltilerde kimyasalların en etkin şekilde etkileşebilmeleri için kullanılmıştır.

UV-GB Spektrofotometre (Thermo Electron Co. , Spectronic™ GENESYS™ model, Wisconsin, Amerika Birleşik Devletleri): Tek ışın yollu UV-GB Spektrofotometre ile sentezlenen altın çubuk nanopartiküllerin absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir. Partiküllerin karakterizasyon analizinde kullanılmıştır.

Santrifüj Aletleri: Partiküllerin çökmesini, sentezlenen partiküllerden istenmeyen kimyasalların uzaklaştırılması sırasında kullanılmıştır.

- (Eppendorf 5418, Eppendorf Orta Doğu ve Afrika FZ-LLC, Dubai, Birleşik Arap Emirliği)
- (Sigma, 2-16P, Osterode, Almanya)

Hassas Terazi (Shimadzu Inc., Kyoto, Japonya), Deiyonize Su Cihazı (Millipore Simplicity 185, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya), Isıtıcı Manyetik Karıştırıcı (AM4, VELP Scientifica, Usmate Velate (MB), İtalya), Mikropipet (1-10, 10-100, 100-1000 µL), Eppendorf tüp, Pens.

3.11. Yöntem

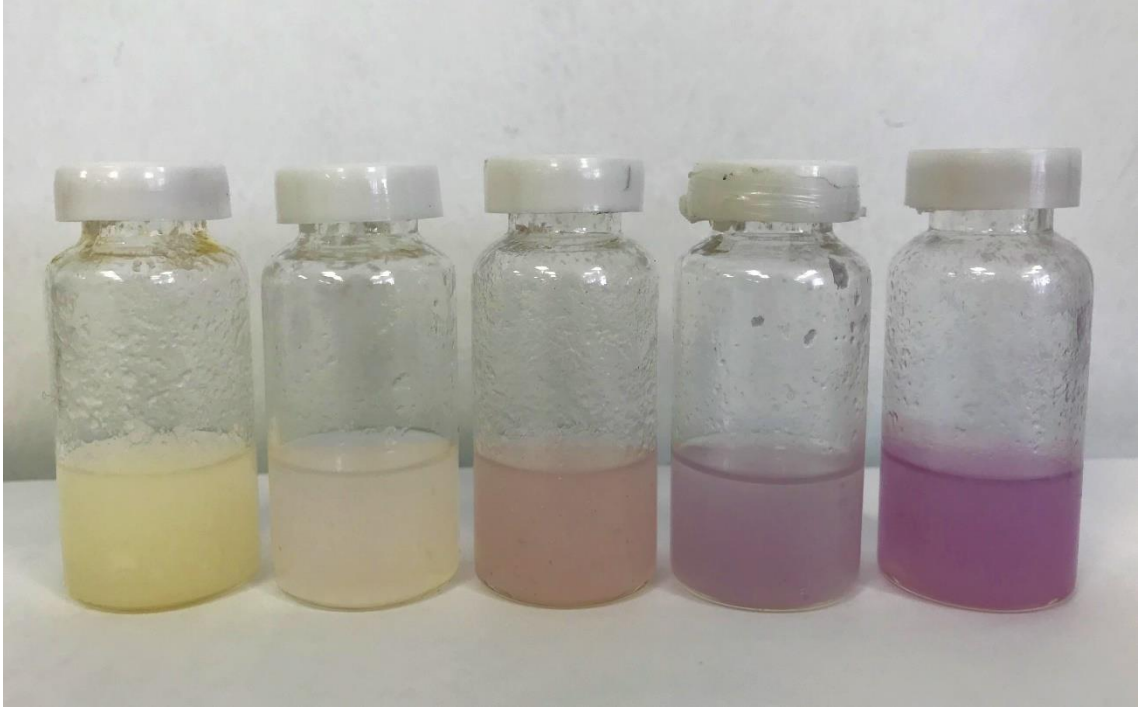
Bakteri tayinine yeni bir yaklaşım amacıyla bu tez çalışması gerçekleştirilmiştir. Selüloz nanofibril; yüzey modifikasyonlarını gerçekleştirmeye uygun, esnek, tek kullanımlık, ucuz, doğada bolca bulunan ve doğada çözülebilir bir malzeme olduğu için tercih edilmiştir.

Selüloz nanofibril ile HAuCl_4 çözeltisi etkileştirilmesi suretiyle yüzey modifikasyonları gerçekleştirilip sadece *E. coli* bakterisini tutabilen bir yüzey geliştirilmiştir. Sentezlenen altın çubuk nanopartikülleri, SERS etiketi olan DTNB molekülü etkileştirilmiştir. Altın çubuk nanopartiküllerinin yüzeyleri NHS/EDC çözeltisiyle aktif hale getirilmiştir. Daha sonra avidin çözeltisi ortama eklenmiştir. Eklenen bu avidin çözeltisine biyotinli anti *E. coli* antikor eklenmiştir. Altın çubuk nanopartikül çözelti ile avidin biyotin antikorlu çözelti karıştırıldıktan sonra daha önceden hazırlanmış olan *E. coli* bağlı altın selüloz nanofibril yüzey çözeltinin içine eklenmiştir. Yüzeyler hazırlandıktan sonra DNTB sinyalleri SERS aracılığıyla okunmuştur. Aynı yöntemle marul üzerinde biyolojik örnek denemeleri gerçekleştirilmiştir.

3.11.1. Optimizasyon Deneyleri

3.11.1.1. Selüloz Nanofibril Çözeltisine Eklenen HAuCl_4 Çözeltisi Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Bu optimizasyon deneyinde hazırlanan selüloz nanofibril çözeltisine belirli konsantrasyonlardaki HAuCl_4 çözeltisi eklenmiştir. Bu amaçla selüloz nanofibril çözeltisi içine 50, 100, 200, 250, 300 µL HAuCl_4 çözeltisi eklenmiştir (Resim 3.6). Deneyde kullanılan *E. coli*; $1,5 \times 10^5$ kob/mL konsantrasyonundadır. Elde edilen SERS sinyal şiddetleri karşılaştırıldığında optimum miktar 200 µL olarak tespit edilmiştir.



Resim 3.6. Soldan sağıa sırasıyla 50, 100, 200, 250, 300 µL HAuCl₄ çözeltisi eklenmiş selüloz nanofibril çözeltileri.

3.11.1.2. Altın Çubuk Nanopartikül Miktarının Optimizasyonu

Bu optimizasyon deneyinde sentezlenen altın çubuk nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha önceden hazırlanan modifiye altın selüloz nanofibril yüzeye bağlı *E. coli* içeren yüzeyler 50, 100, 150, 200 ve 250 µL olacak şekilde farklı miktarlarda altın çubuk nanopartikül çözeltisi içine daldırılmıştır. Deneyde kullanılan *E. coli*; $1,5 \times 10^5$ kob/mL konsantrasyonundadır. Elde edilen SERS sinyal şiddetleri karşılaştırıldığında optimum miktar 200 µL olarak bulunmuştur.

3.11.1.3. Modifiye Selüloz Selüloz Nanofibril Yüzeyle *E. coli*'nin Etkileşim Süresi Optimizasyonu

Bu optimizasyon deneyinde sentezlenen ve yüzey modifikasyonları yapılan selüloz nanofibril yüzey *E. coli* ile etkileştirilmiştir. Etkileşim süresinin optimizasyonu amacıyla etkileşim süresi 1, 15, 30, 45 ve 60 dakika olarak belirlenmiştir. Elde edilen SERS sinyal şiddetleri karşılaştırıldığında optimum sürenin 30 dk olduğu belirlenmiştir.

3.11.2. Geliştirilen Yöntemin Seçiciliğinin Test Edilmesi

Tez çalışması kapsamında geliştirilen tayin yönteminin hedef bakteri olarak *E. coli*'ye seçici olması amaçlanmıştır. Geliştirilen tayin yönteminin, *E. coli* bakterisine olan seçiciliğini test etmek için 3 farklı bakteri türüne daha aynı yöntem uygulanmıştır. Kullanılan diğer bakteriler; *M. luteus*, *B. subtilis*, *E. aerogenes*'tir. Deneysel süresince *E. coli* için $1,5 \times 10^5$ kob/mL, *M. luteus* için $5,8 \times 10^5$ kob/mL, *E. aerogenes* için $1,5 \times 10^5$ kob/mL ve *B. Subtilis* için $7,3 \times 10^5$ kob/mL derişimindeki bakteri çözeltileri kullanılmıştır. Her bir bakteriden elde edilen SERS sinyal şiddetleri karşılaştırılmıştır.

3.11.3. SERS Ölçümleri

SERS cihazı ile DTNB etiketi sinyalleri alınmıştır. Kalibrasyon eğrisi oluşturulurken, optimizasyon deneyleri, seçicilik deneyi, biyolojik örnek deneyi ve haritalandırma deneyinin sonucunda elde edilen Raman spektrumlarının takibinde DTNB molekülünün en iyi gözlenen pikini oluşturan NO₂ bandının dalga boyu olan 1330 cm^{-1} seçilmiştir. $1,5 \times 10^1 - 1,5 \times 10^5$ kob/mL derişimlerinde *E. coli* bakteri çözeltileri kullanılmıştır. Ölçümler, lam üzerine yerleştirilen altın selüloz nanofibril yüzeylerden (Resim 3.7) elde edilen sinyal şiddetlerinin okunmasıyla gerçekleştirilmiştir. SERS sinyal şiddetlerinin görüntülenmesinde NuSpec programı kullanılmış ve mikroskop görüntüleme programı olarak da QCapture Pro 6.0 kullanılmıştır. Sinyal ölçümleri 20× objektifte, 60 sn olarak alınmıştır. Lazer spot alanı 30 µm ve lazer gücü 150 mW olarak ayarlanmıştır.



Resim 3.7. Raman spektroskopi cihazı.

3.11.4. Raman Haritalandırması

3.7'deki gibi hazırlanan 6 farklı altın selüloz nanofibril yüzey Nicolet iS50 spektrometresi 'nin numune haznesine yerleştirilmiştir. Elde edilen SERS sinyal şiddetleri aracılığıyla haritalandırma metodu kullanılarak yüzeyler üzerinde DTNB'den elde edilen sinyal yoğunluğu renk skalası yardımıyla görsel olarak gösterilmiştir.

3.11.5. Biyolojik Örnek Denemesi

Tez kapsamında geliştirilen yöntemin biyolojik numunelerde de uygulanabilir olduğunu kanıtlamak için marul yaprakları kullanılmıştır. Yapılan deney sonuçları LB (Luria-Bertani) katı besiyerinde bakteri sayımı yapılarak karşılaştırılmıştır. Marul yapraklarından elde edilen marul suyu çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiyi hazırlamak için orta büyüklükte 3 adet marul yaprağı deiyonize su ile iyice yıkanmıştır. Deney süresince steril ortamda çalışılmıştır. pH'ı 7,4 olarak hazırlanan 0,1 M PBS tamponundan 250 μ L kullanılmıştır. 15 g olarak tartılan marul, 250 μ L PBS tamponu içinde steril Stomacher poşeti kullanılarak fiziksel olarak parçalanmıştır (Resim 3.8).



Resim 3.8. Stomacher cihazı (solda), PBS çözeltisi içinde homojenize edilmiş marul çözeltisi (sağda).

Karışım, yaklaşık 1 dk içinde homojen hale gelmiştir. Homojen hale gelen marul suyu çözeltisinden 5 mL alınarak, içeriğinde bakteri olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla Hacettepe Üniversitesi Gıda mühendisliği bölümüne gönderilmiştir. Hem örnekten direkt olarak alınan hem de örnekten genel zenginleştirme yapılarak ekim yapılmış ve örneğin mL'sinde 10 dan az bakteri bulunduğu saptanmıştır.

Biyolojik örnek denemesinde kör çözelti olarak PBS tamponu ve $1,5 \times 10^2$ – $1,5 \times 10^5$ kob/mL konsantrasyonlarındaki *E. coli* çözeltileri kullanılmıştır. Dilüsyonlar hazırlanırken $1,5 \times 10^6$ kob/mL konsantrasyonundaki *E. coli* çözeltisinden 100 μ L, 0,1 M pH: 7,4 olarak hazırlanmış PBS tamponundan 900 μ L karıştırılmıştır. Böylece 10 kat seyreltme yapılmış olup bakteri konsantrasyonu $1,5 \times 10^5$ olarak elde edilmiştir. Bu çözelti altın selüloz nanofibril yüzey yerleştirilmiş ve karıştırıcıda 30 dk boyunca 150 rpm de etkileşmesi amacıyla çalkalayıcıda bekletilmiştir. Bu sayede yüzey ile bakterilerin etkileştirilmesi sağlanmıştır. Aynı prosedür $1,5 \times 10^4$, $1,5 \times 10^3$ ve $1,5 \times 10^2$ kob/mL bakteri konsantrasyonlarında olacak şekilde hazırlanan tüm çözeltilere de uygulanmıştır. Bu işlemler sonucunda hazırlanan yüzeylerin sinyal şiddetleri SERS kullanılarak ölçülmüştür.

