



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü



**BENZOKİNONA DAYALI ELEKTROKİMYASAL VE  
KOLORİMETRİK *Escherichia coli* TESPİT  
SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Nursima UÇAR

Biyokimya Anabilim Dalı

İzmir

2024



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü

**BENZOKİNONA DAYALI ELEKTROKİMYASAL VE  
KOLORİMETRİK *Escherichia coli* TESPİT  
SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Nursima UÇAR

Danışman: Prof. Dr. Suna TİMUR

Biyokimya Anabilim Dalı Adı  
Biyokimya Yüksek Lisans Programı

İzmir  
2024



Nursima UÇAR tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Benzokinona Dayalı Elektrokimyasal Ve Kolorimetrik *Escherichia coli* Tespit Sistemlerinin Geliştirilmesi” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve .....tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:****İmza****Jüri Başkanı** : .....

.....

**Raportör Üye** : .....

.....

**Üye** : .....

.....



**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Benzokinona Dayalı Elektrokimyasal Ve Kolorimetrik *Escherichia coli* Tespit Sistemlerinin Geliştirilmesi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

.... / .... / 20..

İmzası

Nursima UÇAR



## ÖZET

### **BENZOKİNONA DAYALI ELEKTROKİMYASAL VE KOLORİMETRİK *Escherichia coli* TESPİT SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Uçar, Nursima

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Suna TİMUR

2024, 59 Sayfa

Günümüzde hızla gelişen küresel toplumda patojenik biyogüvenlik endişeleri giderek artmakta ve bu sebeple patojenlerin analizini sağlayabilecek hızlı test sistemlerine gereksinim duyulmaktadır. Bu ihtiyaç doğrultusunda, ilgili tez çalışmasında *Escherichia coli* bakterisinin benzokinon temelli kolorimetrik ve elektrokimyasal tespit sistemlerinin tasarlanması hedeflenmiştir. Bu yaklaşımla, benzokinon adı verilen redoks ajanı, *Escherichia coli* 'yi diğer bakterilerden ayırt etmek için iyi bir avantaja sahiptir. Kolorimetrik sistem için renk analizi metodu kullanılmıştır. Ayrıca antikor temelli elektrokimyasal biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Biyosensör sistemi için lineer çalışma aralığı  $1,0 \times 10^1$  ile  $1,0 \times 10^4$  kob/mL olarak, dedeksiyon limiti (LOD) ise 0,57 kob/mL olarak belirlenmiştir. Geliştirilen biyosensörün seçiciliğinin belirlenmesi için Fosfat Tamponlu Salin, Muller Hinton Broth besiyeri, otoklavlanmış (ölü) *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* gibi girişimci moleküllerle testler gerçekleştirilmiştir. Benzokinon ile biyosensör sisteminin seçiciliğini belirlemek için testler gerçekleştirildi. Elektrokimyasal biyosensör sisteminde benzokinonun aktif yüzey alanına katkısı belirlenmiştir. Bu testler ile benzokinonun sistem üzerindeki başarılı etkisi kanıtlanmıştır. Bu çalışma, *Escherichia coli* ve diğer patojenlerin tespiti için pratik, yenilikçi ve uygun maliyetli bir yöntem sunmakta olup, farklı formatlara kolayca uyarlanabilir bir potansiyele sahiptir.

**Anahtar sözcükler:** *Escherichia coli*, elektrokimyasal biyosensör, benzokinon, kolorimetrik analiz



**ABSTRACT****DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL AND  
COLORIMETRIC *Escherichia coli* DETECTION SYSTEMS BASED ON  
BENZOQUINONE**

Uçar, Nursima

Msc in Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Suna TIMUR

2024, Page 59

In today's rapidly developing global society, pathogenic biosecurity concerns are increasing and therefore rapid test systems that can provide analysis of pathogens are needed. In line with this need, the relevant thesis study aimed to design benzoquinone-based colorimetric and electrochemical detection systems for *Escherichia coli* bacteria. With this approach, the redox agent called benzoquinone has a good advantage to distinguish *Escherichia coli* from other bacteria. Color analysis method was used for the colorimetric system. In addition, antibody-based electrochemical biosensor system was developed. The linear working range for the biosensor system was determined as  $1.0 \times 10^1$  to  $1.0 \times 10^4$  cfu/mL, and the limit of detection (LOD) was determined as 0.57 cfu/mL. In order to determine the selectivity of the developed biosensor, tests were carried out with interfering molecules such as Phosphate Buffered Saline, Muller Hinton Broth medium, autoclaved (dead) *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Tests were carried out to determine the selectivity of the biosensor system with benzoquinone. The contribution of benzoquinone to the active surface area in the electrochemical biosensor system was determined. With these tests, the successful effect of benzoquinone on the system was proven. This study presents a practical, innovative and cost-effective method for the detection of *Escherichia coli* and other pathogens, and has the potential to be easily adapted to different formats.

**Keywords:** *Escherichia coli*, electrochemical biosensor, benzoquinone, colorimetric analysis



## ÖNSÖZ

İnsanlığın ilerlemesi ile patojenik biyogüvenlik endişesi giderek artmaktadır. Hastalıklara ve ekonomik kayıplara neden olabilen başta bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitler gibi patojenlerin tespiti çok önemlidir. Gerçekleştirdiğim literatür araştırmaları sonucunda, bu alandaki patojenleri saptamaya yönelik kullanılan ticari yöntemler oldukça maliyetli olmakla birlikte, cihaz temelli ve dolayısıyla laboratuvar temelli yöntemlerdir. Buradan yola çıkarak bu tez kapsamında yaygın olarak bulunan *Escherichia coli* bakterisinin tespiti için benzokinon aracılığıyla hem kolorimetrik hem de elektrokimyasal tespit sağlayabilen bir biyosensör sistemi fikri ile yola çıktım. Özellikle sanayiye yönelik olan tezimin başarılı tamamlanması sonucunda sonuç odaklı, problem çözmeye dayalı bir yüksek lisans çalışması gerçekleştirdim.

İZMİR

.../.../20..

Nursima Uçar



**İÇİNDEKİLER**

ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vii
ÖNSÖZ .....	ix
İÇİNDEKİLER .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xiii
TABLolar DİZİNİ .....	xv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xvii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	4
2.2 Benzokinon .....	6
2.3 Biyosensörler .....	9
2.3.1 Optik Biyosensörler .....	10
2.3.2 Piezoelektrik Biyosensörler .....	11
2.3.3 Termal Biyosensörler .....	11
2.3.4 Elektrokimyasal Biyosensörler .....	11
2.4 Biyoreseptörler .....	16
2.4.1 Antikorlar .....	17
3. MATERYAL VE METOD .....	20
3.1 Materyal .....	20
3.2 Kullanılan Cihazlar .....	20
3.3 YÖNTEM .....	21
3.3.1 Mikrobiyal kültürün hazırlanması .....	21
3.3.2 BQ optimizasyonu .....	21
3.3.3 Kolorimetrik bakteri dedeksiyonu .....	22
3.3.4 Elektrokimyasal biyosensör yüzeyinin modifikasyonu .....	22
3.3.5 Elektrokimyasal biyosensörün analitik performans çalışmaları .....	23
3.3.6 Girişimci moleküllerin etkisi .....	24
3.3.7 Seçicilik .....	24

4.BULGULAR.....	25
4.1 Benzokinon Konsantrasyonunun Optimizasyonu.....	25
4.2 <i>E.coli</i> 'nin Kolorimetrik Tespiti.....	26
4.3 Elektrokimyasal Biyosensör Sisteminin Optimizasyonu.....	28
4.3.1 Antikor Konsantrasyonu Optimizasyonu.....	28
4.3.2 BSA Konsantrasyonu Optimizasyonu.....	29
4.4 Elektrokimyasal Biyosensörün Karakterizasyon Sonuçları.....	30
4.5 Elektrokimyasal Biyosensörün Analitik Sonuçları.....	32
4.5.1 Kalibrasyon Grafiği ve Dedeksiyon Limitinin(LOD) Belirlenmesi.....	33
4.5.2 Tekrarlanabilirlik ve Varyasyon Katsayısı.....	35
4.5.3 Girişimci Moleküller.....	35
4.6 Seçicilik.....	36
4.7 Elektrokimyasal Biyosensörün Yüzey Alanı.....	37
4.8 Diğer Biyosensör Sistemleri ile Tasarlanan Biyosensörün Karşılaştırılması ..	40
5. GENEL DEĞERLENDİRME.....	42
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	44
TEŞEKKÜR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	58

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1 Benzokinonun kimyasal yapısı(PubChem,2024) .....	8
Şekil 2. 2 Biyosensörlerin sınıflandırılması .....	9
Şekil 2. 3 Elektrokimyasal biyosensörlerin sınıflandırılması.....	12
Şekil 2. 4 Antikor yapısı .....	18
Şekil 3. 1 <i>E. coli</i> bakterisinin tespit edilmesi amacıyla geliştirilen elektrokimyasal biyosensör sisteminin yüzey modifikasyonu.....	23
Şekil 4. 1 (A) <i>E. coli</i> ile BQ'nun 5 dakikalık inkübasyondan sonra kolorimetrik optimizasyon sonuçları. (B) Farklı konsantrasyonlarda BQ'nun CV eğrileri (C) <i>E. coli</i> ile farklı konsantrasyonlarda BQ'nun inkübasyondan sonra CV eğrileri. (D) <i>E. coli</i> ile farklı konsantrasyonlarda BQ'nun inkübasyondan sonra sonuçlarının karşılaştırılması. Tüm konsantrasyonların ortalamaları ve standart sapmaları üç tekrarlı deneyden alınmıştır.(CV ölçümleri 50 mV/s tarama hızında 0,4 V ile 0,8V arasında potansiyel aralığında gerçekleştirildi) .....	26
Şekil 4. 2 A) $1,0 \times 10^1$ ila $1,0 \times 10^9$ kob/mL konsantrasyon aralığında <i>E. coli</i> 'nin kolorimetrik tespiti. B)Farklı BQ konsantrasyonlarında RGB analizine göre renk yoğunluğu kalibrasyon eğrisi. C) Farklı <i>E. coli</i> konsantrasyonlarının 6mM BQ ile inkübasyonunun RGB analizine göre kalibrasyon eğrisi D)Girişimci olarak sırasıyla steril PBS, bakteri içermeyen steril MHB ortamı, otoklavlanmış <i>E. coli</i> ve canlı <i>S. aureus</i> bakterisinin 6mM BQ ile reaksiyonunun kolorimetrik tespiti..	27
Şekil 4. 3 SPGE yüzeyine eklenen farklı antikor konsantrasyonlarının optimizasyon sonuçları (CV ölçümleri 50 mV/s tarama hızında 0,3 V ile 0,6V arasında potansiyel aralığında gerçekleştirildi) .....	29
Şekil 4. 4 SPGE /Antikor yüzeyine eklenen farklı BSA konsantrasyonlarının optimizasyon sonuçları (CV ölçümleri 50 mV/s tarama hızında 0,3 V ile 0,6V arasında potansiyel aralığında gerçekleştirildi) .....	30
Şekil 4. 5 Boş SPGE elektrot, antikor modifikasyonu sonrası (SPGE/Antikor), BSA bloklanması ardından (SPGE/Antikor/BSA) BQ eklenmesiyle (SPGE/Antikor/BSA/BQ) ve <i>E. coli</i> analitinin eklenmesi sonrasında (SPGE/Antikor/BSA/BQ- <i>E.coli</i> ) elde edilen CV sonuçları (Ölçümler, 50 mV/s tarama hızında -0,3 V ile 0,6 V arasında potansiyel aralığında gerçekleştirildi). 31	
Şekil 4. 6 Boş SPGE elektrot; SPGE/Antikor; SPGE/Antikor/BSA; SPGE/Antikor/BSA/BQ SPGE/Antikor/BSA/ BQ- <i>E. coli</i> modifiye elektrotları	

için EIS sonuçları (Ölçümler için 0,18V'da 0,02Hz ile 10 Hz akım aralığı kullanıldı).....	32
Şekil 4. 7 Boş SPGE elektrot; SPGE/Antikor; SPGE/Antikor/BSA; SPGE/Antikor/BSA/BQ SPGE/Antikor/BSA/ BQ- <i>E. coli</i> modifiye elektrotları için DPV sonuçları (Ölçümler için 0,4 V dan 0,8 V'a potansiyel aralığı kullanıldı.) .....	33
Şekil 4. 8 A)Farklı konsantrasyonlarda <i>E. coli</i> 'nin SPGE/Antikor/BSA yüzeyine eklenmesine ait DPV sonuçları.B) SPGE/Ab/BSA sisteminin farklı <i>E.coli</i> -BQ analit konsantrasyonlarına karşı kalibrasyon eğrisi. Kalibrasyon eğrisi DPV tekniği ile elde edildi.....	34
Şekil 4. 9 <i>E. coli</i> biyosensörünün bazı analitlere karşı tepkileri; PBS, MHB besiyeri, otoklavlanmış <i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i> , (Ölçümler DPV tekniği ile gerçekleştirildi.) .....	36
Şekil 4. 10 A)Antikor optimizasyon adımının farklı tarama hızlarında CV analizi. B)Tepe akımlarının tarama hızının kareköküne karşı çizimleri.C)BQ optimizasyon adımının farklı tarama hızlarında CV analizi. D)Tepe akımlarının tarama hızının kareköküne karşı çizimleri.....	39

**TABLolar DİZİNİ**

Tablo 4. 1 Antikor optimizasyonundan CV sonuçlarının anodik pik akımı, katodik pik akımı ve potansiyel farkının sayısal verileri.....	29
Tablo 4. 2 SPGE/Antikor yüzeyine BSA optimizasyonundan CV sonuçlarının anodik pik akımı, katodik pik akımı ve potansiyel farkının sayısal verileri.....	30
Tablo 4. 3 Tasarlanan E. coli biyosensörü için bazı analitik parametreler.....	35
Tablo 4. 4 Antikor optimizasyonundan farklı tarama hızlarındaki CV sonuçlarının anodik pik akımı, katodik pik akımının sayısal verileri .....	38
Tablo 4. 5 SPGE/Antikor/BSA yüzeyine BQ optimizasyonundan farklı tarama hızlarındaki CV sonuçlarının anodik pik akımı, katodik pik akımının sayısal verileri.....	39
Tablo 4. 6 <i>E. coli</i> tespiti için elektrokimyasal biyosensörler.....	40



## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
BSA	Bovin Serum Albumin
BQ	Benzokinon
CV	Döngüsel Voltametri
DPV	Diferansiyel Darbe Voltametrisi
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemorajik <i>E. coli</i>
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmüno-sorbent Testi
ETEC	Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
HQ	Hidrokinon
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
KOB	Koloni Oluşturan Birim
LAMP	Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon
LOD	Dedeksiyon Limiti
LPS	Lipopolisakkarit
LSV	Doğrusal Tarama Voltametrisi
LT	Isıya Duyarlı Toksin
MHA	Mueller Hinton Ahar
MHB	Mueller Hinton Broth
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SPGE	Ekran Baskılı Altın Elektrot
ST	Isıya dayanıklı Enterotoksin
STEC	Shiga Toksini Üreten <i>E. coli</i>
SWV	Kare Dalga Voltametrisi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
qPCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu



## 1.GİRİŞ

Günümüzün hızla gelişen küresel toplumda patojenik biyogüvenliğe ilişkin endişeler gittikçe artmaktadır Bunun başlıca nedeni uluslararası ticaret, hızlı sanayileşme, kentsel genişleme ve yetersiz atık yönetimidir. Bu faktörler toplu olarak patojenik biyogüvenlikteki zorlukların artmasına katkıda bulunmaktadır. Bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitler gibi patojenler hastalıklara ve ekonomik kayıplara neden olarak gıda ve çevredeki varlıklarını büyük bir sorun haline getirmektedir. Bunlar arasında su kirliliği kritik bir konu olarak öne çıkmaktadır. Bu nedenle su kaynaklarımızın korunması zorunlu hale gelmiştir. Bu, konunun kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını, su kalitesinin titizlikle izlenmesini ve bakteriyel kirliliğin azaltılmasına yönelik yenilikçi stratejilerin geliştirilmesini gerektirmekte ve bunların tümü insan sağlığını ve ekosistemi korumayı amaçlamaktadır.

Gram negatif bir bakteri olan *Escherichia coli* (*E. coli*), tipik olarak insanlar da dahil olmak üzere sıcak kanlı organizmaların bağırsaklarında bulunur. *E. coli* suşlarının bazıları gıda kaynaklı hastalıklar ve idrar yolu enfeksiyonları gibi ciddi hastalıklara neden olabiliyor. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Avrupa Birliği kurallarına göre, güvenli su kalitesi standartları, 100 mL suda tespit edilebilir *E. coli* bulunmamasını zorunlu kılmaktadır. Ancak bu standarda ulaşmak çoğu zaman iyi donanımlı laboratuvarlarda zaman alan analizler gerektirir. Sonuç olarak, gıda endüstrisi ve çevresel izleme, düşük bakteri seviyelerini hızlı bir şekilde tespit edebilecek yöntemler geliştirme konusunda önemli bir zorlukla karşı karşıyadır. Bu nedenle patojen tespiti için hızlı, kesin ve hassas sistemlere acil ihtiyaç vardır.

Biyosensörler bu açıdan çevresel uygulamalarda hava, su veya gıdalardaki zararlı bakterileri veya pestisitleri tespit etmek için kullanılır. Bu sistemler, kapsamlı numune hazırlığı gerektirmeden çeşitli ortamlarda hassas ve seçici, gerçek zamanlı patojen tespitine olanak tanır. Su kaynaklı bakterilerin tespiti kolorimetrik ve elektrokimyasal yöntemler son zamanlarda önemli bir ilgi kazanmıştır. Hücre kültürü ve koloni sayımı gibi geleneksel yöntemlerin sonuç

vermesi günler sürebilirken, biyosensörler sonuçları gerçek zamanlı olarak veya birkaç saat içinde sağlayabilir. Biyosensörler taşınabilir, uygun maliyetli ve kullanımı kolay olacak şekilde tasarlanabilir; bu da onları yerinde testler için ideal kılar. Öte yandan kolorimetrik biyoalgılama sistemleri, karmaşık işlemlere veya özel enstrümantasyona gerek kalmadan basit görsel analizler sunarak onları geleneksel sensörlerden ayırır. Bununla birlikte, çok sayıda biyosensör sistemi, kolorimetrik sistemlerin yanı sıra daha da düşük tespit limitleri sağlayan elektrokimyasal tespit sunmaktadır.

Redoks araçları, mikrobiyal solunum enzimatik reaksiyonlarında oksijenin yerini alabilen, mikrobiyal hücreler için son elektron alıcıları olarak görev yapabilen elektrokimyasal olarak aktif maddelerdir (Ikeda et al., 1996). Bu araçlar, akımları değiştirerek mikrobiyal aktivitenin tespit edilmesini ve toksik maddelerin neden olduğu inhibisyonu mümkün kılar (J. Li et al., 2013). Biyosensörlerde bu bileşikler, mikroorganizmalar ve elektrotlar arasındaki elektron transferini teşvik ederek fotosentetik aktivitenin veya hücre solunumunun izlenmesini kolaylaştırır. Ferrisiyanür, ferrosen, tetratiafulvalen ve kinonlar gibi bazı araçlar enzimatik veya mikrobiyal reaksiyonlarda kullanılır. Özellikle kinonlar, metabolik süreçlerde nötr araçlar ve potansiyel elektron taşıma taşıyıcıları olarak işlev görür; örneğin ubikinonlar, solunum zincirindeki flavoproteinler için elektron alıcıları olarak görev yapar. Benzokinon (BQ), *E. coli* enfeksiyonlarıyla mücadelede umut vaat eden kimyasal bir bileşiktir (Kondo & Ikeda, 2000; Wang et al., 2013). Temel metabolik yollara müdahale ederek bakteriyel solunumu ve enerji üretimini bozan bir elektron alıcısı olarak görev yapar. Çalışmalar, benzokinonun aynı zamanda oksidatif stresi indükleyerek ve hücre fonksiyonları bozarak *E. coli*'ye karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini göstermiştir. Hücre solunumu sırasında glikoz, bozulmamış bir redoks enzimi ile reaksiyona girer. Bu enzim indirgenir ve daha sonra doğrudan veya solunum zincirindeki uygun bir bölge aracılığıyla elektron alıcısına (BQ) elektronlar sağlanır. *E. coli* hücreleri elektrotlarla uygun şekilde hizalandığında, enzimatik eylemleri BQ'yu hidrokinona (HQ) indirger ve bu daha sonra kırmızı renkli bir kompleks olan kinhidronu oluşturmak için geri kalan BQ ile etkileşime girer. Belirli BQ konsantrasyonlarında renk değişimi bakteri konsantrasyonunu gösterebilir.

