



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



AÇIL HOMOSERİN LAKTON MOLEKÜLLERİNİN ELEKTROKİMYASAL METOD İLE ALGILANMASI

Şevval Maral ÖZCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. N. Cenk SESAL

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Atıf KOCA

İSTANBUL, 2017



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



AÇIL HOMOSERİN LAKTON MOLEKÜLLERİNİN ELEKTROKİMYASAL METOD İLE ALGILANMASI

Şevval Maral ÖZCAN

520114010

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. N. Cenk SESAL

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Atıf KOCA

İSTANBUL, 2017



MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES
IN PURE AND APPLIED SCIENCES



DETECTION OF ACYL HOMOSERINE LACTONE MOLECULES VIA ELECTROCHEMICAL METHOD

Şevval Maral ÖZCAN

520114010

MASTER THESIS

Department of Biology
Biology Program

Thesis Supervisor

Assist. Prof. Dr. N. Cenk SESAL

Thesis CO- Supervisor

Prof. Dr. Atıf KOCA

ISTANBUL, 2017

**MARMARA ÜNİVERSİTESİ FEN
BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Şevval Maral ÖZCAN'ın "Açıl Homoserin Lakton Moleküllerinin Elektrokimyasal Metod ile Algılanması" başlıklı tez çalışması, 6 Şubat 2017 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Doç.Dr. N. Cenk SESAL (Danışman)

Marmara Üniversitesi (İMZA)

Prof.Dr.Atıf KOCA (İkinci Danışman)

Marmara Üniversitesi (İMZA)

Prof.Dr.Meral BİRBİR (Üye)

Marmara Üniversitesi (İMZA)

Doç.Dr.Filiz VARDAR (Üye)

Marmara Üniversitesi (İMZA)

Yrd.Doç.Dr.İskender KARALTI (Üye)

Marmara Üniversitesi (İMZA)

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20.02.2017 tarih ve 2017/05-02 sayılı kararı ile Şevval Maral ÖZCAN'ın Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof.Dr. Uğur YAHŞİ



TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGMENT)

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, destek olmak için her zaman elinden geleni yapan, yardımları sayesinde çok şey öğrendiğim, değerli danışman hocam Doç. Dr. Cenk SESAL' a teşekkür ederim.

Bu multidisipliner çalışmayı yapmamı sağlayan, beni elektrokimya ile tanıştıran ve bu alanda bilgi edinmemi sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Atıf KOCA' ya çok teşekkür ederim.

Üniversite eğitimim süresince bana her zaman örnek olan ve çalışmalarına destek veren, Prof. Dr. Meral BİRBİR, Doç. Dr. Filiz VARDAR, Dr. Pınar ÇAĞLAYAN ve Dr. Efe Baturhan ORMAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım için gerekli ortamı sağlayan Marmara Üniversitesi Atmosferik Fizik Laboratuvarına, Elektrokimyasal Teknolojiler Laboratuvarına ve Doç. Dr. Bülent Oktay AKKOYUNLU'ya teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamda kullandığım ftalosiyanınleri sentezleyen değerli hocalarım Prof. Dr. M. Kasım ŞENER, Doç. Dr. Zekeriya BIYIKLIOĞLU ve Doç. Dr. Hatice DİNÇER'e katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, dostluklarını ve yardımlarını asla esirgemeyen Ezgi UÇARKUŞ, Nazlıhan YILDIRIM, Büşranur TARHAN, Duygu AKYÜZ, Barış GÖKALSIN, Ümit Ergin ÖZEN, Orçun TOKSÖZ, Birkan AÇIKGÖZ, Özge KEKEÇ Busecan AKSOYDAN, Buse BERBER'e ve Didem BERBER'e teşekkür ederim.

Bu tez kapsamındaki çalışmalara FEN-C-YLP 250416-0186 no'lu proje ile destek olan BAPKO'ya ve 2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı desteğinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayattaki en değerli varlıklarım Annem, Anneannem, Teyzem ve Babama bütün hayatım boyunca hem maddi hem de manevi anlamda her zaman arkamda durdukları, beni hiç yalnız bırakmadıkları için çok teşekkür ederim.

Ayrıca benden sevgi ve dostluklarını esirgemeyen manevi destek sağlayan yakın arkadaşlarıma da her zaman yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Şubat / 2017

Ş. Maral ÖZCAN

İÇİNDEKİLER	SAYFA
TEŞEKKÜRLER	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SEMBOLLER	vi
KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Salt Çoğunluk Algılama (Quorum Sensing-QS) Mekanizması	2
1.2. Çeşitli Açıl Homoserin Lakton (AHL) Molekülleri ve Özellikleri	4
1.2.1. 3 oxo C ₁₂ HSL molekülü	5
1.2.2. C ₄ HSL ve C ₆ HSL molekülü	6
1.2.3. C ₈ HSL molekülü	7
1.2.4. AHL saptama yöntemleri	7
1.3. Biyosensörler	8
1.4. Elektrokimyasal Biyosensörler	10
1.5. Amperometrik ve Potansiyometrik Yöntemler	11
1.5.1. Amperometrik yöntemler	11
1.5.2. Potansiyometrik yöntemler	12
1.5.2.1. Dönüşümlü voltametri tekniği (CV)	13
1.5.2.2. Kare dalga voltametri tekniği (SWV)	16
1.5.2.3. Kronoamperometre tekniği (CA)	16
1.5.2.4. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi tekniği (EIS)	17
1.6. Elektrokimyasal Polimerizasyon (Elektropolimerizasyon)	18
1.7. Metaloftalosiyanınlar	19
1.7.1. 2,2,6,6 Tetrametil-1-piperidiniloksi çinko(II) ftalosiyanın (TEMPO-ZnPc)	20
1.7.2. Non periferel mangan(III) ftalosiyanın (n-MnPc)	21
1.7.3. Titanyum Ftalosiyanın (TiPc)	22
1.7.4. 4-azidoanilin Mangan ftalosiyanın (PANİ-N ₃ -MnPc)	22
2. MATERYAL VE YÖNTEM	25
2.1. MATERYAL	25
2.1.1. Kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar	25
2.1.2. Kullanılan cihazlar	26
2.1.3. Hazırlanan kimyasallar	26
2.2. YÖNTEM	27
2.2.1. Camsı karbon elektrotların temizlenmesi	27
2.2.2. Çalışma elektrotlarının farklı metaloftalosiyanınlarla modifiye edilmesi	27
2.2.2.1. Çalışma elektrotlarının TEMPO-ZnPc ile modifiye edilmesi	27
2.2.2.2. Çalışma elektrotlarının n- MnPc ile modifiye edilmesi	28
2.2.2.3. Çalışma elektrotlarının PANİ-N ₃ -MnPc ile modifiye edilmesi	29

2.2.2.4. Çalışma elektrotlarının TiPc ile modifiye edilmesi	29
2.2.3. AHL moleküllerinin seyreltilmesi	30
2.2.4. AHL moleküllerinin elektrot sisteminde sensör testi	31
2.2.4.1. AHL moleküllerinin TEMPO-ZnPc modifiye elektrotla sensör testi	31
2.2.4.2. AHL moleküllerinin n-MnPc modifiye elektrotla sensör testi	33
2.2.4.3. AHL moleküllerinin PANİ-N ₃ -MnPc modifiye elektrotla sensör testi	33
2.2.4.4. AHL moleküllerinin TiPc modifiye elektrotla sensör testi	34
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	35
3.1. TEMPO-ZnPc, n-MnPc, PANİ-N ₃ -MnPc komplekslerinin elektrokimyasal davranışları	35
3.1.1. TEMPO-ZnPc kaplı elektrotun elektrokimyasal davranışı	35
3.1.2. n-MnPc kaplı elektrotun elektrokimyasal davranışı ve GCE üzerine elektropolimerizasyonu	37
3.1.3. PANİ-N ₃ -MnPc'nin ITO üzerine elektropolimerizasyonu	39
3.2. Modifiye edilen elektrotlar ile AHL moleküllerinin titrasyonu	41
3.2.1. TEMPO-ZnPc modifiye elektrotların AHL molekülleri ile titrasyonu	41
3.2.2. TEMPO-ZnPc modifiye elektrotla süt içindeki 3 oxo C ₁₂ HSL molekülünün algılanması	47
3.2.3. n-MnPc ve TiPc modifiye elektrotların AHL molekülleri ile titrasyonu	49
3.2.4. PANİ-N ₃ -MnPc modifiye elektrotların AHL molekülleri ile titrasyonu	50
4. SONUÇLAR	57
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	67

ÖZET

AÇIL HOMOSERİN LAKTON MOLEKÜLLERİNİN ELEKTROKİMYASAL METOD İLE ALGILANMASI

Son yıllarda bakteriler tarafından kazanılan antibiyotik direnci, çeşitli hastalıkların tedavisinde etkinliği azaltmakta, tedavi süresini uzatarak maddi ve manevi kayıplara sebep olmaktadır. Araştırmalar antibiyotik direncinin oluşmasında en önemli faktörlerden birinin biyofilm tabakası olduğunu göstermiştir. Bakterilerde antibiyotiğe dirençli biyofilm formunun oluşumunda salt çoğunluğu algılama (Quorum Sensing-QS) sistemi rol oynamaktadır. QS, mikroorganizmalar arasında hücreler arası iletişimi sağlayan haberleşme sistemidir. Gram negatif bakterilerin kullandığı QS sinyal molekülleri Açıl Homoserin Laktonlar (AHL)'dır. Bakterilerin sebep olduğu biyofilmin, virülans faktör üretiminin ve sporulasyonun önceden tespit edilebilmesi için AHL moleküllerinin algılanmasına yönelik hızlı, pratik, ekonomik teknikler geliştirme ihtiyacı doğmuştur. Bu çalışmada AHL'lerin tespitini sağlayacak elektrokimyasal biyosensör yapımı amaçlanmıştır. Belirtilen amaç doğrultusunda algılayıcı olarak elektrokatalitik özelliğe sahip olan metaloftalosiyanınlerden TEMPO-ZnPc, non periferale MnPc, TiPc ve PANİ-N₃-MnPc kullanılmıştır. Kurulan elektrokimyasal sistemde, elektrotların metaloftalosiyanınlerle modifikasyonunda klik elektrokimya, elektropolimerizasyon ve damlatıp kaplama teknikleri kullanılmıştır. Modifiye edilen elektrotlarla çeşitli AHL moleküllerinin titrasyonu sonucu elektrokimyasal sistemdeki değişimler incelenmiştir. Elektrokimyasal analizler sonucunda TiPc ve n-MnPc modifiye elektrotlarla AHL moleküllerinin titrasyonu sonucunda elektrokimyasal sistemde önemli bir değişim gözlenmemiştir. TEMPO-ZnPc modifiye elektrotunun 3 oxo C₁₂ HSL'yi 2.32x10⁻⁶ - 39.90x10⁻⁶ mol dm⁻³ konsantrasyon aralığında, PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotunun ise 12.50x10⁻⁶ - 300.00x10⁻⁶ mol dm⁻³ konsantrasyon aralığında tespit ettiği belirlenmiştir. PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotla C₈ HSL ve C₁₀ HSL molekülleri için de elektrokimyasal sistemde değişimler gözlenmiştir. Elde edilen veriler AHL'lerin metaloftalosiyanınler kullanılarak elektrokimyasal sistemde hızlı bir şekilde saptanabileceğini göstermiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçların, QS kaynaklı biyofilm, virülans, sporulasyon gibi biyolojik aktivitelerin saptanma çalışmalarına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

ABSTRACT

DETECTION OF ACYL HOMOSERINE LACTONE MOLECULES VIA ELECTROCHEMICAL METHOD

In recent years, antibiotic resistance acquired by bacteria, reduces effectiveness in the treatment of various diseases and prolongs the duration of treatment, causing material and spiritual loss. Research has shown that one of the most important factors in the formation of antibiotic resistance is biofilm forms. Quorum sensing (QS) system plays a role in the formation of the antibiotic-resistant biofilm form in bacteria. QS is a communication system that provides intercellular communication among microorganisms. The QS signaling molecules used by Gram negative bacteria are Acyl Homoserine Lactones (AHL). The need for rapid, practical, economical techniques for the detection of AHL molecules has led to the pre-detection of harmful activities such as biofilm, virulence factor production and sporulation caused by bacteria. In this study, it is aimed to make an electrochemical biosensor to detect AHLs. From metallophthalocyanines which have electrocatalytic properties, TEMPO-ZnPc, nonperipheral MnPc, TiPc and PANI-N₃-MnPc were used as a sensor for the purpose stated. In the established electrochemical system, click electrochemistry, electropolymerization and dip coating techniques have been used in the modification of electrodes with metallophthalocyanines. The changes in the electrochemical system were investigated resulting from the titration of various AHL molecules with modified electrodes. As a result of electrochemical analysis, no significant change was observed in the electrochemical system as a result of titration of AHL molecules with TiPc and n-MnPc modified electrodes. In the TEMPO-ZnPc modification electrode, the concentration of 3-oxo-C₁₂-HSL was in the range of 2.32×10^{-6} to 39.90×10^{-6} mol dm⁻³ and in the PANI-N₃-MnPc modification electrode in the concentration range of 12.50×10^{-6} - 300.00×10^{-6} moles dm⁻³. Changes were also observed in the electrochemical system for the C₈-HSL and C₁₀-HSL molecules with the PANI-N₃-MnPc modified electrode. The obtained data show that AHLs can be detected rapidly in the electrochemical system using metallophthalocyanines. It is expected that the results obtained from the study can be helpful for the detection of QS related biological activities such as biofilms, virulence and sporulation.

SEMBOLLER / SYMBOLS

Pc	: Ftalosiyanin
TiPc	: Titanyum ftalosiyanin
MnPc	: Mangan ftalosiyanin
ml	: Mililitre
l	: Litre
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
mg	: Miligram
nm	: Nanometre
mm	: Milimetre
cm	:Santimetre
Ag⁺¹	: Gümüş iyonu
TiO₂	: Titanyum dioksit
dm³	: Desimetreküp
ZnPc	: Çinko (II) ftalosiyanin
TEMPO	:2,2,6,6- tetrametil-1 piperidiniloksi
AgCl	: Gümüş klorür
Pt	: Platin
LiClO₄	: Lityum perklorat
H₂O	: Su
3 oxo C₁₂ HSL	: N-(3oxo-dodecanoyl)-L- Homoserin Lakton
C₄ HSL	: N-Bütiril-DL-Homoserin Lakton

C₆ HSL	: N-Hekzanoil-DL- Homoserin Lakton
C₈ HSL	: N-Oktanoil-DL- Homoserin Lakton
C₁₀ HSL	: N-Dekanoil-DL- Homoserin Lakton
E_{pa}	: Anodik pik potansiyeli (mV)
E_{pk}	: Katodik pik potansiyeli (mV)
I_{pa}	: Anodik pik akımı (μA)
I_{pk}	: Katodik pik akımı (μA)
ΔE_p	: Pik potansiyeli (mV)
I	: Akım (μA)
A	: Elektrot alanı (cm ²)
D	: Difüzyon katsayısı
F	: Faraday sabiti
n	: Redoks sırasında transfer edilen elektron sayısı
T	: Zaman
V	: Potansiyel tarama oranı (V/s)
Z	: Empedans
f	: Frekans
C	: Konsantrasyon
m	: Eğim
M	: Metal

KISALTMALAR / ABBREVIATIONS

AHL	: Açıl Homoserin Lakton
CA	: Kronoamperometri
CEC	: Klik elektrokimya
CV	: Dönüşümlü Voltametri
DCM	: Diklorometan
DMSO	: Dimetilsülfoksit
E	: Potansiyel
EIS	: Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
GCE	: Camsı karbon elektrot
N₃	: Azit grubu
ITO	: İndiyum kalay oksit
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
MPc	: Metaloftalosiyenin
SWV	: Kare dalga voltametrisi
SCE	:Doymuş kalomel elektrot
n-MnPc	: Non-periferal tetra substitüent Mangan (III) ftalosiyenin
TBAP	: Tetrabütilamonyum perklorat
PANİ	: Polianilin
PANİ-N₃	: 4-azidoanilin
QS	: Salt çoğunluk algılama (Quorum sensing)
AI	: Otoindüktör
CDC	: Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi
Gfp	:Yeşil floresan protein

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

SAYFA

Şekil 1.1. Bir biyosensörün şematik gösterimi	9
Şekil 1.2. Yarı tersinir bir reaksiyonun dönüşümlü voltamogramı (A), Farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogram (B).	14
Şekil 1.3. TEMPO-ZnPc molekül yapısı: ZnPc(7), TEMPO grubu (8), Nitroksil grubu (9)	21
Şekil 1.4. n- MnPc molekül yapısı	22
Şekil 1.5. TiPc molekül yapısı; M:TiO	22
Şekil 1.6. MnPc molekül yapısı	23
Şekil 2.1. TEMPO-ZnPc toz hali (a), DMSO’da çözülen TEMPO-ZnPc molekülü (b), TEMPO-ZnPc ile modifiye edilen camsı karbon elektrot (c).	28
Şekil 2.2. ITO elektrotun hazırlanan PANİ çözeltisi içinde elektropolimerizasyonu (a) ve PANİ film kaplı ITO (b), PANİ film kaplı ITO’ların MnPc çözeltisi içinde klik elektrokimya yöntemiyle kaplanması (c), İTO/PANİ-N ₃ -MnPc modifiye elektrot (d).	29
Şekil 2.3. Farklı AHL molekülleri (A), Farklı AHL moleküllerinin %10’luk DMSO ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda stok solüsyonlarının hazırlanması (B).	30
Şekil 2.4. Sensör testlerinin yapıldığı elektrokimyasal sistem; Bilgisayar (1), Potansiyostat (2), Pt tel (3), TEMPO-ZnPc/GCE modifiye çalışma elektrotu (4), Ag/AgCl referans elektrot (5), elektrokimyasal hücre (6), Mikropipet (7).	31
Şekil 3.1. TEMPO-ZnPc’nin DMSO/TBAP ortamı içinde GC elektrotta A) Değişik tarama hızlarında CV döngüleri, B) 0.100 V s ⁻¹ ‘de SWV ölçümü.	36
Şekil 3.2. GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrot ve boş elektrotun 0.01 mol dm ⁻³ Ferrosiyanin çözeltisi içinde EIS ölçüm grafiği.	37
Şekil 3.3. n-MnPc’nin DCM/TBAP elektrolit ortamında GCE üzerinde N ₂ altında farklı tarama hızlarında CV ölçüm grafiği.	38
Şekil 3.4. n-MnPc’nin 100 mV s ⁻¹ ‘de GC elektrotta DCM/TBAP ortamında tekrar eden CV döngüleri.	39
Şekil 3.5. 4-azidoanilin hidroklorit’in 100 mV s ⁻¹ ’de ITO üzerine DMSO/TBAP ortamında elektropolimerizasyonu.	40
Şekil 3.6. GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrot ve boş elektrotun pH LiClO ₄ /H ₂ O içinde CV ölçüm grafiği.	41
Şekil 3.7. GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrotun farklı konsantrasyonlarda 3 oxo C ₁₂ HSL içeren LiClO ₄ /H ₂ O içinde SWV ölçüm grafiği.	42