3.11.6. SEM Görüntüsü İçin Örneklerin Hazırlanması

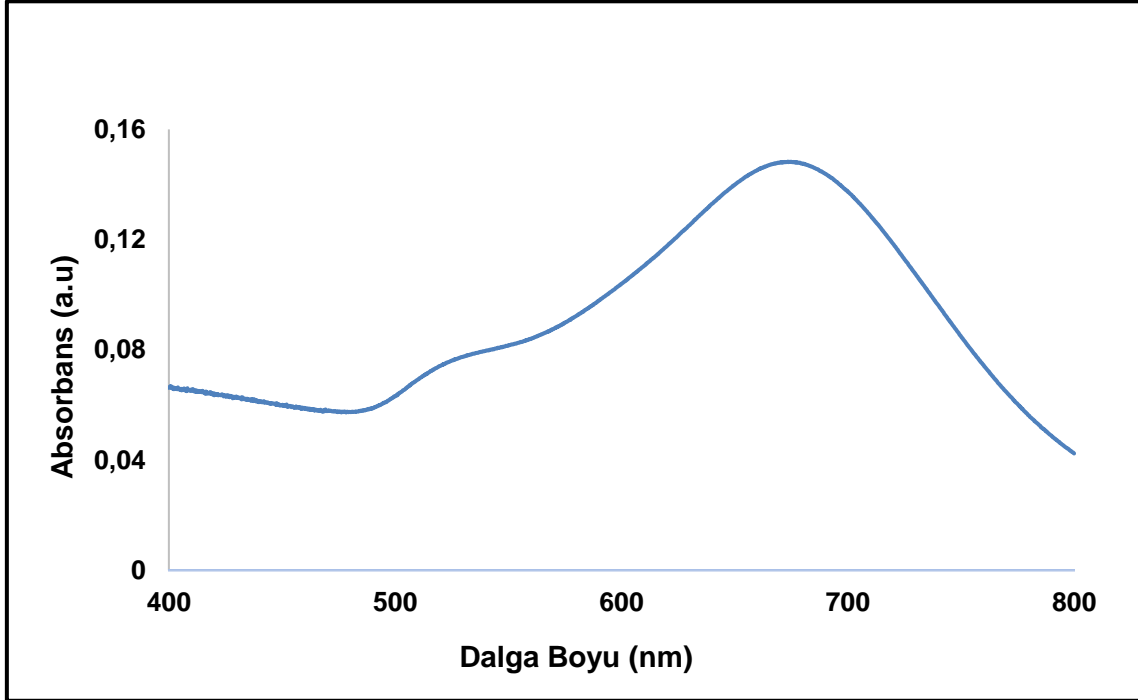
Modifiye edilmemiş ve modifiye edilmiş altın selüloz nanofibril yüzey, modifiye edilmiş altın selüloz nanofibril yüzeye bağlanmış *E. coli* kompleks yüzey ve *E. coli* bağlanmış altın selüloz nanofibril yüzeye bağlanmış altın çubuk nanopartikül kompleksinin yüzey görüntülerini elde etmek amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) cihazı kullanılmıştır. Bakteri hücrelerinin morfolojilerini ve yüzeyel yapılarının bütünlüğünü korumak amacıyla sabitleme işlemi uygulanmıştır. Bakteri ile etkileştirilmiş olan yüzeyleri sabitlemek amacıyla farklı fiksatif çözeltileri hazırlanmıştır.

Numunelerin görüntülenmesini sağlamak ve görüntüleri iyileştirmek için numunelerin kaplanması gerekmektedir. Numunelerin üzerine iletken bir metal tabakası oluşturmak termal hasarı azaltır ve SEM deki topografik inceleme için gereken ikincil elektron sinyalinin iyileştirir. Kullanılan kaplama tekniği çözünürlüğü artırır. Deneyler sırasında bu çözünürlüğü arttırmak için püskürtmeli altın kaplama yöntemiyle kaplama yapılmıştır. SEM görüntüleri Hacettepe Hunitek merkezinden alınmıştır.

4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR VE BULGULAR

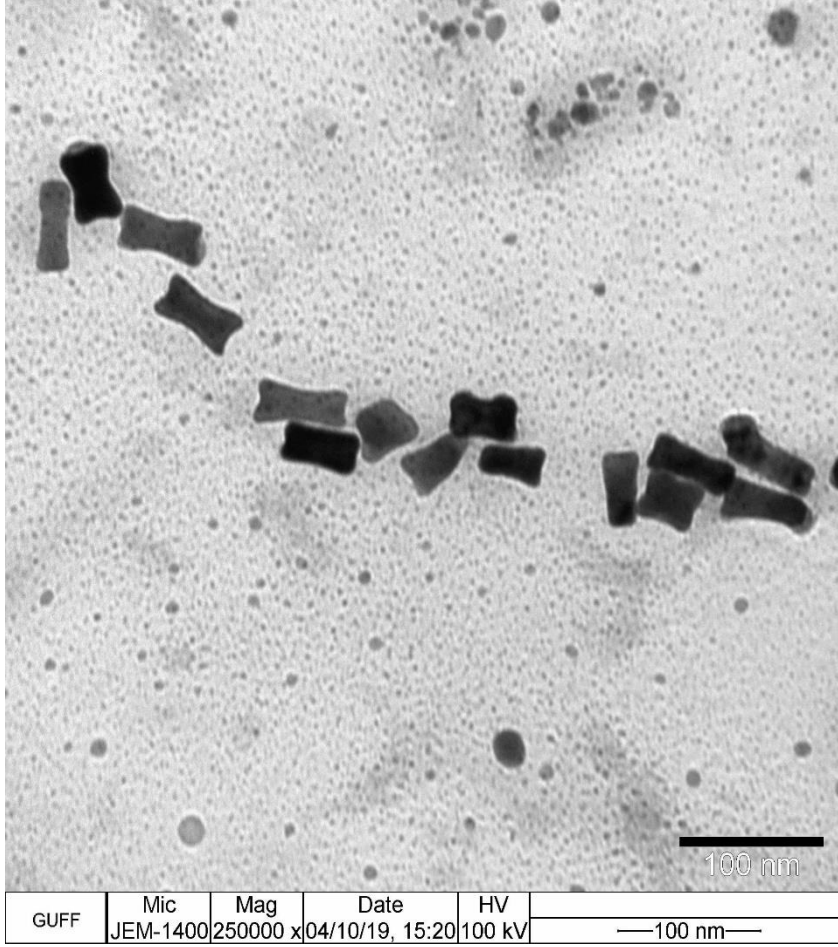
4.1. Altın Çubuk Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen altın çubuk nanopartiküllerinin karakterizasyonu UV-GB Spektrofotometre ve TEM cihazları kullanılarak yapılmıştır. Şekil 4.1'de altın çubuk nanopartiküllerin UV-GB Spektrofotometre cihazıyla kaydedilen iki ayrı karakteristik absorpsiyon spektrumu gözlenmektedir. Altın çubuk nanopartiküllerin görünen ilk absorpsiyon piki yaklaşık 524 nm'deki banttır ve enine (çapraz) plazmon (rezonans) bandı olarak adlandırılır. Görünen ikinci absorpsiyon piki ise yaklaşık 670 nm'deki banttır ve boyuna plazmon bandı olarak adlandırılır.



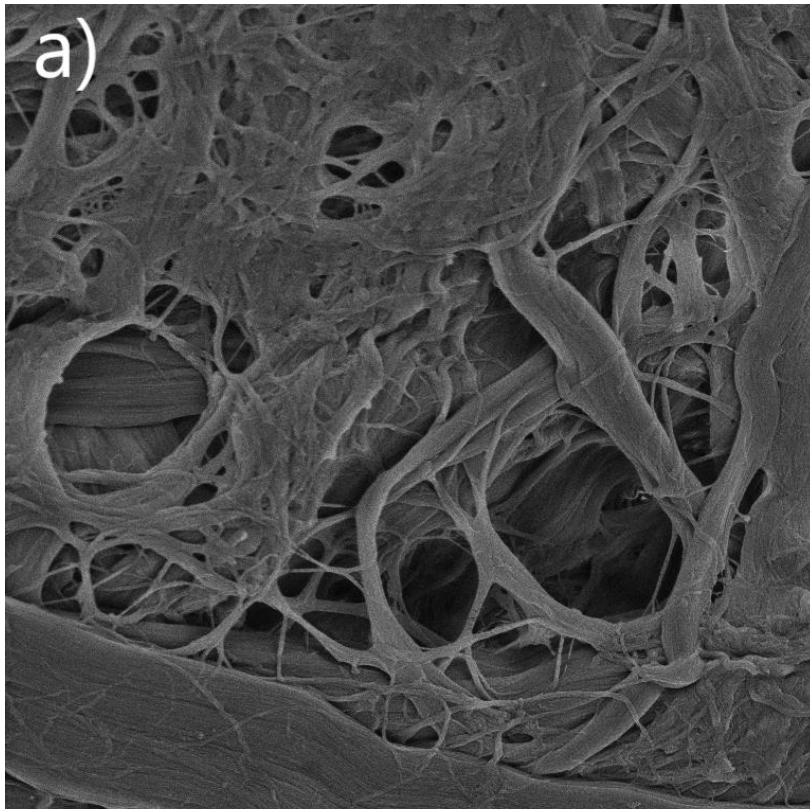
Şekil 4.1. Altın çubuk nanopartiküllerin UV-GB absorpsiyon spektrumu.

Sentezlenen altın çubuk nanopartiküllerin TEM görüntüleri incelendiğinde boyutlarının yaklaşık 50x10 nm olduğu görülmektedir (Şekil 4.2).

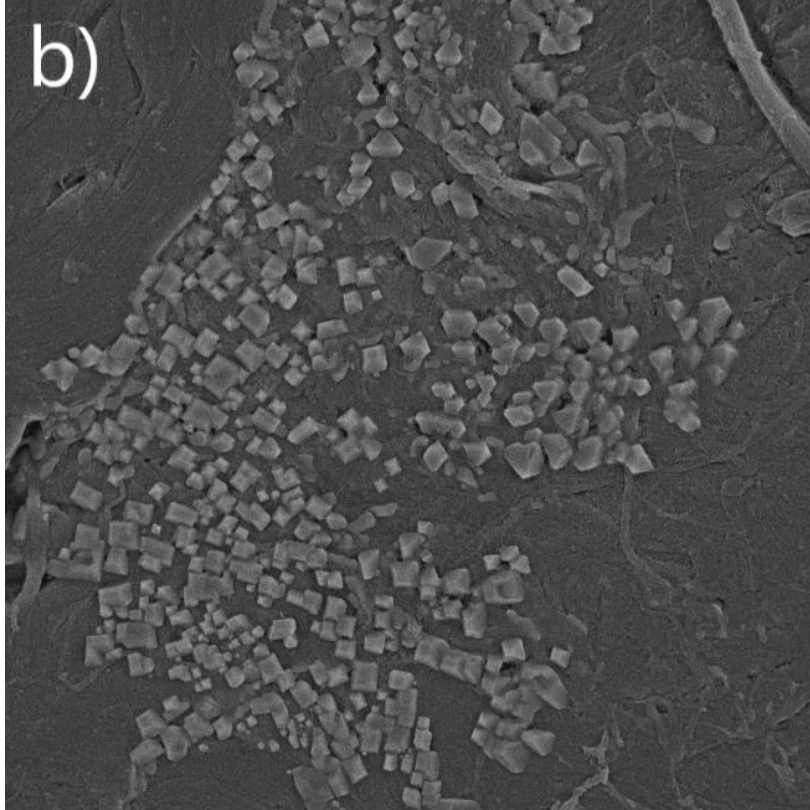


Şekil 4.2. Altın çubuk nanopartiküllerin TEM görüntüsü.

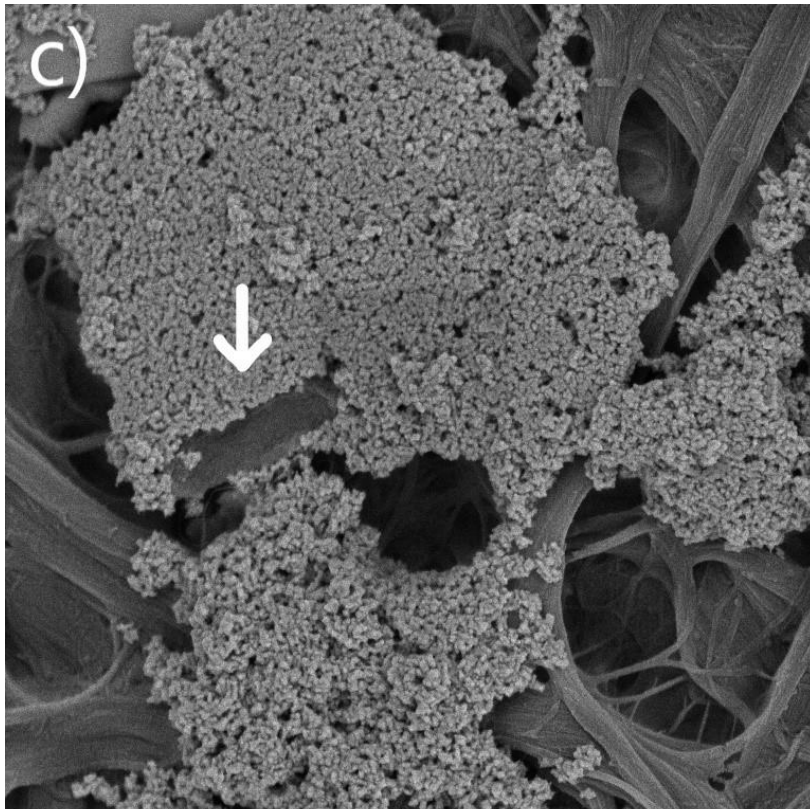
Altın selüloz nanofibril yüzeye ait SEM görüntüleri 500 nm, 1 μ m ve 2 μ m skalasında verilmiştir. Altın kaplanan numuneler farklı fiksatiflerle sabitlenmiştir. Görüntüler; selüloz nanofibril yüzey, altın selüloz nanofibril yüzey ve *E. coli* bakterisinin altın selüloz nanofibril yüzey üzerine tutunmuş olduğu SEM görüntüleridir (Şekil 4.3).