Bu çalışma, *E. coli* tespiti için BQ kullanan çeşitli yaklaşımları araştırmayı ve kolorimetrik ve elektrokimyasal yöntemlerin sonuçlarını karşılaştırmayı amaçlamaktadır. Amaç BQ tabanlı kolorimetrik ve elektrokimyasal biyosensör sistemlerinin temel prensiplerini anlamaktır.



## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1 *Escherichia coli*

*E. coli*, insan ve sıcakkanlı hayvanların bağırsaklarında yaygın olarak bulunan yaklaşık 2-3 mikrometre uzunluğundaki çubuk şeklinde gram negatif bir bakteridir (Basavaraju et al., 2022). Hücre yapısının temelini peptidoglikan katmanı oluşturur ve dışta, lipopolisakkaritlerden (LPS) zengin, kalın bir dış zar bulunmaktadır. Bu dış zar, bakteriyi çevresel strese karşı korurken, aynı zamanda patojenik *E. coli* suşlarının konakçıya zarar verme potansiyelini artıran önemli bir yapıdır. LPS tabakasının lipid A kısmı, *E. coli*'nin bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerinden sorumlu olan endotoksinleri içermektedir (Sperandeo et al., 2017). Hücre zarının altında yer alan sitoplazmik membran, bakteri için enerji üretimi ve madde taşınmasında hayati bir rol oynamaktadır (Nakae, 1986). *E. coli*'nin genetik materyali, çekirdek zarından yoksun bir şekilde sitoplazmada serbestçe bulunan dairesel bir DNA molekülünden oluşmaktadır. Ek olarak, plazmidler adı verilen küçük DNA halkaları, antibiyotik direnci ve virülans gibi özellikleri taşıyabilir ve bunlar diğer bakterilere yatay gen transferi ile aktarılabilir. Hareket kabiliyeti olan *E. coli* suşları, flagella adı verilen kamçı benzeri yapılara sahiptir; bu yapılar, bakterinin sıvı ortamda hareket etmesini sağlamaktadır. Ayrıca, pili ve fimbriya adı verilen kısa çıkıntılar, *E. coli*'nin yüzeylere tutunmasında ve konak hücrelerle etkileşiminde önemli bir rol oynamaktadır. *E. coli*'nin hücre yapısının bu unsurları, onu hem çevresel koşullara uyumlu hale getirir hem de patojenik potansiyelini arttırmaktadır (Öztürk et al., 2023).

Normalde insanların ve hayvanların bağırsak florasında bulunan komensal bir bakteridir; ancak bazı suşları, ciddi enfeksiyonlara ve hastalıklara yol açabilen patojenik özellikler geliştirmiştir. Patojenik *E. coli* suşları, özellikle bağırsak enfeksiyonlarında farklı mekanizmalarla konakçıya zarar vermektedir. Ancak bazı suşları da su ve gıda kaynaklı kontaminasyonla ciddi hastalıklara yol açabilmektedir. *E. coli*'nin varlığı su kirliliğinin bir göstergesi olarak kabul edilir. Yüksek konsantrasyonlarda bulunan *E. coli* ishal, idrar yolu enfeksiyonları,

menenjit, anemi ve böbrek yetmezliği gibi ciddi hastalıklara yol açabilmektedir (Nataro and Kaper, 1998).

Patojenik *E. coli*'nin virülans faktörleri arasında adhezinler, toksinler, invazinler ve çeşitli sekresyon sistemleri yer alır. Bu faktörler, bakterinin konakçı hücrelere yapışmasını, invazyonunu ve zarar vermesini sağlamaktadır (Gebisa et al., 2019). Örneğin, enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) suşları, bağırsak hücrelerine bağlanarak ısıya dayanıklı enterotoksin (ST) ve ısıya duyarlı toksinler (LT) üretir, bu da yoğun su ve elektrolit kaybına neden olarak şiddetli ishale yol açar (Duan et al., 2019). Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) suşları ise Shiga toksinlerini salgılayarak, bağırsak mukozasını tahrip eder ve bu süreçte bağışıklık sisteminin yanıtız kalmasına neden olur (Sperandio and Pacheco, 2012). Bazı *E. coli* suşları ise tip III sekresyon sistemi gibi karmaşık protein sistemleri aracılığıyla konak hücrelerine doğrudan virülans faktörleri enjekte ederek bağışıklık savunmasını aşar (Coburn et al., 2007).

*E. coli* bakterisinin tespiti, gıda güvenliği, çevresel izleme ve klinik tanılama alanlarında hayati bir öneme sahiptir. *E. coli* tespiti için kullanılan yöntemler genellikle klasik kültür tabanlı teknikler, moleküler biyolojik yöntemler ve gelişmiş biyosensör teknolojilerini içerir (Hameed et al., 2018). Kültür tabanlı yöntemler, *E. coli*'nin izole edilmesi ve tanımlanmasında uzun zamandır altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemler, bakterilerin seçici bir besiyerinde üretilmesini ve ardından morfolojik, biyokimyasal ya da serolojik analizlerle tanımlanmasını içermektedir. Ancak, bu tekniklerin en büyük dezavantajı, sonuçların elde edilmesinin zaman almasıdır; genellikle 24-48 saat sürebilir. Bu süre, özellikle hızla yayılabilen gıda kaynaklı enfeksiyonlarda kritik olabilir (Priyanka et al., 2016).

Daha hızlı ve hassas sonuçlar için, moleküler biyolojik teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), spesifik *E. coli* genlerini amplifiye ederek doğrudan bakteriyel DNA'nın tespit edilmesine olanak sunmaktadır. Yüksek hassasiyetli ve özgüllüğü ile bilinen PCR ve klasik yöntemlere kıyasla daha hızlı sonuçlar vermektedir (Joshi and Deshpande, 2011; Olive, 1989). Gerçek zamanlı PCR (qPCR), hedef DNA'nın miktarını ölçebilmesi sayesinde kantitatif analiz sağlamaktadır ve bu teknik, özellikle Shiga toksini

üreten *E. coli* (STEC) gibi patojenik suşların tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ahmed et al., 2015). Ayrıca, döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) gibi yöntemler de *E. coli*'nin hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit edilmesi için geliştirilen yenilikçi yaklaşımlar arasında yer almaktadır (Garg et al., 2022). Geleneksel teknikler mikrobiyal büyümeyi ölçme yeteneğinden yoksundurlar aynı zamanda algılama süreleri de sorun yaratmaktadır (Güven et al., 2011). Bu yöntemlerin uzun geri dönüş süreleri, yüksek maliyetleri ve kaynakların kısıtlı olduğu ortamlarda uygulanmalarının zorluğu nedeniyle ciddi zorluklar meydana gelmektedir. Bu nedenle patojenlerin tespiti için hızlı, spesifik ve hassas sistemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Son yıllarda, biyosensör teknolojileri de *E. coli* tespitinde önemli bir yer edinmiştir. Elektrokimyasal biyosensörler, biyolojik bir tanıma elemanı ile bakteriyel hücrelerin etkileşimini elektrik sinyallerine dönüştürerek hızlı bir tespit sağlamaktadır. Bu sensörler, *E. coli*'nin proteinleri ya da DNA'sı gibi özgül biyomolekülleri tanıyabilir ve genellikle yüksek duyarlılık gösterebilmektedir. Optik biyosensörler ise ışık bazlı tekniklerle bakterinin varlığını saptamaktadır. Bu sensörler, optik sinyalleri kullanarak hedef analitlerle etkileşime giren biyomolekülleri tespit eder. Biyosensörler, hızlı sonuç vermeleri ve portatif olmaları nedeniyle özellikle saha çalışmalarında avantajlıdır.

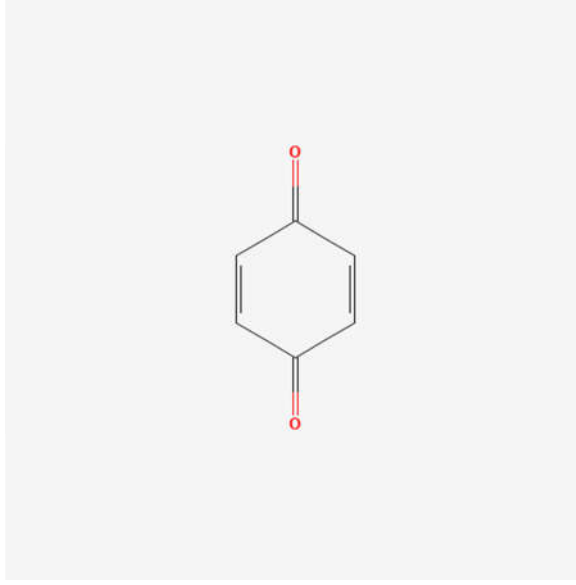
Tüm bu yöntemler, *E. coli*'nin hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit edilmesine yönelik önemli araçlar sunar. Her bir yöntemin kendine özgü avantajları ve sınırlamaları bulunmaktadır; dolayısıyla, tespit sürecinde kullanılacak yöntem, uygulamanın gereksinimlerine ve mevcut kaynaklara bağlı olarak seçilmelidir.

## 2.2 Benzokinin

Redoks mediyatörleri, genel olarak kimya, biyokimya ve elektrokimya alanlarında geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu mediyatörler, bir redoks reaksiyonunda elektronları bir bileşikten diğerine taşır ve bu süreçte oksitlenip indirgenirler (Tamirat et al., 2020). Elektronların doğrudan taşınmadığı veya verimli bir şekilde aktarılamadığı durumlarda devreye girerler. Örneğin, bir katalizör veya enzim tepkimesinde, mediyatörler elektron transfer hızını artırarak reaksiyonun verimliliğini yükseltebilmektedir. Bu da, hem endüstriyel hem de

laboratuvar ölçeğinde birçok kimyasal sürecin optimize edilmesine katkı sağlamaktadır. Redoks mediyatörleri ayrıca elektrokimyasal enerji depolama sistemlerinde de önemli bir rol oynar, çünkü bataryalar ve yakıt hücrelerinde elektron transfer süreçlerini iyileştirebilmektedir (Zhou and Sun, 2024). Özellikle biyosensörler ve elektrokimyasal cihazlar gibi çeşitli teknolojilerde elektron transferini hızlandırmak ve verimliliği artırmak amacıyla kullanılırlar. Mediyatörler, doğrudan elektroda transfer edilemeyen elektronların taşınmasında önemli bir rol oynamaktadır ve böylece biyosensörlerin performansını optimize edebilmektedir. Redoks mediyatörleri, hem oksitlenmiş hem de indirgenmiş formlar arasında kolayca geçiş yapabilen bileşiklerdir ve bu özellikleri onları elektrokimyasal süreçler için ideal kılmaktadır.

Benzokinon, redoks mediyatörleri arasında sıkça kullanılan bir bileşiktir ve özellikle organik kimya ve elektrokimya alanında önem taşımaktadır. Şekil 2.1'de kimyasal yapısı gösterilmiştir. Kimyasal yapısı itibarıyla bir kinon olan benzokinon, iki karbonil grubu taşıyan aromatik bir bileşiktir ve bu yapısı sayesinde redoks reaksiyonlarına girmeye son derece uygundur (Borges et al., 2014). Benzokinon, okside olduğunda elektron alır ve indirgendikçe elektron verir. Bu çift yönlü işlevi, onu pek çok kimyasal süreçte kullanılan ideal bir mediyatör yapmaktadır. Ayrıca, benzokinonun indirgenmiş hali olan hidrokinon, tekrar okside edilerek benzokinona dönüşebilir, bu da onun tekrar tekrar kullanılabilmesini sağlar (Jiang et al., 2015). Benzokinon, bu özelliği sayesinde endüstriyel süreçlerde ve araştırmalarda tercih edilen bir bileşik olmuştur. Benzokinonun, özellikle glikoz sensörleri gibi biyosensörlerde kullanımı oldukça yaygındır, çünkü glikoz oksidaz enzimiyle reaksiyona girerek glikozun oksidasyonunu hızlandırır ve bu süreçte elektron transferini mediyatör olarak gerçekleştirir. Bu özellikleri, onu biyokimyasal ve elektrokimyasal süreçler için tercih edilen bir mediyatör haline getirmektedir.



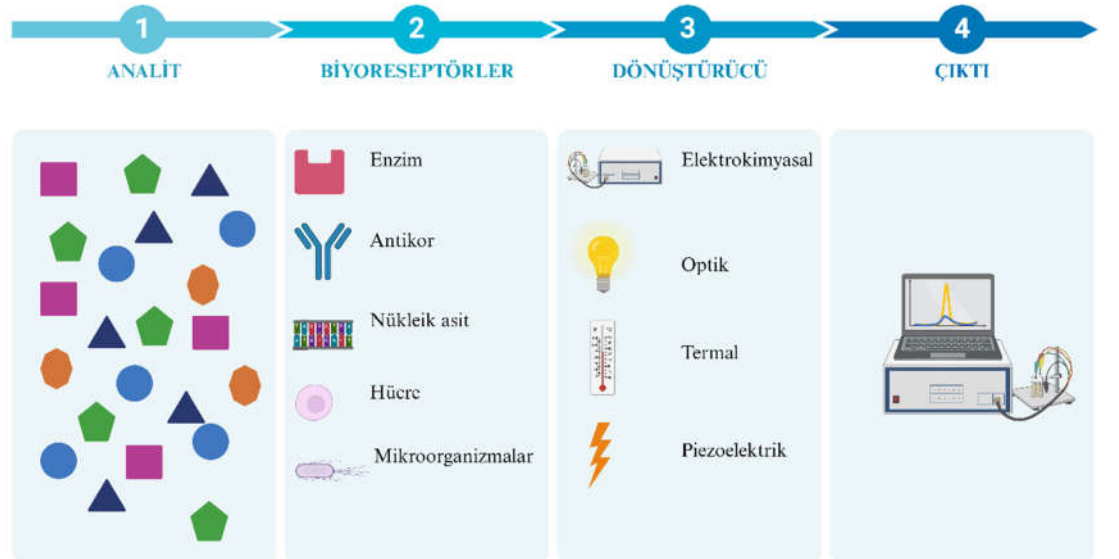
Şekil 2. 1 Benzokinonun kimyasal yapısı(PubChem,2024)

Benzokinonun elektrokimyasal sistemlerde kullanımı, düşük redoks potansiyeline sahip olması nedeniyle de avantajlıdır. Düşük redoks potansiyeli, biyosensörlerde daha hassas ve seçici ölçümler yapılmasına olanak tanımaktadır. Ayrıca, benzokinonun kimyasal kararlılığı ve biyoyumluluğu da uygulama alanlarını genişletmektedir (Houk et al., 1998). Bu özellikler, biyosensörlerin uzun ömürlü ve güvenilir bir şekilde çalışmasını sağlamaktadır. Benzokinon, ayrıca çevre izleme ve gıda analizinde de kullanılan çeşitli biyosensörlerin geliştirilmesinde kritik bir bileşendir, çünkü hızlı ve doğru sonuçlar elde etmeye olanak tanır.

Benzokinonun kullanım alanları yalnızca biyokimyasal tepkimelerle sınırlı değildir; aynı zamanda organik sentezlerde, elektrolakalama işlemlerinde ve enerji depolama sistemlerinde de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Francke and Little, 2014). Örneğin, elektrokimyasal kaplama işlemlerinde benzokinon, metal iyonlarının indirilmesini hızlandırarak daha verimli ve düzgün kaplamalar elde edilmesini sağlar. Ayrıca, benzokinon türevleri, özellikle organik sentezlerde önemli ara ürünler olarak görev yapar. Yapısal dönüşümlere kolaylıkla girebilmesi ve redoks özellikleri sayesinde, kimyasal sentezlerde ara madde olarak kullanımı yaygındır. Bunun yanı sıra, enerji depolama sistemlerinde de benzokinonun redoks döngüleri, bataryaların şarj ve deşarj döngülerini daha verimli hale getirmek için kullanılır.

## 2.3 Biyosensörler

Biyosensörler, bir dönüştürücü ile doğrudan temas halinde tutulan biyolojik bir tanıma elemanı kullanan cihazlardır (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC). Biyosensörler, seçici bir biyotanıma elemanının ve hassas bir dönüştürücü elemanın doğrudan entegrasyonuna dayanır. Analit örnekleri arasında proteinler (antijen, antikor ve enzim), nükleik asitler, diğer biyolojik veya metabolik bileşenler yer alır. Biyoreseptör, analit ile biyoreseptörlerin arasındaki etkileşimi ölçülebilir bir sinyale dönüştürmektedir (Lowe, 1984). Dönüştürücü analitin biyolojik elemanla etkileşiminden kaynaklanan sinyali ölçülebilen ve miktarlandırılabilen (fizikimyasal, optik, piezoelektrik, elektrokimyasal, vb.) bir sinyale dönüştürür. Biyoreseptör ve dönüştürücünün tipi biyosensörün sınıfını belirlemektedir. Şekil 2.2’de biyosensörlerin sınıflandırılması gösterilmektedir. Biyosensörler, seçicilik, kararlılık, basitlik, yüksek özgüllük ve hassasiyet, hızlı yanıt, taşınabilirlik, düşük maliyet, kullanıcı dostu çalışma ve gerçek zamanlı analiz gibi özellikler sergilerler (Verma and Bhardwaj, 2015). Biyosensörler hem çevresel hem de biyolojik kaynaklı bir analiti saptamak için kullanılmaktadırlar (Bohunicky and Mousa, 2010).



Şekil 2. 2 Biyosensörlerin sınıflandırılması

### 2.3.1 Optik Biyosensörler

Optik biyosensörler, fotonlardan gelen bilgileri elektriksel sinyallere dönüştüren sistemler olarak tanımlanır ve biyosensörlerin önemli bir türüdür (Borisov and Wolfbeis, 2008). Bu sensörler, analiz için genellikle görünür ya da ultraviyole ışığı kullanır. Temel bileşenleri, dalga boyu ayarlanabilen bir ışık kaynağı, bir ışık dedektörü ve ışığın hedef analitle etkileşime girdiği algılama malzemesidir (Askim and Suslick, 2017). Analit ile biyoreseptör arasındaki etkileşim sonucunda floresans, kırılma indisi, ışık saçılması ya da adsorpsiyon gibi optik değişiklikler gözlemlenir ve bu değişiklikler analitin konsantrasyonuyla ilişkilidir (Garzón et al., 2019).