Şekil 3.8. Kalibrasyon grafiği; SWV pik akımı ile LiClO ₄ /H ₂ O elektrolitteki 3 oxo C ₁₂ HSL konsantrasyonu arasındaki ilişki (a), Akım konsantrasyon grafiği ve grafiğine göre hesaplanan R ² değeri (b).	43
Şekil 3.9. GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrotun farklı konsantrasyonlarda 3 oxo C ₁₂ HSL içeren LiClO ₄ /H ₂ O içinde 100 mVs ⁻¹ tarama hızında kaydedilen CV ölçümü.	44
Şekil 3.10. GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrotun farklı konsantrasyonlarda C ₄ HSL (a) ve C ₆ HSL (b) içeren LiClO ₄ /H ₂ O içinde SWV ölçüm grafiği, GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrotun farklı konsantrasyonlarda C ₈ HSL (c) ve C ₁₀ HSL (d) içeren LiClO ₄ /H ₂ O içinde SWV ölçüm grafiği.	46
Şekil 3.11. GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrotun farklı konsantrasyonlarda 3 oxo C ₁₂ HSL içeren süt örneği içinde SWV ölçüm grafiği.	48
Şekil 3.12. Kalibrasyon grafiği; SWV pik akımı ile süt örneği içindeki 3 oxo C ₁₂ HSL konsantrasyonu arasındaki ilişki (a), Akım konsantrasyon grafiği ve grafiğine göre hesaplanan R ² değeri (b).	48
Şekil 3.13. GCE/n-MnPc modifiye elektrotun 0,1 M PBS içinde farklı konsantrasyonlardaki 3 oxo C ₁₂ HSL (a) ve C ₄ HSL (b) ile titrasyonu sırasında kaydedilen SWV ölçüm grafiği.	49
Şekil 3.14. GCE/TiPc modifiye elektrotun farklı konsantrasyonlarda 3 oxo C ₁₂ HSL ve C ₄ HSL içeren LiClO ₄ /H ₂ O içinde SWV ölçüm grafiği.	50
Şekil 3.15. ITO/PANİ-N ₃ -MnPc modifiye elektrotun farklı konsantrasyonlarda C ₁₀ HSL içeren LiClO ₄ /H ₂ O içinde SWV ölçüm grafiği (a), Kalibrasyon grafiği; SWV pik akımı ile LiClO ₄ /H ₂ O elektrolitteki C ₁₀ HSL konsantrasyonu arasındaki ilişki (b), Kalibrasyon grafiğine göre hesaplanan R ² ve eğim değerleri (c).	52
Şekil 3.16. ITO/PANİ-N ₃ -MnPc modifiye elektrotun farklı konsantrasyonlarda C ₄ HSL içeren LiClO ₄ /H ₂ O içinde SWV ölçüm grafiği (a), farklı konsantrasyonlarda C ₈ HSL içeren LiClO ₄ /H ₂ O içinde SWV ölçüm grafiği (b), farklı konsantrasyonlarda 3 oxo C ₁₂ HSL içeren LiClO ₄ /H ₂ O içinde SWV ölçüm grafiği (c).	54

TABLO LİSTESİ	SAYFA
Tablo 1.1. Çeşitli AHL molekülleri ve üreten bakteri türleri	5
Tablo 1.2 QS sinyal moleküllerini saptamada kullanılan bakteriyel hücre bazlı biyosensörler ve kullanılan reporter proteinler	8
Tablo 3.1 GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrot ile çeşitli AHL moleküllerinin titrasyonu sonucu algılanan konsantrasyon aralıkları ve LOD değerleri.	47
Tablo 3.2 GCE/TEMPO-ZnPc ve ITO/PANİ-N ₃ -MnPc modifiye elektrotlarla çeşitli AHL moleküllerinin titrasyonu sonucu algılanan konsantrasyon aralıkları ve LOD değerleri.	55

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ / INTRODUCTION

Geçmişten günümüze bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde antibiyotik ve diğer kemoterapötiklerin kullanıldığı bilinmektedir. Bununla beraber antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımları bakterilerin bu ajanlara karşı direnç geliştirmesine sebep olmaktadır. Antibiyotik direnci bir mikroorganizmanın antibiyotiklerin etkilerine karşı durabilme yeteneğidir. Bakterilerde antibiyotik direncinin gelişmesiyle enfeksiyonların tedavisinde antibiyotiklerin etkinliğini kaybetmesi ve ikincil enfeksiyonların ortaya çıkması gibi olumsuzluklar meydana gelmektedir. Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi'ne (CDC) göre Amerika'da her yıl yaklaşık 2.000.000 insan antibiyotik dirençli patojen bakterilerden dolayı ciddi enfeksiyonlara yakalanmaktadır. Antibiyotik dirençli enfeksiyonlar sonucunda sadece Amerika'da yılda yaklaşık 23.000 insan hayatını kaybetmektedir [1]. Yapılan araştırmalar bakterilerin bu antibiyotik direncini kazanmasında biyofilm oluşturma, plazmit aktarımı, bakteri hücre duvarı adaptasyonları gibi etkenlerin sebep olduğunu göstermiştir [2]. Antibiyotik direncinin oluşmasına neden olan etkenlerden biyofilm tabakasının aynı zamanda mikroorganizmaların kendilerini dezenfektanlar, ultraviyole ışınları, pH, sıcaklık, enzimler gibi tehditlerden korunmasını sağladığı da literatürde yer almaktadır. Biyofilm tabakası insanlarda enfeksiyonların sürekliliğinde ve hastalıkların bulaşıcılığında önemli rol oynamaktadır [3,4]. Araştırmalar sonucunda bakterilerde antibiyotik direncini sağlayan biyofilm tabakasının meydana gelmesinde en önemli etkenlerden birinin salt çoğunluğu algılama (Quorum sensing -QS,) sistemi regülasyonu olduğu ortaya çıkmıştır [5]. QS regülasyonun mikroorganizmalar arasında salgılanan küçük sinyal molekülleri ile sağlandığı bilinmektedir [6]. Açıl homoserin laktonlar (AHL) Gram negatif bakterilerin kendi aralarında iletişim için kullandığı QS sinyal molekülleridir. AHL sinyal moleküllerinin miktarının artmasıyla QS sistemi regülasyonunun arttığı, buna bağlı olarak çeşitli virülans faktörlerin salgılanması, biyofilm formasyonu, konak canlı üzerinde patojenite oluşturma gibi zararlı bakteriyel faaliyetlerin başlatıldığı bilinmektedir. QS regülasyonu sayesinde bakteriler tarafından kazanılan bu özellikler, bakteri kaynaklı hastalıkların tedavi süresini uzatmakta, kullanılan ilaçların etkisini azaltmaktadır. Bu durum hastaların tedavi süresince maddi ve manevi kayıplara uğramasına sebep olmaktadır. Zararlı bakteriyel faaliyetleri önleme

yolunda ilk aşama olarak, AHL moleküllerinin varlığını tespit edecek yöntemler geliştirme ihtiyacı ortaya çıkmaktadır.

Günümüzde bu molekülleri tespit etme ve miktarını belirleme aşamasında biyosensörler devreye girmektedir. Bu amaca uygun bir biyosensörle, AHL moleküllerinin salgılanma aşamasında tespitinin yapılması mümkün olacak ve bakteri kaynaklı zararlı fizyolojik faaliyetlere karşı gerekli müdahalenin erken safhada yapılabilmesi için yol açılacaktır. Günümüzde AHL moleküllerinin algılanması için yapılan optik biyosensör çalışmaları, bakteri kültürlerinin, floresan boyaların, enzimlerin ve substratların kullanımı gibi zaman alan ve maliyetli işlemleri içermektedir. Elektrokimyasal biyosensörler ise minyatürleşmeye uygun, eş zamanlı sonuç verme ve yüksek hassasiyet gösterme gibi özelliklerinden dolayı son yıllarda öne çıkmaktadır. Elektrokimyasal yöntemler redoks aktif bileşikler kullanılarak elektrot sisteminde moleküllerin doğrudan veya dolaylı olarak saptanmasına dayanmaktadır [7]. Metalofalosiyeninler, sensör ve biyosensör üretiminde sıklıkla kullanılan ve çoğu bileşik için önemli katalitik aktivite gösteren komplekslerdir. Elektrot modifikasyon teknikleri elektrotun elektrokataliz özelliğini etkilemektedir.

Bu bilgiler ışığında AHL moleküllerini saptamaya yönelik yapılan elektrokimyasal biyosensör çalışmasıyla QS mekanizmasına bağlı olarak ortaya çıkan virülans faktörler salgılama, antibiyotiğe dirençli biyofilm tabakası meydana getirme gibi zararlı fizyolojik faaliyetlerin henüz oluşum aşamasında iken tespit edilebilmesinin ileride bu alanda yapılacak çalışmalara ışık tutacağı öngörülmektedir.

1.1. Salt Çoğunluk Algılama (Quorum Sensing-QS) Mekanizması

Quorum sensing (QS), mikroorganizmalar arasında hücreler arası iletişimi sağlayan haberleşme sistemi olarak bilinmektedir [8,9]. Qs sistemi ilk olarak 1973 yılında biyoluminesans deniz bakterisi *Vibrio fischeri*'de keşfedilmiştir. Bu sistemle ilgili çalışmaların artmasıyla birlikte gram negatif ve gram pozitif bakterilerin kendi içlerinde, birbirleri ve konak canlı arasında farklı sinyal molekülleriyle sağlandığı belirlenmiştir [10-12].

Bir ortamda bulunan bakteri miktarı çoğaldıkça ürettikleri sinyal molekülleri de artmaktadır. Bu üretilen sinyal moleküllerinin yoğunluğu belli bir eşik değerini aştığı

anda bakterilerin gen ekspresyonu uygun olarak düzenlenmekte ve bakteriler biyofilm oluşturarak bulunduğu konak canlıda patojenite göstermektedir [8,13]. Aynı zamanda QS mekanizması ile oluşturulan biyofilm formunun, mikroorganizmaların kendilerini dezenfektanlar, ultraviyole ışınlar, pH, sıcaklık, enzimler ve antibiyotikler gibi tehditlere karşı korumasını da sağladığı literatürde bilinmektedir [14].

Bakterilerin salgılanan sinyal moleküllerine cevap verebilmeleri için QS sistemi, tanıma/düzenleme proteinlerinden oluşmaktadır. Bu ikili sistem sinyal moleküllerine bağlanmayı ve gen ekspresyonlarının düzenlenmesini, bununla beraber sinyal moleküllerinin sentezini de gerçekleştirmektedir. İkili sistem temelde efektör ve reseptör olmak üzere iki bileşenden oluşan bir sistemdir [15]. Bu iki bileşen otoindükleyici proteinlerin saptanması için üretilen proteinlerin fosforilasyon ve defosforilasyon basamaklarının düzenlenmesine dayalıdır. QS molekülleri membranı geçirgen hale getirir ve hem intraselüler hem de ekstraselüler ortamı indüklerler [16,17].

QS sisteminin sağlanmasında Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde farklı haberleşme yolları ve sinyal molekülleri görev yapmaktadır. Bununla birlikte farklı QS sistemleri bütün bakterilerde benzer görevlerin yapılmasından sorumlu gen ekspresyonlarını düzenlemektedir. *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens* gibi Gram negatif bakteriler kendi aralarında iletişim için Açıl homoserin lakton (AHL) denilen sinyal moleküllerini üretirken, *Streptococcus pneumoniae*, *Chromobacterium violaceum* gibi Gram pozitif bakteriler iletişim için oto indükleyici peptidleri (AI-2) üretmektedir [18,19]. Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler türler arası iletişim için sinyal molekülü olarak otoindükleyici-2'leri kullanmaktadırlar [20] [21]. Ayrıca *Pseudomonas* kinolon sinyal moleküllerinin (PQS) keşfiyle QS sinyal moleküllerinin yalnızca bu gruplarla sınırlanmadığı görülmüştür. AHL sinyal moleküllerinin miktarının artmasıyla QS sistemi regülasyonunun arttığı buna bağlı olarak zararlı bakteriyel faaliyetlerin başlatıldığı bilinmektedir. Gram negatif bakterilerin ürettikleri AHL sinyal molekülleri belli bir yoğunluğa ulaştığında AHL' ler reseptör proteinlere bağlanmakta ve bakterilere ait QS genlerinin ekspresyonları düzenlenmektedir[9,22,23].

QS regülasyonu sayesinde bakteriler tarafından kazanılan virülans faktör salgılama, patojenite meydana getirme ve antibiyotiğe dirençli biyofilm oluşturma gibi

zararlı özellikler, bakteri kaynaklı hastalıkların tedavi süresini uzatmakta, kullanılan ilaçların etkisini azaltmaktadır [24,3,1]. Bunun yanı sıra QS molekülleri üreten bakterilerin gıdalar üzerinde biyofilm oluşturarak ve çeşitli toksinler salgılayarak besin zehirlenmelerine sebep olduğu literatürde yer almaktadır [25] . Belirtilen sebeplerden dolayı bakteriyel hastalıkların kontrolünde ve mekanizmalarının anlaşılmasında QS moleküllerinin algılanması büyük önem teşkil etmektedir.

1.2. Çeşitli Açıl Homoserin Lakton (AHL) Molekülleri ve Özellikleri

AHL'ler içerdikleri karbon zincirine göre uzun ve kısa zincirli AHL'ler olarak iki gruba ayrılmaktadır. 4 ile 8 arası karbon içeren AHL'ler kısa zincirli, 8 ile 14 arasında karbon içeren AHL'ler uzun zincirli olarak bilinmektedir. AHL molekülleri farklı formlarda olmakla beraber oksidasyonu 3. karbon pozisyonundan gerçekleşmektedir. Homoserin lakton halkası tüm AHL moleküllerinde sabittir ve laktone amid bağları ile bağlanır [26]. Bu sinyal molekülleri, bakterilere bulundukları canlı üzerinde elastinaz, ramnolipid, piyosiyenin, çeşitli eksotoksinler gibi çeşitli virülans faktörler salgılama özelliği kazandırmaktadır. Kazandıkları bu özellikler sayesinde bakteriler bulundukları konak canlıda patojenite meydana getirmektedir. Salgılanan virülans faktörlerden elastinazın, damarların yapısında bulunan elastini parçaladığı, ramnolipidin bakterilerin antibiyotiğe dirençli biyofilm formuna dönüşmesine ve motilitelerinin sağlanmasında rol aldığı literatürde yer almaktadır [27]. Başka bir virülans faktör olan piyosiyenin pigmentinin üretimiyle bakteriler, konak canlıda proteolitik aktivite başlamaktadır.

AHL'ler bakteri türlerine özgü spesifik özellik göstermektedir (**Tablo 1.1**). *P. aeruginosa* 3 oxo C₁₂ HSL ve C₄ HSL üretirken, *V. fischeri* 3 oxo C₆ HSL, *A. tumefaciens* 3 oxo C₈ HSL, *Burkholderia spp.* türleri C₈ HSL, *Aeromonas spp.* türleri C₄ HSL ve C₆ HSL üretmektedir. AHL otoindükleyicilerinin türler arası sinyalleri de etkilediği bilinmektedir [28-30].