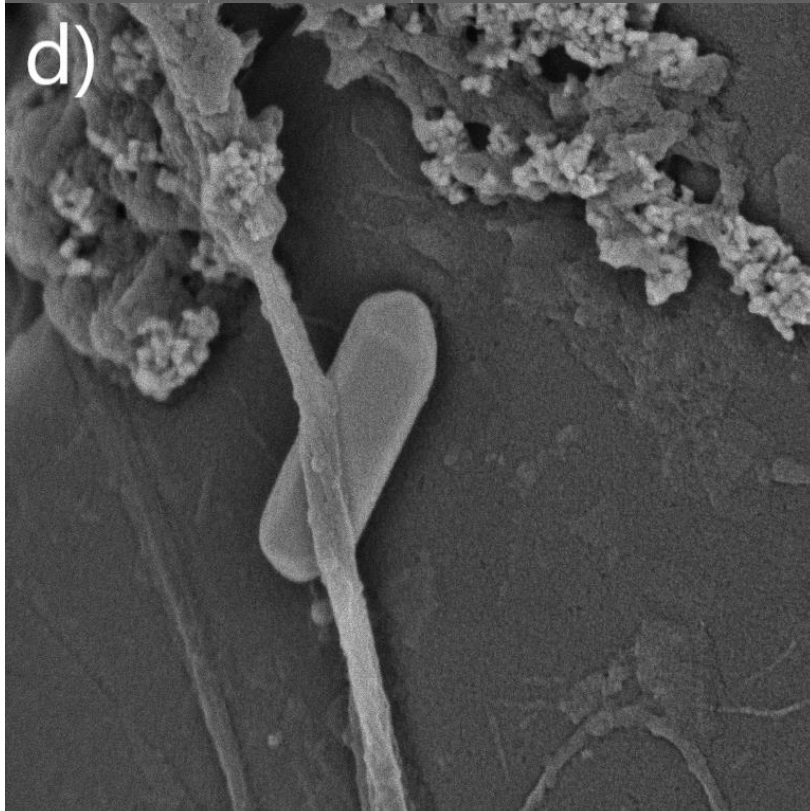
SEM HV: 3.0 kV	WD: 4.34 mm		GAIA3 TESCAN
View field: 8.48 μ m	Det: In-Beam SE	2 μ m	HUNITEK
SEM MAG: 24.5 kx	Date(m/d/y): 03/19/19		



SEM HV: 3.0 kV	WD: 4.35 mm		GAIA3 TESCAN
View field: 8.84 μ m	Det: In-Beam SE	2 μ m	HUNITEK
SEM MAG: 23.5 kx	Date(m/d/y): 03/19/19		



SEM HV: 3.0 kV	WD: 4.17 mm		GAIA3 TESCAN
View field: 5.01 μm	Det: In-Beam SE	1 μm	
SEM MAG: 41.4 kx	Date(m/d/y): 03/19/19		HUNITEK



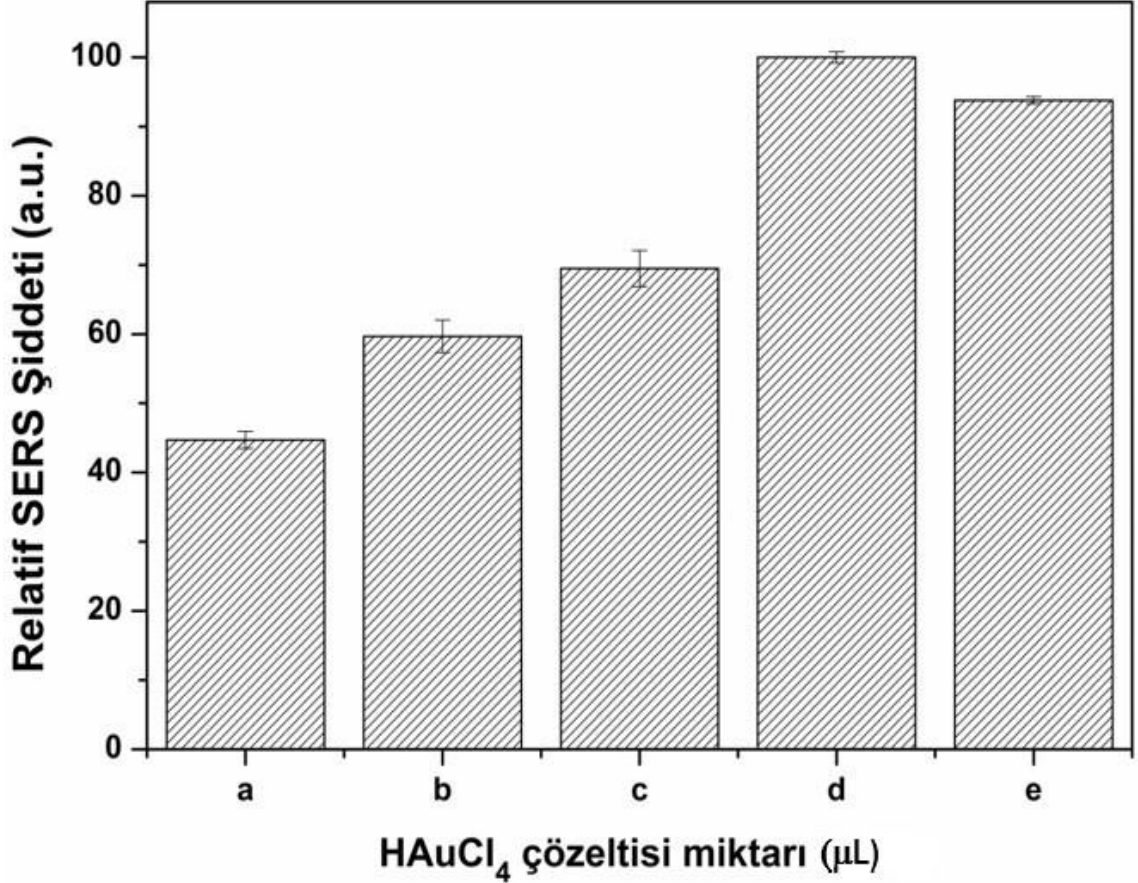
SEM HV: 3.0 kV	WD: 4.29 mm		GAIA3 TESCAN
View field: 2.57 μm	Det: In-Beam SE	500 nm	
SEM MAG: 80.7 kx	Date(m/d/y): 03/19/19		HUNITEK

Şekil 4.3. Selüloz nanofibril yüzeyin TEM görüntüleri a) selüloz nanofibril yüzey ve ağsı yapısı b) altın selüloz nanofibril yüzey c) Modifiye altın selüloz nanofibril yüzeye tutunmuş *E. coli* bakterisi d) Modifiye altın selüloz nanofibril yüzeye tutunmuş ve altın çubuk nanoparitikül ile etkileştirilmiş *E. coli* bakterisi.

4.2. Optimizasyon Deneylei

4.2.1. Selüloz Nanofibril Çözeltisine Eklenen H_{Au}Cl₄ Çözeltisi Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Bu optimizasyon deneyinde hazırlanan selüloz nanofibril çözeltilerine 50, 100, 150, 200, 250 µL H_{Au}Cl₄ çözeltisi eklenmiştir ve Raman spektroskopi şiddetleri karşılaştırılarak optimum miktarın tayin edilmesi amaçlanmıştır. Diğer parametreler sabit tutulmuştur. Deneyde kullanılan *E. coli*; $1,5 \times 10^5$ kob/mL'dir. DTNB etiketinin en belirgin piki olan 1330 cm^{-1} bandından elde edilen Raman spektroskopi sinyal şiddetleri, oransal olarak grafiğe aktarılmıştır (Şekil 4.4). Elde edilen sonuçlara göre; artan miktarda eklenen H_{Au}Cl₄ çözeltisi belli bir konsantrasyona kadar sinyal şiddetinde artışa neden olmuştur. Ancak belli konsantrasyondan sonra eklenen H_{Au}Cl₄ çözeltisi doaygunluğa ulaşp, Raman sinyal şiddetinin düşmesine sebep olmuştur. Sonuçlara göre elde edilen SERS sinyal şiddetleri karşılaştırıldığında optimum miktar 200 µL olarak tespit edilmiştir.

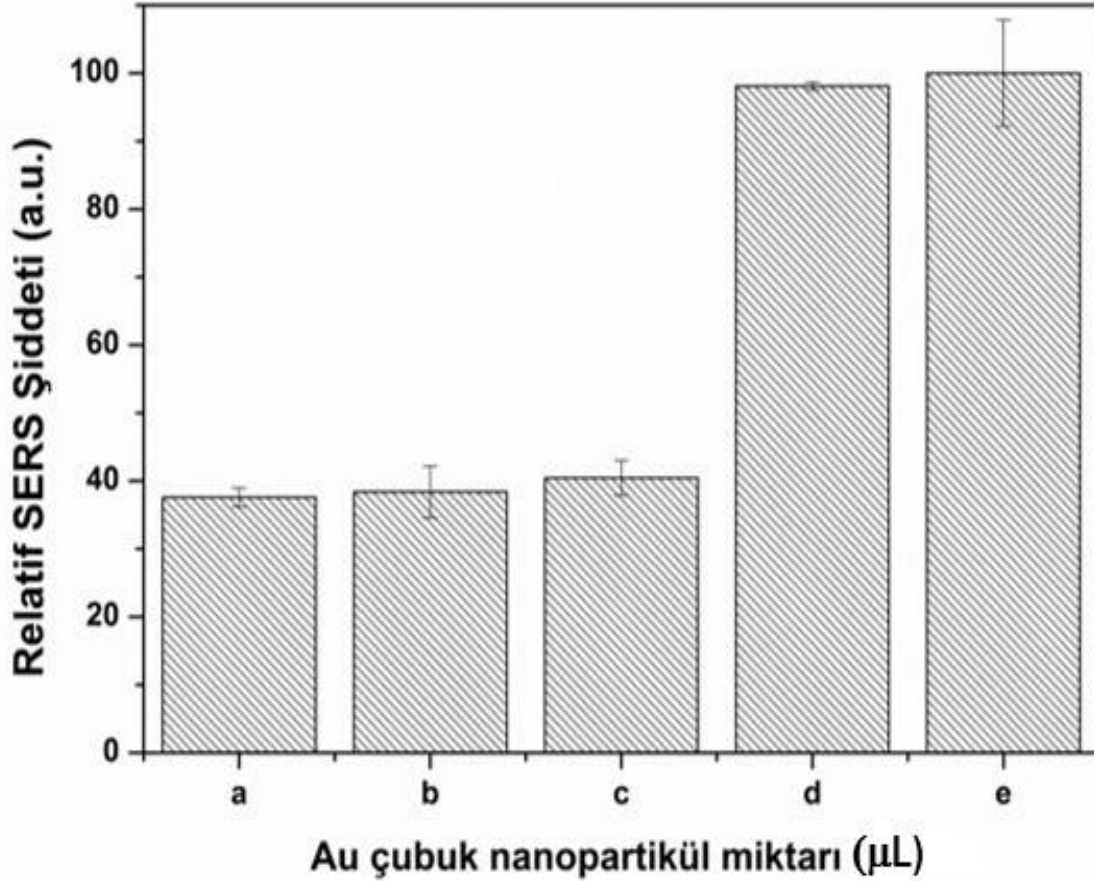


Şekil 4.4. Artan miktarlarda eklenen HAuCl₄ çözeltisinin sabit *E. coli* derişimlerinde elde edilen SERS sinyallerinin oransal olarak karşılaştırılması a)50 μL HAuCl₄ çözeltisi b)100 μL HAuCl₄ çözeltisi c)150 μL HAuCl₄ çözeltisi d)200 μL HAuCl₄ çözeltisi e)250 μL HAuCl₄ çözeltisi.