Optik biyosensörler iki ana kategoriye ayrılır. İlki, biyoreseptör ile hedef analit arasındaki etkileşim sonucunda doğrudan optik özelliklerde meydana gelen değişimlere dayanan, etiketsiz sensörlerdir. Bu tür sistemlerde herhangi bir kimyasal etiketleme gerekmemektedir. Diğer tip ise, biyomoleküllerin optik özellik gösteren problemlerle kovalent olarak etiketlendiği etiketli sensörlerdir (Borisov and Wolfbeis, 2008). Etiketli sistemlerde, hedef analit ve biyoreseptör arasındaki etkileşim optik bir prob aracılığıyla izlenir ve bu, ek bir adım gerektirir. Etiketsiz sistemler, etiketli sistemlere göre daha ucuz ve basit olma avantajına sahiptir (Fan et al., 2008). Hem etiketli hem de etiketsiz optik biyosensörler, hızlı sonuçlar vermeleri, taşınabilir olmaları, özgüllük ve kararlılık sağlamaları nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Harshita et al., 2023).

Kolorimetrik biyosensörler, analitlerin konsantrasyonunu renk değişimi yoluyla algılayan biyosensörlerdir (Piriya V.S et al., 2017). Bu sensörler, biyolojik bir tanıma elemanı (enzim, antikor, DNA gibi) ile kimyasal veya biyokimyasal reaksiyon sonucunda renk değişimi meydana getiren bir sinyal dönüşüm elemanını birleştirmektedir (Liu, 2024). Genellikle bir substrat üzerine yerleştirilen bu biyosensörler, analitlerin varlığı ya da miktarına bağlı olarak renkli bir ürün üretmektedir. Renk değişimi çıplak gözle görülebilir veya spektral ölçüm cihazları ile nicel olarak değerlendirilebilir. Kolorimetrik biyosensörler, düşük maliyetli ve kolay taşınabilir olmaları nedeniyle çevre izleme, gıda

güvenliği ve tıbbi teşhis gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Qian et al., 2022). Ayrıca, bu sensörler genellikle hızlı sonuçlar verir ve karmaşık ekipman gerektirmez, bu da pratik uygulamalar için önemli bir avantaj sağlamaktadır.

### **2.3.2 Piezoelektrik Biyosensörler**

Piezoelektrik biyosensör, piezoelektrik kristal yüzeyindeki bir kütle bağı nedeniyle salınımların değişmesi ilkesi üzerinde çalışmaktadır (Pohanka, 2018). Biyosensör, iki elektrot tarafından yüzeye verilen alternatif voltajla uyarılır. Alternatif voltaj, kristalin mekanik salınımlarına neden olur ve kristalin üzerinde bulunan elektrotların yüzeyine bağlı analit, salınım frekansında değişikliğe neden olmaktadır (Pohanka, 2018). Salınımların frekansı, kristal salınım devresine konulduğunda ölçülmektedir (García-Martinez et al., 2011).

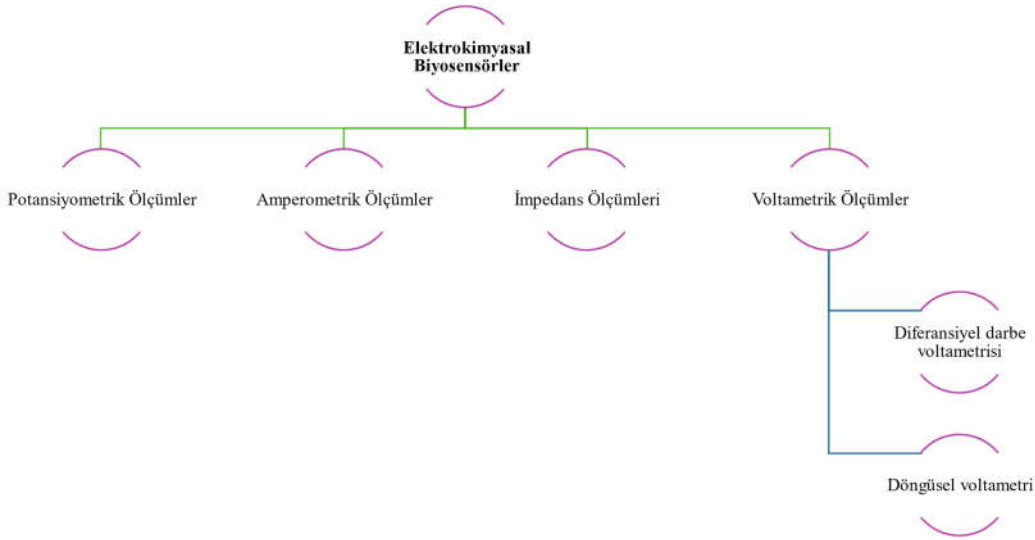
### **2.3.3 Termal Biyosensörler**

Termal biyosensörler, biyolojik reaksiyonların temel özelliklerinden ısının emilmesi veya evriminden yararlanmaktadır (Spink and Wadsö, 1976). Bu, reaksiyon ortamındaki sıcaklıktaki bir değişiklik olarak yansıtılır (Ramanathan and Danielsson, 2001). Bu sensörler, birçok biyokimyasal reaksiyonun ya ekzotermik ya da endotermik olmasından yararlanır. Tıbbi teşhis, gıda güvenliği, çevre ve biyoteknoloji gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır.

### **2.3.4 Elektrokimyasal Biyosensörler**

Elektrokimyasal biyosensörler, biyokimyasal süreçleri elektrik sinyallerine dönüştüren analitik cihazlardır (Li et al., 2017). Bu sistemlerde, dönüştürücü eleman, hedef analit ve biyolojik tanıma elemanı arasındaki etkileşimleri elektrik akımı veya voltaja dönüştürmektedir. Elektrotlar, elektrokimyasal biyosensör sistemlerinin en önemli bileşenlerindedir ve elektron akışını ve biyoaktiviteyi kontrol ederek sensör performansını doğrudan etkilerler. Temel olarak, elektrokimyasal biyosensör sisteminin tasarımında bir referans elektrot, bir yardımcı elektrot ve bir çalışma elektrotu gereklidir. Referans elektrot, akım

geçişine izin vermeden çalışma elektrodunun potansiyelini ölçmek ve sabitlemek amacıyla kullanılır. Kararlı bir elektrokimyasal potansiyele sahip olmalıdır (Dryden and Wheeler, 2015). Yardımcı elektrot ise çalışma elektroduna akım uygulayabilmek için elektrolitik çözeltiyle bağlantı sağlamaktadır (Grieshaber et al., 2008). Biyolojik tanıma elemanı, çalışma elektroduna immobilize edilir ve biyokimyasal reaksiyonlar bu elektrot üzerinde gerçekleşmektedir. Yüzeyde meydana gelen reaksiyon, elektron transferi ile oluşan akım farkı ile kendini gösterir ve bu fark, hedef analitin konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir (Balkourani et al., 2021). Yüzey modifikasyonu, elektrodun algılama yeteneği ve hedef analit gibi birçok parameter elektrot seçiminde önemli rol oynar. Bu parametrelere bağlı olarak, altın, platin veya karbon gibi çeşitli malzemelerden yapılmış çalışma elektrotları kullanılabilir. Elektrokimyasal biyosensörlerdeki reaksiyon sinyallerini ölçmek için farklı elektrokimyasal teknikler kullanılabilir (Li et al., 2017). Ölçüm prensiplerine göre, bu sensörler amperometrik, potansiyometrik, impedimetrik ve voltametrik olarak sınıflandırılmaktadır (Singh et al., 2021a). Şekil 2.3’de elektrokimyasal biyosensörlerin sınıflandırılması gösterilmiştir.



Şekil 2.3 Elektrokimyasal biyosensörlerin sınıflandırılması

#### 2.3.4.1 Amperometrik ölçümler

Amperometrik biyosensörler, basit yapıları ve yüksek hassasiyetleri nedeniyle en yaygın kullanılan analitik yöntemlerden biridir. Bu sensörler, biyokimyasal reaksiyonlar sırasında oluşan oksidasyon ve indirgenme süreçlerinin çalışma elektrodu üzerinde meydana getirdiği akım değişikliklerini ölçmektedir (Chaubey and Malhotra, 2002). Genellikle, amperometrik biyosensörlerin çalışma prensibi, çalışma ve referans elektrotları arasında uygulanan potansiyel ile tanımlanır. Hedef analite ilişkin kesin ve nicel veriler sürekli ölçülen akım sayesinde elde edilebilir. Çözeltideki elektroaktif türlerin konsantrasyonları ile akımın büyüklüğü orantılıdır. Bu sensörler, hem katodik (indirgeyici) hem de anodik (oksitleyici) reaksiyonları kaydedebilme özelliğine sahiptir. Biyokatalitik ve afinite sensörlerinde, amperometrik ölçümün basitliği ve düşük tespit sınırlarına ulaşabilmesi gibi özelliklerinden dolayı yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu sensörler genel olarak potansiyometrik sensörlere göre daha yüksek bir hassasiyete sahiptir. Voltametrik sensörlerden temel farkı ise, belirli bir ölçüm potansiyelinin uygulanmamasıdır. Ayrıca, amperometrik biyosensörler hızlı tepki süreleri ve geniş enerji aralıklarıyla dikkat çeker ve seri üretim için uygun bir yapıya sahiptir (Ghindilis et al., 1998).

#### 2.3.4.2 Potansiyometrik ölçümler

Potansiyometrik biyosensörler, çalışma ve referans elektrotları arasındaki potansiyel farkını ölçerek çalışan analitik cihazlardır. IUPAC'a göre, potansiyometrik biyosensörlerin iki temel özelliği vardır: (i) biyolojik bileşen, hedef analiti tanıyan sensör reseptörünün önemli bir parçasıdır, (ii) biyosensör tarafından üretilen analitik sinyal bir potansiyeldir (Koncki, 2007). Bu biyosensörlerin en önemli avantajlarından biri, son derece kararlı ve doğru bir referans elektrot kullanıldığında yüksek hassasiyet ve seçicilik sunmalarıdır. Ayrıca, üretimleri kolay, maliyetleri düşük olup, geniş bir iyon konsantrasyonu aralığında etkin şekilde çalışabilirler ve küçültülmeleri performanslarını olumsuz yönde etkilemez. Potansiyometrik biyosensörler, teşhis ve tespit alanında birçok

yeniliğin önünü açmış ve bu yöntemle geliştirilen çeşitli sensörler piyasada yerini almıştır (Singh et al., 2021). Voltammetrik ve amperometrik biyosensörlere göre, potansiyometrik biyosensörler elektrot boyutundan etkilenmeme gibi önemli bir avantaja sahiptir. Bu özellik, hassasiyet kaybı yaşamadan biyosensörlerin minyatürleştirilmesine ve özelleştirilmiş uygulamalar için geliştirilmesine olanak tanımaktadır (Zdrachek and Bakker, 2021).

#### **2.3.4.3 Voltametrik biyosensörler**

Voltametri, analit hakkında bilgi edinmek amacıyla uygulanan potansiyelin değiştirilip ardından oluşan akımın ölçülmesi prensibine dayanan bir elektroanalitik yöntemdir (Grieshaber et al., 2008). Voltametrik biyosensörler, hem potansiyel hem de akım değişimlerini algılayarak işlev görür. Potansiyel geniş bir aralıkta tarandığında, bu sırada oluşan akım-potansiyel ilişkisi ölçülür ve üretilen akım, elektrolit çözeltisinde bulunan hedef analitin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Ronkainen et al., 2010). Düşük maliyetleri, yüksek seçicilikleri ve hassasiyetleri sayesinde voltammetrik biyosensörler sensör platformlarında yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Ayrıca, düşük gürültü seviyeleriyle öne çıkarlar ve bu yöntem, tek bir taramada farklı tepe potansiyellerine sahip birden fazla kimyasal türün tespit edilmesine olanak tanımaktadır (Singh et al., 2021). Biyosensörlerde algılama amacıyla diferansiyel darbe voltametrisi (DPV), döngüsel voltametri (CV), kare dalga voltametrisi (SWV) ve doğrusal tarama voltametrisi (LSV) gibi çeşitli voltametrik teknikler kullanılmaktadır.

Döngüsel voltametri, en yaygın kullanılan voltametrik yöntemlerden biridir. CV'de, sabit bir hızla değişen uygulanan voltaja karşı ölçülen akım, belirlenen başlangıç ve bitiş voltajları arasında kaydedilmektedir. Uygulanan voltaj, önce pozitif ya da negatif yönde başlangıç potansiyelinden bitiş potansiyeline, ardından ters yönde bitiş potansiyelinden başlangıç potansiyeline doğru uygulanmaktadır. Bu teknik, elektrokimyasal reaksiyon mekanizmalarını, standart elektron transfer hız sabitlerini ve difüzyon katsayılarını belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Aristov and Habekost, 2015). CV, çalışma elektrodundaki oksitlenebilir maddelerin miktarı hakkında bilgi sağlar ve biyosensörlerin

kararlılığını, tekrarlanabilirliğini ve yeniden üretilebilirliğini değerlendirmek için de etkili bir yöntemdir (Serra, 2011).

Diferansiyel darbe voltametrisi, yüksek hassasiyetiyle bilinen bir elektrokimyasal tekniktir ve genellikle bileşiklerin tekli veya eş zamanlı analizlerinde kullanılmaktadır. Bu teknikte, küçük genlikli potansiyel darbeleri doğrusal bir rampa potansiyeline uygulanır ve bu darbeler merdiven dalga formunda kısa süreli uygulanmaktadır (Deffo et al., 2024). DPV'de, başlangıç potansiyeli seçilir ve elektroda uygulanır. Bu potansiyel, her darbe arasında eşit aralıklarla artırılır. Akım, darbe uygulanmadan önce ve sonra ölçülerek, her darbenin sonunda akımlar arasındaki fark hesaplanmaktadır (Simões and Xavier, 2017). DPV'nin en büyük avantajlarından biri, yüksek hassasiyete neden olan düşük kapasitif akım etkisidir. Küçük adım boyutları, daha dar voltametrik tepe noktalarıyla sonuçlanır ve bu nedenle, DPV benzer oksidasyon potansiyellerine sahip analitleri ayırt etmek için ideal bir yöntemdir (Venton and DiScenza, 2020).

Kare dalga voltametrisi, bir baz iletken potansiyeline eklenen simetrik bir kare dalga formunun çalışma elektroduna uygulandığı, büyük genlikli diferansiyel bir tekniktir (Osteryoung and Osteryoung, 1985). Faradian olmayan akımların minimal katkısı sayesinde SWV, yüksek hassasiyetli bir tarama sağlayabilir. Bu teknikte, ters akım dalga formları yerine diferansiyel akım dalga formları kullanılır ve potansiyel değişimi ile akım toplama arasındaki zaman farkı, SWV'yi diğer elektroanalitik tekniklerden daha hassas hale getirmektedir (Tolun and Altintas, 2023). SWV'nin zamanlaması frekansla ilişkilidir; frekans arttıkça zaman sabiti azalır ve Faraday akımı artar, bu da voltamogramda daha keskin ve net tepe noktalarıyla sonuçlanır (Batista Deroco et al., 2020). Bu teknik, LOD açısından kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle karşılaştırıldığında en hızlı ve en hassas voltametri yöntemlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Simões and Xavier, 2017).

#### **2.3.4.4 İmpedimetrik biyosensörler**

Empedans sensörleri, tek başına ya da voltametrik yöntemlerle birlikte kullanılabilen başka bir elektrokimyasal yöntemdir. Bu sensörler, empedanstaki değişimleri kullanarak analitleri veya biyolojik varlıkları tespit eden

elektrokimyasal biyosensör sistemleri olarak tanımlanmaktadır (Singh et al., 2021b). Bu yöntemin en yaygın uygulamalarından biri elektrokimyasal empedans spektroskopisidir (EIS). EIS, birçok kimyasal ve fiziksel özelliğin hassas bir göstergesi olarak işlev görür. EIS, elektrot özelliklerinin ve elektrot-arayüzündeki süreçlerin tespit edilmesi için etkin bir şekilde kullanılabilir (Singh et al., 2021b). Elektrot yüzeyinde gerçekleşen bağlanma olayları, çözeltideki elektriksel özelliklerin değişmesine yol açar. EIS tekniği, frekans alanında çalışarak çözeltideki analitlerin özelliklerine bağlı olarak bir kombinasyondan oluşan devre modeli kullanır. Bu modele bir voltaj uygulandığında, akım Ohm yasasına göre hesaplanır ve bu akım, sistemdeki tüm elemanlardan (çalışma elektrodu, biyolojik materyal, çözelti ve yardımcı elektrot) geçer. Bu sayede elde edilen empedans değeri, sistemdeki tüm bileşenlerin katkılarını temsil eder. Biyolojik bir maddenin EIS değeri, zamanın veya analiz edilen maddenin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak belirlenmektedir. EIS, biyosensörlerin hazırlanmasında, biyomoleküllerin etkileşimlerinin izlenmesinde, biyoreseptör ve analit arasındaki etkileşimlerin tespit edilmesinde ve yüzey karakterizasyonu çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Magar et al., 2021)

## 2.4 Biyoreseptörler

Biyoreseptörler, biyosensörlerin temel bileşenlerinden biridir ve spesifik bir analiti tanıma görevini üstlenirler. Biyoreseptörler, biyomoleküllerle seçici etkileşimler kurarak hedef molekülleri tanıyabilir ve belirleyebilir (Bazin et al., 2017). Genellikle enzimler, antikolar, nükleik asitler ve hücreler gibi biyolojik molekülden oluşmaktadırlar. Bu biyomoleküller, doğal biyokimyasal süreçlerde olduğu gibi biyosensörlerde de belirli bir analite karşı yüksek özgüllük göstermektedir. Biyoreseptörlerin en önemli avantajı, seçici bağlanma yetenekleri sayesinde kompleks karışımlar içerisinde dahi hedef molekülü ayırt edebilme kapasiteleridir. Bu özellikleri, özellikle tıbbi teşhis, çevre izleme ve gıda güvenliği gibi alanlarda biyosensörlerin doğruluğunu ve güvenilirliğini arttırmaktadır.

Biyoreseptörlerin işlevi, biyosensörlerde biyolojik bir tanıma olayı gerçekleştiğinde kimyasal ya da fiziksel bir sinyal oluşturmak üzerine kuruludur. Hedef analit biyoreseptöre bağlandığında, bu bağlanma bir sinyal transdüksiyon

mekanizması aracılığıyla elektriksel, optik ya da termal bir sinyale dönüştürülmektedir (Karunakaran et al., 2015). Örneğin, antikör-temelli biyosensörlerde, antijenin antikora bağlanması sonucu oluşan sinyal, bir optik veya elektrokimyasal sinyale çevrilerek ölçülebilir hale gelir. Biyoreseptörlerin seçiminde, hedef analitin biyolojik yapısına uygun spesifik bağlanma özelliklerine sahip olmaları kritik önem taşır. Böylece biyosensörlerde yüksek hassasiyet ve seçicilik elde edilerek, düşük konsantrasyonlardaki analitlerin bile tespit edilmesi mümkün olur.

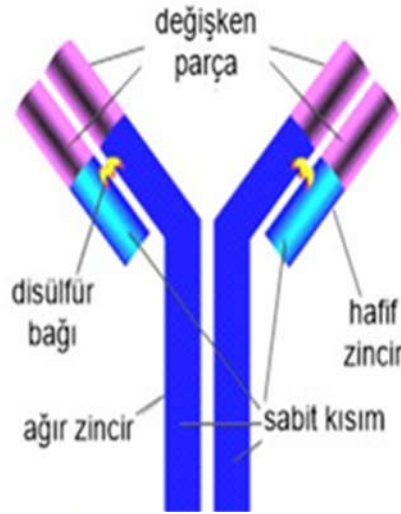
Biyosensörler, biyoreseptör tipine göre katalitik ve afinite temelli olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (Ja et al., 2015). Katalitik biyosensörler, biyoreseptör olarak enzimler gibi katalitik özellik gösteren molekülleri kullanır ve kimyasal reaksiyonlar yoluyla hedef molekülün tanımlanmasını sağlar. Bu sensörlerde biyoreseptör, hedef analitin bir ürün ya da yan ürün oluşturmasına neden olan bir reaksiyonu katalize eder. Glikoz sensörleri, katalitik biyosensörlere örnek olarak verilebilir. Afinite biyosensörler ise, antikörler, aptamerler ve nükleik asitler gibi biyomolekülleri kullanarak, analitin biyoreseptöre spesifik bağlanmasını esas alır. Bu biyosensörlerde herhangi bir kimyasal dönüşüm gerçekleşmez; bunun yerine biyoreseptör ve analit arasındaki yüksek özgüllüğe dayalı bağlanma olayı sinyal oluşturur. Afinite temelli biyosensörler, immünosensörler ve DNA tabanlı sensörlerde sıkça kullanılır ve özellikle seçici tespit gerektiren durumlarda tercih edilir.