Tablo 1.1. Çeşitli AHL molekülleri ve üreten bakteri türleri

MOLEKÜL İSMİ	ÜRETEN BAKTERİ
C ₄ HSL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Aeromonas spp.</i>
C ₆ HSL	<i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Aeromonas spp.</i> , <i>Erwinia caratovora</i>
C ₈ HSL	<i>Burkholderia mallei</i> , <i>B. cepacia</i> , <i>Aeromonas spp.</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Serratia marcescens</i>
C ₁₀ HSL	<i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Serratia liquefaciens</i>
3 oxo C ₁₂ HSL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>B. cepacia</i>

1.2.1. 3 oxo C₁₂ HSL molekülü

P. aeruginosa bakterisinin *lasI/lasR* ve *rhlI/rhlR* olmak üzere iki adet QS regülasyon sistemi bulunmaktadır [31,32]. Bakteri popülasyon yoğunluğu eşik değerine ulaştığında *lasI/lasR* sisteminde, *lasI* tarafından 3 oxo C₁₂ HSL sinyal molekülü üretilip *LasR*'ye bağlanmakta ve oluşan yapı birçok genin regülasyonunu sağlamaktadır. *lasI/lasR* sisteminin elastaz ve ekzotoksin A sentezini sağladığı literatürde belirtilmiştir[33]. Başka bir virülans faktör olan piyosiyenin pigmentinin üretimiyle bakteriler tarafından konak canlıda proteolitik aktivitenin başlatıldığı bilinmektedir [34]. Diğer bir virülans faktör olan elastinaz ise akciğerlerin yapısında bulunan elastini parçayarak solunum hastalıklarına sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalar *P. aeruginosa*'nın QS sistemini kullanarak kistik fibroz (CF) hastalarının akciğerlerinde biyofilm oluşumunu ve olgunlaşmasını sağladığını göstermiştir [35]. CF hastalarının akciğerlerinde kolonize halde gözlenen *P. aeruginosa* antibiyotiğe dirençli biyofilm formu oluşturmakta ve tedaviyi zorlaştırmaktadır. CF otozomal ressesif genetik bir hastalıktır ve başta akciğerler olmak üzere pankreas ve bağırsak sistemini de etkilemektedir. Gelişimde yavaşlama, akciğer ve sinüs enfeksiyonları, nefes almada zorluk sık görülen semptomlarındandır. *P. aeruginosa*, AHL molekülü üretimine bağlı olarak üriner sistem enfeksiyonlarına, solunum yolu hastalıklarına, yumuşak doku enfeksiyonlarına, gastrointestinal

enfeksiyonlara ve immün sistemi baskılanmış hastalarda sistemik enfeksiyonlar gibi birçok hastalığa sebep olmaktadır [36-38]. *Burkholderia cepacia* ve *P. aeruginosa* bakterilerinin QS regülasyonu sonucu AHL üreterek beraber CF hastalarının akciğerlerinde kolonize olduğu literatürde yer almaktadır [39].

Ayrıca *P. aeruginosa* varlığında *S. aureus* gibi Gram pozitif bakterilerle hücre-hücre iletişimi sağlandığı ve buna bağlı olarak yaraların iyileşme zamanının uzadığı bilinmektedir. Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi'ne (CDC) göre ABD'de her yıl yaklaşık 51.000 *P. aeruginosa* enfeksiyonu gerçekleşmektedir. *P. aeruginosa*'nın geliştirdiği antibiyotik direnci ile hastanelerde tedavi görmekte olan hastaların tedavi süreçlerinin uzamasına sebep olduğu literatürde yer almaktadır [40][41].

1.2.2. C₄ HSL ve C₆ HSL molekülleri

Aeromonas türlerinde de çeşitli virülans faktörlerin salgılanmasında ve biyofilm oluşumunda QS sisteminin rol aldığı bilinmektedir. *A. hydrophila* ve *A. salmonicida* türleri AhvR/AsaR QS sistemine sahip olup çeşitli AHL molekülleri salgılamaktadır. Gıda kaynaklı *Aeromonas* türlerinin C₄ HSL ve C₆ HSL moleküllerini üreterek biyofilm meydana getirdiği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [22]. *Aeromonas* türlerinin QS regülasyonuna bağlı olarak cam, plastik yüzeyler ve çeşitli sebzeler üzerinde biyofilm oluşturduğu buna bağlı olarak gıdalarda kontaminasyonlara sebep olduğu bilinmektedir [25].

Bir bitki patojeni olan *Erwinia caratovora*'nın *P. aeruginosa*'daki luxI/luxR QS sisteminin homoloğu olan ExpI/ExpR ve CarI/CarR düzenleyici QS sistemlerine sahip olduğu ve bu sistemlerin regülasyonu ile C₆ HSL ürettiği çalışmalar sonucu ortaya çıkmıştır [42]. Bu molekülün konsantrasyonuna bağlı olarak çeşitli virülans faktörlerin ve eksoenzimlerin salgılandığı bilinmektedir. Bu faktörler bitki dokularının bozulmasına sebep olmaktadır.

P. aeruginosa'da rhII/rhlR QS sisteminde rhII tarafından üretilen C₄ HSL rhlR'ye bağlanmakta ve bu yapı ramnolipid sentezini düzenlemektedir. Sentezlenen ramnolipid, bakterilerin antibiyotiğe dirençli biyofilm formuna dönüşmesinde ve motilitelerinin sağlanmasında rol almaktadır.

1.2.3. C₈ HSL molekülü

Burkholderia cepacia'nın salgıladığı C₈ HSL molekülü konsantrasyonuna bağlı olarak *Burkholderia cepacia* kompleksinin (Bcc) oluşturulduğu ve bu kompleksin CF hastalarında hayatı tehdit eden akciğer enfeksiyonlarına sebep olmaktadır [39]. Yapılan araştırmalar bu bakteri türünün CepI/CepR QS sistemine sahip olduğunu, bu sistemin düzenlenmesiyle C₈ HSL üretilerek antibiyotiğe dirençli biyofilm formu oluşturduğunu göstermiştir [43].

Yersinia türlerinin YpsR/I and YtbR/I QS sistemine sahip olup, bu sistemin regülasyonu C₈ HSL üretmektedir. C₈ HSL konsantrasyonuna bağlı olarak *Yersinia* türleri motilite, bakteriyel kümeleşme, biyofilm oluşumu gibi patojenik özellikler kazanılmaktadır.

Klebsiella pneumonia, C₈ HSL üretimiyle immün sistemi baskılanmış hastalarda enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Özellikle yoğun balgam üretimi, inflamasyon, hücre ölümleri ve hemoroji ile seyreden akciğerlerde kalıcı hasarlar yarattığı literatürde yer almaktadır[12]. *Serratia* türünde AHL üretimine bağlı olarak salgılanan virülans faktörler, insanda nozokomiyal ve üriner sistem enfeksiyonlarına sebep olmaktadır. *S. liquefaciens* ve *S. marcescens* türlerinde QS sistemi olarak SpnI/R mekanizması bulunmaktadır. Bu sistemin bakteri popülasyon yoğunluğu eşik değerine ulaştığında C₈ HSL üretiminin başladığı ve bu bakteri türlerinin flagella oluşumunda, bazı biyosümfaktantların ve nükleazların üretiminde rol aldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [44,45].

1.2.4 AHL saptama yöntemleri

Bakteri kaynaklı hastalıklarda QS sisteminin rolünün araştırılması için biyolojik örneklerde QS sinyal moleküllerinin saptanmasına yönelik araştırmalar büyük önem kazanmıştır. Sinyal moleküllerinin saptanması için HPLC, gaz kromatografisi gibi çeşitli fizikokimyasal metotlar tasarlanmıştır [46]. Fakat bu metotlar çok miktarda örneğe ihtiyaç duyulması, fazla vakit alması ve pahalı cihazların kullanımı gibi dezavantajları içermektedir. Bu yöntemler dışında QS sinyal moleküllerini saptamaya yönelik bakteriyel hücre bazlı biyosensörler bulunmaktadır[47]. Bu biyosensörlerde ise düşük saptama

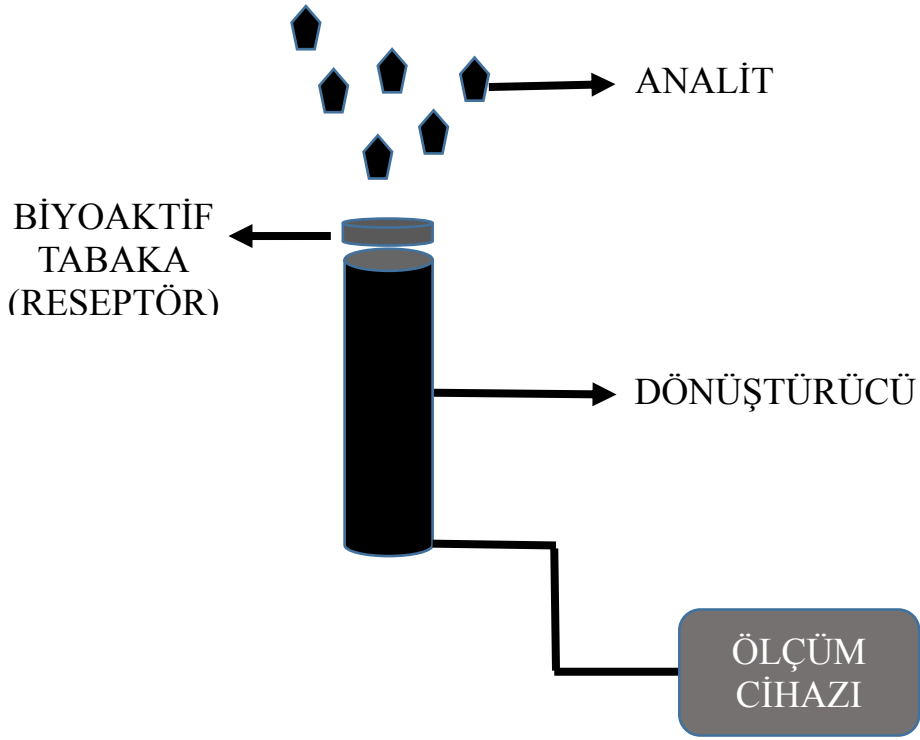
hassasiyeti, ek substrat ilave ihtiyacı, reporter bakteri suşlarının belirli sıcaklıkta yaşama ihtiyacı gibi dezavantajlar bulunmaktadır [30] (**Tablo 1.2**).

Tablo 1.2. QS sinyal moleküllerini saptamada kullanılan bakteriyel hücre bazlı biyosensörler ve kullanılan reporter proteinler [48] .

Gen	Protein	Saptama Metodu	Dezavantajlar
lux	Bakteriyel lusiferaz	Biyolüminesans	Oksijen gerektirmesi, ısı kararsızlığı
luc	lusiferaz	Biyolüminesans	İlave substrat gerektirmesi, Oksijen gerektirmesi
gfp	Yeşil floresan proteini	Floresans	Düşük hassasiyet, geniş absorbsiyon spektrası
lacZ	B-Galaktosidaz enzimi	Biyolüminesans Floresans Kolorimetre Elektrokimya	İlave substrat gerektirmesi

1.3. Biyosensörler

Biyolojik analitleri (algılanacak molekül) algılayan sensörlere “biyosensör” denilmektedir[49]. Biyosensörlerin gelişimi 1962 yılında Leland C. Clark ve Lyons tarafından glukoz saptanması için yapılan enzim elektrot ile başlamıştır [50]. Bu çalışmadan sonra fizik, kimya, biyoloji gibi farklı alanlardaki bilim insanları birlikte çeşitli biyosensörler geliştirmişlerdir. Biyosensörler, genelde analit ile etkileşime giren biyoaktif bir bileşen, bu etkileşim sonucu ortaya çıkan sinyal iletimi ve bu olayların bir ölçüm sistemiyle kombinasyonundan oluşmaktadır (**Şekil 1.1**)



Şekil 1.1. Bir biyosensörün şematik gösterimi

Bir biyosensör reseptör (algılayıcı molekül) ve dönüştürücü olmak üzere iki kısımdan meydana gelmektedir. Reseptör kısmını, seçici olarak analitle etkileşime girebilen moleküller oluştururken, dönüştürücü kısmını reseptörün analiti fark ettiği anda ürettiği kimyasal veya fiziksel sinyalleri sayısal verilere çeviren yapılar oluşturmaktadır. Biyosensör dizaynında kullanılan reseptör molekül analite özgü olmalı ve analit dışındaki başka moleküllere bağlanmamalıdır. Biyosensör yapımında istenilen analite göre enzimler, antibadiler, aptamerler, vb. biyoaktif maddeler reseptör molekül olarak kullanılmaktadır [51]. Reseptör ve analitin ana prensibi ise anahtar-kilit uyumudur. Anahtar-kilit ilişkisi ortamda birbiriyle eşleşebilen iki veya daha fazla moleküler yapının belli bir biyolojik işlevi yerine getirmeleri üzerine düşünülmüş bir ilke olarak tanımlanmaktadır. Bu ilişki Emil Fischer tarafından enzim ve substratlar arasında gerçekleşen spesifite nedeniyle bir kuram olarak tanımlanmıştır. Bu kuramın daha açık bir ifadesini Daniel E. Koshland, “eldiven içindeki el” ya da “Induced-Fit” kuramı ile proteinlerin yapısında bulunan atomların, uzaysal düzenlenmesi olduğunu ortaya koymuştur. Bu kuram, enzim ve substratlar arasındaki uyumun moleküller arasındaki bağlar için de geçerli olduğunu açıklamıştır. Molekül çiftlerinin yapıları, tamlığı,

biçimleri ve elektrik yükleri moleküllerin etkileşimlerinin özelliklerini koşullandırabilmektedir. Nitelikli bir biyosensörde yüksek duyarlılık, yüksek seçicilik, ölçümde kararlılık, belirli bir ölçüm aralığı, uzun ömürlülük ve tekrarlanabilirlik aranan en önemli parametrelerdir [52]. Biyosensörler, dizaynında kullanılan dönüştürücü çeşitlerine göre Optik biyosensörler, Elektrokimyasal biyosensörler, Kütle bazlı biyosensörler ve Kalorimetrik biyosensörler olarak sınıflandırılmaktadır [53,54].

Optik biyosensörlerde, iletici kısım olarak optik lifler üzerine uygun bir biyomolekülün immobilizasyonu yapılmaktadır. Bu biyosensörün ölçüm prensibi fizikokimyasal değişimdir. Işık yansıması veya yayımı sonucunda sinyaller meydana gelir ve oluşan sinyaller optik aygıtlarla ölçülür. Optik biyosensörler; floresan bazlı, biyoluminesans bazlı ve kolorimetrik bazlı olarak üçe ayrılmaktadır.

Kalorimetrik biyosensörler, enzimatik bir reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanılarak substrat konsantrasyonunun belirlendiği biyosensörlerdir. Kütle bazlı biyosensörlerde ise enzim moleküllerine substratların bağlanmasından dolayı meydana gelen kütle değişimlerinin, ölçümü baz alınarak madde miktarına ulaşılmaktadır. Kütle bazlı biyosensörler; Piezoelektrik bazlı ve Manyetik bazlı biyosensörler olarak ikiye ayrılmaktadır.

Elektrokimyasal biyosensörler, moleküllerin elektrokimyasal özelliklerinden yararlanarak yapılan biyosensörlerdir [49]. Bir karşılaştırma elektrotu ve uygun bir çalışma elektrotu ile oluşturulan bir elektrokimyasal sistemde ölçülen gerilim veya akım değerleri yardımıyla analitin nicel tayini yapılmaktadır.

1.4. Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal sensörler, elektrokimyasal bilgileri analitik sinyallere dönüştüren cihazlardır. Elektrokimyasal sensör kimyasal tanıma sistemi ve dönüştürücü olmak üzere iki temel bileşenden meydana gelmektedir. Dönüştürücü kısmı, kimyasal cevapları ölçülebilir sinyallere dönüştürmede kullanılan modern analitik aletlerdir. Bu iki parça çalışma elektrodunu oluşturmaktadır. Referans elektrot ve karşıt elektrot da elektriksel ölçümlerde kullanılmaktadır. Kimyasal tanıma sisteminde, kullanılan analitin biyolojik bir molekül olduğu sensörler “biyosensör” adını almaktadır [55]. Elektrokimyasal

biyosensörler kimyasal ya da biyolojik etkileşim sırasında oluşan elektron transferi veya elektron üretimine yanıt vermektedir.

Biyosensör çalışmalarında, elektrokimyasal yöntem, redoks aktif bileşikler kullanılarak elektrot sisteminde moleküllerin doğrudan veya dolaylı olarak saptanmasına dayanmaktadır [56,57]. Elektrotlarla algılanan bakterilerin metabolik reaksiyonlarındaki değişimler potansiyostat yardımıyla bilgisayar sisteminde sayısal verilere çevrilmiştir. Elektrokimyasal çalışmalarda camı karbon elektrot (GCE), indiyum kalay oksit (ITO) gibi elektrotlar kullanılmaktadır. Elektrokimyasal sensör çalışmalarında karbon elektrot kullanımı mekanik dayanıklılık ve suyun elektrolizinin engellemesi gibi avantajlar sağlamaktadır [58]. Karbon bazlı elektrotlar; camı karbon (GC), polikristal bor kaplı elmas (Pbdd), karbon nanotüpleri gibi çeşitlere ayrılmaktadır.

Elektrokimyasal biyosensör çalışmalarında potansiyel, akım, zaman gibi parametrelerden yararlanır. Bu parametrelerden hangileri kullanılıyorsa elektrokimyasal teknikler ona göre adlandırılmaktadır. Örneğin potansiyel-akım parametresini içeren elektrokimyasal teknik voltametri adını alırken, zaman- akım parametresini içeren teknik kronoamperometri adını almaktadır.

Elektrokimyasal biyosensörler iletim ve ölçüm sistemlerine göre; amperometrik bazlı, potansiyometrik bazlı ve yarı iletken esaslı olmak üzere üçe ayrılmaktadır [58].

1.5. Amperometrik ve Potansiyometrik Yöntemler

Amperometrik ve potansiyometrik yöntemler materyallerin karakteristiklerinin belirlenmesinde, bir analitin kalitatif veya kantitatif analizinde sıklıkla kullanılan elektrokimyasal tekniklerdendir. Akım, voltaj ve zaman gibi parametreler kullanılarak ölçüm esasına dayanmaktadırlar.

1.5.1. Amperometrik yöntemler

Amperometrik bazlı biyosensörlerde belli bir potansiyeldeki akım şiddeti ölçümü esas alınmaktadır. Söz konusu akım yoğunluğu, çalışma elektrotunda yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif maddelerin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Bu akım derişim ile ilişkilendirilmektedir.