4.2.2. Altın Çubuk Nanopartikül Miktarının Optimizasyonu

Bu optimizasyon deneyinde hazırlanan altın selüloz nanofibril yüzeylerle *E. coli* bakterisi etkileştirilmiş ve bu yüzeyler 50, 100, 150, 200, 250 μL altın çubuk nanopartikül çözeltisi içine yerleştirilmiştir (Şekil 4.5). Deney sonunda elde edilen Raman spektroskopi şiddetleri karşılaştırılarak optimum miktarın tayin edilmesi amaçlanmıştır. Diğer parametreler sabit tutulmuştur. Deneyde kullanılan *E. coli*; 1,5×10⁵ kob/mL'dir. DTNB etiketinin en belirgin piki olan 1330 cm⁻¹ bandından elde edilen Raman spektroskopi sinyal şiddetleri, oransal olarak grafiğe aktarılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 200 μL ve 250 μL altın çubuk nanopartikül çözeltisi içine eklenen yüzeylerden en iyi sinyal şiddetleri alınmıştır.

Partikül miktarını en iyi sonuç gözlenen konsantrasyona yakın düzeyde kullanmak amacıyla deney verilerine göre en iyi sinyal şiddetinin gözleendiği konsantrasyonlardan biri olan 200 μL altın çubuk nanopartikül miktarı optimum miktar olarak belirlenmiş ve deneylerde bu miktar kullanılmıştır.

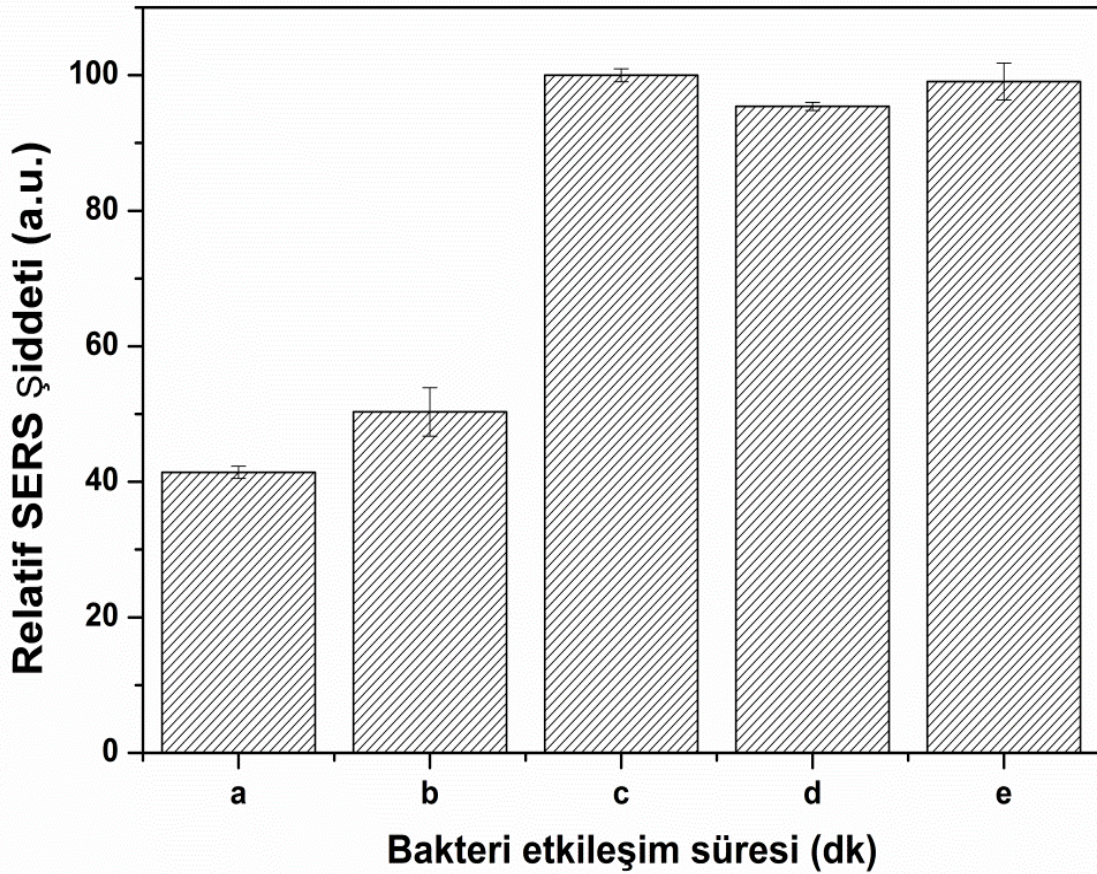


Şekil 4.5. Artan miktarlarda altın çubuk nanopartikül çözeltisinin sabit *E. coli* derişimlerinde *E. coli* ile etkileştirilmiş altın selüloz nanofibril yüzeyden elde edilen Raman sinyallerinin oransal olarak karşılaştırılması a) 50 μL altın çubuk nanopartikül çözeltisi b)100 μL altın çubuk nanopartikül c)150 μL altın çubuk nanopartikül çözeltisi d)200 μL altın çubuk nanopartikül çözeltisi e)250 μL altın çubuk nanopartikül çözeltisi.

4.2.3. Modifiye Altın Selüloz Nanofibril Yüzeyle *E. coli*'nin Etkileşim Süresi Optimizasyonu

Bu optimizasyon deneyinde modifiye edilmiş altın selüloz nanofibril yüzeyler ile *E. coli* bakterisinin farklı sürelerdeki etkileşiminin SERS sinyal şiddetine etkisi

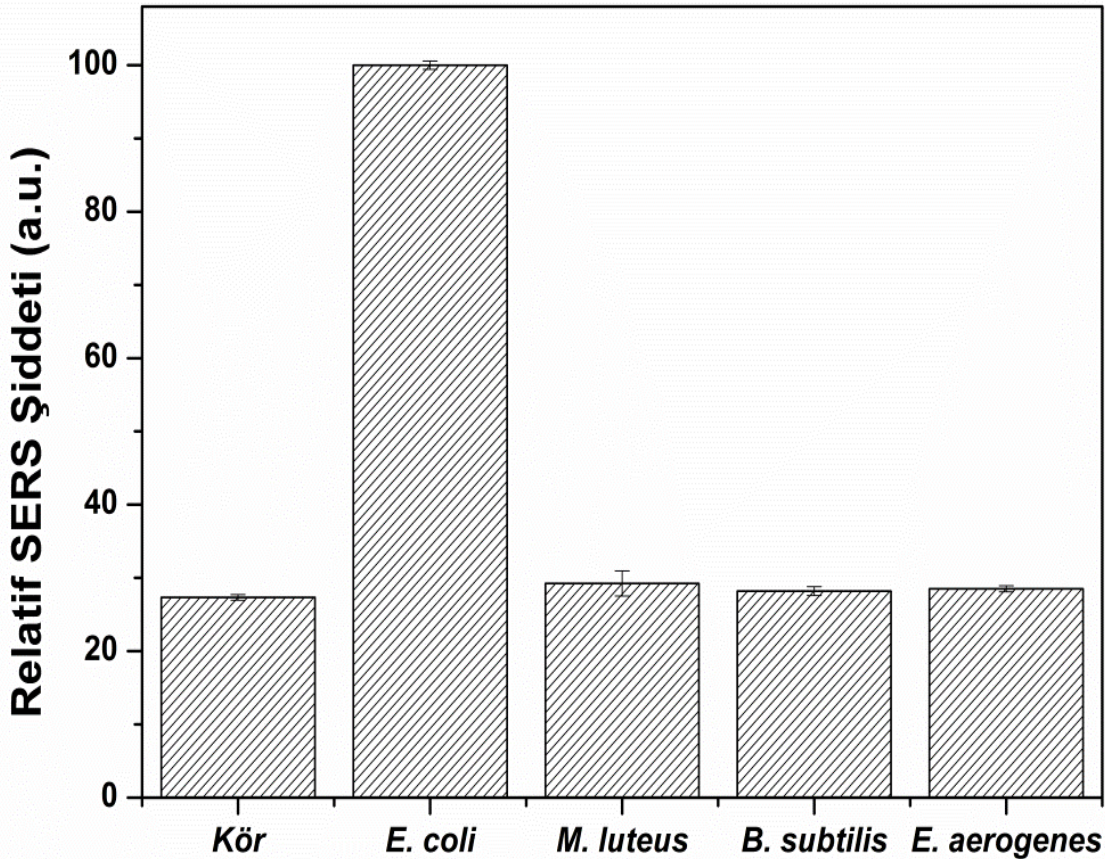
gösterilmiştir (Şekil 4.6). Bakteriler; 1, 15, 30, 45 ve 60 dakika süre ile çalkalayıcıda etkileşime bırakılmıştır. Deneyde kullanılan *E. coli*; $1,5 \times 10^5$ kob/mL'dir. Diğer parametreler sabit tutulmuştur. Bakteri etkileştirilmesi; oda sıcaklığında ve 1mL bakteri içeren eppendorf tüp içine yerleştirilen modifiye altın selüloz nanofibril yüzeyin çalkalayıcıda 150 rpm'de bekletilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Oransal olarak SERS sinyal şiddetleri karşılaştırıldığında *E. coli* bakterisinin modifiye altın selüloz nanofibril yüzeye hızla bağlandığı görülmektedir. Geliştirilen yöntemin hızlı sonuç vermesi hedeflendiğinden; elde edilen sonuçlar incelendiğinde 30 dakika sonunda bakterilerin yüzey ile tamamen etkileştiği sonucu görülmektedir. En iyi sonuçların 30 dakika etkileşim süresi sonucunda elde edilmesi sebebiyle optimum etkileşim süresi olan 30 dakika süre, deneylerde modifiye altın selüloz ile bakterilerin etkileşim süresi olarak seçilmiştir.



Şekil 4.6. Artan sürelerde modifiye altın selüloz nanofibril yüzey ile etkileşime bırakılan sabit *E. coli* derişimlerinde elde edilen Raman sinyallerinin oransal olarak karşılaştırılması a)1 dakika b)15 dk c)30 dk d)45 dk e)60 dk.

4.3. Geliştirilen Yöntemin Seçiciliğinin Test Edilmesi

Tez çalışması kapsamında geliştirilen tayin yönteminin *E. coli* bakterisine olan seçiciliğini test etmek için *M. luteus*, *B. subtilis*, *E. aerogenes* gibi 3 farklı bakteri türüne daha aynı yöntem uygulanmıştır (Şekil 4.7). Deneysel süresince *E. coli* için $1,5 \times 10^5$ kob/mL, *M. luteus* için $5,8 \times 10^5$ kob/mL, *E. aerogenes* için $1,5 \times 10^5$ kob/mL ve *B. Subtilis* için $7,3 \times 10^5$ kob/mL derişimindeki 1'er mL hacimdeki bakteri çözeltileri kullanılmıştır. Her bir bakteriden elde edilen SERS sinyal şiddetleri karşılaştırılmıştır (şekil 4.7). Elde edilen sonuçlara göre kör numune yani herhangi bir bakteri içermeyen numunenin SERS sinyal şiddeti ile *E. coli* haricindeki bakterilerin verdikleri SERS sinyal şiddetleri arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Elde edilen düşük Raman sinyallerinin, spesifik olmayan bağlanmaların bir sonucu olduğu bilinmektedir. Deney sonuçlarına göre yöntemin *E. coli* bakterisine seçici olduğu kanıtlanmıştır.

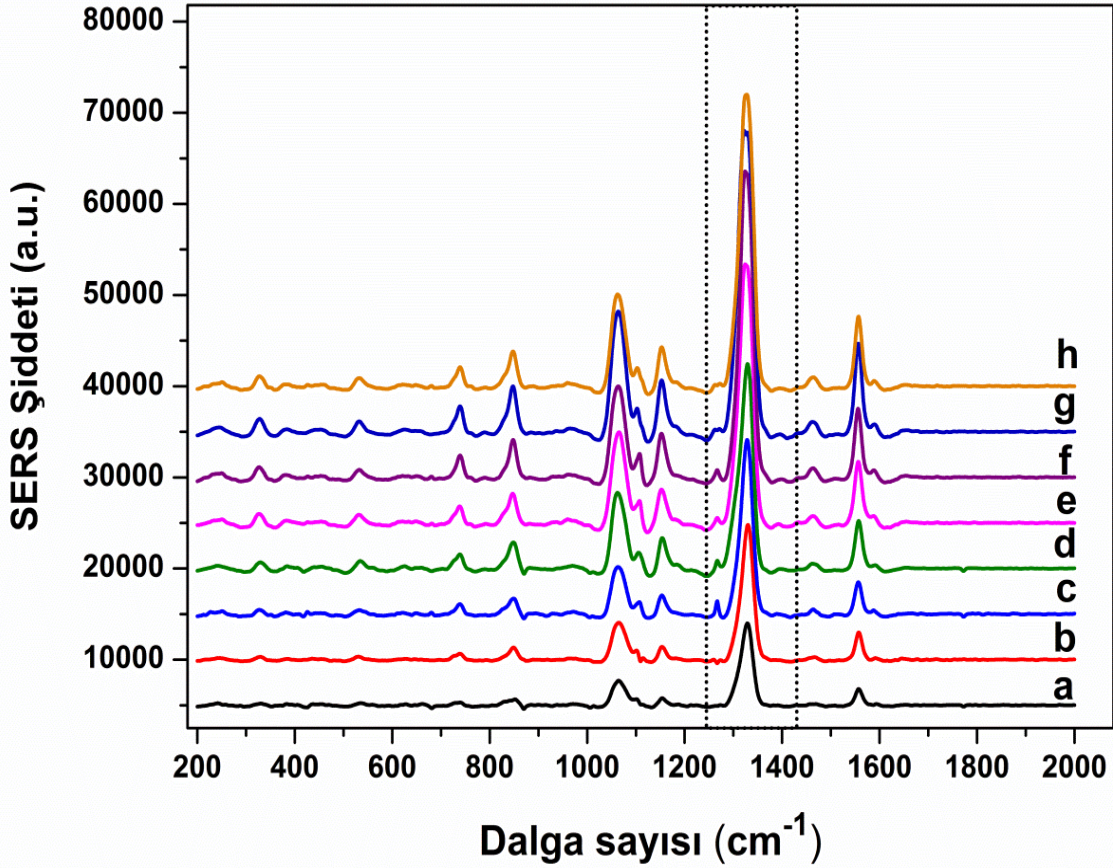


Şekil 4.7. *M. luteus*, *B. subtilis*, *E. aerogenes*, *E. coli* ve kör numune kullanılarak gerçekleştirilen deneylerden elde edilen SERS sinyal şiddetlerinin karşılaştırılması.