#### **2.4.1 Antikörler**

Antikörler, biyosensörlerde biyoreseptör olarak yaygın bir şekilde kullanılan proteinlerdir ve yüksek özgüllükle hedef molekülleri tanıma yetenekleri sayesinde biyosensörlerin hassasiyetini arttırmaktadırlar (Dkhar et al., 2022). Antikörler, B lenfositleri tarafından üretilen ve vücuda yabancı olan antijenlere bağlanarak onları tanıyıp nötralize eden moleküllerdir (Cohen et al., 2001). Antikör molekülleri, iki kısa zincir (hafif zincir) ve iki uzun zincir (ağır zincir) olmak üzere toplam dört polipeptitten oluşmaktadır. Bu uzun ve kısa zincirler, disülfid bağları ile birbirine bağlanmıştır. Şekil 2.4'de antikörlerin yapısı gösterilmektedir. Antikörler ayrıca iki farklı bölgeden oluşur: aminoterminal bölge ve karboksi

terminal bölge. Aminoterminal bölge, her antikorda farklılık gösteren değişken bir domain olup, karboksi terminal bölge ise benzer tipteki hafif zincirler arasında sabit bir amino asit dizilimi gösteren sabit bir domain olarak tanımlanır.

Biyosensörlerde, antikorlar hedef molekülü tanıma elemanı olarak görev yapar ve bu molekülle (antijenle) kilit-anahtar benzeri bir mekanizma ile bağlanırlar (X. Liu et al., 2023). Antijen-antikor etkileşimi sonucunda oluşan bağlanma olayı, sinyal transdüksiyon mekanizmaları aracılığıyla ölçülebilir bir sinyale dönüştürülür, böylece biyosensörler aracılığıyla hedef molekül tespit edilmektedir. Bu özgül bağlanma mekanizması, biyosensörlerde seçiciliği ve doğruluğu artırarak, kompleks biyolojik karışımlar içinde bile hedef moleküllerin tespitine olanak tanımaktadır.



Şekil 2. 4 Antikor yapısı

Biyosensörlerde kullanılan antikorlar genellikle monoklonal veya poliklonal olmaktadır. Monoklonal antikorlar, belirli bir epitopa karşı yüksek özgüllük gösteren tek bir antikor klonundan üretilir ve bu sayede biyosensörlerde çok spesifik ve hassas tespitler yapılmasını sağlamaktadır (Conroy et al., 2009) . Poliklonal antikorlar ise birden fazla epitopa karşı bağlanabilen farklı antikorların bir karışımıdır ve daha geniş kapsamlı bir tespit sağlamaktadır (Lipman et al., 2005). Antikorların biyosensörlerde biyoreseptör olarak kullanılmasının en önemli avantajı, hedef antijenle yüksek bağlanma özgüllüğü göstererek, yanlış pozitif sonuçların önüne geçmeleridir. Bu da tıbbi teşhis, çevre izleme ve gıda güvenliği gibi birçok alanda doğruluğu ve güvenilirliği arttırmaktadır.

Antikor temelli biyosensörler, çeşitli tekniklerle çalışabilir; en yaygın olanlar immüno-sensörlerdir. İmmüno-sensörlerde, antikor-antijen etkileşimi sonrası oluşan sinyal genellikle optik, elektrokimyasal veya piezoelektrik yöntemlerle algılanır. Enzim Bağlantılı İmmüno-sorbent Testi (ELISA) gibi teknikler, biyosensörlerde antikorların biyoreseptör olarak kullanımına örnek teşkil eder. Bu sensörler, tıbbi teşhiste spesifik patojenlerin veya biyomoleküllerin hızlı ve hassas bir şekilde tespit edilmesini sağlamaktadır. Antikorların biyoreseptör olarak kullanıldığı biyosensörler, özellikle enfeksiyon hastalıkları, kanser biyomarkerları ve toksin tespitinde etkin sonuçlar vermektedir.



### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1 Materyal

Araştırmada kullanılan *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu Amerikan Tip Kültür Koleksiyonundan (ATCC) temin edildi. Mueller Hinton Broth (MHB) Sigma Aldrich'den satın alındı. Agar (1.01614), Merck'ten satın alındı. p-Benzokinin, sığır serum albümini (BSA) (liyofilize toz,  $\geq\%96$ ), potasyum klorür ve potasyum hekzasiyanoferrat (III), Sigma Aldrich'ten (Steinheim, Almanya) satın alındı. Anti-*E. coli* poliklonal antikoru (5,5 mg mL<sup>-1</sup>), Thermo Fisher Scientific'ten (Rockford, IL, ABD) temin edildi. Ayrıca tüm deneysel çalışmalarda çalışma tamponu olarak fosfat tamponlu salin (PBS tamponu) (1x, pH 7,4) kullanıldı.

#### 3.2 Kullanılan Cihazlar

Tüm elektrokimyasal lmler (DPV, CV ve EIS) PalmSens 4 potansiyostat (Palm Instruments, Houten, Netherlands) ile yapıldı. Ekran baskılı altın elektrotlar (SPGE) (DropSens-DRP-150 (alışma elektrotu; altın, referans elektrot; Ag/AgCl ve karşıt elektrot; platin)) Metrohm (Herisau, Switzerland) tarafından sağlandı. Tüm elektrokimyasal ölçümler, 8,9 mL 1x PBS tamponunda (pH 7,4), 1 mL 1 M KCl ve 100  $\mu$ L 50 mM [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] içeren bir elektrokimyasal hücrede gerçekleştirildi. DPV lmleri -0,2 ila 0,4 V potansiyel aralığında gerçekleştirildi. CV lmleri -0,3 ila 0,6 V potansiyel aralığında yapılırken CV lmleri için tarama hızı 50 mV/s'de sabitlendi. Ayrıca EIS lmleri 0,18 V'de 0,02 ila 10 Hz arasında gerçekleştirildi.

### 3.3 YÖNTEM

#### 3.3.1 Mikrobiyal kültürün hazırlanması

*Escherichia coli* ATCC 25922 suşu, ATCC'den temin edilmiş ve araştırma süresi boyunca -20°C'de %16 gliserol içeren ortamda saklanmıştır. *E. coli*, MHB içerisinde 37°C'de 16-24 saat boyunca 100 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilerek hazırlandı. Eş zamanlı olarak saflığı kontrol etmek için Mueller Hinton Agar (MHA) plakalarına ekim yapıldı. İnkübasyon süresinden sonra bakteri hücreleri, ortam koşullarında 10 dakika boyunca 3000 rpm'de santrifüjleme yoluyla toplandı ve daha sonra iki kez steril PBS ile yıkandı. Geriye kalan bakteriyel pelletler steril bir PBS solüsyonunda yeniden süspansiyon edildi. *E. coli* süspansiyonunun konsantrasyonu, McFarland Yoğunluk Ölçer (DEN 1B) kullanılarak  $1,0 \times 10^9$  kob/mL konsantrasyonda hazırlandı (Sun et al., 2019; Yu et al., 2021)  $10^1$  ile  $10^9$  arasında değişen dilüsyonlar hazırlandı ve her seyreltme solüsyonu, üç kopya halinde 96 kuyucuklu mikrolakalara aşılandı. Ayrıca bu seyreltme solüsyonları elektrokimyasal biyosensör kısmında kullanılmak üzere 1 mL şeklinde de hazırlandı.

#### 3.3.2 BQ optimizasyonu

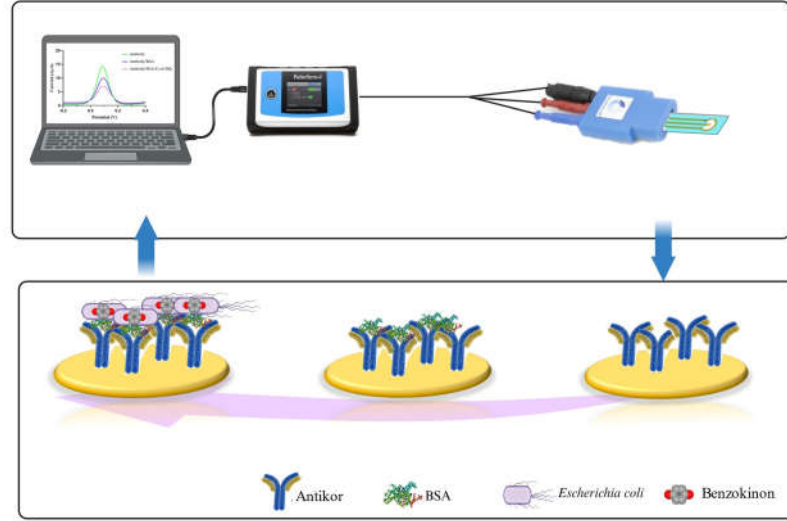
Başlangıçta, PBS (pH 7.4) kullanılarak çeşitli BQ konsantrasyonları (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 mM) hazırlandı. Deneyler, kolorimetrik tespit için 96 kuyucuklu mikrolakalar ve elektrokimyasal tespit için santrifüj tüpleri kullanılarak gerçekleştirildi. Mikrolakalarda yukarıda bahsedildiği gibi 100 µL bakteri ( $1,0 \times 10^9$  kob/mL) ve farklı konsantrasyonlarda 100 µL BQ birleştirildi. 1 saat inkübe edildikten sonra renk değişiklikleri kaydedildi. Eş zamanlı olarak santrifüj tüplerinde 100 µL bakteri ( $1,0 \times 10^9$  kob/mL) ve çeşitli konsantrasyonlarda 100 µL BQ 5 dakika süreyle inkübe edildi. Bu numunelerin elektrot yüzeyinde CV ölçümleri alındı.

### 3.3.3 Kolorimetrik bakteri dedeksiyonu

*E.coli* ve *S. aureus*, PBS kullanılarak istenen konsantrasyona kadar seyreltildi. Daha sonra, kolorimetrik tespit için 96 oyuklu mikropalakalara 100 µL BQ ve değişen konsantrasyonlarda 100 µL farklı bakteri suşları eklendi. Mikro plakalardaki renk değişiklikleri, Mi 11 akıllı telefon aracılığıyla fotoğraflar çekilerek 1 saat boyunca belirli aralıklarla kaydedildi ve RGB(Red-blue-green) değerleri ImageJ kullanılarak analiz edildi.

### 3.3.4 Elektrokimyasal biyosensör yüzeyinin modifikasyonu

Başlangıçta, *E. coli* antikorları (25 µg/ml) ekran baskılı altın elektrotlara (SPGE) adsorbe edildi ve tanıma katmanı olarak biyomoleküllerin immobilizasyonu için beklemeye bırakıldı. Daha sonra elektrot yüzeyi, bağlanmamış biyomolekülleri uzaklaştırmak için 1,0 M PBS tamponu ile durulandı. Bu adımın ardından, spesifik olmayan etkileşimleri bloklayarak önlemek için BSA çözeltisi (%2,5) damlatıldı ve ardından ortam koşullarında 15 dakika kurumaya bırakıldı (Cimafonte et al., 2020). Daha sonra bağlanmayan BSA'nın uzaklaştırılması amacıyla PBS ile yıkandı. Son olarak, *E. coli*'nin farklı konsantrasyonları ( $10^1$  ila  $10^8$  kob/mL) 6 mM BQ ile reaksiyona sokuldu, elektrotlara damlatıldı ve antikor/analit tanıma reaksiyonu yoluyla biyofonksiyonel yüzeyler tarafından seçici yakalama için 30 dakika boyunca inkübe edildi Bakteriyel inkübasyondan yoksun bir büyüme ortamı, negatif kontrol olarak görev yaptı. Her modifikasyon adımı DPV, CV ve EIS tekniği ile izlendi ve her modifikasyon adımı Şekil 3.1' de özetlenmiştir.



Şekil 3. 1 *E. coli* bakterisinin tespit edilmesi amacıyla geliştirilen elektrokimyasal biyosensör sisteminin yüzey modifikasyonu.

### 3.3.5 Elektrokimyasal biyosensörün analitik performans çalışmaları

Tasarlanan biyosensör sisteminin analitik çalışmalarında biyosensör sistemi için kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Ayrıca biyosensörün çalışma aralığı, dedeksiyon limiti (LOD), tekrarlanabilirlik ve varyasyon katsayısı hesaplandı. Tasarlanan biyosensör sisteminin ilk olarak kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Çalışma tamponunda hazırlanan  $1 \times 10^1$  ile  $1 \times 10^9$  arasında değişen *derişimlerinde* *E. coli* bakteri çözeltisi hazırlanarak 6mM BQ ile tepkimeye sokuldu. Daha sonra (Au/Antikor/BSA) elektrot yüzeyine immobilize edildi ve DPV tekniği ile ölçümler gerçekleştirildi. Kalibrasyon grafiği, yüzeye eklenen *E.coli*-BQ konsantrasyonlarına karşı, antikor ve analit arasındaki sinyal farkları ile elde edildi.

Dedeksiyon limitinin belirlenmesi için antikor ile modifiye edilmiş (Au/Antikor/BSA) elektrot yüzeyine *E.coli*-BQ eklendi ve art arda 10 kere DPV ölçümü alındı ve elde edilen sonuçların standart sapması hesaplandı. Dedeksiyon limiti değeri  $[(3X \text{ Standart sapma})/m \text{ değeri}]$  formülü ile hesaplandı. Biyosensörün lineer tayin aralığının orta noktası olarak seçilen  $1 \times 10^5$  ile modifiye edilmiş (Au/Antikor/BSA) elektrot yüzeyine eklendi ve art arda 10 kere DPV ölçümü alındı. Tekrarlanabilirlik değeri elde edilen standart sapması olarak kabul

edildi. Varyasyon katsayısı ise  $[\text{Standart sapma/ortalama}] \times 100$  formülü ile hesaplandı.

### 3.3.6 Girişimci moleküllerin etkisi

Tasarlanan biyosensörün *E.coli*-BQ'a spesifik olduğunu belirlemek amacıyla girişimci deneyleri gerçekleştirildi. Kullanılan tamponun etkisini görebilmek için PBS, *E. coli* ortamının bağlantıya etkisi için MHB ortamı, ölü hücrelerin etkisini gözlemlemek için otoklavlanmış *E. coli*, su analizlerinde en çok görülen diğer bakteri olduğu için *S. aureus* ATCC 25923 girişimci moleküller olarak seçildi. Tüm girişimci moleküllerin çözeltileri (Au/Antikor/BSA) elektrot yüzeyine uygulandı. DPV, CV ve EIS ölçümleri alınarak *E.coli*-BQ ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.

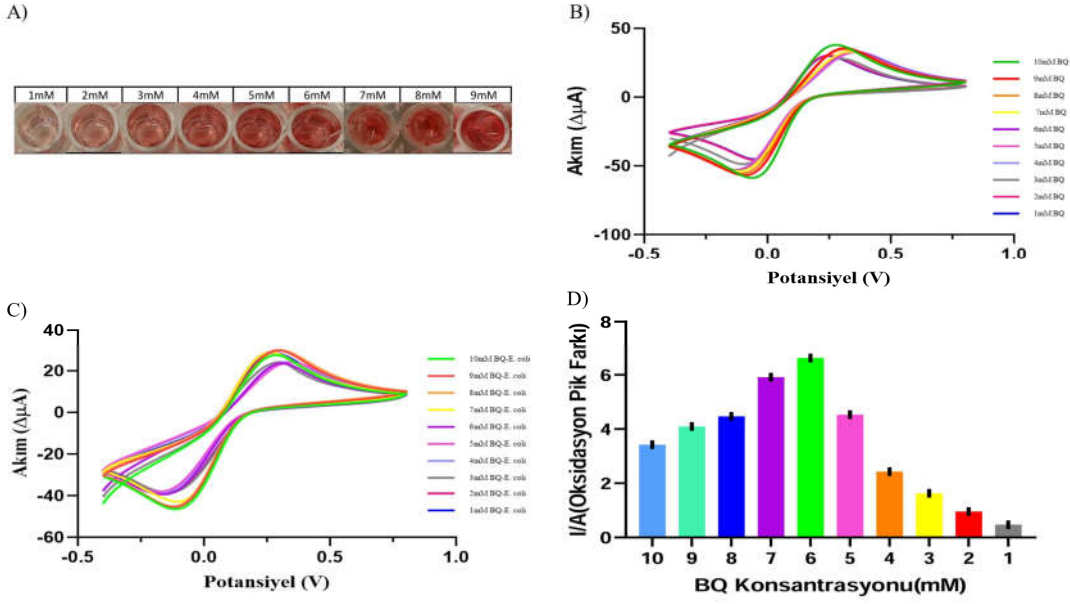
### 3.3.7 Seçicilik

Tasarlanan elektrokimyasal biyosensörün *E. coli*- BQ ölçümlerinde daha etkili olup olmadığını kanıtlamak için *E. coli*, *E.coli*-*S. aureus*, *E. coli*-*S. aureus*-BQ, *S.aureus*-BQ örnekleri hazırlandı ve SPGE/Antikor/BSA yüzeyinde denemeleri yapıldı.