1.5.2. Potansiyometrik yöntemler

Potansiyometrik esaslı biyosensörlerde akımın sıfıra yaklaştığı şartlar altında, bir çalışma elektrotu ile referans elektrot arasındaki potansiyel değişimleri ölçülmektedir [59]. Potansiyel değişimi, referans elektrotla kıyasla çalışma elektrotu üzerinde ölçülen yüke bağlı olarak meydana gelir. Çalışma elektrotu potansiyelinin saptanması doğrudan analit konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılır. Potansiyometrik düzenekler basit ve ucuz olmaları sebebiyle biyosensör çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

Voltametri bir çalışma elektrotunun polarize olduğu şartlarda uygulanan potansiyelin bir parametreyi ölçmesinden faydalanarak analit hakkında bilgi elde etmemizi sağlayan elektro analitik metotlara verilen genel isimdir [60]. Analitin akımda meydana getirdiği değişimlerle redoks süreçlerine bağlı oluşan elektron transferleri ölçülmektedir. Voltametri, Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1920 yılında bulunan polarografi tekniğine dayanarak geliştirilmiştir. Voltametri yöntemi elektrokimyasal sistemde, çalışma elektrotuyla referans elektrot arasında farklı potansiyeller uygulanarak ortaya çıkan akımın, çalışma elektrotu ile karşıt elektrotu arasından ölçülmesine dayanır. Üç elektrottan birisi zamanla potansiyeli değiştirilen çalışma elektrotudur. Çalışma elektrotu olarak çeşitli karbon elektrotlar, altın, platin gibi redoks aktif özellik göstermeyen metaller kullanılmaktadır. Bu elektrotların her birinin çalışma potansiyel aralığı farklıdır. Aynı zamanda bu çalışma aralığı deneyde kullanılan çözücü türüne ve farklı pH değerlerine bağlı olarak değişebilmektedir. Elektrokimyasal çalışmalarda su, diklorometan, dimetil sülfoksit, asetonitril gibi çözücüler kullanılmaktadır.

Voltametrinde referans elektrot olarak metal-metal iyonunu içeren tuzdan oluşan elektrotlar kullanılmaktadır. En çok kullanılan referans elektrotlar kalomel elektrot ve Ag/AgCl elektrottur. Referans elektrotlar küçük akımlardan etkilenmezler. Bu elektrottan anodik akım geçirildiğinde metal yükseltgenerek çok miktardaki klorür ile çöker. Böylece elektrot yüzeyinde derişim sabitlenir ve potansiyel akımdan bağımsız hale gelir. Katodik akım geçirildiğinde metal iyonları indirgenmeye başlar, elektrot yüzeyindeki çökelti ayrışır, aynı konsantrasyonda metal iyonu oluşur, sonuçta potansiyel sabit kalır. İki elektrotlu sistemde elektrotun polarize olması için sistemden yüksek akım geçirmek gerekebilir. Yine sistemde kullanılan çözeltinin direnci yüksek olduğundan elektrot

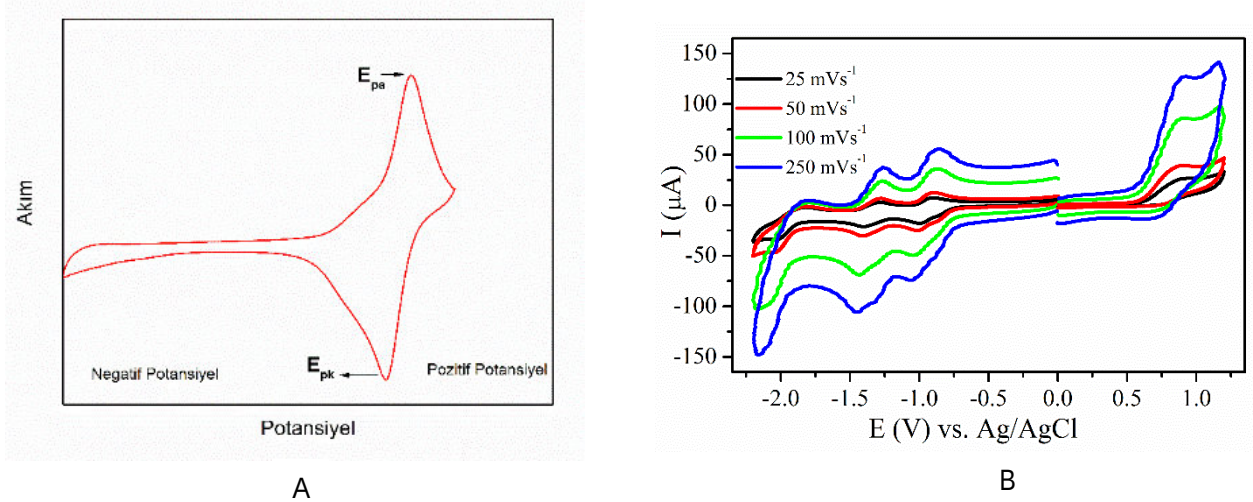
polarize olmayabilir ve belirli bir noktadan sonra pikler kaybolur. Bu sorunları gidermek için sistemde üçüncü bir elektroda ihtiyaç vardır. Akım çalışma elektrotu ile yardımcı elektrot arasından geçirilir, çalışma elektrotunun potansiyeli karşılaştırma elektrotuna karşı sıfır akım altında saptanır. Sistemde yardımcı elektrot olarak tungsten veya platin tel kullanılmaktadır. Bunların yüzey alanı çalışma elektrotu alanının 50 katından fazla olmalıdır.

Voltametrik teknikler farmasötik analizlerde, klinik çalışmalarda, biyolojik örneklerde maddelerin elektrokimyasal özelliğinden yararlanarak kalitatif ve kantitatif analizler yapmamızı sağlayan, spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlere göre çok daha ucuz olması sebebiyle sıklıkla kullanılan tekniklerdir. Voltametrik tekniklerin özellikle kan değerleri, metabolitler ve kimyasal maddelerin ölçümünde çok kullanışlı olduğu bilinmektedir. Voltametrik tekniklerden dönüşümlü voltametri ve kare dalga voltametri kullanılan en önemli tekniklerdir.

1.5.2.1. Dönüşümlü voltametri tekniği (CV)

Dönüşümlü Voltametri (CV) tekniği elektro aktif tür içeren durgun çözeltideki bir elektroda başlangıç potansiyeli (E_1) ile son uygulanan potansiyel (E_2) arasında tarama yapıldıktan sonra aynı veya farklı bir tarama hızıyla tekrar ters yönde tarama yapılması esasına dayanmaktadır. Başlangıç ve bitiş potansiyeli aynı ya da farklı olabilmektedir. İleri ve geri tarama işlemi incelenen elektrokimyasal özelliğe göre istenilen sayıda yapılabilmektedir. Bu teknikte potansiyel zamanla doğrusal olarak değiştirilmektedir. Uygulanan potansiyelin zamanla değişmesi tarama hızı olarak adlandırılmaktadır. Dönüşümlü voltamogramda Anodik pik potansiyeli (E_{pa}), Katodik pik potansiyeli (E_{pk}), Anodik pik akımı (I_{pa}), Katodik pik akımı (I_{pk}) en önemli parametrelerdir (**Şekil 1.2**) Elektrota potansiyel taraması uygulandığında potansiyel, standart indirgenme potansiyeline yaklaşmakta ve elektrot yüzeyindeki madde indirgenmeye başlamaktadır. Potansiyelin negatif değerlere yaklaşması maddenin indirgenme hızının artmasına buna bağlı olarak akım değerinin artmasına sebep olur.

İndirgenme hızı arttıkça çözeltiden elektrot yüzeyine difüzyonla madde geçişi gerçekleşir. Elektrot yüzeyindeki difüzyon tabakası kalınlaştıkça elektrottan akım geçişi zorlaşır ve akım azalır. Potansiyel taramasında, redoks tepkimelerinde meydana gelen akım ölçülüp akım potansiyel eğrisi oluşturulur. Bu eğriye “döngüsel voltamogram” denilmektedir. Dönüşümlü voltametri tekniği adsorbsiyon, difüzyon olaylarının olup olmadığını tespit etmede, elektrot yüzeyinde kimyasal reaksiyon varlığını belirlemede, kimyasal reaksiyon varlığında bu reaksiyonun dönüşümlü olup olmadığını saptamada sıklıkla kullanılmaktadır. Dönüşümlü voltametrede uygulanan ileri ve geri tarama pikleri yardımıyla bileşiklerin redoks özelliklerinin karakterizasyonu ve reaksiyon mekanizmalarının anlaşılması sağlanmaktadır.



Şekil 1.2. Yarı tersinir bir reaksiyonun dönüşümlü voltamogramı (A), Farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogram (B).

Dönüşümlü voltametrede madde, ileri yönde yapılan taramada indirgenmişse katodik pik (E_{pk}) oluşmakta ve geri yöndeki taramasında bu indirgenmiş maddenin elektrotta tekrar yükseltgenmesinden kaynaklı anodik pik (E_{pa}) gözlenmektedir. CV tekniğinde tersinir, yarı tersinir ve tersinmez reaksiyonlarla karşılaşılmaktadır. Bir redoks tepkimesinde indirgenen veya yükseltgenen elektrot üzerinde hızlı elektron alışverişi meydana geliyorsa bu redoks çifti tersinirdir. Randles-Sevcik eşitliğine göre 25 °C’de tersinir redoks çifti için pik akımı tanımlanmıştır.

$$I_p = 2,69.105 \text{ n}^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2}$$

Eşitlikte;

v; tarama hızı,

I_p ; Pik akımı

n; redoks tepkimesinde transfer edilen elektron sayısı

A; elektrot alanı

C; analit konsantrasyonu

D; difüzyon katsayısıdır.

Eşitlikte de görüldüğü gibi tersinir tepkimelerde akım, derişimle ve tarama hızının karekökü ile doğru orantılıdır. Bu eşitlik kullanılarak elektroaktif türlerin difüzyon katsayısı saptanabilmektedir. Tersinir bir sistem için:

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pk} = 0.0592/n$$

Eşitliği geçerlidir ve $\Delta E_p = 0.0592/n$ değeri tarama hızıyla değişmez. Eşitlikte E_{pk} ve E_{pa} katodik ve anodik pik potansiyelleridir.

Tersinmez sistemlerde ise elektron transfer hızı düşüktür ve bu sistemler için:

$$I_p = - (2.99 \times 10^5) n (\alpha_c n_a)^{1/2} C_o^\infty D^{1/2} \omega^{1/2} \nu^{1/2}$$

Eşitliği kullanılmaktadır. Eşitlikte;

n_a ; transfer edilen toplam elektron sayısı,

α_c ; elektron transfer katsayısıdır.

Eşitlikte de görüldüğü gibi tersinmez sistemlerde akım elektron transfer katsayısının kareköküyle doğru orantılıdır.

Tersinir dönüşümlü voltamogramda anodik ve katodik pik akımları birbirine eşittir [61]. Tersinirlikten uzaklaştıkça anodik ve katodik piklerin arasındaki mesafe artar [62]. Yarı tersinir tepkimelerde dönüş piki çok küçük değerler alır ve yüksek değerlerde potansiyel uygulandığında reaksiyon tersinir hale geçer. Bu yüzden yarı tersinir tepkimelerde geri pik asimetriktir ve daha geniş voltamogram gözlenmektedir. Yarı tersinir tepkimelerin ΔE_p değeri 80 ile 200 mV arasında bir değer almaktadır. Tam tersinmez bir elektrot tepkimesinde ise pik simetrik olmaz ve geri pik gözlenmez [60]. Tersinmez reaksiyonlarda ise ΔE_p değeri 200 mV'dan büyüktür.

1.5.2.2. Kare dalga voltametri tekniği (SWV)

Kare dalga voltametri (SWV) tekniğinde, çalışma elektrotuna simetrik kare dalgalar şeklinde potansiyel uygulanır. Bir periyodun yarısında, potansiyel negatif değer alırken diğer yarısında pozitif değer alır. Akım, kare dalga'nın katodik ve anodik bölgesinde ölçülür. Birincisi ileri yöndeki pulsun sonunda ($\dot{I}_1$), ikincisi geri yöndeki ($\dot{I}_2$) pulsun sonundadır. Anodik ve katodik pik akımlarının toplamı bulunan pik akımıdır ve teknik, bu özelliğinden dolayı daha da hassasiyet kazanmaktadır. Ölçümlerde Kare dalga'nın tamamlanma süresi bir periyottur fakat periyot yerine $1/\pi$ 'ye eşit olan frekans değeri kullanılır. Frekans arttıkça kare dalga pik akımı ve ölçümün hassasiyeti de artmaktadır [63]. Kare dalga voltametrisinde akım ölçümleri ileri ($\dot{I}_1$) ve geri ($\dot{I}_2$) olarak yapılmaktadır. Her bir kare dalga'nın net akımı $\Delta I = \dot{I}_1 - \dot{I}_2$ 'dir. Net akım - potansiyel grafiğinde tek pik elde edilmektedir. Net akım, konsantrasyonla orantılı olarak değişmektedir. Net akım ileri veya geri akımdan büyüktür. Bu sebeple voltametrik pik kolay bir şekilde okunmaktadır. Bu teknikte yarı dalga potansiyeli pik potansiyeline eşittir.

SWV Kalousek, Barker, and Osteryoung formatı olarak 3 farklı gruba ayrılmaktadır [64]. SWV, Kalousek komütatörü ve Barker SW polarografisinden ortaya çıkmıştır. Kalousek SWV tekniği düşük frekanslıdır ve akım sadece yarım kare dalga ile ölçüm yapar. Tekniğin Baker formatında yavaş dalgaların çoğalması sağlanır. Osteryoung en çok kullanılan SWV tekniğidir. Bu teknikte SWV'in her tam kare dalgası tarafından potansiyel artışı sağlanmaktadır. Akım her yarım kare dalga sonunda ölçülmektedir [65]. SWV tekniğinde kare dalga yoluyla toplam akıma kapasitif katkılar minimuma indirilmiş olur. Bu sebeple çok hızlı tarama yapılabilmektedir. Ayrıca teknik, $1,00 \times 10^{-8}$ M' a varan düşük saptama sınırlarında analiz imkanı sağlamaktadır. Bu avantajlarından dolayı SWV, biyolojik örneklerde ve ilaç analizlerinde, kantitatif tayinlerde en çok kullanılan elektroanalitik metottur.

1.5.2.3. Kronoamperometre tekniği (CA)

Kronoamperometre tekniği çalışma elektrotunun, elektroaktif türlerin elektrot yüzey konsantrasyonunun sıfıra yaklaştığı ve faradik reaksiyonun oluşmadığı bir potansiyelden, faradik potansiyele kadar taranmasından oluşan bir tekniktir. Çözeltideki

çalışma elektrodunun potansiyelinin aniden değiştirilmesiyle akım- zaman ilişkisinin analizine dayanır. Yöntemde çalışma elektrotuna öncelikle herhangi bir redoks reaksiyonunun olmadığı potansiyel uygulanıp daha sonra redoks reaksiyonun gerçekleştiği bir potansiyel uygulanır. [63]. Bu teknikte difüzyona bağlı olarak madde geçişi olduğu ve reaktanın azaldığı gözlenir, difüzyon tabakası aşamalı olarak genişler. Yöntemde zamanla akım değişimi Cottrell eşitliği ile belirtilir:

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

Bu eşitlikte,

$I(t)$;t anındaki akımı,

n; elektron sayısı,

F; Faraday sabiti,

A; elektrot alanı

D; Difüzyon katsayısı,

C; konsantrasyon

T; zaman

Burada akım zamanın karekökü ile ters orantılı olarak değişmektedir. Elektron sayısı bilinen bir reaksiyon için k sabiti ile difüzyon katsayısı hesaplanır. Bu değer elektrot yüzeyinde oluşan tepkimenin difüzyon kontrollü olup olmadığını gösterir. Kornoamperometre tekniği elektroaktif türlerin difüzyon katsayısının ölçümünde, çalışma elektrodunun yüzey alanı ölçümünde, elektrotta adsorbsiyonunun belirlenmesinde ve elektrot reaksiyonunun mekanizmasını çalışmada sıklıkla kullanılmaktadır.

1.5.2.4. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) tekniği

Empedans, potansiyelin akımla değişim oranıdır ve bir devredeki toplam direnci temsil etmektedir. Empedans, temelde yüksek frekanslar uygulandığında kapasitans ve indüktif değişikliklerden etkilenen direncin ölçümüne dayanmaktadır . EIS tekniği elektrokimyasal tekniklerden farklı olarak dakikalardan mikrosaniyelere varan zaman sabitleriyle bağlantılı ara yüzey işlemlerinde kullanılmaktadır. Bu tekniğin temel

avantajı, değişimler yeterince küçük olduğu sürece cevabın yaklaşık olarak doğrusal olmasıdır . Üçlü elektrot sisteminde:

- Faradik empedans (Z_F)
- Referans elektrotla çalışma elektrotu arasındaki elektrolit çözelti direnci
- Çift tabaka kapasitansı

EIS tekniği için en önemli parametrelerdir.

Empedans sonuçları genelde empedans-frekans grafiği ile ifade edilmektedir. EIS ölçümleri biyosensör çalışmalarında elektrot yüzeyinin immobilizasyonunda, iletken ve yarı iletken polimer özelliklerinin incelenmesinde, sıklıkla kullanılmaktadır. Sonuçta redoks aktif türler direnç gösterirken, aktif olmayan türler kapasitör gibi davranış gösterir. Biyosensör dizaynında elektrot yüzeyine reseptör olarak polimer, membran gibi çeşitli maddelerin adsorbsiyonun doğru bir şekilde yapılıp yapılmadığının kontrolünde EIS tekniğine başvurulmaktadır.