4.4. SERS Sonuçları ve Kalibrasyon Eğrisi

Gerekli optimizasyon deneyleri gerçekleştirildikten sonra geliştirilen yöntem için optimum konsantrasyonlar tespit edilmiştir. Bu yöntem ile tayin edilecek bakteri olarak seçilen *E. coli* bakterisinin K12 suşunun $1,5 \times 10^1$, $1,5 \times 10^2$, $1,5 \times 10^3$, $1,5 \times 10^4$, $1,5 \times 10^5$, $1,5 \times 10^6$, $1,5 \times 10^7$ kob/mL derişimleri ve kontrol olarak da kör numune kullanılmıştır. Kör numunede bakteri yerine 1mL pH: 7,4 fosfat tamponu kullanılmış ve diğer deney prosedürü aynı şekilde uygulanmıştır. Grafiğe aktarılan sonuçlarda DTNB molekülünün kendine özgü SERS karakteristik spektrumları görülmektedir (Şekil 4.8). Her spektrum; modifiye altın selüloz nanofibril yüzey üzerinde rastgele seçilen 10 noktanın ortalama ölçüm sonuçlarını temsil etmektedir.

1330 cm^{-1} ve 1558 cm^{-1} 'de görünen SERS bantları sırasıyla DTNB molekülünün nitro grubunun (NO_2) simetrik gerilmesi ve aromatik halka yapısının gerilmesi sonucu oluşmaktadır [82]. 1139 cm^{-1} ve 1048 cm^{-1} 'deki pikler ise CH_3 'teki salınımlar, C-N gerilmesi ve C-N bükülmesinden kaynaklanmaktadır [83]. DTNB etiketinin en belirgin piki olan 1330 cm^{-1} bandından elde edilen Raman spektroskopisi sinyal şiddetleri, bütün deneysel sonuçlarda kullanılmıştır.



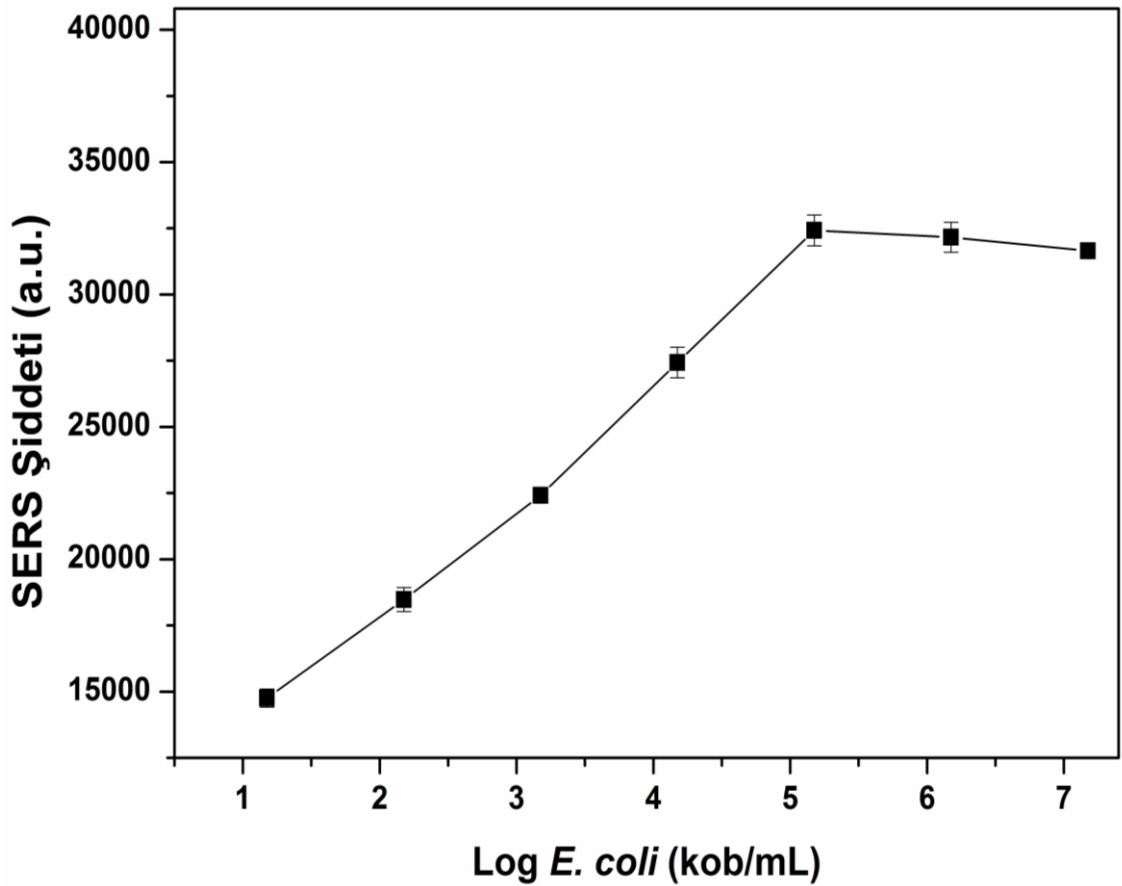
Şekil 4.8. Artan *E. coli* konsantrasyonuna karşı DTNB etiket molekülünden elde edilen SERS spektrumları ve sinyal şiddetleri a) kör b) $1,5 \times 10^1$ c) $1,5 \times 10^2$ d) $1,5 \times 10^3$ e) $1,5 \times 10^4$ f) $1,5 \times 10^5$ g) $1,5 \times 10^6$ h) $1,5 \times 10^7$.

Kör numuneden gelen sinyallerin spesifik olmayan bağlanmalar sebebiyle olduğu bilinmektedir. Artan bakteri konsantrasyonuna paralel olarak sinyal şiddetlerinin de artması; antikor bağlı altın çubuk nanopartiküllerin artan *E. coli* konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak daha çok bakteriye bağlanması ve DTNB molekülünden gelen spektrumların sinyal şiddetlerinin doğru orantılı olarak artması sebebiyledir. Grafikte görülmektedir ki; $1,5 \times 10^5$ konsantrasyonuna kadar bakteri konsantrasyonu arttıkça SERS sinyal şiddeti de artmaktadır. Ancak; $1,5 \times 10^6$ ve $1,5 \times 10^7$ bakteri konsantrasyonunda sinyal şiddetindeki artış durmakta ve hatta düşmektedir.

Bunun sebebi olarak modifiye altın CNF yüzey üzerindeki antikorların bağlayabileceği maksimum bakteriyi bağladığı ve doygunluk noktasına ulaştığı söylenebilir. Bir diğer sebep olarak etiket molekül olan DTNB miktarının yetersiz

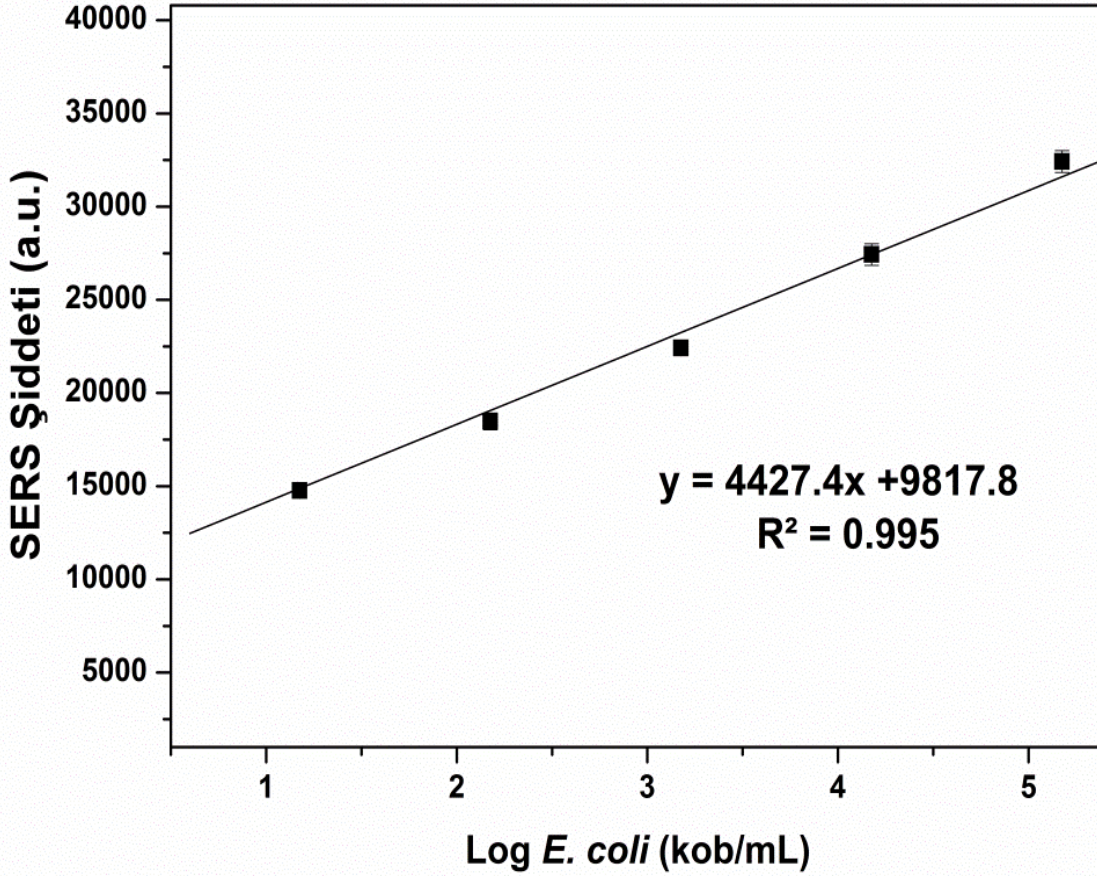
kalmış olabileceği söylenebilir. Ayrıca antikor miktarının da yeterli olmaması yüksek konsantrasyonlarda sinyal artışı gözlenememesine sebep olmuş olabilir. Antikor malzemesinin pahalı olması sebebiyle daha önceki çalışmalarda optimize edilen antikor miktarı kullanılmıştır [82]. Geliştirilen yöntemin düşük konsantrasyonlarda bakteri tayini yapabilmesi bu tez çalışmasının amaçlarından olduğu için, çok yüksek konsantrasyonlarda tayin yapmaya gerek duyulmamış ve deneylerde antikor miktarında artış yapılmamıştır.

Bakteri tayininin doğrusal olarak gerçekleştirilebildiğini göstermek adına kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Lineer kalibrasyonun $1,5 \times 10^5$ kob/mL noktasına kadar saptanabildiği, daha yüksek bakteri konsantrasyonlarında ise kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan saptığı gözlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. $1,5 \times 10^1$ - $1,5 \times 10^7$ kob/mL *E. coli* bakterisinin doğrusal olmayan kalibrasyon eğrisi.

Kalibrasyon eğrisi *E. coli* derişimlerine karşı alınan DTNB etiket molekülünün en belirgin piki olan 1330 cm^{-1} bandından elde edilen SERS sinyal şiddetlerinden kör numune sinyal şiddeti çıkarılarak oluşturulmuştur (Şekil 4.10). Kalibrasyon eğrisinde; farklı *E. coli* ($1,5 \times 10^1$ - $1,5 \times 10^5$ kob/mL) konsantrasyonlarına karşı DTNB molekülünden gelen SERS sinyal şiddetlerinin değişimi gösterilmektedir.



Şekil 4.10. Farklı *E. coli* ($1,5 \times 10^1$ - $1,5 \times 10^5$ kob/mL) konsantrasyonlarına karşı DTNB molekülünün 1330 cm^{-1} bandından elde edilen SERS sinyal şiddetlerinin gösterildiği kalibrasyon eğrisi.