## 4.BULGULAR

### 4.1 Benzokinon Konsantrasyonunun Optimizasyonu

İlk olarak önerilen deneyin duyarlılığı üzerinde BQ konsantrasyonunun etkisini değerlendirmek için çeşitli BQ konsantrasyonları ( 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 mM) hazırlandı ve *E. coli* ( $1 \times 10^9$  kob/mL) içeren numunelerle test edildi. İnkübasyondan sonraki renk değişimi bir saat içinde farklı zaman noktalarında (2, 5, 10, 15, 20, 30, 45 ve 60 dakika) fotoğraflandı. Şekil 4.1 A'da 5 dakikalık inkübasyondan sonraki renk değişimini göstermektedir; kırmızı renk yoğunluğunun daha yüksek BQ konsantrasyonlarıyla arttığı görüldü. Şekil 4.1 B'de farklı konsantrasyonlardaki BQ'nun CV eğrileri gösterilmiştir. Bu eğrilerin redoks pikleri artan BQ konsantrasyonlarıyla artmıştır.  $10^9$  kob/mL *E. coli* ile karıştırılmış farklı konsantrasyonlardaki BQ'nun CV eğrileri Şekil 4.1 C'de gösterilmiştir. PBS'li BQ ile BQ ve *E. coli* içeren örnekler arasındaki farkı değerlendirmek için oksidasyon-pik farkları Şekil 4.1 D'de gösterilmiştir. Bu değerler 1 ile 6 mM BQ konsantrasyonları arasında önemli bir artış göstermiştir, ardından 6 mM'den sonra kademeli bir azalma olmuştur. Sonuç olarak, geniş tespit aralığı nedeniyle 6 mM, *E. coli* tespiti için optimum BQ konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 1 (A) *E. coli* ile BQ'nun 5 dakikalık inkübasyondan sonra kolorimetrik optimizasyon sonuçları. (B) Farklı konsantrasyonlarda BQ'nun CV eğrileri (C) *E. coli* ile farklı konsantrasyonlarda BQ'nun inkübasyondan sonra CV eğrileri. (D) *E. coli* ile farklı konsantrasyonlarda BQ'nun inkübasyondan sonra sonuçlarının karşılaştırılması. Tüm konsantrasyonların ortalamaları ve standart sapmaları üç tekrarlı deneyden alınmıştır.(CV ölçümleri 50 mV/s tarama hızında 0,4 V ile 0,8V arasında potansiyel aralığında gerçekleştirildi)

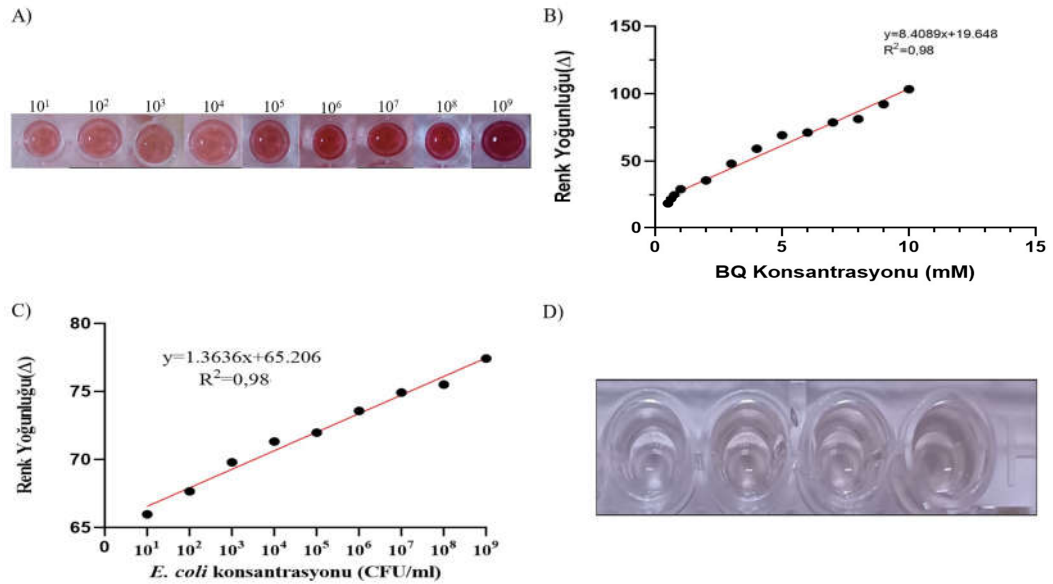
#### 4.2 *E. coli*'nin Kolorimetrik Tespiti

Optimum BQ konsantrasyonu belirlendikten sonra, *E. coli* örnekleri farklı konsantrasyonlara seyreltilerek PBS ile hazırlandı. Şekil 4.2 A'da gösterildiği gibi,  $1 \times 10^1$  ile  $1 \times 10^8$  kob/mL aralığında bir renk gradyanı elde edildi ve bu gradyan RGB analizi kullanılarak değerlendirildi. Bu analiz yöntemi, akıllı telefonla kolayca uygulanabilecek bir sistem sunmaktadır; renk değişiklikleri çıplak gözle dahi ayırt edilebilecek şekilde belirgindi. Tüm fotoğraflar beyaz ışık altında, ışık kutusunda çekilmiş olup, görüntüler bir akıllı telefon yardımıyla yakalanmıştır. 96 kuyucuklu plakalarda gözlemlenen renkler, *E. coli* konsantrasyonu arttıkça belirgin şekilde koyulaşmıştır.

Şekil 4.2 A'da, artan *E. coli* konsantrasyonunun, bakteri ve BQ arasındaki etkileşimden kaynaklanan renk koyulaşmasına yol açtığı görülmektedir. Aynı zamanda, Şekil 4.2 B'deki veriler, farklı konsantrasyonlardaki BQ örneklerine ait RGB analizine ait kalibrasyon grafiği gösterilmiştir. Cv sonuçlarıyla uyumlu

olarak 6mM BQ konsantrasyonun renk analizi de oldukça iyi sonuç vermektedir. Şekil 4.2 C’de test örneğindeki bakteri konsantrasyonunun, ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edilen RGB değerlerine ait kalibrasyon grafiğidir.  $R^2$  değeri 0,9863 çıkmıştır bu renk analizinde oldukça tutarlı bir sonuç verdiğini göstermektedir. Aynı zamanda analiz edilen renk yoğunluğuna dayalı olarak bakteri konsantrasyonunun tahmin edilebileceğini göstermektedir. Bu renk tabanlı analiz yöntemi, özellikle mikrobiyoloji ve çevresel izleme gibi çeşitli alanlarda uygulama potansiyeline sahip olup, bakteriyel konsantrasyonları ölçmek için pratik bir yöntem sunmaktadır.

Ayrıca, olası karışımların önüne geçmek amacıyla farklı maddelerle kontrol testleri de yapılmıştır. Steril PBS, bakteri içermeyen steril MHB ortamı, otoklavlanmış (inaktif hale getirilmiş) *E. coli* ve canlı *S. aureus* ATCC 25923 bakterileri, BQ ile kolorimetrik reaksiyonları açısından test edilmiştir. Benzokinon, RGB analizinde hesaba katılan doğal hafif sarı tonunun dışında, bu ortamlarda herhangi bir renk üretmemiştir. Şekil , bu farklı maddelerin BQ ile etkileşimine dair renk değişimlerini göstermektedir. Bu sonuçlar, yöntemin özgüllüğünü ve güvenilirliğini artıran önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

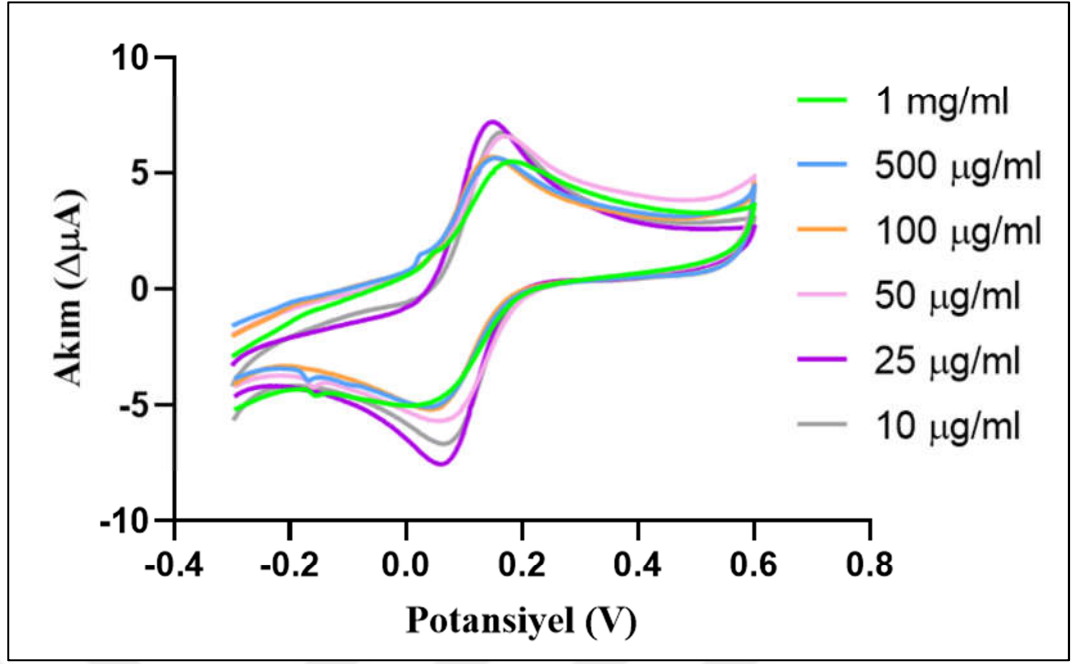


Şekil 4. 2 A)  $1,0 \times 10^1$  ila  $1,0 \times 10^9$  kob/mL konsantrasyon aralığında *E. coli*'nin kolorimetrik tespiti. B) Farklı BQ konsantrasyonlarında RGB analizine göre renk yoğunluğu kalibrasyon eğrisi. C) Farklı *E. coli* konsantrasyonlarının 6mM BQ ile inkübasyonunun RGB analizine göre kalibrasyon eğrisi D) Girişimci olarak sırasıyla steril PBS, bakteri içermeyen steril MHB ortamı, otoklavlanmış *E. coli* ve canlı *S. aureus* bakterisinin 6mM BQ ile reaksiyonunun kolorimetrik tespiti

## 4.3 Elektrokimyasal Biyosensör Sisteminin Optimizasyonu

### 4.3.1 Antikor Konsantrasyonu Optimizasyonu

Tasarlanan biyosensör sisteminde, *E. coli* antikoruna farklı konsantrasyonlarda (1000, 500, 100, 50, 25, 10 µg/ml) PBS tamponunda hazırlandı. Hazırlanan antikorlar, optimum etkileşim süresini sağlamak için SPGE yüzeyine eklendikten sonra 30 dakika inkübe edildi. Antikorlar elektrotlara bağlandıktan sonra gerçekleştirilen CV ölçümleri Şekil 4.3’de gösterilmiştir. CV ölçümlerinde anodik pik akımı ( $I_{pa}$ ) ve katodik pik akımı ( $I_{pc}$ ) değerleri sırasıyla kaydedildi. Tablo 4.1’deki verilerde antikor konsantrasyonlarına göre  $I_{pa}$ ,  $I_{pc}$  ve potansiyel farklarına ait veriler gösterilmiştir. Bulgular, 25 µg/ml antikor konsantrasyonunun, hem yüksek oksidasyon ve redüksiyon akımları hem de düşük potansiyel farkı (DE) ile en iyi biyosensör yanıtını sağladığını göstermektedir. Bu sonuç, 25 µg/ml konsantrasyonunun biyosensör sistemi için en uygun antikor miktarını sağladığını göstermektedir. Bu durum, antikor konsantrasyonunun spesifik *E. coli* hedeflerine bağlanma kapasitesini artırarak biyosensör hassasiyetini optimize ettiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4. 3 SPGE yüzeyine eklenen farklı antikor konsantrasyonlarının optimizasyon sonuçları (CV ölçümleri 50 mV/s tarama hızında -0,3 V ile 0,6V arasında potansiyel aralığında gerçekleştirildi)

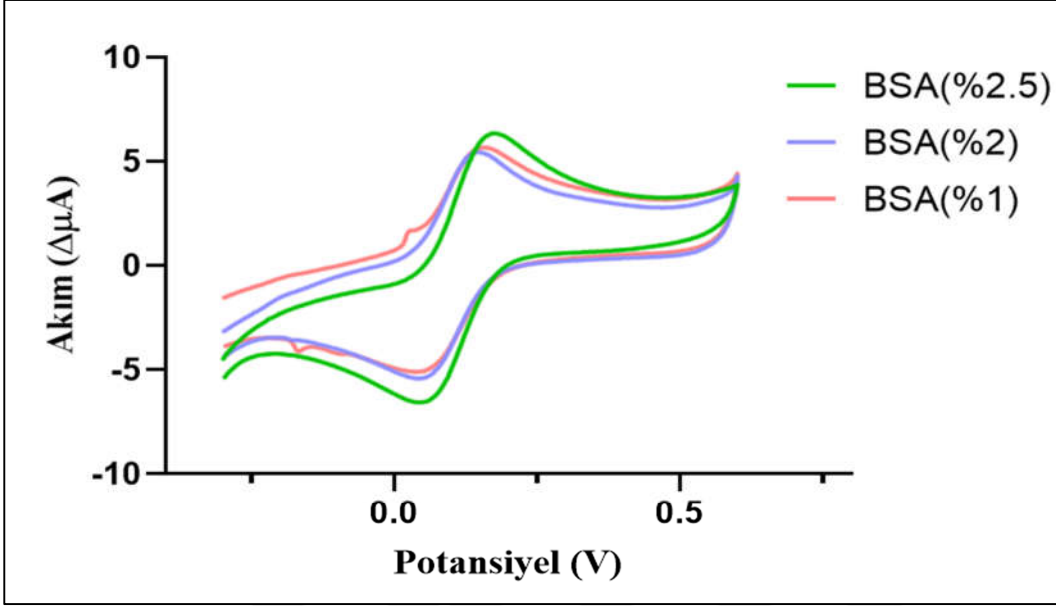
Tablo 4. 1 Antikor optimizasyonundan CV sonuçlarının anodik pik akımı, katodik pik akımı ve potansiyel farkının sayısal verileri

Antikor Konsantrasyonu	$I_{pa}(\mu A)$	$I_{pc}(\mu A)$	DE(mV)
1 mg/ml	3.236	-4.611	145
500 $\mu g/ml$	3.875	-4.852	101
100 $\mu g/ml$	4.301	-5.008	99
50 $\mu g/ml$	4.577	-5.434	102
25 $\mu g/ml$	7.340	-7.697	87
10 $\mu g/ml$	6.685	-6.945	93

#### 4.3.2 BSA Konsantrasyonu Optimizasyonu

Tasarlanan elektrot yüzeyinde *E. coli* antikorunu (25  $\mu g/ml$ ) eklendikten sonra bloklama için BSA kullanıldı. %1, %2, %2,5 konsantrasyonlarında BSA hazırlandı ve antikorlu yüzeyin üzerine eklendi 15 dakika bekletildi. BSA bloklamasından sonra CV ölçümleri alındı,  $I_{pa}$  ve  $I_{pc}$  değerleri kaydedildi. CV ölçümleri Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Tablo 4.2'deki verilerde BSA konsantrasyonlarına göre  $I_{pa}$ ,  $I_{pc}$  ve potansiyel farklarına ait veriler gösterilmiştir. Grafik ve tablo verilerine göre, %2.5 BSA konsantrasyonu, en yüksek oksidasyon ( $I_{pa}$ : 6.471  $\mu A$ ) ve redüksiyon ( $I_{pc}$ : -6.829  $\mu A$ ) akımlarını sağlamıştır. Bu

bulgular, yüksek BSA konsantrasyonlarının sensör yüzeyinde antikor bağlanmasını iyileştirerek elektrokimyasal yanıtı optimize ettiğini göstermektedir.



Şekil 4. 4 SPGE /Antikor yüzeyine eklenen farklı BSA konsantrasyonlarının optimizasyon sonuçları (CV ölçümleri 50 mV/s tarama hızında -0,3 V ile 0,6V arasında potansiyel aralığında gerçekleştirildi)

Tablo 4. 2 SPGE/Antikor yüzeyine BSA optimizasyonundan CV sonuçlarının anodik pik akımı, katodik pik akımı ve potansiyel farkının sayısal verileri

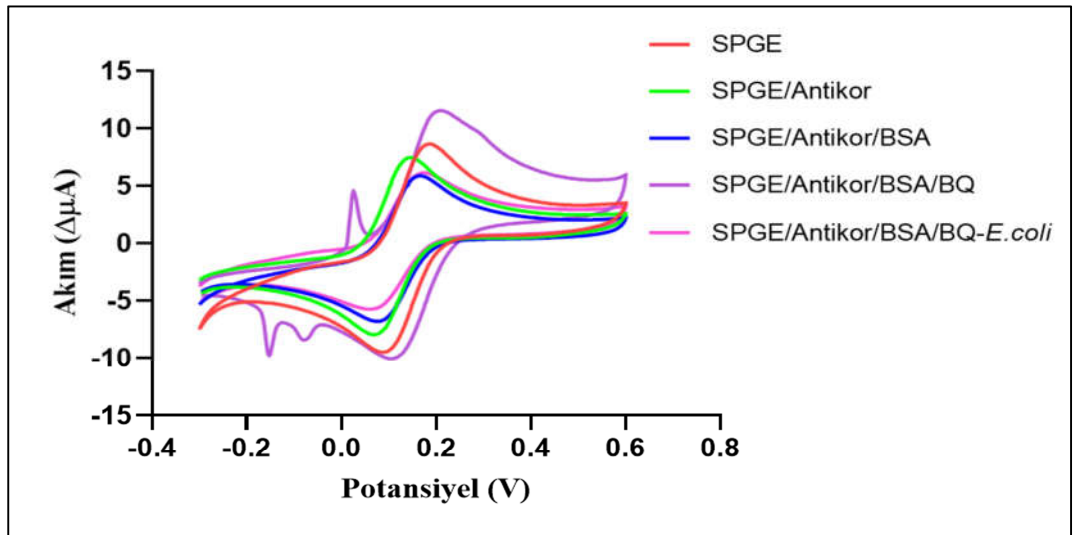
BSA Konsantrasyonu	$I_{pa}(\mu A)$	$I_{pc}(\mu A)$	DE(mV)
1%	3.092	-4.842	105
2%	4.424	-5.140	97
2.5%	6.471	-6.829	127

#### 4.4 Elektrokimyasal Biyosensörün Karakterizasyon Sonuçları

Biyosensörlerin karakterizasyon çalışmalarında CV ve EIS teknikleri sıkça kullanılır. Bu tez kapsamında da, tasarlanan biyosensörün ara yüzey özellikleri hakkında bilgi sahibi olmak amacıyla CV ve EIS tekniklerinden yararlanılmıştır. Şekil 4.5'de, SPGE, SPGE/Antikor, SPGE/Antikor/BSA, SPGE/Antikor/BSA/BQ ve GE/Antikor/BSA/*E. coli*-BQ için CV sonuçları gösterilmektedir. Beklendiği gibi, hacimli gruplar redoks probunun transferini engelledikçe anodik ve katodik akım tepeleri azaldı. Antikorlarla modifikasyon üzerine, çıplak GE'ye kıyasla tepe akımlarında belirgin bir azalma vardı. Bu, antikorların elektrot yüzeyini kısmen

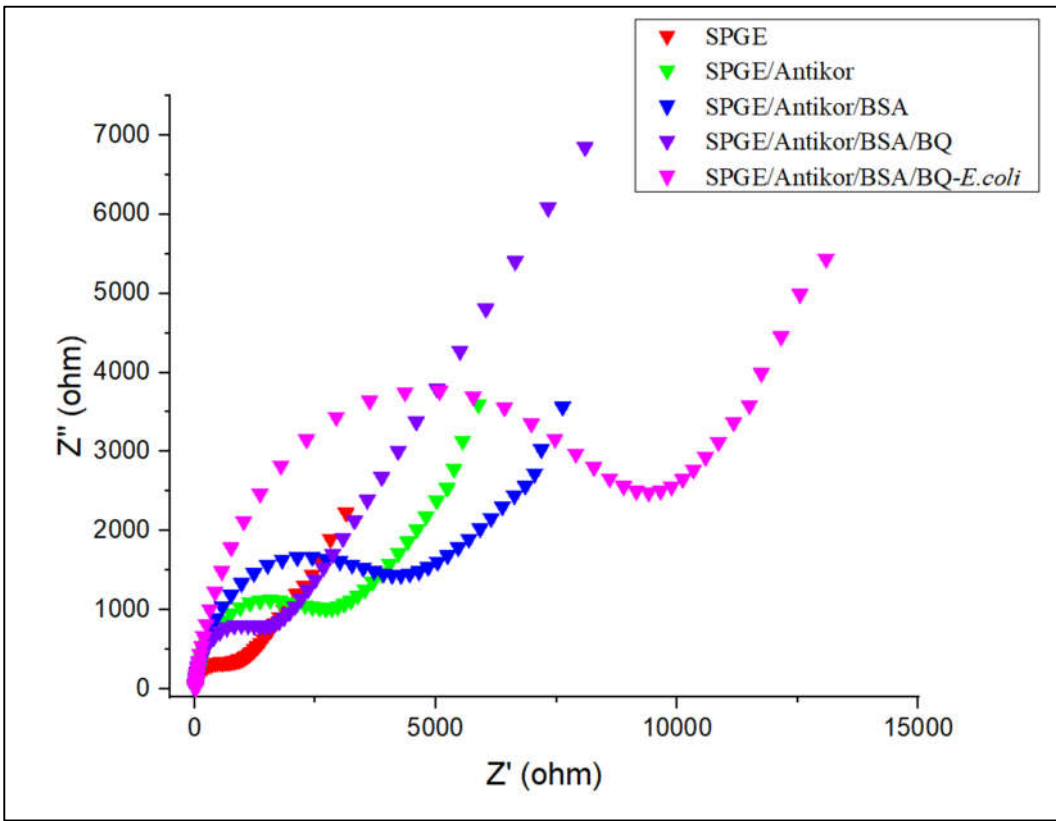
kapladığını ve elektron transferine engel oluşturduğunu gösterir. SPGE/Antikor/BSA incelendiğinde, BSA moleküllerinin ek tabakası elektron transferini daha da engelleyerek tepe akımlarında daha fazla azalmaya yol açtı. SPGE/Antikor/BSA/*E. coli*-BQ ile son modifikasyon, *E. coli*'nin başarılı adım adım işlevselleştirilmesi ve spesifik yakalanmasıyla tutarlı olarak daha da önemli bir akım azalması gösterdi. Ek olarak SPGE/Antikor/BSA/BQ ölçümleri ile anodik ve katodik akım tepeleri arttı. Benzokinonun kullanıldığı CV ölçümlerinde pik akımındaki artışın temel nedeni, benzokinonun redoks (indirgenme-yükseltgenme) özelliklerine dayanmaktadır. Benzokinon, indirgenebilir bir bileşiktir ve elektrot yüzeyinde elektron alıp vererek kolayca indirgenip yükseltgenebilir.