1.6. Elektrokimyasal Polimerizasyon (Elektropolimerizasyon)

Elektropolimerizasyon sensör çalışmalarında iletken polimerlerin hazırlanmasında ve elektrotların çeşitli polimerlerle modifiye edilmesinde kullanılan yöntemdir. Elektropolimerizasyon tekniğinde polimer, belirli bir voltaj aralığında, uygun çözücü içerisinde tekrar eden döngülerle kalınlığı artan bir tabaka şeklinde oluşturulur. Polimer filmin elektrot yüzeyinde oluşturulabilmesi yüzeydeki polimerin iletken olmasından kaynaklanmaktadır. Elektropolimerizasyonla oluşturulan modifiye elektrotların yüzeyindeki tabakanın yapısı ve özellikleri, kullanılan çözücü, ortam sıcaklığı, metal türü gibi faktörlerle değişebilmektedir. Elektropolimerizasyon potansiyostatik, galvanostatik ve dönüşümlü voltametri teknikleriyle gerçekleştirilebilmektedir.

Potansiyostatik yöntemde düşük sabit bir potansiyel kullanılırken galvanostatik elektropolimerizasyonda sisteme sabit bir akım uygulanmaktadır. Dönüşümlü voltametri tekniği ile yapılan elektropolimerizasyonda ise belirli bir potansiyel aralığı uygun tarama hızı ile taranmaktadır. Bu yöntemle polimerin hangi potansiyel aralığında indirgenip yükseltgendiği, kaç döngü sonunda istenilen kalınlığa ulaşp ulaşmadığı saptanabilmektedir. Elektropolimerizasyonla hazırlanan iletken filmler son yıllarda enerji, elektrokataliz, biyosensör çalışmaları, elektrokimyasal aygıt üretimi gibi alanlarda

sıklıkla kullanılmaktadır. Bu polimer filmlerinin en önemli özelliği elektrot yüzeyinde reaksiyon alanı oluşturmaları ve iletken yüzey altındaki yükü elektrolit içinde çözünmüş maddeye aktarmalarıdır [66]. Çeşitli elektropolimerize filmlerden polimerik ftalosiyanimler, sensör alanındaki uygulamalarından dolayı öne çıkmaktadır. Örneğin elektropolimerize tetra etoksi tiyofen substitüe ftalosiyanimler kullanılarak L- sistein'in elektrokimyasal olarak algılandığı literatürde gösterilmiştir [67].

Elektrot modifikasyonlarında, redoks aktif bileşikler metal-metal komplekslerin ve saf organik polimerler kullanılabilmektedir. Çoğu redoks iletken polimer monomerlerin yükseltgenmesiyle hazırlanırken, çalışma elektrotu üzerindeki polimer film elektrokimyasal metotlarla da sentezlenebilmektedir. Bu iki metodu kapsayan elektropolimerizasyon hızlı ve ucuz olması sebebiyle sensör çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir [68].

1.7. Metaloftalosiyanimler

Ftalosiyanimler (Pc) en önemli boyar madde sınıfında bulunan ve günümüzde sentetik olarak elde edilen mavi yeşil renkli aromatik makrosiklik bileşiklerdir. "Ftalosiyanim" sözcüğü "naphtha (mineral yağı)" ve "cyanine (koyu mavi)" sözcüklerinin birleşiminden meydana gelmiştir. Yunanca Ftalosiyanimler ilk kez 1907'de Braun ve Tcherniac isimli araştırmacılar tarafından ftalimid ve asetikanhidrit ile o-siyanobenzamid sentezi sırasında mavi renkli yan ürün olarak elde edilmiştir [69].

Ftalosiyanimler, önceden boya ve pigment maddesi olarak kullanılırken günümüzde kataliz, kimyasal sensör, fotodinamik tedavi, semikondüktör güneş enerjisi eldesi, optik bilgi depolama gibi birçok farklı bilim ve teknoloji alanında kullanılmaktadır [70]. Ftalosiyanimler 18π ($4n+2$) elektronlu konjuge sisteme sahip moleküllerdir ve $\pi \rightarrow \pi$ geçişlerinden kaynaklanan $\sim 600-700$ nm civarında Q-bandı verirler. nötral formu dianyon halde bulunur ve Pc^{2-} olarak gösterilir. Bu moleküllerin yüksek simetri ve düzlemsellik özelliklerini gösterdiği bilinmektedir. Ftalosiyanimler kimyasal ve termal kararlılığa sahip bileşiklerdir. Düzlemsel olduklarından, moleküller kolayca kümelenirler. Bu yüzden substitüe olmayan ftalosiyanimlerin farklı organik çözücülerde ve suda çözünürlüğü oldukça düşüktür.

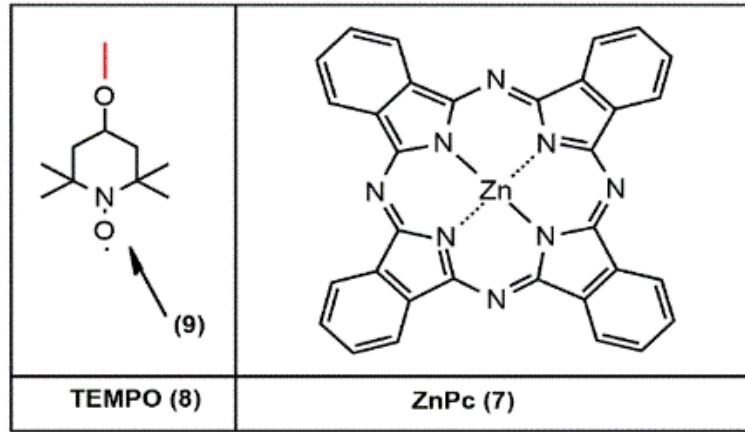
Ftalosiyaninlerin makro halkasına periferel veya nonperiferel olarak farklı fonksiyonel substituentlerin ve metal iyonlarının eklenmesiyle bu moleküllerin farklı organik çözücülerde yüksek çözünürlüğü sağlanabilmektedir [70]. Yapılarına bağlanan metaller ve uç gruplar sebebiyle farklı renklerde olabilmektedir. Ftalosiyanin molekülünün merkezindeki iki hidrojen atomunun periyodik tablonun hemen hemen tüm metal iyonlarıyla yer değiştirilmesi sonucu birçok Metaloftalosiyanin (MPc) sentezlenebilir. Merkez metal ve substituentlerin seçimi metaloftalosiyanin komplekslerinin elektrokimyasal, kimyasal, fizikokimyasal özellikleri için önemli faktörlerdir[71]. Spektra ölçümlerinde metalsiz ftalosiyaninler 600-700 nm aralığında iki tane absorpsiyon bandı gösterirken, metaloftalosiyaninler bu bölgede tek absorpsiyon bandı göstermektedir [72].

Son yıllarda özgün optik, katalitik, elektronik özelliklerinden, yoğun renklerinden, redoks özelliklerinden ve kararlı yapılarından dolayı Ftalosiyaninler ve Metaloftalosiyaninler dikkat çekmektedir . MPc'ler, sensör ve biyosensör üretiminde sıklıkla kullanılan ve çoğu bileşik için önemli katalitik aktivite gösteren komplekslerdir. Özellikle redoks-aktif merkez metal iyonları bulunan ftalosiyaninlerin birçok önemli kimyasal reaksiyonu katalizlediği bilinmektedir. Pc halkasının redüksiyonu sonucu MPc^{3-} , MPc^{4-} , MPc^{5-} and MPc^{6-} gibi türler oluşabilirken, MPc^{1-} and MPc^0 gibi türlerde yükseltgenme sonucu oluşurlar. Ayrıca merkezde bulunan Fe^{+2} , Co^{+2} , ve Mn^{+2} gibi metal iyonlarıda metal merkezli yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonu verebilmektedirler. Fe^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+} , Zn^{+2} , Mn^{+2} ftalosiyanin gibi metaloftalosiyaninlerle modifiye edilen elektrotlar, boş elektrotla karşılaştırıldığında yüksek oranda elektrokatalitik özellik göstermektedir. Metaloftalosiyaninlerin zengin redoks davranışlarından dolayı CO_2 , CO , H^+ gibi birçok hedef bileşiği katalizlediği literatürde belirtilmektedir [73,74].

1.7.1. 2,2,6,6- Tetrametil-1- piperidiniloksi çinko(II) ftalosiyanin (TEMPO-ZnPc)

TEMPO grubu diğer organik moleküllere ve biyomoleküllere kovalent olarak bağlanma özelliğine sahip serbest bir radikaldir. Bu özelliği TEMPO radikalini birçok uygulama için uygun hale getirmektedir. TEMPO radikalini içeren fonksiyonel materyallerin farklı hedef moleküller için aktif elektrokatalizör olarak kullanım alanı bulmaktadır. TEMPO radikali redoks aktif bir moleküldür ve elektrokimyasal olarak

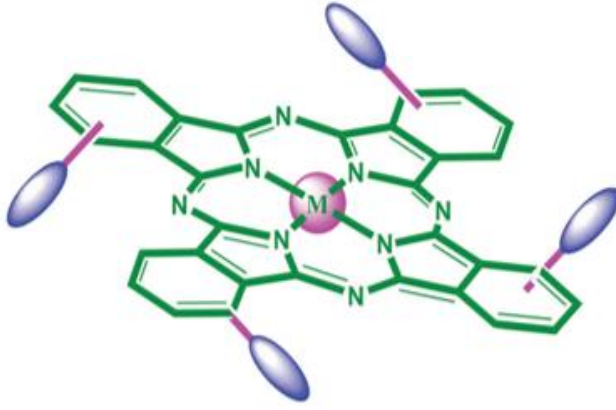
okside olma özelliğine sahiptir [75]. TEMPO radikalini içeren moleküller, farklı hedef moleküllerin ve alkolün oksidasyonunda aktif elektrokatalizör olarak kullanılabilir. Araştırma grubumuz tarafından TEMPO radikali Çinko (II) ftalosiyanine periferel olarak eklenerek TEMPO-ZnPc molekülü sentezlenmiştir (**Şekil 1.3**). TEMPO-ZnPc molekülünün yapısındaki çoklu elektron halkasına dayalı indirgenme reaksiyonu ve TEMPO bazlı oksidasyon reaksiyonu gösterme özelliği bulunmaktadır.



Şekil 1.3. TEMPO-ZnPc molekül yapısı: ZnPc(7), TEMPO grubu (8), Nitroksil grubu (9)

1.7.2. Non periferel mangan(III) ftalosiyanın (n-MnPc)

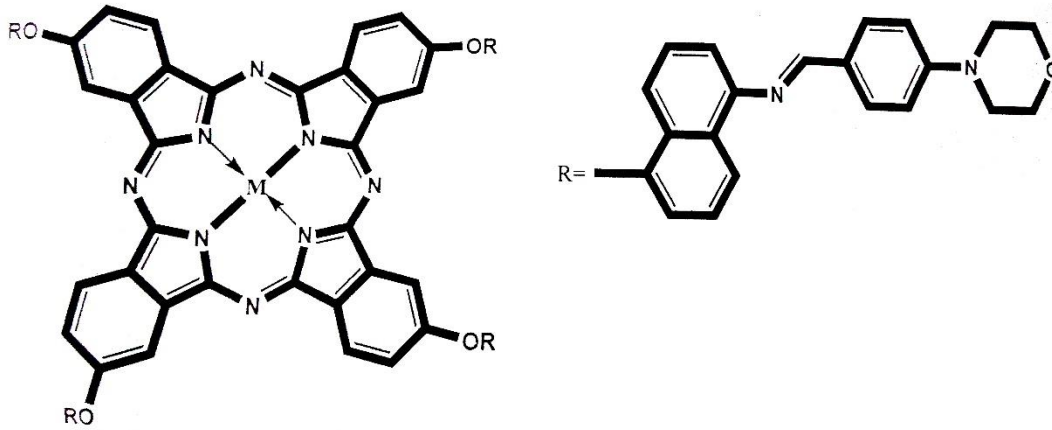
MnPc kompleksi merkezinde yer alan Mangan iyonunun geniş aralıkta değerlik almasına bağlı olarak çeşitli oksidasyon durumları göstermektedir. Bu durum MnPc'nin çoklu elektron transferi süreçlerinde, elektrokatalizör olarak kullanılabilirliğini arttırmaktadır. MnPc metal bazlı ve halka bazlı redoks süreçleri de göstermektedir. Bununla birlikte MnPc'nin periferel veya nonperiferel substitüe olması elektropolimerizasyonunu etkileyen faktörlerdendir. Araştırma grubumuz tarafından Mangan (III) ftalosiyanın molekülüne non periferel olarak tetra substitüe edilerek n-MnPc molekülü hazırlanmıştır (**Şekil 1.4**). Molekülün elektropolimerizasyon davranışlarının özellikle elektrokatalitik uygulamalara uygunluk gösterdiği literatürde yer almaktadır [76].



Şekil 1.4. n-MnPc molekül yapısı; M:MnCl₂

1.7.3. Titanyum Ftalosiyenin (TiPc)

TiPc kompleksinin merkezinde yer alan Titanyum metali redoks aktif bir metaldir (Şekil 1.5.). Bu özelliği kompleksin sensör çalışmalarında kullanımına imkan sağlamaktadır.

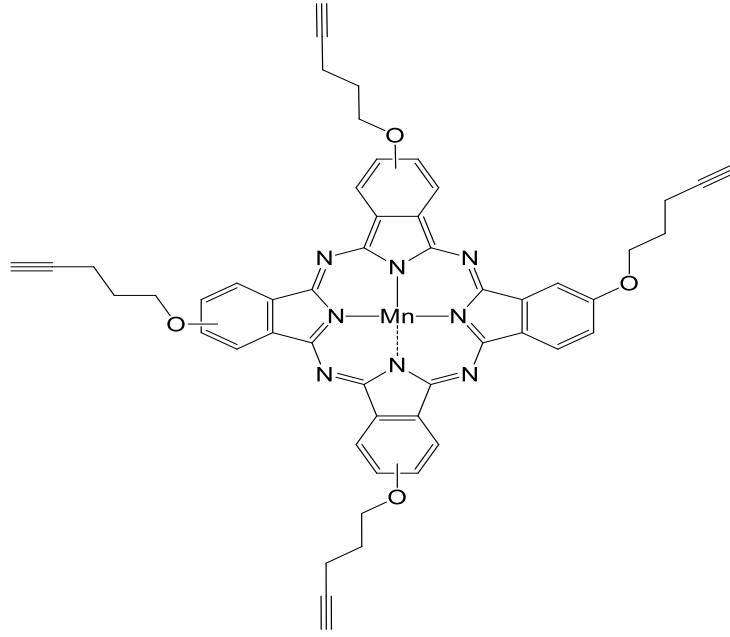


Şekil 1.5. TiPc molekül yapısı; M:TiO

1.7.4. 4-azidoanilin Mangan Ftalosiyenin (PANİ-N₃-MnPc)

Polianilin, anilinin kimyasal polimerleşme sürecinden elde edilen iletken polimerlerdendir. PANİ çevresel koşullarda gösterdiği stabilite, yüksek kapasitans özelliği, biyoyumluluğu ve elektroaktivitesi sebebiyle elektrokatalitik olaylarda yaygın olarak kullanılmaktadır. PANİ çeşitli organik çözücülerde ve suda oksidatif elektropolimerizasyon kullanılarak kolaylıkla elde edilebilmektedir. PANİ tersinir

değişimleri kontrol edebilmekte ve farklı metotlarla elektropolimerize edilebilmektedir. Polimer filmin elektrokimyasal olarak kolay hazırlanışı, ucuz olması, farklı oksidasyon bölgelerinin bulunması PANİ'nin sensör olarak kullanımına imkan sağlamaktadır [77]. Elektrot yüzeyindeki PANİ film tabakası çeşitli türlerin redoks süreçlerinin kinetiğini hızlandırmaktadır. PANİ'nin iletkenliği polimer iskeleti boyunca yük taşınabilirliğine bağlıdır. PANİ, Araştırma grubumuz tarafından sentezlenen MnPc (Şekil 1.6.) gibi çeşitli metaloftalosiyeninlere elektrokimyasal olarak da bağlanabilmektedir.



Şekil 1.6. MnPc molekül yapısı

Verilen bilgiler ışığında özetle, Gram negatif bakteriler arasında iletişimi sağlayan AHL molekülleri sayesinde bakterilerin biyofilm oluşturma, virülans özellik gösterme, ekstrasellüler enzim salgılama gibi zararlı fizyolojik özellikler kazandığı bilinmektedir. Artan bakteri popülasyonu ile beraber, salgılanan AHL molekülü konsantrasyonu da artmaktadır. Bunun sonucunda bakteriler çeşitli virülans faktörler salgılayarak ve biyofilm formları meydana getirerek gıdalarda bozulmalara, gıda zehirlenmelerine, immün sistemi baskılanmış hastalarda antibiyotik dirençli enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Bu çalışmada bakterilerin bulundukları ortamda meydana getirdiği zararlı etkilerin önceden saptanabilmesi, gerekli önlemlerin alınabilmesi ve zararlı bakteriyel faaliyetlerin önlenmesi için salgılanan AHL moleküllerini tespit edecek bir elektrokimyasal biyosensör yapımı amaçlanmıştır.