Geliştirilen yöntemin tayin ve ölçüm limitlerini belirlemek amacıyla kalibrasyon eğrisi yardımıyla LOD (limit of detection, tayin limiti) ve LOQ (limit of quantification, ölçüm limiti) değerleri hesaplanmıştır. LOD ve LOQ değerlerini tanımlamak için kullanılan birkaç terim vardır. Genel olarak LOD; testin belirtilen koşulları altında tespit edilebilecek ancak zorunlu olarak ölçülmeyen bir numunede analitin en düşük konsantrasyonu olarak alınır. LOQ, belirtilen test koşulları altında kabul edilebilir doğruluk ve hassasiyetle belirlenebilen bir

numunedeki analitin en düşük konsantrasyonudur [84]. LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması, verilen eşitlikte gösterilmiştir.

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \sigma}{S} \quad \text{LOQ} = \frac{10 \sigma}{S}$$

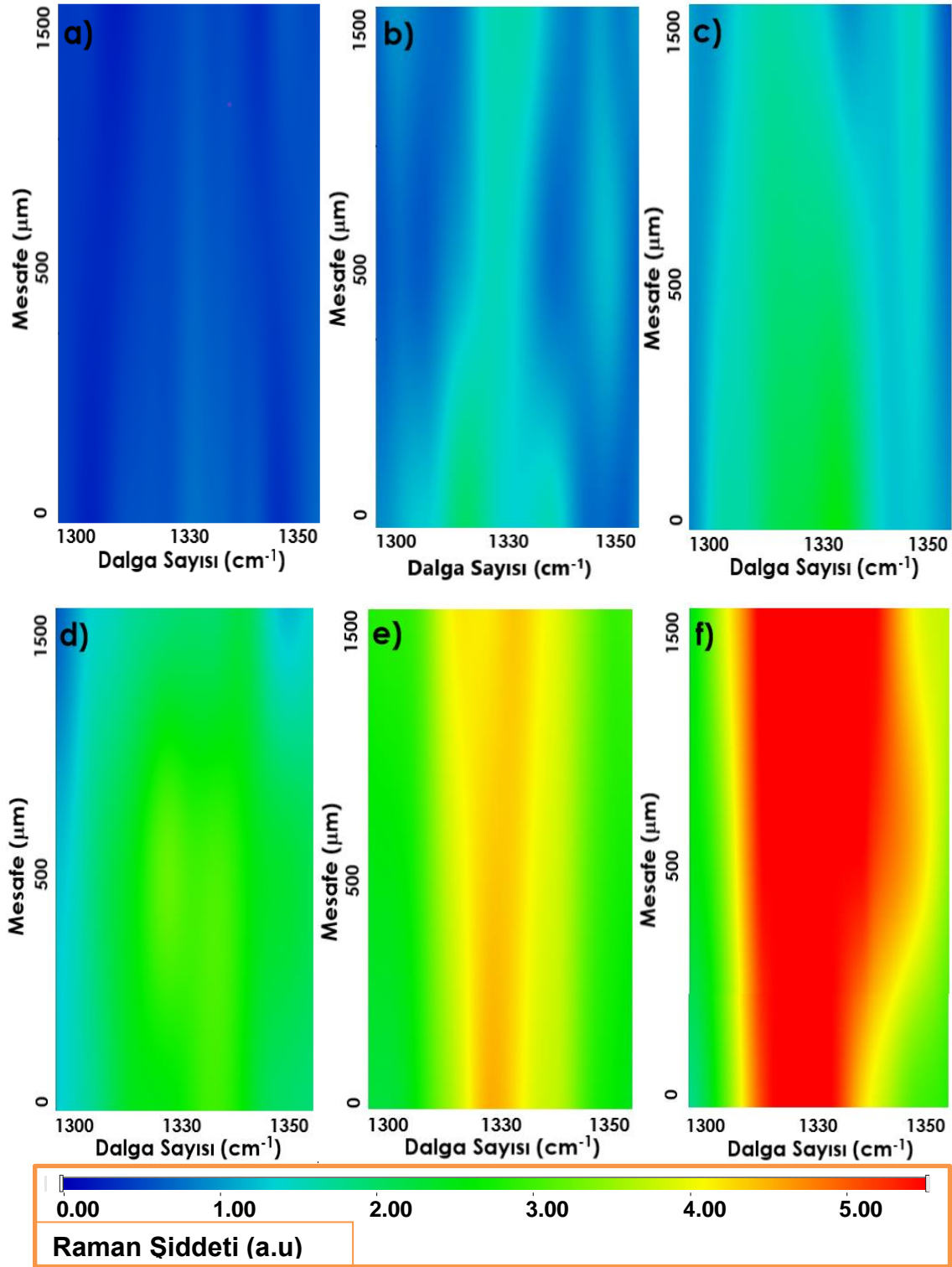
σ : regresyon katsayısının standart sapması

S : kalibrasyon eğrisinin eğimi

Bu eşitlikler kullanılarak tayin limiti 2 kob/mL, ölçüm limiti ise 6 kob/mL olarak hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisi yardımıyla R^2 değeri de (Regresyon katsayısı) 0,995 olarak hesaplanmıştır. Yöntemin doğrusal aralığı $1,5 \times 10^1$ - $1,5 \times 10^5$ kob/mL olarak bulunmuştur. Deneyler 3 kere tekrarlanmış ve sinyal ortalamaları kullanılmıştır. Bu sayede yöntemin tekrarlanabilir olduğu gösterilmiştir. Hesaplanan tayin limiti; geliştirilen yöntemin *E. coli* bakterisini hassas bir şekilde tespit edebildiğini göstermektedir.

4.5. Raman Haritalandırması

Raman haritalandırma yöntemi ile etiket molekül olan DTNB'nin numune üzerinde doğrusal bir hat boyunca $500 \mu\text{m}$ 'lik aralıklarla 3 ayrı noktadan Raman sinyalleri toplanılmış ve renk skalası yardımıyla dağılım, görsel olarak gösterilmiştir (Şekil 4.11). DTNB molekülünün en belirgin piki olan 1330 cm^{-1} bandından elde edilen SERS sinyal şiddetleri kullanılmıştır. DTNB molekülünün en yoğun dağıldığı noktalar kırmızı renkli bölgelerdir. En seyrek dağılım gösterdiği noktalar ise mavi renkli bölgelerdir. Haritalandırma çalışmasında *E. coli* bakterisinin $1,5 \times 10^1$ - $1,5 \times 10^5$ kob/mL gibi artan konsantrasyonları ve kör numune kullanılmıştır. Haritalandırma sonucunda DTNB molekülünün numune üzerindeki dağılımı görsel olarak da gösterilmiş, bu tez çalışması ile geliştirilen yöntemin güvenilirliği kanıtlanmıştır.



Şekil 4.11. Farklı *E. coli* konsantrasyonlarında DTNB molekülünün 1330 cm^{-1} bandından elde edilen sinyaller kullanılarak elde edilen Raman haritalandırma görselleri a) kör b) $1,5 \times 10^1$ c) $1,5 \times 10^2$ d) $1,5 \times 10^3$ e) $1,5 \times 10^4$ f) $1,5 \times 10^5$.

4.6. Biyolojik Örnek Denemesi

Tez kapsamında geliştirilen bakteri tayin yöntemini biyolojik örnek üzerinde de uygulanabilirliği araştırılmış ve bu sayede yöntemin güvenilirliği test edilmiştir. Biyolojik örnek olarak seçilen marul yaprakları fiziksel olarak parçalanıp ph: 7,4 PBS tamponuyla homojen hale getirilmiş ve bilinen konsantrasyonlarda *E. coli* bakterisiyle etkileştirilmiştir. Deney sonucunda geri kazanım değeri hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisi denklemi yardımıyla elde edilen sonuçlar klasik sayma yöntemiyle karşılaştırılmıştır. Geri kazanım değerleri çizelgede belirtilmiştir. $1,5 \times 10^3$ kob/mL bakteri konsantrasyonunun geri kazanımı %38'dir. $1,5 \times 10^4$ kob/mL bakteri konsantrasyonunun geri kazanımı %66,7'dir. $1,5 \times 10^5$ kob/mL bakteri konsantrasyonunun geri kazanımı 94,7'dir. (Çizelge 4.1)

Eklenen <i>E. coli</i> (kob/mL)	Bulunan <i>E. coli</i> (kob/mL)
1500	575
15000	10000
150000	142000

Çizelge 4.1. Eklenen ve bulunan *E. coli* bakteri sayısı.

5.SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bakteri tayini, toplumsal sağlık açısından önemini koruyan bir konudur. Hızlı ve etkin bakteri tayin yöntemleri geliştirmek amacıyla araştırmacılar tarafından çok sayıda çalışma gerçekleştirilmektedir. *E. coli* gibi fekal kaynaklı kirlilikten doğabilecek bakterileri, içme suyunda ya da sebzelerdeki kontaminasyonlarını tespit etmek hayati önem taşımaktadır. SERS uygulamaları için nanoselüloz bazlı substrat kullanımıyla ilgili çalışmalar da gün geçtikçe artmaktadır. Bu tez çalışmasında, SERS substratı olarak yeni CNF bazlı yüzey geliştirilmesi ve bakteri tayininde kullanılması amaçlanmıştır.

Bu tez kapsamında hızlı ve etkin *E. coli* bakteri tayini gerçekleştirebilmek için; altın selüloz nanofibril malzeme üretilmiş, DTNB etiketli altın çubuk nanopartiküller *E. coli* bakterisine özgü antikorlarla modifiye edilmiş ve son olarak SERS ölçümleri alınarak *E. coli* tayini yapılmıştır. Deneyleerde $1,5 \times 10^1$ - $1,5 \times 10^5$ kob/mL *E. coli* kullanılmıştır. Öncelikli olarak selüloz nanofibril çözeltisi içine H₂AuCl₄ eklenmiş ve yüksek sıcaklıkta etkileşime bırakılmış ve yeterli süre sonunda çözelti içinde su buharlaştırılarak katı, kağıt benzeri, esnek bir yüzey elde edilmiştir. Etkileşim öncesi açık sarı renkli olan çözelti etkileşim sonucunda açık pembe renge dönmüştür. Bu renk değişimi altın moleküllerinin nano boyuta indirgenmiş olduğunun göstergesidir ve bu partiküller selüloz nanofibrilin ağısı yapısına entegre olmuştur. Bu sayede *E. coli* bakterisinin yüzeye tutunmasını sağlayacak modifikasyon işlemleri gerçekleştirilebilir hale gelmiştir. 11-MUA molekülleri yüzeyindeki tiyol grupları altın nanopartiküllerle kuvvetli bağlar oluşturur. 11-MUA molekülleri üzerindeki karboksil grupları sayesinde modifikasyon işlemleri gerçekleştirilebilir. 11-MUA ile muamele edilmiş altın selüloz nanofibril yüzey, NHS/EDC molekülleri ile etkileştirildiğinde yüzeydeki karboksil grupları aktif hale gelmektedir. Son aşamada ise *E. coli*'ye özgü antikorun yüzeye bağlanabilmesi için avidin molekülü kullanılmıştır. Avidin ile etkileşim sonunda spesifik olmayan etkileşimleri engelleyebilmek adına, avidin ile bağlanmamış aktive edilen grupları kapatacak olan BSA çözeltisi kullanılmıştır. Avidin, biyotinli anti *E. coli* antikoruna yüksek afinitesi sayesinde spesifik olarak bağlanır ve böylece altın selüloz nanofibril yüzey üzerinde *E. coli* bakterisine özgü

antikorlar yer edinmiş olur. Modifiye edilmiş bu yüzeyler, konsantrasyonları bilinen farklı *E. coli* derişimindeki çözeltiler içine yerleştirilip etkileşmeleri sağlandıktan sonra *E. coli* bakterileri, yüzeye tutunmaktadır. Elde edilen *E. coli* tutturulmuş yüzeylerden SERS ölçümü yapabilmek ve sinyal şiddetini arttırmak amacıyla altın çubuk nanopartiküller sentezlenmiş ve öncelikle SERS etiket molekülü olan DTNB ile etkileştirilip *E. coli* bakterisine bağlanabilmesi için yüzey modifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen altın çubuk nanopartiküllerin karakterizasyonu TEM ve UV-GB spektrofotometre cihazlarıyla yapılmıştır. UV-GB spektrofotometre cihazlarıyla yaklaşık 524 nm'de görülen pik, altın çubuk nanopartiküllere özgüdür, bu sayede altın çubuk nanopartikül tanımlanmıştır. Selüloz nanofibrilin modifikasyon basamakları aynı şekilde altın çubuk nanopartiküllere de uygulanmış ve sonuçta *E. coli* bakterisine özgü antikorlar altın çubuk nanopartikül yüzeyine entegre olmuştur. Modifiye edilmiş altın selüloz nanofibril yüzey, modifiye edilen altın çubuk nanopartikül çözeltisi içine yerleştirilmiş ve etkileşim sonucunda yüzeydeki *E. coli* bakterilerine tutunmuştur.