CV tekniği ile alınan ölçümler için katyodik pikler boş altın elektrot için  $-9,918 \mu\text{A}$ ; SPGE/Antikor için  $-7,964 \mu\text{A}$ ; SPGE/Antikor/BSA için  $-6,704 \mu\text{A}$ ; SPGE/Antikor/BSA/BQ  $-10,653 \mu\text{A}$  ve SPGE/Antikor/BSA/*E. coli*-BQ  $-6,154 \mu\text{A}$  olarak bulundu. Anodik pikler ise boş altın elektrot için  $9,151 \mu\text{A}$ ; SPGE/Antikor için  $7,600 \mu\text{A}$ ; SPGE/Antikor/BSA için  $6,276 \mu\text{A}$ ; SPGE/Antikor/BSA/BQ  $10,329 \mu\text{A}$  ve SPGE/Antikor/BSA/*E. coli*-BQ  $4,751 \mu\text{A}$  olarak belirlendi. Piklerdeki bu belirgin yükselme ve düşüşler, Altın elektrot yüzeyine uygulanan modifikasyon adımlarının başarıyla gerçekleştirildiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 4. 5 Boş SPGE elektrot, antikor modifikasyonu sonrası (SPGE/Antikor), BSA bloklanması ardından (SPGE/Antikor/BSA) BQ eklenmesiyle (SPGE/Antikor/BSA/BQ) ve *E. coli* analitinin eklenmesi sonrasında (SPGE/Antikor/BSA/BQ-*E. coli*) elde edilen CV sonuçları (Ölçümler, 50 mV/s tarama hızında -0,3 V ile 0,6 V arasında potansiyel aralığında gerçekleştirildi).

CV sonuçlarına ek olarak, yüzey karakterizasyonu için EIS ölçümleri yapıldı ve Şekil 4.6'da özetlendi. EIS sonuçları, gösterildiği gibi Warburg empedansı (W), çözelti direnci ( $R_s$ ), kapasitans (C1) ve elektron transfer direncinin değişimi ( $R_{ct}$ ) dahil olmak üzere elektrik devresini tasarlamak için kullanıldı. Nyquist diyagramı bir elektrik yarım dairesidir ve Randle'ın eşdeğer devreleriyle değerlendirilmiş ve uygulanmıştır. EIS verileri CV sonuçlarıyla uyumludur. *E. coli*-BQ, BSA ve antikor SPGE yüzeyine sabitlendiğinde direnç değerleri artmıştır ve bu da elektrot yüzeyinde başarılı bir bağlanma olduğunu göstermiştir.

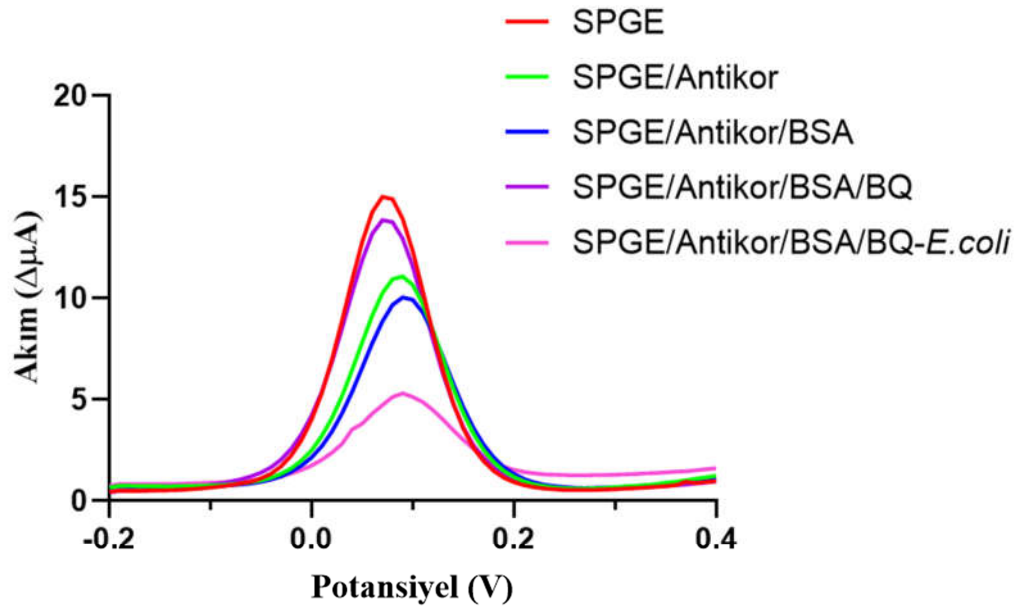


Şekil 4. 6 Boş SPGE elektrot; SPGE/Antikor; SPGE/Antikor/BSA; SPGE/Antikor/BSA/BQ SPGE/Antikor/BSA/ BQ- *E. coli* modifiye elektrotları için EIS sonuçları (Ölçümler için 0,18V'da 0,02Hz ile 10 Hz akım aralığı kullanıldı)

#### 4.5 Elektrokimyasal Biyosensörün Analitik Sonuçları

Tasarlanan *E. coli* biyosensörünün analitik özelliklerinin incelenmesi amacıyla DPV tekniği kullanıldı. Biyosensörün her bir modifikasyon aşaması bu teknikle takip edilmiştir ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.7'de verilmiştir. Altın

elektrot yüzeyine antikor bağlandığında, DPV piklerinde bir azalma gözlemlenmiştir. Bu düşüş, antikorların yüzeye bağlanmasıyla yüzeydeki yük aktarımının kısmen engellenmesine bağlı olarak sinyalin zayıflamasıyla ilişkilendirilmektedir. BSA ile yüzey bloklama işleminin ardından piklerdeki düşüş devam etmiştir, bu durum ise BSA'nın yüzeyi kaplayarak yük transferini daha da sınırlandırması ile açıklanabilir. Öte yandan, yalnızca BQ eklendiğinde DPV piklerinde belirgin bir artış meydana gelmiştir. Bu yükselme, BQ'nun yüzeyde oksitlenebilir bir bileşen olarak elektrot sinyalini artırması ile ilişkilendirilebilir. Son olarak, BQ ve *E. coli* bakterisinin antikor ile modifiye edilmiş yüzeye eklendiğinde ise DPV piklerinde tekrar bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu düşüş, bakteri-antikor kompleksinin oluşumuyla yüzeydeki elektriksel iletkenliğin azalması ve yük transferinin kısıtlanmasıyla açıklanabilir.



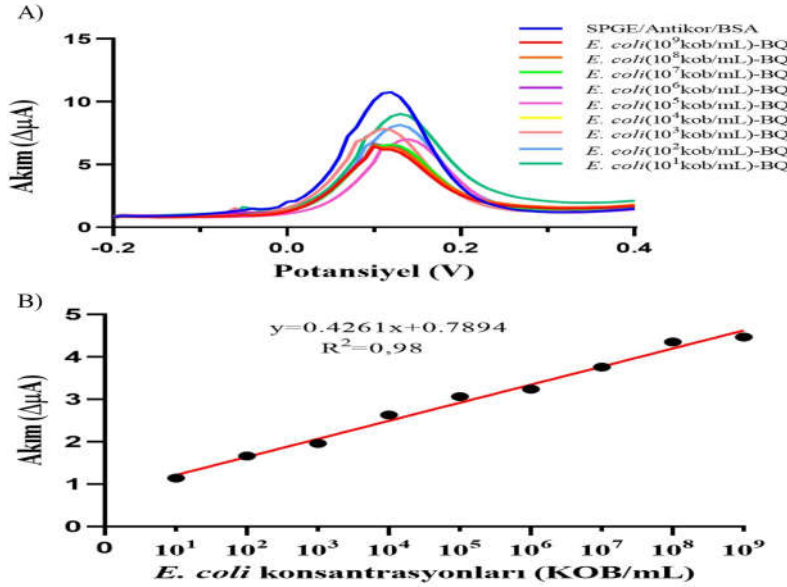
Şekil 4. 7 Boş SPGE elektrot; SPGE/Antikor; SPGE/Antikor/BSA; SPGE/Antikor/BSA/BQ SPGE/Antikor/BSA/ BQ- *E. coli* modifiye elektrotları için DPV sonuçları (Ölçümler için -0,2 V dan 0,4 V'a potansiyel aralığı kullanıldı.)

#### 4.5.1 Kalibrasyon Grafiği ve Dedeksiyon Limitinin(LOD) Belirlenmesi

SPGE/Antikor/BSA şeklinde modifiye edilmiş *E. coli* sensörünün analitik performansının belirlenebilmesi için  $1 \times 10^1$  ve  $1 \times 10^9$  kob/mL konsantrasyon aralığında *E. coli* ve 6mM BQ çözeltisi karıştırılarak yüzeye uygulanarak

kalibrasyon grafiği oluşturuldu. DPV tekniği kullanılarak antikor ile analit sinyalleri arasındaki akım farkı belirlendi. Kullanılan *E. coli* konsantrasyonları x eksenini, elde edilen akım farkları y eksenini olacak şekilde grafik oluşturuldu. Dokuz farklı *E. coli* konsantrasyonu uygulandığında elde edilen DPV sinyalleri ile elde edilen kalibrasyon grafiği şekil 4.8’de verildi. Bu sonuçlara gore tasarlanan *E. coli* sensorunun doğrusal tayin aralığı  $1 \times 10^1$  ve  $1 \times 10^9$  kob/mL ve doğrusal eşitlik  $y = 0,4261x + 0,7894$  ( $R^2 = 0,98$

) olarak belirlendi. LOD değeri biyosensor sisteminin duyarlılığının olutudur. LOD değeri  $[(3 \times \text{Standart Hata})/m]$  formulu kullanılarak hesaplandı. LOD değeri 0,57 kob/mL olarak belirlendi.



şekil 4. 8 A)Farklı konsantrasyonlarda *E. coli*’nin SPGE/Antikor/BSA yuzeyine eklenmesine ait DPV sonuçları.B) SPGE/Ab/BSA sisteminin farklı *E.coli*-BQ analit konsantrasyonlarına karşı kalibrasyon eğrisi. Kalibrasyon eğrisi DPV tekniği ile elde edildi.

#### 4.5.2 Tekrarlanabilirlik ve Varyasyon Katsayısı

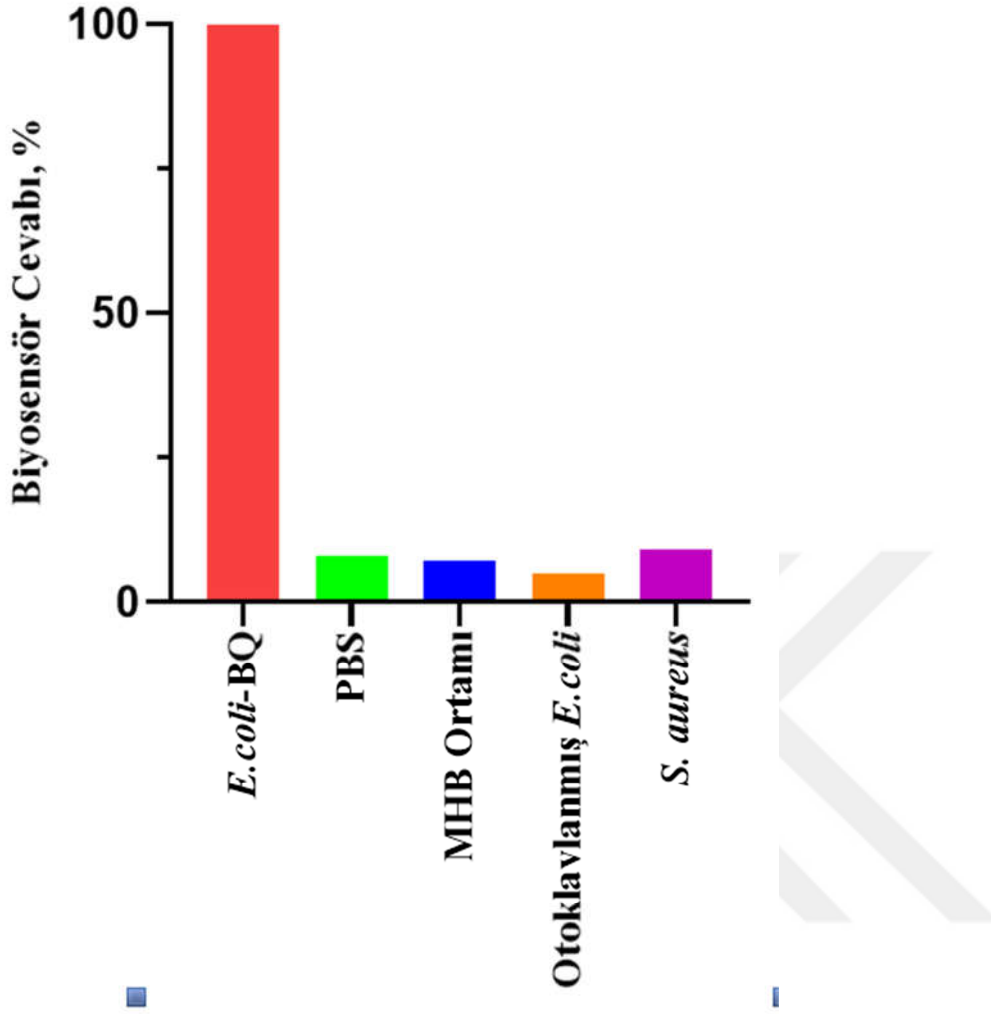
Tasarlanan biyosensörün varyasyon katsayısı (%), ve tekrarlanabilirlik ( $\pm$ SE) değerleri hesaplandı. Tekrarlanabilirlik ( $\pm$ SE) değerini hesaplamak için 10 ardışık ölçüm yapıldı ve  $\pm$ 0,08 olarak bulundu. Ayrıca, varyasyon katsayısı (%) [(Standart Hata/Ortalama) $\times$ 100] formülü kullanılarak hesaplandı ve %1,51 olarak bulundu.

Tablo 4. 3 Tasarlanan *E. coli* biyosensörü için bazı analitik parametreler.

Analitik Parametreler	Değerler
Lineer Aralık(kob/mL)	$1 \times 10^1 - 1 \times 10^9$
Eğim	0,4261
Eğim Standart Sapma	0,016
Kesim Değeri	0,7894
Kesim Değeri Standard Sapma	0,093
Korelasyon Katsayısı	0,9895
Tekrarlanabilirlik	0,08
Varyasyon Katsayısı(%)	1,51
Dedeksiyon Limiti(LOD)(kob/mL)	0,57

#### 4.5.3 Girişimci Moleküller

Tasarlanan biyosensörün *E. coli*-BQ için özgülüğünü değerlendirmek amacıyla girişimci denemeleri gerçekleştirildi. Kullanılan tamponun etkisini değerlendirmek için PBS tamponu ve kullanılan ortamın *E. coli* üzerindeki etkisini değerlendirmek için MHB ortamı test edildi. Otoklavlanmış *E. coli* hücreleri ve *S. aureus* bakterileri de girişimci molekül olarak test edildi. Araya giren moleküller (SPGE/Antikor/BSA) içeren çözeltiler elektrot yüzeyine uygulandı. DPV, CV ve EIS ölçümleri alındı ve *E. coli*-BQ için elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı. Sonuçlar şu şekildedir: biyosensör tepkileri PBS için %8, MHB ortamı için %7, otoklavlanmış *E. coli* için %5 ve *S. aureus* için %9 idi (Şekil 4.9 ). Tasarlanan biyosensör sistemi seçilen girişimci moleküllere karşı daha düşük bir tepki gösterdi. Bu sonuçlara dayanarak tasarlanan biyosensörün *E. coli*'nin tespitinde spesifik ve etkin bir şekilde kullanılabileceği sonucuna varıldı.



Şekil 4. 9 *E. coli* biyosensörünün bazı analitlere karşı tepkileri; PBS, MHB besiyeri, otoklavlanmış *E. coli* ve *S. aureus*, (Ölçümler DPV tekniği ile gerçekleştirildi.).

#### 4.6 Seçicilik

Tasarlanan elektrokimyasal biyosensörün, *E. coli*-BQ ölçümlerinde etkinliğini değerlendirmek amacıyla dört farklı örnek hazırlandı: *E. coli*, *E. coli*-*S. aureus* karışımı, *E. coli*-*S. aureus*-BQ karışımı ve *S. aureus*-BQ. Tüm örnekler SPGE/Antikor/BSA kaplanmış yüzey üzerinde analiz edildi. İlk olarak yüzeye eklenen  $10^9$  kob/mL *E.coli* ile yapılan DPV sonuçlarına göre BQ olmadan yalnızca %45,8 oranında bir verim sağladığını gösterdi.  $10^9$  kob/mL *E. coli* ve  $10^9$  kob/mL *S. aureus* karışımı yüzeye eklendiğinde ise verim %27,7'e düştü. *E. coli*-*S. aureus*-BQ karışımı yüzeye eklendiğinde ise, bakterilerin son konsantrasyonları seyreltildiği halde %49,9 oranında bir verim elde edildi; bu durum, BQ'nun *E.*

*coli* ile etkileşiminin tespit sürecindeki hassasiyeti artırdığını ortaya koydu. Öte yandan, *S. aureus*-BQ yüzeye eklendiğinde elektrot ölçümlerinde bağlanma gerçekleşmediği için herhangi bir değişiklik gözlemlenmedi.

#### 4.7 Elektrokimyasal Biyosensörün Yüzey Alanı

CV yöntemi, önerilen algılama sensörünün özelliklerini analiz etmek için kullanışlı bir yaklaşımdır. Elektrokimyasal biyosensörlerde tarama hızı değerlerinin değiştirilerek ölçüm alınmasının temel nedeni, sistemin elektrokimyasal dinamikleri hakkında ayrıntılı bilgi edinmektir. Tarama hızı değişimi, elektrot yüzeyindeki yük aktarım hızının belirlenmesine ve biyosensör performansının farklı hızlardaki tepkisini gözlemlemeye olanak sağlar. Tarama hızı değiştirilerek hem SPGE/ Antikor hem de SPGE/Antikor/BSA/BQ ile yapılan modifikasyonun elektrodun performansı üzerindeki etkisi tespit edildi. SPGE/Antikor ve SPGE/Antikor/BSA/BQ için farklı tarama hızlarında hesaplanan  $I_{pa}$  ve  $I_{pc}$  değerleri Tablo ve Tablo'da verilmiştir. İki modifikasyon adımı da tepe akımı, tarama hızının 0,01 ila 0,1 V/s aralığında artmasıyla arttı. Dahası, tepe akımı ile tarama hızının karekökü arasında doğrusal bir ilişki gözlemlendi. Aynı ayrı ele alındığında, elektrot modifikasyonunun farklı adımlarının görünen elektroaktif yüzey alanı, çıplak elektrot için  $0,017 \text{ cm}^2$  ile sonuçlandı. Antikor eklendikten sonra elektroaktif yüzey alanı  $0,013 \text{ cm}^2$ 'ye düştü. Ancak yüzeye BSA ve BQ eklendikten sonra elektroaktif alanı başarıyla  $0,021 \text{ cm}^2$ 'ye çıkardı.