Biyolojik analitleri algılayacak sensörlerin dizaynında enzim kullanımına göre enzimatik veya nonenzimatik çalışmalar bulunmaktadır. Enzimatik biyosensör dizaynında, kullanılacak enzimin elektrot yüzeyine immobilizasyonu sırasında madde kayıpları oluşmakta ve çevresel faktörlerden (ortam sıcaklığı, pH vb.) dolayı enzimlerin stabilitesinde bozulmalar meydana geldiği bilinmektedir. Literatürdeki bilgiler metaloftalosiyanın elektrokatalitik yapıları, birçok indirgenme ve yükseltgenme süreçlerini sağlamaları ve yüksek termal stabiliteleri sebebiyle sensör ve biyosensör dizaynında reseptör molekül olarak sıklıkla kullanılan kompleksler olduklarını göstermiştir [76]. Çalışmamızda, AHL moleküllerini saptamada reseptör molekül olarak metaloftalosiyanın kullanımıyla enzimatik biyosensörlerde oluşan dezavantajların ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Gerçekleştirilen nonenzimatik elektrokimyasal biyosensör çalışmasıyla, metaloftalosiyanın kullanılarak hızlı ve pratik bir şekilde AHL moleküllerinin dolayısıyla ortamdaki bakteri varlığının tespiti amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda öncelikle algılayıcı (reseptör) molekül olarak TEMPO-ZnPc, n-MnPc, TiPc ve PANİ-N₃-MnPc molekülleri seçilmiş ve araştırma gruplarımızca sentezleri gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen moleküller ile elektrotlar modifiye edilmiştir. Daha sonra AHL molekülleriyle modifiye elektrot ucundaki TEMPO-ZnPc, n-MnPc, TiPc ve PANİ-N₃-MnPc moleküllerinin etkileşimini incelemek için üçlü elektrot sistemi, elektrokimyasal hücre, potansiyostat ve bilgisayardan oluşan düzenek kurulmuş, amperometrik ve voltametrik ölçümler yapılmıştır.

BÖLÜM 2

2. MATERYAL VE YÖNTEM / MATERIAL AND METHOD

2.1. Materyal

2.1.1 Kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar

1. Dimetil sülfoksit (DMSO) ((Merck, K38436331 807, 99.9% saf)
2. Ultra saf su ($\geq 18\text{ M}\Omega$, Milli-Q, Millipore, ddH₂O)
3. Diklorometan (DCM) (Merck, K42042950 112, 99.8 % saf)
4. Tetrabütilamonyum perklorat (TBAP) (Fluka Analytical, 86893, $\geq 99\%$ saf)
5. Lityum perklorat (Aldrich, 431567-50G)
6. TEMPO-ZnPc, PANİ-N₃-MnPc, n-MnPc, TiPc molekülleri
7. N-Hexanoyl-DL-Homoserine lactone (Sigma Aldrich, $\geq 97.0\%$ HPLC),
8. N-Octanoyl-DL- Homoserine lactone (Sigma Aldrich, $\geq 97.0\%$ HPLC),
9. N-Decanoyl-DL-Homoserine lactone (Sigma Aldrich, $\geq 97.0\%$ HPLC),
10. N-Butyryl-DL-Homoserine lactone (Sigma Aldrich, $\geq 97.0\%$ HPLC),
11. N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (Sigma Aldrich)
12. Elektrokimyasal Hücre
13. Beher
14. Yüksek saflıkta N₂ gazı
15. Camsı Karbon Elektrot (GCE) (yüzey alanı of 0.196 cm², 5 mm disk)
16. İndiyum Kalay Oksit (ITO)
17. Ag/AgCl referans elektrot
18. Pt tel
19. Doymuş Kalomel elektrot
20. Alümina Solüsyon (Gamma Micropolish II, 0.05micron)
21. Elektrot Temizlik Pedleri
22. Pipet Ucu (10µl, 100 µl, 1000 µl) (Axygen-ABD)
23. Nitril Eldiven (Pudrasız) (Broche-Türkiye)

2.1.2. Kullanılan cihazlar

1. **pH Metre (Thermo-ABD):** Hazırlanan PBS çözeltisinin pH ayarlamasında kullanılmıştır.
2. **Dijital Hassas Terazî (Ohaus-ABD):** Katı kimyasalları tartmak için kullanılmıştır.
3. **Vorteks (Heidolph-Almanya):** AHL moleküllerinin ve kimyasalların çalkalanmasında kullanılmıştır.
4. **Buzdolabı (Siemens-Almanya):** Kimyasalların ve AHL moleküllerinin +4°C' ve -20 °C' de saklanması için kullanılmıştır.
5. **Mikropipetler (1000µl, 100µl, 10µl) (Thermo/ Finnpiette-ABD):** AHL moleküllerinin ve sıvı kimyasalların aktarımında kullanılmıştır.
6. **Potansiyostat (GAMRY Instruments, Reference 600 Potentiostat/Galvanostat/ZRA):** Dönüşümlü Voltametre, kare dalga voltametre, kronoamperometre ve empedans ölçümlerinde kullanılmıştır.
7. **Bilgisayar:** Potansiyostatta algılanan değişimlerin sayısal verilere çevrilmesinde kullanılmıştır.
8. **UV Kabin:** AHL moleküllerinin seyreltik çözeltisini hazırlamak için kullanılmıştır.
9. **Ultra Distile Saf Su Cihazı (Millipore-ABD):** Sensör testlerinin yapıldığı distile su teminini için kullanılmıştır.
10. **Pastör Fırını:** Cam malzemelerin kurutulmasında ve elektrotların modifikasyonunda kullanılmıştır.
11. **Otoklav (Nüve-Türkiye):** Tüm sterilizasyon işlemleri sırasında kullanılmıştır.

2.1.3. Hazırlanan kimyasallar

1. Ferrosen Çözeltisi:

Empedans ölçümlerinde kullanılan elektrolittir. 0.100 M konsantrasyonda hazırlanmıştır.

2. PBS:

250,0 ml 0.100 M PBS hazırlamak için 20,000 g NaCl, 0.500 g KCl, 5,400 g Na₂HPO₄ ve 0.647 g KH₂PO₄ tuzları tartıldı. 250,0 ml distile su içinde çözülmüştür. Çözeltinin son pH'ı 7.4 olacak şekilde pH metre kullanılarak ayarlanmıştır. Hazırlanan çözelti otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir. Çözelti sensör testinin

gerçekleştirildiği elektrolit olarak kullanılmıştır.

3. %10'luk DMSO:

30,0 ml %10'luk çözelti hazırlamak için otoklavda steril edilen falkon tüp içerisine 3,0 ml DMSO ve 27,0 ml distile su aktarılıp vortekste iyice karışması sağlanmıştır. %10'luk DMSO AHL moleküllerinin çözülmesi için kullanılmıştır.

4. Kromik Asit çözeltisi:

%98 H₂SO₄ çözeltisinden 1,0 L beher içine aktarıldı. Manyetik karıştırıcıda 120 °C'de 700 rpm devirde kaynayınca kadar tutulmuştur. Asit kaynamaya başlayınca 1 kaşık Potasyum dikromat atılıp 10 dakika manyetik karıştırıcıda bırakılmıştır. Aynı işlem iki kere daha uygulanmıştır. Manyetik karıştırıcıdan alınan beherin ağzı kapatılıp 1 gün beklemeye bırakılmıştır. Hazırlanan çözelti deneyler sırasında kullanılan cam malzemelerin ve Pt telin temizlenmesinde kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Camsı karbon elektrotların (GCE) temizlenmesi

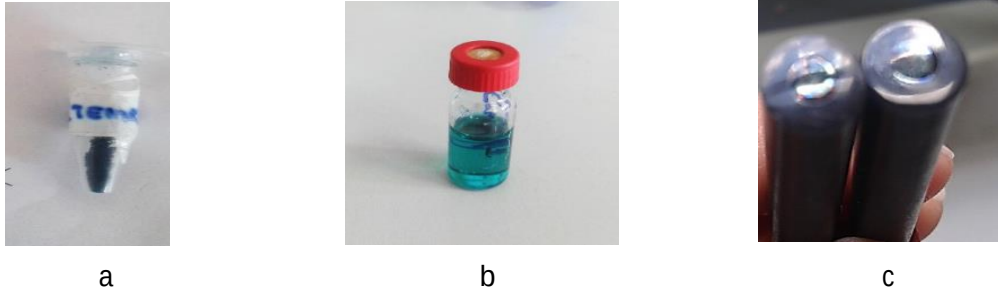
GCE (5 mm disk) 0.1 M Alümina solüsyonundan (Gamma Micropolish II, 0.05micron) elektrot temizleme pedi üzerine dökülüp elektrot yüzeyi iyice temizlenmiştir. Temizlenen elektrotlar içerisinde saf distile su bulunan behere daldırılıp 5 dakika ultrasonik banyoda muamele edilmiştir. Beher içerisinden çıkartılan elektrotlar 0.05 M Alümina solüsyonu ile tekrar temizlendikten sonra 5 dakika daha saf distile su bulunan beherde ultrasonik banyoda muamele edilmiştir.

2.2.2. Çalışma elektrotlarının farklı metaloftalosiyeninlerle modifiye edilmesi

2.2.2.1. Çalışma elektrotlarının TEMPO-ZnPc ile modifiye edilmesi

Metaloftalosiyeninlerin elektrokatalitik özelliği literatürde belirtilmektedir [76,70]. Bununla beraber moleküler yapılarında içerdikleri merkezi metal iyonun redoks aktivitesi metaloftalosiyeninlerin maddeleri elektro-algılama aktivitesinde kilit rol oynamaktadır. TEMPO bir serbest radikaldır ve diğer organik moleküllere kovalent olarak bağlanma özelliğine sahiptir. TEMPO radikali redoks aktif bir bileşik olduğundan elektrokimyasal olarak okside olma kapasitesini sağlamaktadır. Nitroksil grubu taşıyan biyomoleküllere de bağlanma özelliği bu grubu içeren materyallerin farklı hedef moleküller için aktif elektrokatalizör olarak kullanımı için uygun hale getirmektedir.

Çinko(II) ftalosiyenin (TEMPO-ZnPc) araştırma grubumuz tarafından, periferik olarak 2,2,6,6- tetrametil-1 piperidiniloksi (TEMPO) radikali ile birleştirilerek sentezlenmiştir [75]. TEMPO-ZnPc yapısındaki çoklu elektron halkasına bağlı indirgenme reaksiyonu ve TEMPO grubuna bağlı oksidasyon reaksiyonu göstermektedir. 0.6 mg TEMPO-ZnPc tartılıp 1 ml Dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek elektrotu kaplamak üzere çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiden 5 µl GCE yüzeyine damlatılıp Pasteur fırınında kurumaya bırakılmıştır (**Şekil 2.1**).



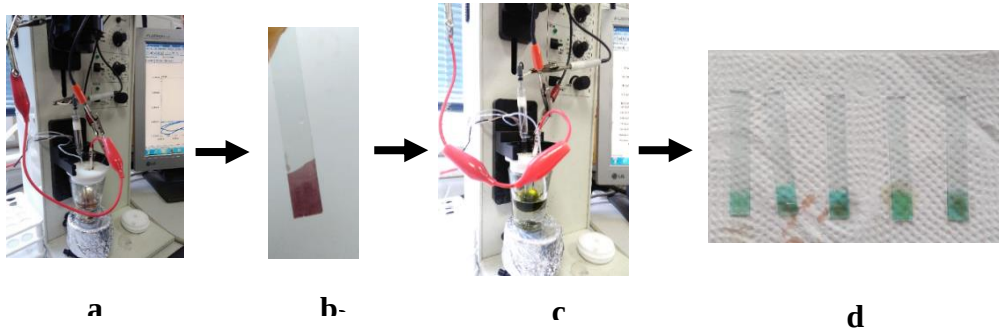
Şekil 2.1. TEMPO-ZnPc toz hali (a), DMSO’da çözülen TEMPO-ZnPc molekülü (b), TEMPO-ZnPc ile modifiye edilen camı karbon elektrot (c).

2.2.2.2. Çalışma elektrotlarının n-MnPc ile modifiye edilmesi

n-MnPc molekülü araştırma grubumuz tarafından Mangan (III) ftalosiyenin molekülüne non periferik tetra kalkon substitüe edilerek sentezlenmiştir [78]. n-MnPc 40 mg n-MnPc stok maddeden 0.7 mg tartılıp 1 ml diklorometan içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan çözelti elektrokimyasal hücre içine aktarılıp 3 ml daha diklorometan eklenerek n-MnPc’nin iyice çözülmesi sağlanmıştır. Molekülün elektropolimerizasyonunu gerçekleştirmek için elektrokimyasal sistem kurulmuş, çözeltiye iletkenliği sağlaması için tetrabutyl amonyumperklorat (TBAP) eklenmiştir. Çözelti içerisine camı karbon çalışma elektrot, Ag/AgCl referans elektrot ve platin tel daldırılarak sistem kurulmuştur. Potansiyostatta farklı voltaj aralıkları uygulanarak molekülün optimum polimerizasyon aralığını bulabilmek için dönüşümlü voltmetri ve kare dalga voltmetri ölçümleri yapılmıştır. Uygun polimerizasyon aralığı 0 - 1.5 V olarak bulunduktan sonra elektrot yüzeyi n-MnPc çözeltisi içinde elektropolimerizasyon yöntemiyle 5 kat kaplanmıştır. Modifiyesi yapılan elektrotlar sensör testi için oda sıcaklığında (25 °C) bir gün bekletilmiştir.

2.2.2.3. Çalışma elektrotlarının PANİ-N₃-MnPc ile modifiye edilmesi

PANİ hazırlamak için 0.020 g 4-azidoanilin tartılıp 2,0 ml 0,100 M H₂SO₄ içinde çözülmüştür. Çözelti elektrokimyasal hücreye aktarılıp içine TBAP eklenerek, indiyum kalay oksit (ITO), Ag/AgCl referans elektrot ve Pt telden oluşan üçlü elektrot sistemi kurulmuştur. ITO'nun yüzeyinde PANİ film oluşturmak için çözelti içerisinde 1.2 V ile -0.2 V arasında 20 döngüde elektropolimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elektrotlar kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan PANİ film kaplı elektrotların MnPc ile immobilizasyonu için klik elektrokimya yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde öncelikle üçlü elektrot sistemi kurulmuş, daha sonra 0.5 mg MnPc tartılıp DMSO'da çözeltisi hazırlanmış, çözelti içerisine TBAP ve 0.15 mg CuSO₄ eklenmiştir. Kurulan sistemde PANİ kaplı elektrotlar 900 saniye boyunca -0.15 V' da klik edilmiştir. Klik işlemi sonucunda İTO/PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotlar hazırlanmıştır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. ITO elektrodun hazırlanan PANİ çözeltisi içinde elektropolimerizasyonu (a) ve PANİ film kaplı ITO (b), PANİ film kaplı ITO'ların MnPc çözeltisi içinde klik elektrokimya yöntemiyle kaplanması (c), ITO/PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrot (d).

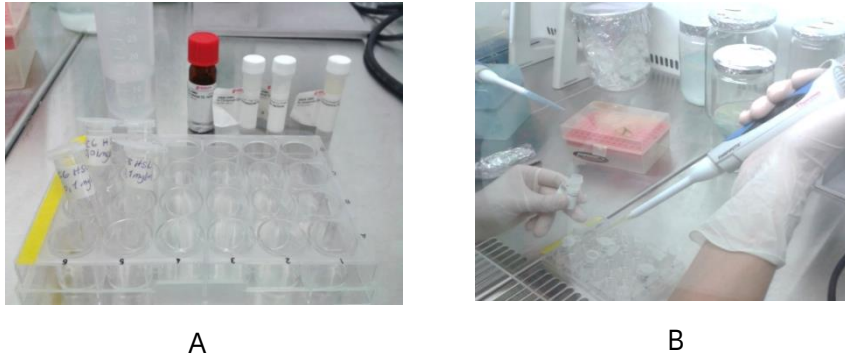
2.2.2.4. Çalışma elektrotlarının TiPc ile modifiye edilmesi

1.2 mg TiPc tartılıp 1 ml diklorometan içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan çözelti elektrokimyasal hücre içine aktarılıp 3 ml daha diklorometan ve TBAP eklenerek çözelti hazırlanmıştır. Molekülün elektropolimerizasyonunu gerçekleştirmek için elektrot sistemi kurulmuştur. Çözelti içerisine GC çalışma elektrotu, Ag/AgCl referans elektrot ve Pt tel yardımcı elektrot daldırılarak sistem hazırlanmıştır. Potansiyostatta farklı voltaj aralıkları uygulanarak molekülün optimum polimerizasyon aralığını bulabilmek için dönüşümlü voltmetri ve kare dalga voltmetri ölçümleri

yapılmıştır. Uygun polimerizasyon aralığı -0.5 - 1.5 V olarak bulunduğundan sonra elektrot elektropolimerizasyon yöntemiyle 10 kat kaplanmış. Modifiyesi yapılan elektrotlar sensör testinde kullanılmıştır.

2.2.3. AHL Moleküllerinin Seyreltilmesi

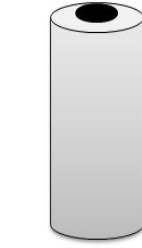
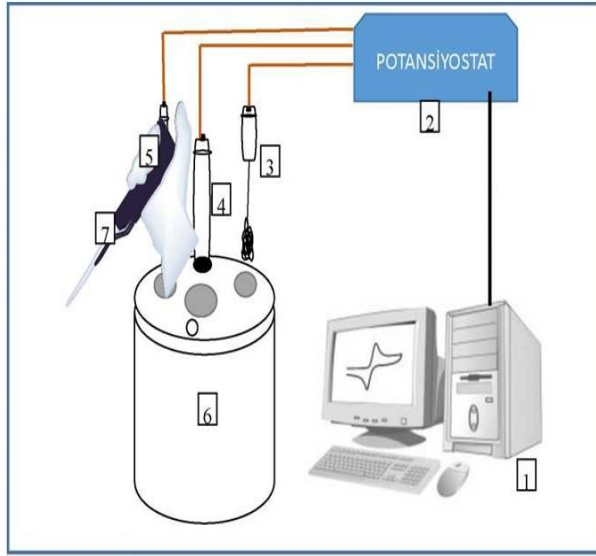
Deneylerde AHL molekülü olarak N-Hekzanoil-DL- Homoserin lakton (C_6 HSL), N-Oktanoil-DL- Homoserin lakton (C_8 HSL), N-Dekanoil-DL- Homoserin lakton (C_{10} HSL), N-Bütiril-DL-Homoserin lakton (C_4 HSL), ve N-(3-okso-dodekanoil)-L-Homoserin lakton (3oxo C_{12} HSL) kullanılmıştır. Tüm AHL molekülleri %10'luk DMSO ile seyreltilmiştir (Şekil 2.3).