Deneysel koşulların optimize edilmesi için çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Selüloz nanofibril çözeltisine 50, 100, 200, 250, 300 µL HAuCl₄ çözeltisi eklenmiş SERS sinyal şiddetleri yardımıyla optimum miktar 200 µL olarak tespit edilmiştir. Selüloz nanofibril çözeltiliye eklenen altın çözeltisinin yüksek konsantrasyonlarda sinyal şiddetinde düşmeye sebep olduğu görülmüştür. Modifiye edilmiş altın selüloz nanofibril yüzeyler ile *E. coli* bakterisinin etkileşim süresinin SERS sinyal şiddetine etkisi araştırılmıştır. Bakteriler; 1, 15, 30, 45 ve 60 dakika süre ile çalkalayıcıda etkileşime bırakılmıştır ve optimum sürenin 30 dakika olduğu gözlenmiştir. Etkileşim süresi daha fazla uzatıldığında SERS sinyal şiddetinde anlamlı bir artış olmadığı gözlenmiştir. 30 dakika gibi kısa bir sürenin bakterilerin yüzeye bağlanabilmesi için yeterli olduğu görülmüş, tezin amaçlarından biri olan hızlı bakteri tayini gerçekleştirilmiştir. Modifiye altın çubuk nanopartikül konsantrasyonunu optimize etmek için modifiye altın selüloz nanofibril yüzeye bağlı *E. coli* içeren yüzeyler 50, 100, 150, 200 ve 250 µL altın çubuk nanopartikül çözeltisi içinde etkileştirilmiştir. Elde edilen SERS sinyal şiddetleri karşılaştırıldığında optimum miktar 200 µL olarak bulunmuştur. Partikül miktarının optimum konsantrasyondan fazla olması durumunda anlamlı bir SERS sinyal

şiddet farkı gözlenmediğinden minimum partikül kullanımı için optimum miktar 200 µL olarak seçilmiştir. Kimyasal maddelerin tasarruflu kullanılması amacıyla daha önceki çalışmalarda optimize edilen antikor miktarı, DTNB konsantrasyonu, avidin konsantrasyonu ve NHS/EDC konsantrasyonu gibi parametreler tekrar optimize edilmemiştir.

Tez çalışması kapsamında geliştirilen tayin yönteminin *E. coli* bakterisine olan seçiciliğini test etmek için *M. luteus*, *B. subtilis*, *E. aerogenes* bakteri türüne daha aynı yöntem uygulanmıştır. Her bir bakteriden elde edilen SERS sinyal şiddetleri karşılaştırıldığında kör numuneden gelen SERS sinyal şiddeti ile *E. coli* haricindeki bakterilerin verdikleri SERS sinyal şiddetleri arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Geliştirilen yöntemin *E. coli* bakterisine seçici olduğu kanıtlanmıştır.

Alınan SERS ölçümleriyle DTNB molekülünün 1330 cm⁻¹'deki en belirgin dalga boyundan elde edilen spektrumlar yardımıyla kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Raman haritalandırma metoduyla da DTNB molekülün yüzey üzerindeki dağılımının görseli elde edilebilmiştir. Tayin limiti 2 kob/mL, olarak hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisi yardımıyla R² değeri 0,995 olarak hesaplanmıştır. Yöntemin doğrusal aralığı 1,5×10¹- 1,5×10⁵ kob/mL olarak bulunmuştur. 1,5×10⁵ kob/mL bakteriden daha yüksek bakteri konsantrasyonlarında geliştirilen yöntemle tayin gerçekleştirilememiştir. Bunun sebebi olarak da yüzeyde bağlanılabilecek antikor miktarının yetersiz gelmesi gösterilebilir. Ancak bu tez kapsamında düşük konsantrasyonlarda bakteri tayini hedeflendiğinden antikor miktarı arttırımı yapılmamıştır. Hesaplanan tayin limiti; geliştirilen yöntemin *E. coli* bakterisini hassas bir şekilde tespit edebildiğini göstermektedir.

SEM görüntüleriyle selüloz nanofibril yüzeyin ağısı yapısı ve içine entegre olmuş altın nanopartiküller gösterilmiştir. *E. coli* bakterisinin yüzeye tutunması da görüntülenebilmiştir. Literatürde, araştırmalarımıza göre, bu görüntü ilk kez gösterilmektedir. Geliştirilen tayin yönteminin avantajları ise; kağıt benzeri bir yüzey üzerinde bakteri tayinine olanak sağlanabilmesi, yaklaşık 1 saat gibi bir

sürede analizin gerçekleştirilebilmesi, SERS yöntemi kullanılarak hedef bakteri konsantrasyonlarının hassas bir şekilde tayin edilebilmesidir.

Zhang ve arkadaşları; selüloz nanofiber malzemeyle altın çubuk nanopartiküllerini etkileştirip küçük molekülleri ve hücreleri yakalayabilen bir filtrasyon membranı oluşturmuş ve SERS yöntemiyle elde ettikleri sonuçları paylaşmıştır. 2 farklı lazer gücünde yapılan deneyler sonucunda kısa dalga boyunda (532 nm) Rodamin B6G boyasının pikomolar konsantrasyonlarının ölçülebildiği, daha uzun dalga boyu lazer (785 nm) kullanıldığında ise *E. coli* bakterisinin 10^7 ve 10^8 kob/mL konsantrasyonlarının yakalanabildiğini ve entegrasyon süresinin saatler süresinden dakikalar süresine kısaldığı bildirilmiştir [85].

Liu ve arkadaşları; kuş lökozu virüsü J alt grubu tayini için nanoselüloz-altın nanopartikül hibrit malzemesi ve diğer malzemelerle çoklu sinyal çoğaltması yoluyla sandviç tipi elektrokimyasal immünosensör geliştirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda $10^{2.08}$ ve $10^{4.0}$ DKID₅₀/mL (DKID₅₀: Doku kültürü infeksiyöz doz) arası doğrusal yanıt gösterdiği ve LOD değerinin $10^{1.98}$ DKID₅₀/mL (S/N :3) olduğu gösterilmiştir [86].

Xiong ve arkadaşları; SERS yöntemi ile sütteki melamini tespit edebilen NFC-altın nanopartikül bazlı substrat geliştirmişlerdir. Bu analiz yönteminde regresyon katsayısı 0.9464 ve LOD değeri 1ppm olarak verilmiştir [87].

Huang ve arkadaşları; Gümüş-nanoselüloz kompozitler geliştirerek SERS yöntemiyle karbendazim pestisitini tayin edebildiklerini bildirmişlerdir. LOD değeri 1.0×10^{-8} M, Regresyon katsayısı 0.98 olarak verilmiştir [88].

Luo ve arkadaşları; *E. coli* O157: H7 bakterisinin hızlı tespiti için selüloz nitrat nanofiber ve iletken manyetik nanopartiküller kullanarak kağıt tabanlı yanal akış immünobiyosensörü geliştirmişlerdir. Bu biyosensörle, 8 dakikalık bir toplam tespit süresinde LOD değerini 67 kob/mL olarak bildirmişler ve test sonuçlarının 10^1 - 10^4 kob/mL aralığında doğrusal olduğunu göstermişlerdir [89].

Bu tez çalışmasında bakteri tayini amacıyla SERS ölçümünde güçlü elektromanyetik alan oluşturmak için esnek bir SERS substratı ve oldukça gözenekli ağısı yapısı sayesinde altın çubuk nanopartikülleri yüklemek amacıyla NCF kullanılmıştır. Hassas ve hızlı bakteri tayini için geliştirilen bu yöntemin, literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] H. Lodish, J.E. Darnell, A. Berk, C.A. Kaiser, M. Krieger, M.P. Scott, A. Bretscher, H. Ploegh, P. Matsudaira, Molecular cell biology, Macmillan, **2008**.
- [2] L.A. Urry, M.L. Cain, S.A. Wasserman, P.V. Minorsky, J.B. Reece, Campbell biology, Pearson Education, Incorporated, **2017**.
- [3] P.R. Murray, K.S. Rosenthal, M.A. Pfaller, A.C. Baştustaoğlu, Ş.T. Yıldırım, M. Tanyüksel, M. Yapar, Tıbbi mikrobiyoloji, Atlas Kitapçılık, **2010**.
- [4] K. Rogers, Bacteria and viruses, Britannica Educational Publishing, **2010**.
- [5] WHO, Food Safety, pp., **2015**.
- [6] M.A. Fikiet, S.R. Khandasammy, E. Mistek, Y. Ahmed, L. Halámková, J. Bueno, I.K. Lednev, Surface enhanced Raman spectroscopy: A review of recent applications in forensic science, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 197 255-260, **2018**.
- [7] A. Tozluoğlu, Y. Çöpür, Ö. Özyürek, S. Çıtlak, Nanoselüloz üretim teknolojisi, Turkish Journal of Forestry, 16 203-219, **2015**.
- [8] M.T. Madigan, J.M. Martinko, P.V. Dunlap, D.P. Clark, Brock biology of microorganisms 12th edn, Int. Microbiol, 11 65-73, **2008**.
- [9] J.B. Reece, L.A. Urry, M.L. Cain, S.A. Wasserman, P.V. Minorsky, R.B. Jackson, Campbell biology, Pearson Boston, **2014**.
- [10] Anonymous, Gram Boyama Tekniği, pp., **2018**.
- [11] J.M. Rangel, P.H. Sparling, C. Crowe, P.M. Griffin, D.L. Swerdlow, Epidemiology of Escherichia coli O157: H7 outbreaks, united states, 1982–2002, Emerging infectious diseases, 11 603, **2005**.
- [12] C.D.C.a. Prevention, E. coli (Escherichia coli), pp., **2014**.
- [13] WHO, E. coli, pp., **2018**.
- [14] C.f.D.C.A. Prevention, E. coli and Food Safety , , pp., **2019**.

- [15] S.T. Odonkor, J.K. Ampofo, Escherichia coli as an indicator of bacteriological quality of water: an overview, *Microbiology research*, 4 e2-e2, **2013**.
- [16] L. Váradi, J.L. Luo, D.E. Hibbs, J.D. Perry, R.J. Anderson, S. Orenge, P.W. Groundwater, Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future, *Chemical Society Reviews*, 46 4818-4832, **2017**.
- [17] B. Priyanka, R.K. Patil, S. Dwarakanath, A review on detection methods used for foodborne pathogens, *The Indian journal of medical research*, 144 327, **2016**.
- [18] Y. Wang, J.K. Salazar, 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**.
- [19] M. Somma, M. Querci, *The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms - The Polymerase Chain Reaction (PCR)*, pp.,
- [20] P. Rajapaksha, A. Elbourne, S. Gangadoo, R. Brown, D. Cozzolino, J. Chapman, A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms, *Analyst*, 144 396-411, **2019**.
- [21] A. Ahmed, J.V. Rushworth, N.A. Hirst, P.A. Millner, Biosensors for whole-cell bacterial detection, *Clinical microbiology reviews*, 27 631-646, **2014**.
- [22] Y. Fang, R. Ramasamy, Current and prospective methods for plant disease detection, *Biosensors*, 5 537-561, **2015**.
- [23] H. Kargarzadeh, I. Ahmad, S. Thomas, A. Dufresne, *Handbook of nanocellulose and cellulose nanocomposites*, John Wiley & Sons**2017**.
- [24] Y.M. Chen, J.P. Gong, Y. Osada, Gel: a potential material as artificial soft tissue, *Macromolecular Engineering: Precise Synthesis, Materials Properties, Applications*, 2689-2717, **2007**.
- [25] P. Wang, S. Pang, B. Pearson, Y. Chujo, L. McLandsborough, M. Fan, L. He, Rapid concentration detection and differentiation of bacteria in skimmed milk using surface enhanced Raman scattering mapping on 4-

- mercaptophenylboronic acid functionalized silver dendrites, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 409 2229-2238, **2017**.
- [26] D. Ciialla, A. März, R. Böhme, F. Theil, K. Weber, M. Schmitt, J. Popp, Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403 27-54, **2012**.
- [27] N. Mungroo, S. Neethirajan, Biosensors for the detection of antibiotics in poultry industry—a review, *Biosensors*, 4 472-493, **2014**.
- [28] J. Van Rie, W. Thielemans, Cellulose–gold nanoparticle hybrid materials, *Nanoscale*, 9 8525-8554, **2017**.
- [29] F. Özdemir, D. Ramazanoğlu, A. Tutuş, Akıllı Malzemeler için Biyomimetik Yüzey Tasarımları, *Journal of Bartın Faculty of Forestry*, 20 1-1,
- [30] H. Zhu, W. Luo, P.N. Ciesielski, Z. Fang, J. Zhu, G. Henriksson, M.E. Himmel, L. Hu, Wood-derived materials for green electronics, biological devices, and energy applications, *Chemical Reviews*, 116 9305-9374, **2016**.
- [31] O.J. Rojas, *Cellulose chemistry and properties: fibers, nanocelluloses and advanced materials*, Springer**2016**.
- [32] H. Luo, G. Xiong, Y. Huang, F. He, Y. Wang, Y. Wan, Preparation and characterization of a novel COL/BC composite for potential tissue engineering scaffolds, *Materials Chemistry and Physics*, 110 193-196, **2008**.
- [33] M.A. Hubbe, O.J. Rojas, L.A. Lucia, Green modification of surface characteristics of cellulosic materials at the molecular or nano scale: A review, *BioResources*, 10 6095-6206, **2015**.
- [34] S. Kalia, A. Dufresne, B.M. Cherian, B. Kaith, L. Avérous, J. Njuguna, E. Nassiopoulos, Cellulose-based bio-and nanocomposites: a review, *International Journal of Polymer Science*, 2011, **2011**.
- [35] D.J. Gardner, G.S. Oporto, R. Mills, M.A.S.A. Samir, Adhesion and surface issues in cellulose and nanocellulose, *Journal of Adhesion Science and Technology*, 22 545-567, **2008**.