Antikor eklendikten sonra elektroaktif yüzey alanındaki azalma muhtemelen antikor tabakasının yalıtım özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Antikorlar elektrot yüzeyine bağlandığında, elektron transfer bölgelerini kısmen bloke edebilir ve elektrokimyasal reaksiyonlar için mevcut etkin yüzey alanını azaltabilir. Bu etki, iletkenliği azaltırken, biyosensör özgülüğü için gerekli olan elektrot üzerinde başarılı antikor immobilizasyonunu doğrular.

BQ eklenmesinden sonra elektroaktif yüzey alanındaki artış, BQ moleküllerinin redoks-aktif doğasına atfedilebilir. Benzokinon, geri dönüşümlü olarak redoks reaksiyonlarına girme yeteneği nedeniyle elektrot yüzeyinde

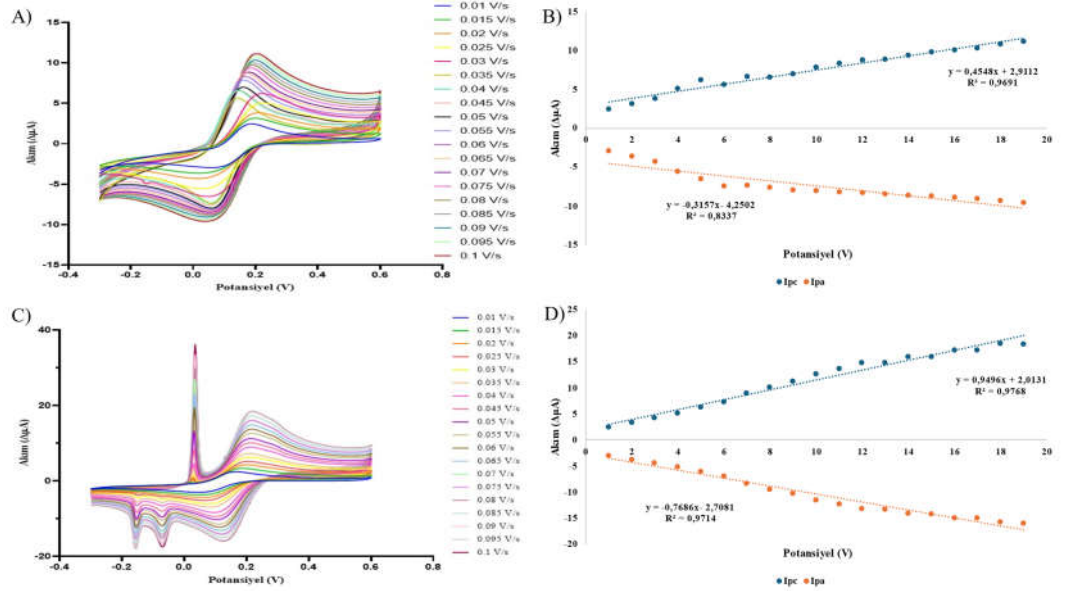
elektron transferini kolaylaştırabilir. Bu özellik, elektrot ile çözültideki elektroaktif türler arasındaki elektron transfer kinetiğini artırarak redoks işlemi için mevcut aktif bölgeleri etkili bir şekilde genişletir. Dahası, elektrot yüzeyinde BQ'nun varlığı, elektron transfer merkezlerinin yoğunluğunu artırarak modifiye edilmiş elektrotun iletkenliğini ve elektrokimyasal aktivitesini iyileştirir. Sonuç olarak, genel elektroaktif yüzey alanı daha büyük görünür ve hem içsel yüzey alanını hem de redoks-aktif BQ moleküllerinden gelen ek katkıyı yansıtır. Bu nedenle, bu modifikasyon adımı, sonraki elektrokimyasal uygulamalar için elektrotun hassasiyetini ve verimliliğini artırmada kritik öneme sahiptir.

Tablo 4. 4 Antikor optimizasyonundan farklı tarama hızlarındaki CV sonuçlarının anodik pik akımı, katodik pik akımının sayısal verileri

	$I_{pc}$	$I_{pa}$
0.01 V/s	2,4577	-2,959
0.015 V/s	3,15894	-3,63363
0.02 V/s	3,83758	-4,3086
0.025 V/s	5,06379	-5,56447
0.03 V/s	6,22156	-6,52387
0.035 V/s	5,64554	-7,41795
0.04 V/s	6,59158	-7,38695
0.045 V/s	6,57966	-7,60487
0.05 V/s	7,00024	-7,97823
0.055 V/s	7,84948	-8,04832
0.06 V/s	8,31536	-8,20282
0.065 V/s	8,74642	-8,32394
0.07 V/s	8,86706	-8,45793
0.075 V/s	9,38205	-8,61338
0.08 V/s	9,74683	-8,75596
0.085 V/s	10,0224	-8,9033
0.09 V/s	10,3248	-9,09499
0.095 V/s	10,7654	-9,34628
0.1 V/s	11,1411	-9,61474

Tablo 4. 5 SPGE/Antikor/BSA yüzeyine BQ optimizasyonundan farklı tarama hızlarındaki CV sonuçlarının anodik pik akımı, katodik pik akımının sayısal verileri

	$I_{pc}$	$I_{pa}$
0.01 V/s	2,4154	-3,026
0.015 V/s	3,34653	-3,7006
0.02 V/s	4,2889	-4,4248
0.025 V/s	5,18682	-5,1892
0.03 V/s	6,31549	-6,078
0.035 V/s	7,27823	-6,9626
0.04 V/s	8,9567	-8,3888
0.045 V/s	10,1264	-9,4598
0.05 V/s	11,2398	-10,268
0.055 V/s	12,6627	-11,469
0.06 V/s	13,7332	-12,269
0.065 V/s	14,8495	-13,128
0.07 V/s	14,8657	-13,248
0.075 V/s	15,9853	-14,038
0.08 V/s	16,0325	-14,156
0.085 V/s	17,2651	-14,939
0.09 V/s	17,2246	-15,022
0.095 V/s	18,4706	-15,784
0.1 V/s	18,4382	-15,929



Şekil 4. 10 A)Antikor optimizasyon adımının farklı tarama hızlarında CV analizi. B)Tepe akımlarının tarama hızının kareköküne karşı çizimleri.C)BQ optimizasyon adımının farklı tarama hızlarında CV analizi. D)Tepe akımlarının tarama hızının kareköküne karşı çizimleri.

## 4.8 Diğer Biyosensör Sistemleri ile Tasarlanan Biyosensörün Karşılaştırılması

Tablo 4. 6 *E. coli* tespiti için elektrokimyasal biyosensörler

Hedef Analit	Biyoreseptör	Elektrot	Tespit Süresi	Lineer Aralık (kob/mL)	Referans
<i>E. coli</i> (ATCC25922), <i>E. coli</i> O157:H7 (NCTC12900)	-	ITO/PET/ <i>E. coli</i> /BQ	60 dakika	1.0x10 <sup>3</sup> - 1.0x10 <sup>9</sup>	(Sun et al., 2019)
<i>E. coli</i> (DH 5α)	-	GCE/ <i>E. coli</i> /BQ	60 dakika	-	(Yu et al., 2021)
<i>E. coli</i>	Antikor	PEM/SiO <sub>2</sub> -NPs <sup>+</sup> /Ab/BSA/ <i>E. coli</i>	5-30 dakika	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>10</sup>	(Mathelié-Guinlet et al., 2019)
<i>E. coli</i>	Antikor	GCE/Au@MoS <sub>2</sub> -PANI/MPA/Ab/BSA/ <i>E. coli</i>	30 dakika	10-10 <sup>7</sup>	(Raj et al., 2021)
<i>E. coli</i> O157	Antikor	SPE/AuNP/NHS/Ab/ <i>E. coli</i> O157	30 dakika	10-10 <sup>6</sup>	(Vu et al., 2021)
<i>E. coli</i> O157:H7	Antikor	SPCE/ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Au MNP-Ab-C/ <i>E. coli</i> O157:H7/Ab-D+ HRP-Ab/TMB	-	20-2x10 <sup>6</sup>	(Bazsefidpar et al., 2023)
<i>E. coli</i>	Antikor	ITO/PS/Avidin/Antikor/ <i>E. coli</i> /Ag@Au	-	10 <sup>1</sup> -10 <sup>5</sup>	(Eksi et al., 2014)
<i>E. coli</i>	Antikor	SPCE/AuNRs/MUA/EDC-NHS/Avidin/Antikor/BSA/ <i>E. coli</i>	40 dakika	10 <sup>1</sup> -10 <sup>5</sup>	(Panhwar et al., 2021)
<i>E. coli</i>	Antikor	GE/AuNP-SWCNTs/Capture Antikor/BSA/ <i>E. coli</i> /Pt-Ni@erGO	-	1.5 × 10 <sup>2</sup> - 1.5 × 10 <sup>7</sup>	(Zheng et al., 2023)
<i>E. coli</i> O157:H7	Aptamer	GCE/AuNP/Kimerik protein/ cDNA/Aptamer	-	1.5 × 10 <sup>1</sup> - 1.5 × 10 <sup>5</sup>	(Z. Li et al., 2022)
<i>E. coli</i> O157:H7	Aptamer	GCE/CDs-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /EDC-NHS/Prob DNA/ <i>E. coli</i> O157:H7	40 dakika	10 - 10 <sup>7</sup>	(Lin et al., 2021)
<i>E. coli</i> O157:H7	Antikor	SPE/ m-COF@IgY/FBA/ <i>E. coli</i>	20-60 dakika	10 x 10 <sup>8</sup>	(Xiao et al., 2022)
<i>E. coli</i>	Antikor	GCE/ B, N- GQDs/EDC-NHS/IgY Ab/BSA/ <i>E. coli</i>	-	0.5 x 10 <sup>1</sup> - 10 <sup>7</sup>	(Ganesan et al., 2024)
<i>E. coli</i>	Antikor	SPGE/Antikor/BSA/BQ- <i>E. coli</i>	30 dakika	1x10 <sup>1</sup> - 1x10 <sup>9</sup>	Bu çalışma

Camsı karbon elektrot (GCE); Polielektrolit katman(PEM); Antikor(Ab); Bovin serum albumin (BSA); Polianilin (PANI); Merkaptopropionik asit (MPA);Ekran baskılı elektrot (SPE);Ekran baskılı karbon elektrot(SPCE); Altın nanoparçacıklar (AuNP);manyetik kovalent organik yapı (m-COF)Bor ve Azot katkıli Grafen Kuantum Noktaları (B, N-GQDs)

*E. coli*, halk sağlığı açısından tespit edilmesi büyük önem taşıyan patojenik bakterilerden biri olup, bu amaçla bugüne kadar literatürde birçok farklı sensör sistemi geliştirilmiştir. Bu tez kapsamında geliştirilen biyosensör sistemi, literatürde mevcut diğer sensör sistemleriyle Tablo 4.6'da detaylı olarak karşılaştırılmıştır. Geliştirilen sensör, elektrot yüzeyinin tasarımında pahalı ve zaman alıcı materyallerin kullanımını gerektirmemesi açısından, diğer çalışmalara kıyasla daha ekonomik ve pratik bir yapıya sahiptir. Bunun yanı sıra, bu çalışmada elde edilen tespit sresinin kısalığı, *E. coli* varlığının hızlı bir şekilde saptanabilmesi için belirgin bir avantaj sağlamakta ve bazı mevcut sistemlere göre önemli bir zaman tasarrufu sunmaktadır. Çalışmanın geniş ve duyarlı bir lineer aralık sunması ise, *E. coli* tespiti için yüksek spesifiklik ve doğruluk gösterdiğinin bir kanıtıdır. Tüm bu özellikler, geliştirilen biyosensör sisteminin hem maliyet etkin hem de zaman açısından avantajlı bir alternatif olduğunu ve *E. coli* gibi patojenlerin hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit edilmesinde önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

## 5. GENEL DEĞERLENDİRME

Bu tez çalışmasında, dünyada hızla artan biyogüvenlik tehditleri ve özellikle gıda ve su kaynaklı bulaşıcı hastalıklara yol açan patojenlerin hızlı tespiti konusuna çözüm sunmayı amaçlayan yenilikçi bir yaklaşım geliştirilmiştir. *Escherichia coli* bakterisinin hızlı ve güvenilir bir şekilde belirlenebilmesi için hem kolorimetrik hem de elektrokimyasal temelli benzokinona dayalı tespit sistemleri tasarlanmıştır.

Tez çalışması, mevcut patojen tespit yöntemlerinin zaman alıcı, yüksek maliyetli ve laboratuvar ortamı gerektiren yapısına alternatif olarak, taşınabilir ve hızlı sonuç verebilen bir biyosensör çözümü sunmayı hedeflemektedir. Bu bağlamda, *E. coli*'nin özgül olarak tanınması için kullanılan antikor temelli biyosensör yaklaşımı sayesinde yüksek hassasiyet ve seçicilik elde edilmiştir. Elektrokimyasal sensörlerde redoks ajanı olarak tercih edilen benzokinon, *E. coli*'yi diğer bakterilerden ayırt edebilen özelliklere sahip olması sayesinde analitik sistemin başarısını artırmıştır. Renk analizine dayalı kolorimetrik sistem, çıplak gözle veya temel bir renk analiz programıyla hızlı bir şekilde tespit imkanı sunmaktadır. Kolorimetrik sistemde, benzokinonun *E. coli* varlığında oluşturduğu renk değişimleri incelenmiş ve optimal renk değişimlerinin elde edilmesi için gerekli koşullar belirlenmiştir.

Geliştirilen biyosensör sisteminin analitik performansı detaylı olarak incelenmiş ve geniş bir lineer çalışma aralığı ile düşük bir tespit limiti (0,57 kob/mL) elde edilmiştir. Tezde ayrıca biyosensörün seçicilik, tekrarlanabilirlik gibi önemli performans kriterleri üzerine analizler yapılmıştır. Farklı girişim yaratan moleküllerle yapılan testlerde biyosensörün özgüllüğü doğrulanmış; örneğin, *Staphylococcus aureus* gibi bakterilerle karşılaştırıldığında yalnızca *E. coli*'ye özgü bir yanıt elde edilmiştir. Ayrıca biyosensör yüzeyinde gerçekleştirilen antikor modifikasyonları ve bloklama adımları, spesifik olmayan bağlanmaları en aza indirerek sinyal güvenilirliğini artırmıştır.

Kolorimetrik yöntem ile hızlı bir görsel tespit sağlanması, biyosensörün sahada kullanım potansiyelini artırırken, elektrokimyasal sistem ise daha düşük

tespit limitleri ile hassas analizler yapılabilmesine olanak tanımaktadır. Her iki yöntemin de başarılı bir şekilde uygulanabilir olması, biyosensör sisteminin farklı alanlarda kullanılabilirliğini sağlamaktadır. Bu bağlamda çalışma, *E. coli* ve benzeri patojenlerin tespitinde etkili, yenilikçi ve uygun maliyetli bir yöntem sunarak birçok alanda uygulanabilir bir potansiyele sahiptir.

Sonuç olarak, geliştirilen bu biyosensör sistemlerinin gelecekte saha uygulamalarında kullanılabilirliği için önemli bir temel oluşturduğu, endüstriyel uygulamalara uyarlanabilmesi ve taşınabilir hale getirilmesi ile toplum sağlığına katkı sunacağı öngörülmektedir.



**KAYNAKLAR DİZİNİ**

- Ahmed, W., Gyawali, P., & Toze, S.** (2015, February 18). *Quantitative PCR measurements of Escherichia coli including Shiga Toxin-Producing E. coli (STEC) in Animal Feces and Environmental Waters* (world) [Research-article]. ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/es505477n>
- Aristov, N., & Habekost, A.** (2015). Cyclic Voltammetry—A Versatile Electrochemical Method Investigating Electron Transfer Processes. *World Journal of Chemical Education*.
- Askim, J. R., & Suslick, K. S.** (2017). Colorimetric and Fluorometric Sensor Arrays for Molecular Recognition. In *Fluorescent Sensors and Imaging Agents* (Vol. 8, pp. 37–88). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12616-2>
- Balkourani, G., Brouzgou, A., Archonti, M., Papandrianos, N., Song, S., & Tsiakaras, P.** (2021). Emerging materials for the electrochemical detection of COVID-19. *Journal of Electroanalytical Chemistry (Lausanne, Switzerland)*, 893, 115289. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115289>
- Basavaraju, M., Gunashree, B. S., Basavaraju, M., & Gunashree, B. S.** (2022). Escherichia coli: An Overview of Main Characteristics. In *Escherichia coli—Old and New Insights*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.105508>
- Batista Deroco, P., Giarola, J. de F., Wachholz Júnior, D., Arantes Lorga, G., & Tatsuo Kubota, L.** (2020). Chapter Four—Paper-based electrochemical sensing devices. In A. Merkoçi (Ed.), *Comprehensive*

*Analytical Chemistry* (Vol. 89, pp. 91–137). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.11.001>

**Bazin, I., Tria, S. A., Hayat, A., & Marty, J.-L.** (2017). New biorecognition molecules in biosensors for the detection of toxins. *Biosensors and Bioelectronics*, *87*, 285–298. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.06.083>

**Bazsefidpar, S., Freitas, M., Pereira, C. R., Gutiérrez, G., Serrano-Pertierra, E., Nouws, H. P. A., Matos, M., Delerue-Matos, C., & Blanco-López, M. C.** (2023). Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au Core–Shell Magnetic Nanoparticles for the Rapid Analysis of *E. coli* O157:H7 in an Electrochemical Immunoassay. *Biosensors*, *13*(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/bios13050567>

**Bohunicky, B., & Mousa, S. A.** (2010). Biosensors: The new wave in cancer diagnosis. *Nanotechnology, Science and Applications*, *4*, 1–10. <https://doi.org/10.2147/NSA.S13465>

**Borges, R. S., Carneiro, A. S., Barros, T. G., Barros, C. A. L., Neto, A. M. J. C., & da Silva, A. B. F.** (2014). Understanding the cytotoxicity or cytoprotective effects of biological and synthetic quinone derivatives by redox mechanism. *Journal of Molecular Modeling*, *20*(12), 2541. <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2541-9>

**Borisov, S. M., & Wolfbeis, O. S.** (2008). Optical biosensors. *Chemical Reviews*, *108*(2), 423–461. <https://doi.org/10.1021/cr068105t>

**Chaubey, A., & Malhotra, B. D.** (2002). Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, *17*(6), 441–456. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00313-X](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00313-X)

**Cimafonte, M., Fulgione, A., Gaglione, R., Papaianni, M., Capparelli, R., Arciello, A., Bolletti Censi, S., Borriello, G., Velotta, R., & Della**

**Ventura, B.** (2020). Screen Printed Based Impedimetric Immunosensor for Rapid Detection of Escherichia coli in Drinking Water. *Sensors*, 20(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/s20010274>

**Coburn, B., Sekirov, I., & Finlay, B. B.** (2007). Type III Secretion Systems and Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(4), 535–549. <https://doi.org/10.1128/cmr.00013-07>