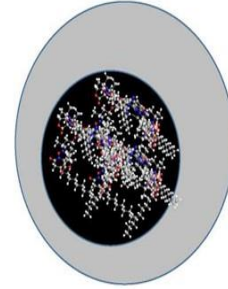
Şekil 2.3. Farklı AHL molekülleri (A), Farklı AHL moleküllerinin %10'luk DMSO ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda stok solüsyonlarının hazırlanması (B).

2.2.4. AHL moleküllerinin elektrot sisteminde sensör testi

Sensör testleri elektrokimyasal hücre, üçlü elektrot sistemi, potansiyostat ve bilgisayardan oluşan düzenekte 25 °C'de gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.4). TEMPO-ZnPc, n- MnPc, PANİ-N₃-MnPc ve TiPc ile modifiye edilen elektrotlar kurulan sistemde elektrokimyasal hücre içerisine daldırılmış, çeşitli konsantrasyonda hazırlanan AHL çözeltileri ile artan dozlarda titre edilmiştir. Titrasyon sırasında potansiyostat kullanılarak SWV ve CV ölçümleri kaydedilmiştir.



Modifiye edilmiş elektrot



Metalofталосіанінілє модифіє еділмїш електротїüzєйі

Şekil 2.4. Sensör testlerinin yapıldığı elektrokimyasal sistem; bilgisayar (1), potansiyostat (2), Pt tel (3), TEMPO-ZnPc/GCE modifiye çalışma elektrotu (4), Ag/AgCl referans elektrot (5), elektrokimyasal hücre (6), mikropipet (7).

2.2.4.1. AHL moleküllerinin TEMPO-ZnPc modifiye elektrotla sensör testi

Sensör testi, üçlü elektrot sistemi, elektrokimyasal hücre, bilgisayar ve potansiyostattan oluşan elektrokimyasal ortamda 25 °C'de gerçekleştirilmiştir. Üçlü elektrot sistemi çalışma elektrotu, yardımcı elektrot ve referans elektrottan meydana gelmektedir. Çalışma elektrotu olarak TEMPO-ZnPc ile modifiye edilmiş elektrotlar kullanılmıştır. Yardımcı elektrot olarak Pt tel, referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot kullanılmıştır. Elektrokimyasal hücre içerisinde 4 ml distile su ve 0,10 mol dm^{-3} lityumperklorat (LiClO_4) tuzundan oluşan elektrolit hazırlanmıştır. İletkenliği sağlamak için lityumperklorat tuzu kullanılmıştır. Hazırlanan elektrolit içerisine referans elektrot, yardımcı elektrot ve modifiye edilmemiş boş elektrot daldırılmıştır. Sensör testinin yapılacağı ortamda safsızlık olup olmadığını anlamak için boş elektrotun elektrolit ortamında dönüşümlü voltametri ve kare dalga voltametri ölçümleri alınmıştır. Bu ölçümler incelenerek ortamın temiz olduğu anlaşıldıktan sonra TEMPO-ZnPc ile

modifiye edilmiş elektrot, elektrolite daldırılıp dönüşümlü voltametri ve kare dalga voltametri ölçümleri yapılmıştır. TEMPO-ZnPc ile kaplı elektrotların sensör testinden önce kararlılığını test etmek için 10 kere üst üste kare dalga voltametri ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler sonucu elektrot kararlılığı sağlanıp redoks piki belirlendikten sonra sensör testine geçiş yapılmıştır. Ortamda oksijen varlığı sensör testinin sonuçlarını etkileyebilmektedir. Bu yüzden her ölçümden en az 15 dakika önce ortamdan saf azot gazı geçirilerek çözelti içerisindeki çözünmüş oksijen ortamdan kaldırılmıştır. AHL moleküllerine yönelik sensör testi için kararlılığı sağlanan TEMPO-ZnPc ile kaplı elektrot, referans elektrot ve yardımcı elektrottan oluşan sisteme 3 oxo C₁₂ HSL çözeltisinden 2,5 ile 2462,5 µM arasında farklı konsantrasyonlarda eklenerek, elektrot ucundaki TEMPO- ZnPc molekülü ile eklenen 3 oxo C₁₂ HSL molekülünün etkileşimi potansiyometrik ölçümlerle incelenmiştir. AHL molekülleri çözeltiye eklendiğinde moleküllerin redoks aktif özelliklerinin olup olmadığının belirlenmesi için boş elektrotla da potansiyometrik ölçümler yapılmıştır. Sensör testinde dönüşümlü voltametri ve kare dalga voltametri ölçümleri 1 - -1 V aralığında yapılmıştır. Aynı işlemler C₄ HSL, C₆ HSL, C₈ HSL ve C₁₀ HSL molekülleri için de ayrı ayrı uygulanmıştır.

GCE/TEMPO-ZnPc elektrotun AHL sensörü olarak kullanımını pratikte görmek amacıyla 3 oxo C₁₂ HSL molekülü içeren süt örneği modifiye elektrotla test edilmiştir. Bu amaçla 10 ml süt kaynatılarak sterilize edilmiştir. Sterilize edilen sütün 4 ml'si elektrokimyasal hücreye aktarılmış ve üzerine TBAP eklenmiştir. Kurulan üçlü elektrot sisteminde GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrotun önce kararlılığını test etmek için 10 kere üst üste kare dalga voltametri ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler sonucu elektrot kararlılığı sağlanıp redoks piki belirlendikten sonra sensör testine geçiş yapılmıştır. 3 oxo C₁₂ HSL çözeltisinin 2,5 ile 2462,5 µM arasında farklı konsantrasyonları süt içine eklenerek, elektrot ucundaki TEMPO- ZnPc molekülü ile süt içindeki 3 oxo C₁₂ HSL molekülünün etkileşimi potansiyometrik ölçümlerle incelenmiştir. Her ölçümden en az 15 dakika önce ortamdan saf azot gazı geçirilerek çözelti içerisindeki çözünmüş oksijen ortamdan kaldırılmıştır. Sensör testinde dönüşümlü voltametri ve kare dalga voltametri ölçümleri 1 - -1 V aralığında yapılmıştır.

2.2.4.2. AHL moleküllerinin n- MnPc modifiye elektrotla sensör testi

Sensör testi, üçlü elektrot sistemi, elektrokimyasal hücre, bilgisayar ve potansiyostattan oluşan elektrokimyasal ortamda 25 °C’de gerçekleştirilmiştir. Çalışma elektrodu olarak n- MnPc ile modifiye elektrotlar kullanılmıştır. Yardımcı elektrot olarak Pt tel, Referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot kullanılmıştır. Hazırlanan 0,1 M PBS (pH 7,4) ‘den 4 ml hücre içerisine aktarılıp sensör testi için elektrolit olarak kullanılmıştır.

Hazırlanan elektrolit içerisine referans elektrot, yardımcı elektrot ve modifiye edilmemiş boş elektrot daldırılmıştır. Ortamdaki safsızlık kare dalga voltametri ölçümleriyle kontrol edilmiştir. n- MnPc ile kaplı elektrotların sensör testinden önce kararlılığını test etmek için 10 kere üst üste kare dalga voltametri ölçümleri yapılmış ve elektrot kararlılığı sağlandıktan sonra sensör testine geçiş yapılmıştır. Her ölçümden en az 15 dakika önce ortamdan saf azot gazı geçirilerek çözelti içerisindeki çözünmüş oksijen ortadan kaldırılmıştır. AHL moleküllerine yönelik sensör testi için kararlılığı sağlanan n- MnPc ile kaplı elektrot, referans elektrot ve yardımcı elektrottan oluşan sisteme 3 oxo C₁₂ HSL çözeltisinden 2,5 – 2662,5 µM arasında farklı konsantrasyonlarda eklenerek, elektrot ucundaki n- MnPc molekülü ile eklenen 3 oxo C₁₂ HSL molekülünün etkileşimi potansiyometrik ölçümlerle incelenmiştir. Sensör testinde dönüşümlü voltametri ve kare dalga voltametri ölçümleri 1 - -1 V aralığında yapılmıştır. Aynı işlemler C₄ HSL, C₆ HSL, C₈ HSL ve C₁₀ HSL molekülleri için de ayrı ayrı uygulanmıştır.

2.2.4.3. AHL Moleküllerinin PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotla sensör testi

Sensör testi, üçlü elektrot sistemi, elektrokimyasal hücre, bilgisayar ve potansiyostattan oluşan elektrokimyasal ortamda 25 °C’de gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal hücre içerisinde 4 ml distile su ve 0,1 mol dm⁻³ lityumperklorat (LiClO₄) tuzundan oluşan elektrolit hazırlanmıştır. Çalışma elektrotu olarak ITO/PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrot kullanılmıştır. Ortamdaki safsızlık kare dalga voltametri ve kronoamperometre ölçümleriyle kontrol edilmiştir. ITO/PANİ-N₃-MnPc elektrotların sensör testinden önce kararlılığını test etmek için 10 kere üst üste kare dalga voltametre ölçümleri yapılmış ve elektrot kararlılığı sağlandıktan sonra sensör testine geçiş yapılmıştır. Sistemden saf azot gazı geçirilmiştir. Hücre içerisine 2,5 ile 3500 µM arasında farklı konsantrasyonlarda 3 oxo C₁₂ HSL molekülünden eklenip, ITO/PANİ-N₃-

MnPc modifiye elektrot ile eklenen 3 oxo C₁₂ HSL molekülünün etkileşimi potansiyometrik ölçümlerle incelenmiştir. Sensör testinde dönüşümlü voltametri ve kare dalga voltametri ölçümleri -1 – 1.3 V aralığında yapılmıştır. Aynı işlemler C₄ HSL, C₆ HSL, C₈ HSL ve C₁₀ HSL molekülleri için de ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

2.2.4.4. AHL moleküllerinin TiPc modifiye elektrotla sensör testi

Sensör testi, üçlü elektrot sistemi, elektrokimyasal hücre, bilgisayar ve potansiyostattan oluşan elektrokimyasal ortamda 25 °C’de gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal hücre içerisinde 4 ml distile su ve 0.1 mol dm⁻³ lityumperklorat (LiClO₄) tuzundan oluşan elektrolit hazırlanmıştır. Ortamdaki safsızlık kare dalga voltametri ölçümleriyle kontrol edilmiştir. Çalışma elektrotu olarak TiPc ile modifiye elektrotlar kullanılmıştır. Sensör testinden önce GCE/TiPc elektrotun kararlılığını test etmek için 10 kere üst üste kare dalga voltametre ölçümleri yapılmış ve elektrot kararlığı sağlandıktan sonra sensör testine geçiş yapılmıştır. Üçlü elektrot sisteminin kurulu olduğu hücre içerisinden saf azot gazı geçirilmiştir. Hücre içerisine 5-5000 µM arasında farklı konsantrasyonlarda 3 oxo C₁₂ HSL molekülünden eklenip, elektrot ucundaki TiPc ile eklenen 3 oxo C₁₂ HSL molekülünün etkileşimi potansiyometrik ölçümlerle incelenmiştir. Sensör testinde dönüşümlü voltametri ve kare dalga voltametri ölçümleri 1 - -1 V aralığında yapılmıştır. Aynı işlemler C₄ HSL, C₆ HSL, C₈ HSL ve C₁₀ HSL molekülleri için de gerçekleştirilmiştir. Her bir sensör testi 3 kere tekrar edilmiştir.

BÖLÜM 3

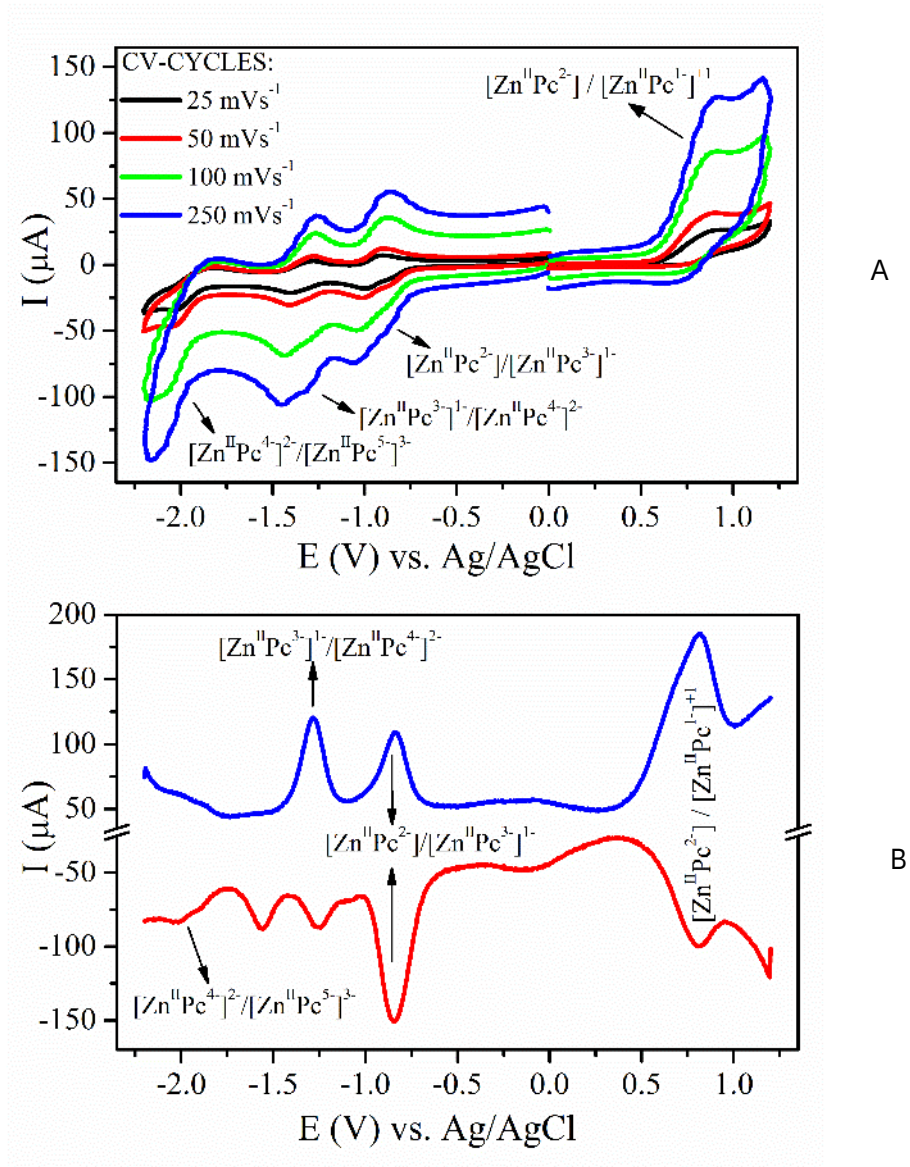
3. BULGULAR VE TARTIŞMA / RESULTS AND DISCUSSION

3.1. TEMPO-ZnPc, n-MnPc ve PANİ-N₃-MnPc Komplekslerinin Elektrokimyasal Davranışları

Ftalosiyaninlerin moleküler yapılarına çeşitli fonksiyonel metal gruplarının eklenmesiyle çözünürlüklerinin ve elektrokatalitik özelliklerinin değiştiği bilinmektedir. Maddelerin elektrokatalitik özelliğinin belirlenmesinde ise en önemli kriter redoks davranışlarının belirlenmesidir. Redoks potansiyeli, kimyasal türlerin elektron alarak indirgenmelerinin ölçüsünü ifade etmektedir. Kimyasal türlerin elektrokatalitik özellikleri, elektrot sisteminde maddenin kendi çözücüsü içinde voltametrik ölçümlerle belirlenmektedir. Bu sebeple; TEMPO-ZnPc, n-MnPc, PANİ-N₃-MnPc komplekslerinin elektrokatalitik özelliklerinin belirlenmesi için elektrot sisteminde voltametrik ölçümler yapılmıştır.