- [36] E. Amini, M. Tajvidi, D.J. Gardner, D.W. Bousfield, Utilization of Cellulose Nanofibrils as a Binder for Particleboard Manufacture, *Bioresources*, 12 4093-4110, **2017**.
- [37] H. Wei, K. Rodriguez, S. Rennecker, P.J. Vikesland, Environmental science and engineering applications of nanocellulose-based nanocomposites, *Environ-Sci Nano*, 1 302-316, **2014**.
- [38] X.F. Wang, Y. Chen, O.G. Schmidt, C.L. Yan, Engineered nanomembranes for smart energy storage devices, *Chem Soc Rev*, 45 1308-1330, **2016**.
- [39] N. Halib, F. Perrone, M. Cemazar, B. Dapas, R. Farra, M. Abrami, G. Chiarappa, G. Forte, F. Zanconati, G. Pozzato, L. Murena, N. Fiotti, R. Lapasin, L. Cansolino, G. Grassi, M. Grassi, Potential Applications of Nanocellulose-Containing Materials in the Biomedical Field, *Materials*, 10, **2017**.
- [40] A. Tayeb, E. Amini, S. Ghasemi, M. Tajvidi, Cellulose nanomaterials—binding properties and applications: a review, *Molecules*, 23 2684, **2018**.
- [41] D. Klemm, F. Kramer, S. Moritz, T. Lindstrom, M. Ankerfors, D. Gray, A. Dorris, Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials, *Angew Chem Int Edit*, 50 5438-5466, **2011**.
- [42] W. Bai, J. Holbery, K.C. Li, A technique for production of nanocrystalline cellulose with a narrow size distribution, *Cellulose*, 16 455-465, **2009**.
- [43] Anonim, Cellulose Lab | Nanocellulose, Cellulose NanoCrystal (Nanocrystalline Cellulose, CNC) and Cellulose Nanofibrils (CNF) Supplier, pp.,
- [44] Y. Habibi, L.A. Lucia, O.J. Rojas, Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications, *Chemical Reviews*, 110 3479-3500, **2010**.
- [45] J. Bras, D. Viet, C. Bruzzese, A. Dufresne, Correlation between stiffness of sheets prepared from cellulose whiskers and nanoparticles dimensions, *Carbohydr Polym*, 84 211-215, **2011**.

- [46] M. Roman, W.T. Winter, Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose, *Biomacromolecules*, 5 1671-1677, **2004**.
- [47] H.Y. Yu, Z.Y. Qin, B.L. Liang, N. Liu, Z. Zhou, L. Chen, Facile extraction of thermally stable cellulose nanocrystals with a high yield of 93% through hydrochloric acid hydrolysis under hydrothermal conditions, *J Mater Chem A*, 1 3938-3944, **2013**.
- [48] A.F. Jozala, L.C. de Lencastre-Novaes, A.M. Lopes, V.D. Santos-Ebinuma, P.G. Mazzola, A. Pessoa, D. Grotto, M. Gerenutti, M.V. Chaud, Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview, *Appl Microbiol Biot*, 100 2063-2072, **2016**.
- [49] L.R. Lynd, P.J. Weimer, W.H. van Zyl, I.S. Pretorius, Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology, *Microbiol Mol Biol R*, 66 506-+, **2002**.
- [50] Y. Numata, L. Mazzarino, R. Borsali, A slow-release system of bacterial cellulose gel and nanoparticles for hydrophobic active ingredients, *Int J Pharmaceut*, 486 217-225, **2015**.
- [51] D.N. Thompson, M.A. Hamilton, Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks, *Appl Biochem Biotech*, 91-3 503-513, **2001**.
- [52] S.A. Rehim, M. Singhal, K.C. Chung, Dermal Skin Substitutes for Upper Limb Reconstruction Current Status, Indications, and Contraindications, *Hand Clin*, 30 239-+, **2014**.
- [53] F. Cakar, I. Ozer, A.O. Aytakin, F. Sahin, Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium, *Carbohydr Polym*, 106 7-13, **2014**.
- [54] S. Tanskul, K. Amornthatree, N. Jaturonlak, A new cellulose-producing bacterium, *Rhodococcus* sp MI 2: Screening and optimization of culture conditions, *Carbohydr Polym*, 92 421-428, **2013**.
- [55] F. Mohammadkazemi, M. Azin, A. Ashori, Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media, *Carbohydr Polym*, 117 518-523, **2015**.

- [56] C.-H. Kuo, J.-H. Chen, B.-K. Liou, C.-K. Lee, Utilization of acetate buffer to improve bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*, *Food Hydrocolloids*, 53 98-103, **2016**.
- [57] A. Krystynowicz, W. Czaja, A. Wiktorowska-Jeziarska, M. Goncalves-Miskiewicz, M. Turkiewicz, S. Bielecki, Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose, *J Ind Microbiol Biot*, 29 189-195, **2002**.
- [58] W. Czaja, D. Romanovicz, R.M. Brown, Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture, *Cellulose*, 11 403-411, **2004**.
- [59] F. Hoeng, A. Denneulin, J. Bras, Use of nanocellulose in printed electronics: a review, *Nanoscale*, 8 13131-13154, **2016**.
- [60] A.F. Turbak, F.W. Snyder, K.R. Sandberg, Microfibrillated cellulose, a new cellulose product: properties, uses, and commercial potential, *J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Symp.:(United States)*, ITT Rayonier Inc., Shelton, WA, pp., **1983**.
- [61] A.H. Tayeb, M.A. Hubbe, P. Tayeb, L. Pal, O.J. Rojas, Soy proteins as a sustainable solution to strengthen recycled paper and reduce deposition of hydrophobic contaminants in papermaking: A bench and pilot-plant study, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5 7211-7219, **2017**.
- [62] F. Rol, M.N. Belgacem, A. Gandini, J. Bras, Recent advances in surface-modified cellulose nanofibrils, *Progress in Polymer Science*, **2018**.
- [63] E. Takacs, L. Wojnarovits, C. Foldvary, P. Hargittai, J. Borsa, I. Sajo, Effect of combined gamma-irradiation and alkali treatment on cotton-cellulose, *Radiat Phys Chem*, 57 399-403, **2000**.
- [64] D. Lv, M. Xu, X. Liu, Z. Zhan, Z. Li, H. Yao, Effect of cellulose, lignin, alkali and alkaline earth metallic species on biomass pyrolysis and gasification, *Fuel Processing Technology*, 91 903-909, **2010**.
- [65] T. Saito, A. Isogai, TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. The effect of oxidation conditions on chemical and crystal structures of the water-insoluble fractions, *Biomacromolecules*, 5 1983-1989, **2004**.

- [66] W. Zhu, J.Y. Zhu, R. Gleisner, X.J. Pan, On energy consumption for size-reduction and yields from subsequent enzymatic saccharification of pretreated lodgepole pine, *Bioresource Technol*, 101 2782-2792, **2010**.
- [67] M. Henriksson, G. Henriksson, L. Berglund, T. Lindström, An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers, *European Polymer Journal*, 43 3434-3441, **2007**.
- [68] N. Hayashi, T. Kondo, M. Ishihara, Enzymatically produced nano-ordered short elements containing cellulose I β crystalline domains, *Carbohydr Polym*, 61 191-197, **2005**.
- [69] S.J. Eichhorn, A. Dufresne, M. Aranguren, N. Marcovich, J. Capadona, S. Rowan, C. Weder, W. Thielemans, M. Roman, S. Renneckar, Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites, *Journal of materials science*, 45 1-33, **2010**.
- [70] M. Labet, W. Thielemans, Improving the reproducibility of chemical reactions on the surface of cellulose nanocrystals: ROP of ϵ -caprolactone as a case study, *Cellulose*, 18 607-617, **2011**.
- [71] T.G. Van De Ven, L. Godbout, *Cellulose: Fundamental Aspects*, BoD–Books on Demand, **2013**.
- [72] M.-C. Daniel, D. Astruc, Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, *Chemical reviews*, 104 293-346, **2004**.
- [73] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discussions of the Faraday Society*, 11 55-75, **1951**.
- [74] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D.J. Schiffrin, R. Whyman, Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid–liquid system, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 801-802, **1994**.

- [75] M. Valcárcel, Á.I. López-Lorente, Gold nanoparticles in analytical chemistry, Elsevier, **2014**.
- [76] M.A. Mackey, M.R. Ali, L.A. Austin, R.D. Near, M.A. El-Sayed, The most effective gold nanorod size for plasmonic photothermal therapy: theory and in vitro experiments, The Journal of Physical Chemistry B, 118 1319-1326, **2014**.
- [77] X. Yang, M. Yang, B. Pang, M. Vara, Y. Xia, Gold nanomaterials at work in biomedicine, Chemical reviews, 115 10410-10488, **2015**.
- [78] W. Zhou, X. Gao, D. Liu, X. Chen, Gold nanoparticles for in vitro diagnostics, Chemical Reviews, 115 10575-10636, **2015**.
- [79] L. An, Y. Wang, Q. Tian, S. Yang, Small gold nanorods: Recent advances in synthesis, biological imaging, and cancer therapy, Materials, 10 1372, **2017**.
- [80] N.R. Jana, L. Gearheart, C.J. Murphy, Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template, Advanced Materials, 13 1389-1393, **2001**.
- [81] B. Güven, Gıda uygulamalarına yönelik yüzeyde güçlendirilmiş Raman Spektroskopisini temel alan biyoanaliz yöntemlerinin geliştirilmesi, Y. Lisans, Gıda Müh. Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi, **2011**.
- [82] B. Guven, N. Basaran-Akgul, E. Temur, U. Tamer, İ.H. Boyacı, SERS-based sandwich immunoassay using antibody coated magnetic nanoparticles for Escherichia coli enumeration, Analyst, 136 740-748, **2011**.
- [83] D.S. Grubisha, R.J. Lipert, H.-Y. Park, J. Driskell, M.D. Porter, Femtomolar detection of prostate-specific antigen: an immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering and immunogold labels, Analytical chemistry, 75 5936-5943, **2003**.
- [84] U.D.o. Health, H. Services, Food, D. Administration, Analytical procedures and methods validation chemistry, manufacturing, and controls

documentation, US Department of Health and Human Services, Maryland, **2000**.

- [85] S. Zhang, R. Xiong, M.A. Mahmoud, E.N. Quigley, H. Chang, M. El-Sayed, V.V. Tsukruk, Dual-excitation nanocellulose plasmonic membranes for molecular and cellular SERS detection, *Acs Appl Mater Inter*, 10 18380-18389, **2018**.
- [86] C. Liu, J. Dong, G.I. Waterhouse, Z. Cheng, S. Ai, Electrochemical immunosensor with nanocellulose-Au composite assisted multiple signal amplification for detection of avian leukosis virus subgroup J, *Biosensors and Bioelectronics*, 101 110-115, **2018**.
- [87] Z. Xiong, X. Chen, P. Liou, M. Lin, Development of nanofibrillated cellulose coated with gold nanoparticles for measurement of melamine by SERS, *Cellulose*, 24 2801-2811, **2017**.
- [88] L. Huang, C. Wu, L. Xie, X. Yuan, X. Wei, Q. Huang, Y. Chen, Y. Lu, Silver-Nanocellulose Composite Used as SERS Substrate for Detecting Carbendazim, *Nanomaterials*, 9 355, **2019**.
- [89] Y. Luo, S. Nartker, M. Wiederoder, H. Miller, D. Hochhalter, L.T. Drzal, E.C. Alcocilja, Novel biosensor based on electrospun nanofiber and magnetic nanoparticles for the detection of E. coli O157: H7, *IEEE transactions on nanotechnology*, 11 676-681, **2011**.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 25/06/2019

Tez Başlığı / Konusu: *E. coli* Tayini İçin Altın Selüloz Nanofibril Materyal Geliştirilmesi


Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 71 sayfalık kısmına ilişkin 21/06/2019 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %6 'dır.

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 Orijinallik 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.


25/06/2019

Adı Soyadı: Saliha Nur TANIŞ
Öğrenci No: N14326090
Anabilim Dalı: Biyomühendislik
Programı: Biyomühendislik
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.


Prof. Dr. NECDET SAĞLAM

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Saliha Nur Tanış

Doęum yeri : Ankara

Doęum tarihi : 31.07.1992

Yabancı dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lisans : Hacettepe Üniversitesi - Biyoloji

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi - Biyomühendislik

Doktora : -

İř Tecrübesi

-

Diğer

-