**Cohen, S., Miller, G. E., & Rabin, B. S.** (2001). Psychological stress and antibody response to immunization: A critical review of the human literature. *Psychosomatic Medicine*, 63(1), 7–18. <https://doi.org/10.1097/00006842-200101000-00002>

**Conroy, P. J., Hearty, S., Leonard, P., & O’Kennedy, R. J.** (2009). Antibody production, design and use for biosensor-based applications. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(1), 10–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.01.010>

**Deffo, G., Nde Tene, T. F., Medonbou Dongmo, L., Zambou Jiokeng, S. L., & Tonleu Temgoua, R. C.** (2024). Differential pulse and square-wave voltammetry as sensitive methods for electroanalysis applications. In K. Wandelt & G. Bussetti (Eds.), *Encyclopedia of Solid-Liquid Interfaces (First Edition)* (pp. 409–417). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85669-0.00040-4>

**Dkhar, D. S., Kumari, R., Mahapatra, S., Divya, Kumar, R., Tripathi, T., & Chandra, P.** (2022). Antibody-receptor bioengineering and its implications in designing bioelectronic devices. *International Journal of Biological Macromolecules*, 218, 225–242. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.109>

- Dryden, M. D. M., & Wheeler, A. R.** (2015). DStat: A Versatile, Open-Source Potentiostat for Electroanalysis and Integration. *PLoS One*, *10*(10), e0140349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140349>
- Duan, Q., Xia, P., Nandre, R., Zhang, W., & Zhu, G.** (2019). Review of Newly Identified Functions Associated With the Heat-Labile Toxin of Enterotoxigenic Escherichia coli. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00292>
- Eksi, H., Güzel, R., Güven, B., Boyacı, I. H., & Solak, A. O.** (2014). *Fabrication of an Electrochemical E. coli Biosensor in Biowells Using Bimetallic Nanoparticle-Labelled Antibodies.* <https://doi.org/10.1002/elan.201400370>
- Fan, X., White, I. M., Shopova, S. I., Zhu, H., Suter, J. D., & Sun, Y.** (2008). Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Analytica Chimica Acta*, *620*(1–2), 8–26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.022>
- Francke, R., & Little, R. D.** (2014). Redox catalysis in organic electrosynthesis: Basic principles and recent developments. *Chemical Society Reviews*, *43*(8), 2492–2521. <https://doi.org/10.1039/C3CS60464K>
- Ganesan, H., Suresh, I., Thuthikkadu Indhuprakash, S., Diraviyam, T., & Bosco Balaguru Rayappan, J.** (2024). Chicken IgY based electrochemical immunosensor for the detection of bacterial pathogen *E. coli* in water. *Microchemical Journal*, *204*, 111152. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.111152>
- García-Martínez, G., Bustabad, E. A., Perrot, H., Gabrielli, C., Bucur, B., Lazerges, M., Rose, D., Rodríguez-Pardo, L., Fariña, J., Compère, C., & Vives, A. A.** (2011). Development of a Mass Sensitive Quartz Crystal

Microbalance (QCM)-Based DNA Biosensor Using a 50 MHz Electronic Oscillator Circuit. *Sensors*, 11(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/s110807656>

**Garg, N., Ahmad, F. J., & Kar, S.** (2022). Recent advances in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid and efficient detection of pathogens. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100120. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100120>

**Garzón, V., Pinacho, D. G., Bustos, R.-H., Garzón, G., & Bustamante, S.** (2019). Optical Biosensors for Therapeutic Drug Monitoring. *Biosensors*, 9(4), 132. <https://doi.org/10.3390/bios9040132>

**Gebisa, E., Geresu, M., & Leggese, D.** (2019). Eshetu Shumi Gebisa, Minda Asfaw Gerasu, Diriba Taddese Leggese. A Review on Virulence Factors of Escherichia Coli. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 7, 83–93. <https://doi.org/10.11648/j.avs.20190703.13>

**Ghindilis, A. L., Atanasov, P., Wilkins, M., & Wilkins, E.** (1998). Immunosensors: Electrochemical sensing and other engineering approaches. *Biosensors and Bioelectronics*, 13(1), 113–131. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(97\)00031-6](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(97)00031-6)

**Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E.** (2008). Electrochemical Biosensors—Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, 8(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/s80314000>

**Güven, B., Basaran-Akgül, N., Temur, E., Tamer, U., & Boyacı, İ. H.** (2011). SERS-based sandwich immunoassay using antibody coated magnetic nanoparticles for Escherichia coli enumeration. *Analyst*, 136(4), 740–748. <https://doi.org/10.1039/C0AN00473A>

- Hameed, S., Xie, L., & Ying, Y.** (2018). Conventional and emerging detection techniques for pathogenic bacteria in food science: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *81*, 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.020>
- Harshita, null, Wu, H.-F., & Kailasa, S. K.** (2023). Recent advances in nanomaterials-based optical sensors for detection of various biomarkers (inorganic species, organic and biomolecules). *Luminescence: The Journal of Biological and Chemical Luminescence*, *38*(7), 954–998. <https://doi.org/10.1002/bio.4353>
- Houk, L. L., Johnson, S. K., Feng, J., Houk, R. S., & Johnson, D. C.** (1998). Electrochemical incineration of benzoquinone in aqueous media using a quaternary metal oxide electrode in the absence of a soluble supporting electrolyte. *Journal of Applied Electrochemistry*, *28*(11), 1167–1177. <https://doi.org/10.1023/A:1003439727317>
- Ikeda, T., Kurosaki, T., Takayama, K., Kano, K., & Miki, K.** (1996). Measurements of Oxidoreductase-like Activity of Intact Bacterial Cells by an Amperometric Method Using a Membrane-Coated Electrode. *Analytical Chemistry*, *68*(1), 192–198. <https://doi.org/10.1021/ac950240a>
- Ja, G., Jv, R., & Pa, M.** (2015). Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, *31*(23). <https://doi.org/10.1021/la503533g>
- Jiang, C., Garg, S., & Waite, T.** (2015). Hydroquinone-Mediated Redox Cycling of Iron and Concomitant Oxidation of Hydroquinone in Oxidic Waters under Acidic Conditions: Comparison with Iron-Natural Organic Matter

Interactions. *Environmental Science & Technology*, 49.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03189>

**Joshi, M., & Deshpande, J. D.** (2011). POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81–97. <https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>

**Karunakaran, C., Rajkumar, R., & Bhargava, K.** (2015). Chapter 1— Introduction to Biosensors. In C. Karunakaran, K. Bhargava, & R. Benjamin (Eds.), *Biosensors and Bioelectronics* (pp. 1–68). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3>

**Koncki, R.** (2007). Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis. *Analytica Chimica Acta*, 599(1), 7–15.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.08.003>

**Kondo, T., & Ikeda, T.** (2000). Rapid detection of substrate-oxidizing activity of hiochi bacteria using benzoquinone-mediated amperometric method. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(2), 217–219.  
[https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)80114-0](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)80114-0)

**Li, H., Liu, X., Li, L., Mu, X., Genov, R., & Mason, A. J.** (2017). CMOS Electrochemical Instrumentation for Biosensor Microsystems: A Review. *Sensors*, 17(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/s17010074>

**Li, J., Yu, Y., Wang, Y., Qian, J., & Zhi, J.** (2013). The benzoquinone-mediated electrochemical microbial biosensor for water biotoxicity assay. *Electrochimica Acta*, 97, 52–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.02.071>

**Li, Z., Zhang, X., Qi, H., Huang, X., Shi, J., & Zou, X.** (2022). A novel renewable electrochemical biosensor based on mussel-inspired adhesive

protein for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 372, 132601.  
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.132601>

**Lin, X., Mei, Y., He, C., Luo, Y., Yang, M., Kuang, Y., Ma, X., Zhang, H., & Huang, Q.** (2021). Electrochemical Biosensing Interface Based on Carbon Dots-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanomaterial for the Determination of *Escherichia coli* O157:H7. *Frontiers in Chemistry*, 9.  
<https://doi.org/10.3389/fchem.2021.769648>

**Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F.** (2005). Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal*, 46(3), 258–268.  
<https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>

**Liu, D.** (2024). Biosensors. In *Handbook of Molecular Biotechnology*. CRC Press.

**Liu, X., Kukkar, D., Deng, Z., Yang, D., Wang, J., Kim, K.-H., & Zhang, D.** (2023). “Lock-and-key” recognizer-encoded lateral flow assays toward foodborne pathogen detection: An overview of their fundamentals and recent advances. *Biosensors and Bioelectronics*, 235, 115317.  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115317>

**Lowe, C. R.** (1984). Biosensors. *Trends in Biotechnology*, 2(3), 59–65.  
[https://doi.org/10.1016/0167-7799\(84\)90011-8](https://doi.org/10.1016/0167-7799(84)90011-8)

**Magar, H. S., Hassan, R. Y. A., & Mulchandani, A.** (2021). Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications. *Sensors*, 21(19), Article 19.  
<https://doi.org/10.3390/s21196578>

- Mathelié-Guinlet, M., Cohen-Bouhacina, T., Gammoudi, I., Martin, A., Béven, L., Delville, M.-H., & Grauby-Heywang, C.** (2019). Silica nanoparticles-assisted electrochemical biosensor for the rapid, sensitive and specific detection of *Escherichia coli*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 292, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.03.144>
- Nakae, T.** (1986). Outer-Membrane Permeability of Bacteria. *CRC Critical Reviews in Microbiology*. <https://doi.org/10.3109/10408418609108734>
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B.** (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 403–403. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.2.403>
- Olive, D. M.** (1989). Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(2), 261–265. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.2.261-265.1989>
- Osteryoung, J. G., & Osteryoung, R. A.** (1985). Square wave voltammetry. *Analytical Chemistry*, 57(1), 101–110. <https://doi.org/10.1021/ac00279a004>
- Öztürk, F. Y., Darcan, C., & Kariptaş, E.** (2023). The Determination, Monitoring, Molecular Mechanisms and Formation of Biofilm in *E. coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(1), 259–277. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00895-y>
- Panhwar, S., ilhan, H., Aftab, A., Muqet, M., Keerio, H. A., Solangi, G. S., Suludere, Z., & Tamer, U.** (2021). High-Performance *E. coli* Antibody-Conjugated Gold Nanorods for the Selective Electrochemical Detection of

Pathogens in Drinking Water. *Journal of Electronic Materials*, 50(12), 7119–7125. <https://doi.org/10.1007/s11664-021-09247-2>

**Piriya V.S, A., Joseph, P., Daniel S.C.G., K., Lakshmanan, S., Kinoshita, T., & Muthusamy, S.** (2017). Colorimetric sensors for rapid detection of various analytes. *Materials Science and Engineering: C*, 78, 1231–1245. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.018>

**Pohanka, M.** (2018). Overview of Piezoelectric Biosensors, Immunosensors and DNA Sensors and Their Applications. *Materials*, 11(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ma11030448>

**Priyanka, B., Patil, R. K., & Dwarakanath, S.** (2016). A review on detection methods used for foodborne pathogens. *Indian Journal of Medical Research*, 144(3), 327. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.198677>

**Qian, S., Cui, Y., Cai, Z., & Li, L.** (2022). Applications of smartphone-based colorimetric biosensors. *Biosensors and Bioelectronics: X*, 11, 100173. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100173>

**Raj, P., Oh, M. H., Han, K., & Lee, T. Y.** (2021). Label-Free Electrochemical Biosensor Based on Au@MoS<sub>2</sub>-PANI for Escherichia coli Detection. *Chemosensors*, 9(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9030049>

**Ramanathan, K., & Danielsson, B.** (2001). Principles and applications of thermal biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(6), 417–423. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00124-5](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00124-5)

**Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., & Heineman, W. R.** (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39(5), 1747. <https://doi.org/10.1039/b714449k>

- Serra, P. A.** (2011). *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*. BoD – Books on Demand.
- Simões, F. R., & Xavier, M. G.** (2017). 6—Electrochemical Sensors. In A. L. Da Róz, M. Ferreira, F. de Lima Leite, & O. N. Oliveira (Eds.), *Nanoscience and its Applications* (pp. 155–178). William Andrew Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-49780-0.00006-5>
- Singh, A., Sharma, A., Ahmed, A., Sundramoorthy, A. K., Furukawa, H., Arya, S., & Khosla, A.** (2021a). Recent Advances in Electrochemical Biosensors: Applications, Challenges, and Future Scope. *Biosensors*, *11*(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/bios11090336>
- Singh, A., Sharma, A., Ahmed, A., Sundramoorthy, A. K., Furukawa, H., Arya, S., & Khosla, A.** (2021b). Recent Advances in Electrochemical Biosensors: Applications, Challenges, and Future Scope. *Biosensors*, *11*(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/bios11090336>
- Sperandeo, P., Martorana, A. M., & Polissi, A.** (2017). Lipopolysaccharide biogenesis and transport at the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1862*(11), 1451–1460. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.10.006>
- Sperandio, V., & Pacheco, A. R.** (2012). Shiga toxin in enterohemorrhagic E.coli: Regulation and novel anti-virulence strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *2*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00081>
- Spink, C., & Wadsö, I.** (1976). Calorimetry as an analytical tool in biochemistry and biology. *Methods of Biochemical Analysis*, *23*(0), 1–159. <https://doi.org/10.1002/9780470110430.ch1>

- Sun, J., Warden, A. R., Huang, J., Wang, W., & Ding, X.** (2019). Colorimetric and Electrochemical Detection of Escherichia coli and Antibiotic Resistance Based on a p-Benzoquinone-Mediated Bioassay. *Analytical Chemistry*, *91*(12), 7524–7530. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04997>
- Tamirat, A. G., Guan, X., Liu, J., Luo, J., & Xia, Y.** (2020). Redox mediators as charge agents for changing electrochemical reactions. *Chemical Society Reviews*, *49*(20), 7454–7478. <https://doi.org/10.1039/D0CS00489H>
- Tolun, A., & Altintas, Z.** (2023). Chapter 16—Chemical sensing of food phenolics and antioxidant capacity. In A. Barhoum & Z. Altintas (Eds.), *Advanced Sensor Technology* (pp. 593–646). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90222-9.00004-2>
- Venton, B. J., & DiScenza, D. J.** (2020). Chapter 3—Voltammetry. In B. Patel (Ed.), *Electrochemistry for Bioanalysis* (pp. 27–50). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821203-5.00004-X>
- Verma, N., & Bhardwaj, A.** (2015). Biosensor Technology for Pesticides—A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *175*(6), 3093–3119. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1489-2>
- Vu, Q. K., Tran, Q. H., Vu, N. P., Anh, T.-L., Dang, T. T. L., Matteo, T., & Nguyen, T. H. H.** (2021). A label-free electrochemical biosensor based on screen-printed electrodes modified with gold nanoparticles for quick detection of bacterial pathogens. *Materials Today Communications*, *26*, 101726. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101726>
- Wang, X., Liu, M., Wang, X., Wu, Z., Yang, L., Xia, S., Chen, L., & Zhao, J.** (2013). P-benzoquinone-mediated amperometric biosensor developed with

Psychrobacter sp. For toxicity testing of heavy metals. *Biosensors and Bioelectronics*, 41, 557–562. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.09.020>

**Xiao, S., Yang, X., Wu, J., Liu, Q., Li, D., Huang, S., Xie, H., Yu, Z., & Gan, N.** (2022). Reusable electrochemical biosensing platform based on egg yolk antibody-labeled magnetic covalent organic framework for on-site detection of *Escherichia coli* in foods. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 369, 132320. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.132320>

**Yu, D., Li, R., Sun, X., Zhang, H., Yu, H., & Dong, S.** (2021). Colorimetric and Electrochemical Dual-Signal Method for Water Toxicity Detection Based on *Escherichia coli* and p-Benzoquinone. *ACS Sensors*, 6(7), 2674–2681. <https://doi.org/10.1021/acssensors.1c00651>

**Zdrachek, E., & Bakker, E.** (2021). Potentiometric Sensing. *Analytical Chemistry*, 93(1), 72–102. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04249>

**Zheng, Y., Qiu, X., Han, D., Liu, C., Song, M., Zhang, S., Wu, H., Chen, R., & Ding, S.** (2023). Bifunctional nanomaterial with antibody-like and electrocatalytic activity to facilitate electrochemical biosensor of *Escherichia coli*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 935, 117303. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2023.117303>

**Zhou, J., & Sun, A.** (2024). Redox mediators for high performance lithium-sulfur batteries: Progress and outlook. *Chemical Engineering Journal*, 495, 153648. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.153648>

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca bana rehberlik eden ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden faydalanarak, beni doğru yönde yönlendiren sadece bilimsel değil, aynı zamanda kişisel anlamda da bana kattığı değerler için değerli danışmanım, Prof. Dr. Suna Timur'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda bana her türlü desteği veren, yardımlarını esirgemeyen Dr. Didem Aksu'ya çok teşekkür ederim. Bilgilerini, desteklerini ve sevgilerini benden hiç esirgemeyen Dr. Duygu Harmancı Karagülle ve Dr. Simge Balaban Hanoğlu'na yol göstericilikleri için teşekkür ederim. Çalışmama farklı noktalardan bakmama yardımcı olan ve her türlü soruma ısrarla cevap veren Dr. Öğr. Üyesi Faezeh Ghorbanizamani ve Dr. Öğr. Üyesi Hichem Moulahoum 'a çok teşekkür ederim. Ayrıca desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen tüm aileme, her zaman yanımda olan arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışmasına TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2210-D Yurt İçi Sanayiye Yönelik Yüksek Lisans Burs programı tarafından burs desteği sağlanmıştır. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkürü borç bilirim.

## ÖZGEÇMİŞ

**Nursima Uçar**

### EĞİTİM BİLGİLERİ:

- Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans 2022-...
- Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü Lisans 2017-2022

### DENEYİMLER:

**Yüksek Lisans, Ege Üniversitesi, Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (2024-....)**

- 16-DPT-001 kodlu Kalkınma Bakanlığı Projesi kapsamında Biyokimyager olarak
- Elektrokimyasal ve optik sensör sistemlerinin geliştirilmesi
- Proje yazımı, proje yürütülmesi ve raporlanması
- Malzeme alım işlemleri

### YAYINLAR:

- Harmanci, D., Hanoglu S.B., Kayali, G. A., Durgunlu, E., **Ucar, N.**, Cicek, C., Timur, S. (2023). Post-Vaccination Detection of SARS-CoV-2 Antibody Response with Magnetic Nanoparticle-Based Electrochemical Biosensor System, *Biosensors* 13(9), 851. <https://www.mdpi.com/2079-6374/13/9/851>.
- Hanoglu S.B, Harmanci D., **Ucar N.**, Evran S., Timur S. (2023). Recent Approaches in Magnetic Nanoparticle-Based Biosensors of miRNA Detection, *Magnetochemistry* 9 (1), 23. <https://www.mdpi.com/2312-7481/9/1/23>

### KİTAP BÖLÜMLERİ

- Hanoglu S.B., **Ucar N.**, Timur S. (2024) Other Analytical Methods for the Detection of Biological and Chemical Threats (pp. 289-330.) *Plasmonic Nanosensors for Biological and Chemical Threats*, Taylor

& Francis Group, CRC Press.  
<https://doi.org/10.1201/9781003459316>.

### **PROJELER**

- 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı (2021/1)

### **BAŞARILAR VE BURSLAR**

- 2210-D Yurt İçi Sanayiye Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı 16-
- DPT-001 kodlu Kalkınma Bakanlığı Projesi- Çalışan Araştırmacı (Ekim,2024- ...)

### **YABANCI DİLLER**

**Yabancı Dil:** İngilizce

### **BECERİLER**

**Bilgisayar Bilgileri:** Microsoft Office Programları, Prisma, Origin Lab