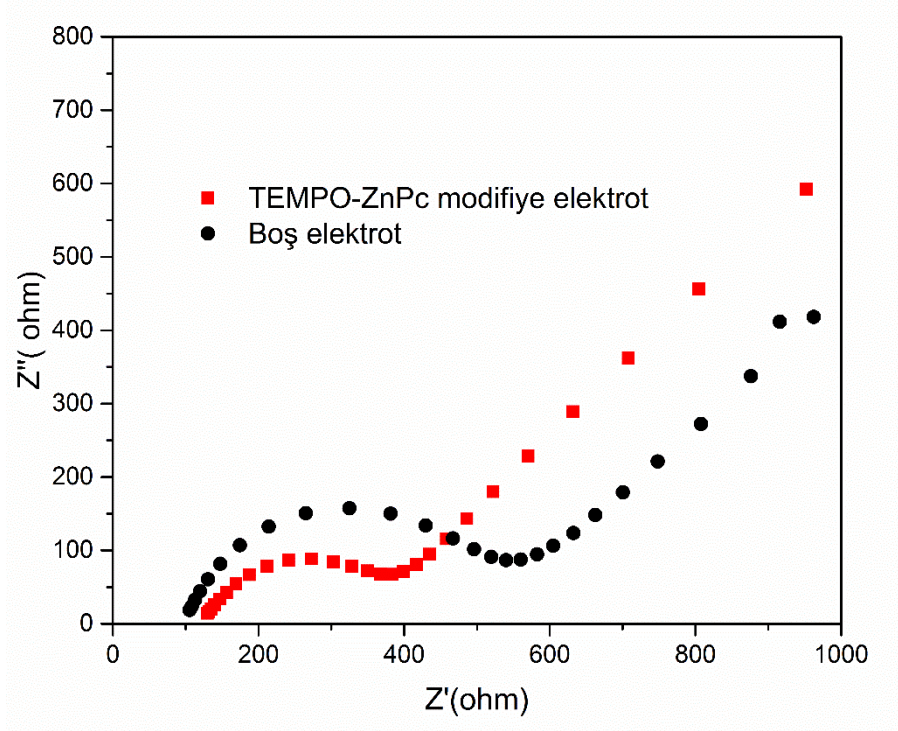
3.1.1. TEMPO-ZnPc kaplı elektrotun elektrokimyasal davranışı

Şekil 3.1’de TEMPO-ZnPc’nin DMSO/TBAP içinde SWV ve CV ölçümü grafikleri gösterilmiştir. TEMPO-ZnPc, DMSO/TBAP elektrolitte -1.28 V ’da $[\text{Zn}^{\text{II}}\text{Pc}^{3-}]^{1-}/[\text{Zn}^{\text{II}}\text{Pc}^{4-}]^{2-}$, -1.98 V ’da $[\text{Zn}^{\text{II}}\text{Pc}^{4-}]^{2-}/[\text{Zn}^{\text{II}}\text{Pc}^{5-}]^{3-}$ ve -0.83 V ’da $[\text{Zn}^{\text{II}}\text{Pc}^2]/[\text{Zn}^{\text{II}}\text{Pc}^{3-}]^{1-}$ çiftleri olmak üzere 3 tane yarı tersinir indirgenme süreci gözlenmiştir. Anodik potansiyel taramasında ise 0.83 V ’da ($\Delta E_p = 114\text{ mV}$, $I_{pa}/I_{pk} = 0,88$) oksidasyon piki gözlenmiştir. TEMPO-ZnPc kompleksinin farklı tarama hızlarında CV ölçüm grafiğinde tarama hızını arttırdıkça tersinirlikten yarı tersinirliğe doğru kayma gözlenmiştir. Grafik pik akımının, tarama hızının karekökü ile doğru orantılı olduğunu göstermektedir. Pozitif potansiyelde tarama yapıldığında ftalosiyaninin $+2$ ’den $+3$ ’e yükseltgendiği görülmektedir. Bu ölçümler sonucunda TEMPO-ZnPc kompleksi için ΔE_p değeri 114 mV bulunmuş ve yarı tersinir bir redoks mekanizması içerdiği anlaşılmıştır.



Şekil 3.1. TEMPO-ZnPc'nin DMSO/TBAP ortamı içinde GC elektrotta A) Değişik tarama hızlarında CV döngüleri, B) 0.100 Vs⁻¹ 'de SWV ölçümü.

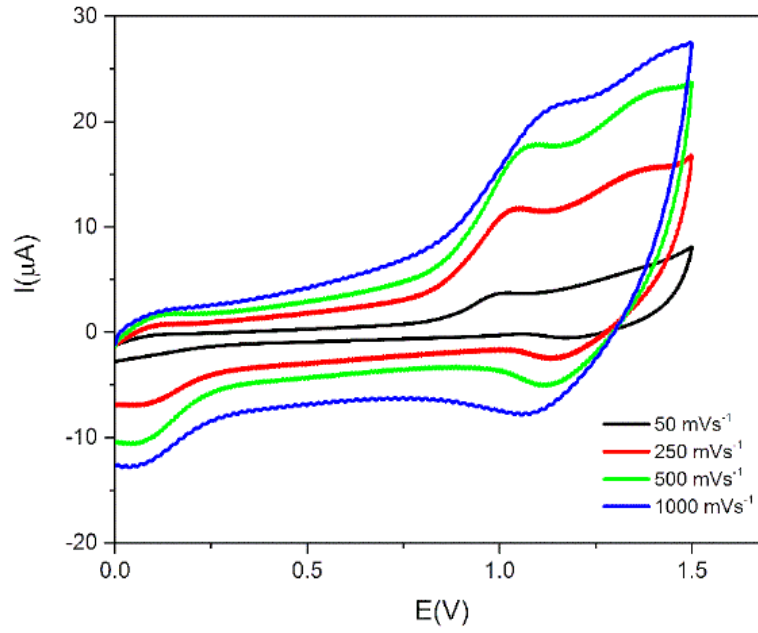
GCE/TEMPO-ZnPc elektrotun iletkenliğini saptamak için elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ölçümü yapılmıştır (**Şekil 3.2**). Grafik boş elektrotun gerçek direncinin TEMPO-ZnPc ile kaplandığında 550 ohm'dan 400 ohm'a düştüğünü göstermiştir. Boş elektrotla karşılaştırıldığında GCE/TEMPO-ZnPc çalışma elektrotunun direncinin azalmasına bağlı olarak iletkenliğinin arttığı ve sensör testi için uygun olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.2. GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrot ve boş elektrotun 0.01 mol dm⁻³ Ferrosiyanin çözeltisi içinde EIS ölçüm grafiği.

3.1.2. n-MnPc kaplı elektrotun elektrokimyasal davranışı ve GCE üzerine elektropolimerizasyonu

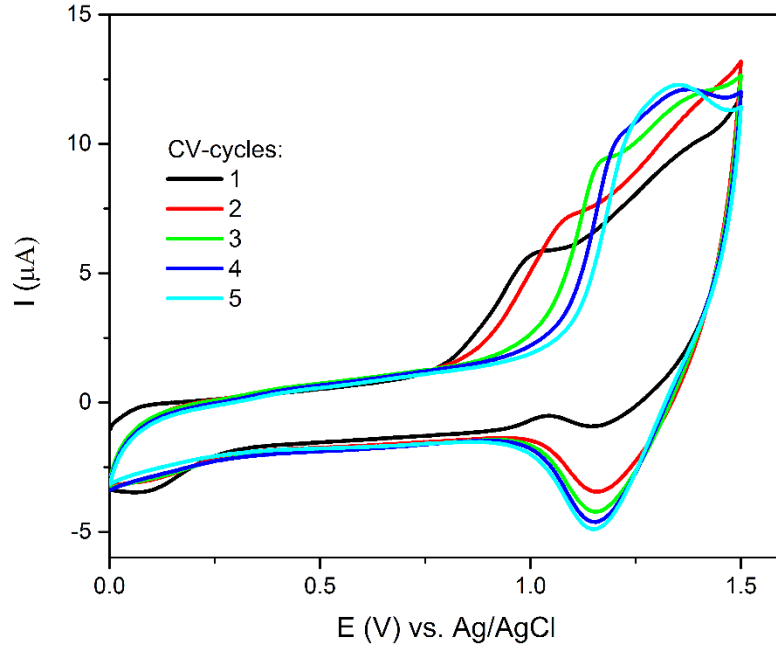
n-MnPc kompleksi -0.75 V ve -0.070 V'da iki adet indirgenme piki göstermiş ve -0.75 V'da Mn^{III}Pc/Mn^{II}Pc redoks reaksiyonu vermiştir. CV ölçümü pik akımının tarama hızının karekökü ile doğru orantılı olarak arttığını göstermektedir (**Şekil 3.3**). Tarama hızı arttırıldıkça n-MnPc kompleksinin yarı tersinir özelliğinin arttığı görülmüştür.



Şekil 3.3. n-MnPc'nin DCM/TBAP elektrolit ortamında GCE üzerinde N₂ altında Farklı tarama hızlarında CV ölçüm grafiği.

Elektrot modifiyesi, elektrokataliz süreçlerinde kullanılan en önemli parametredir. Elektrot yüzeyinin istenilen maddeyle kaplanma kalitesi, elektrotun sensör işlemlerinde kullanımını büyük oranda etkilemektedir. Biyosensör dizaynında analiti algılayacak olan maddenin elektrot yüzeyinde fiziksel veya kimyasal birçok immobilizasyon yöntemi kullanılmaktadır. Damlatıp kaplama (cast film), elektropolimerizasyon, fiziksel adsorblama sık kullanılan tekniklerindendir. AHL'lere yönelik biyosensör dizaynında reseptör molekül olarak test edilen n-MnPc GCE üzerine elektropolimerizasyon yöntemiyle immobilize edilmiştir.

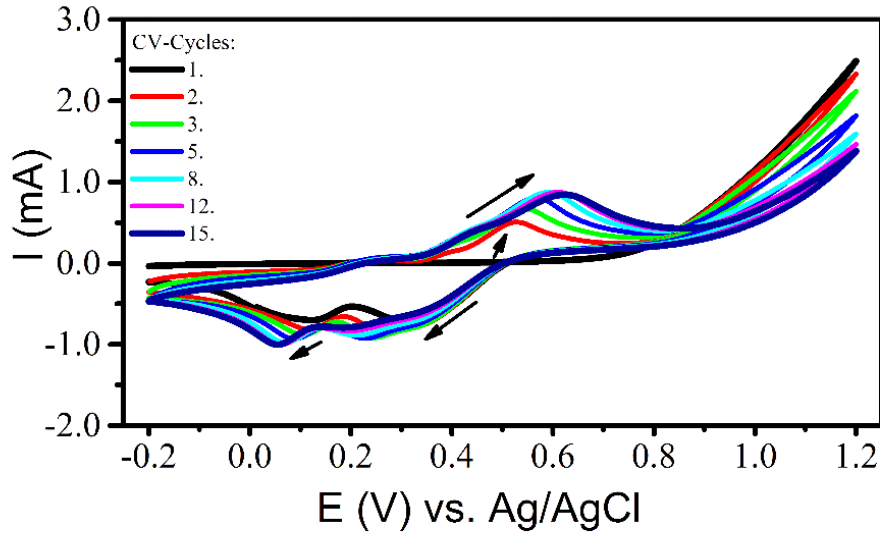
n-MnPc kompleksinin elektropolimerizasyonunun CV ölçümü **Şekil 3.4'**te gösterilmektedir. Elektropolimerizasyon sırasında n- MnPc kompleksinin en iyi redoks aktivite ve iletkenliğe gösterdiği potansiyel aralığı 0 - 1.5 V olarak bulunmuştur. İlk CV döngüsünde 1,1 V'da çıkan pikin, CV döngü sayısı arttırıldıkça kayma gösterdiği ve akımda da artma meydana geldiği gözlenmiştir.



Şekil 3.4. n-MnPc'nin 100 mV s^{-1} 'de GC elektrotta DCM/TBAP ortamında tekrar eden CV döngüleri.

3.1.3. PANİ-N₃-MnPc'nin ITO üzerine elektropolimerizasyonu

Sensör uygulamalarında metaloftalosiyeninlerin elektropolimerizasyon tekniği ile polimerleştirilerek aktif katalizörlerin elde edilmesiyle ilgili çalışmalar literatürde yer almaktadır [79,80]. Çalışmamızda AHL moleküllerinin sensör testinde kullanılmak üzere elektropolimerizasyon yöntemi kullanılarak ITO elektrot üzeri PANİ-N₃ filmi ile kaplanmıştır. 4-azidoanilin hidroklorit'in elektropolimerizasyonu sırasında kaydedilen CV ölçümü **Şekil 3.5**'te gösterilmektedir. 4-azidoanilin türü 0.53 V 'da ilk CV döngüsünde yükseltgenmiş ve tekrarlı CV döngüleri boyunca çalışma elektrotu üzerine elektropolimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. CV döngüleri arttıkça pik potansiyelleri de artış göstermiştir. CV ölçümü sonucunda elektropolimerizasyon sırasında karakteristik değişimler gözlenmiştir. Tekrarlı CV döngüleri boyunca akım yoğunluğu artışıyla birlikte piklerde kayma gözlenmiştir. Sonuçlar 4-azidoanilin türünün elektropolimerize olduğunu ve ITO'nun PANİ-N₃ filmi ile kaplandığını göstermiştir. ITO/PANİ-N₃ üzerindeki azit gruplarıyla MnPc kompleksinin terminal alkinil grubunun elektrokimyasal olarak bağlandığı düşünülmektedir.



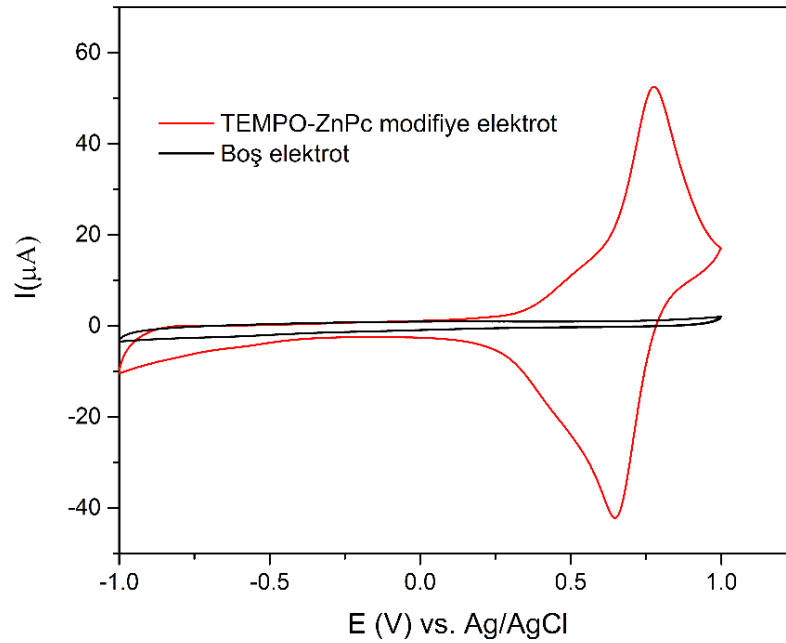
Şekil 3.5. 4-azidoanilin hidroklorit'in 100 mV s^{-1} 'de ITO üzerine DMSO/TBAP ortamında elektropolimerizasyonu.

Literatürdeki çalışmalarda CEC yöntemi ile modifiye elektrotların yapıldığı ve bunların elektrokimyasal sensör olarak kullanıldığı bildirilmektedir[81]. Çalışmamızda, CEC tekniği kullanılarak ITO/PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotu elde edilmiştir. CEC ile modifiye edilen elektrotların redoks özelliğinin arttığı gözlenmiştir. Elektropolimerizasyon tekniği kullanılarak 4-azidoanilin ITO üzerine modifiye edilmiş ve ITO/PANİ-N₃ elektrot MnPc komplekslerinin sabitlenmesi için azit kaynağı olarak kullanılmıştır. ITO/PANİ-N₃ elektrotun MnPc ile modifiye edilmesi için DMSO/TBAP çözeltisi içinde CEC tekniği kullanılarak -0.15 V sabit potansiyelde klik yapılmıştır. ITO, ITO/PANİ-N₃ ve ITO/PANİ-N₃-MnPc elektrotların H₂O/LiClO₄ ortamında SWV ölçümleri sonucunda ITO elektrotun herhangi bir redoks cevabı gözlenmezken ITO/PANİ-N₃ elektrot için 0 V yakınlarında PANİ-N₃'ün redoks piki bulunmuştur. ITO/PANİ-N₃-MnPc elektrot üzerinde hem Mn^{III}Pc/Mn^{II}Pc ait pikin hem de PANİ'ye ait pikin gözlenmesi PANİ-N₃-MnPc'nin klik olduğunu göstermektedir.

3.2. Modifiye Edilen Elektrotlar ile AHL Moleküllerinin Titrasyonu

3.2.1. TEMPO-ZnPc modifiye elektrotların AHL molekülleri ile titrasyonu

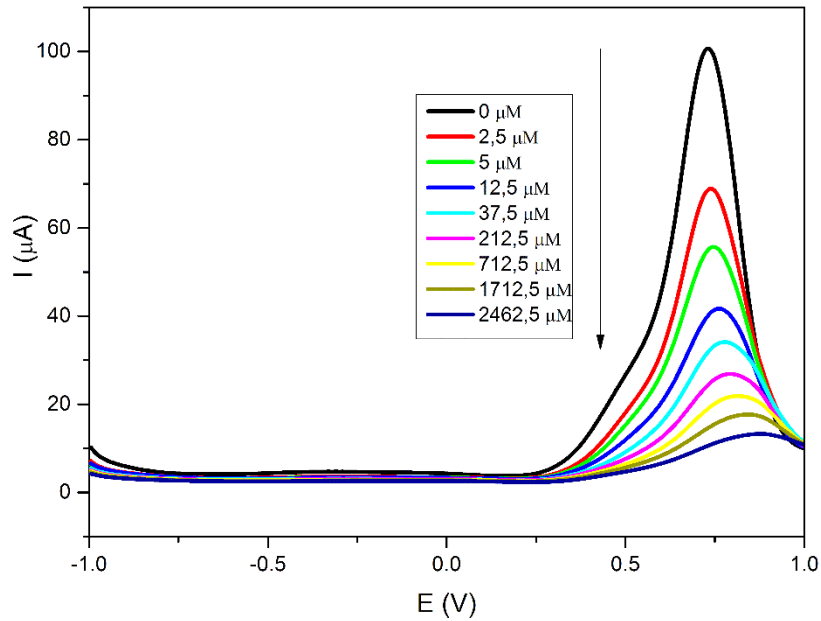
Sensör elektrotunu hazırlamak amacıyla GC elektrotlar damlatıp kaplama tekniği ile TEMPO-ZnPc kompleksi ile kaplanmış ve GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrot yapılmıştır. GCE/TEMPO-ZnPc elektrodun 0.73 V'da (pH 7,4 vs. Ag/AgCl) yarı tersinir oksidasyon piki göstermektedir (Şekil 3.6). Bu piki TEMPO gruplarının oksidasyonlarıyla ilişkilendirildiği literatürde belirtilmektedir [75].



Şekil 3.6. GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrot ve boş elektrotun LiClO₄/H₂O içinde CV ölçüm grafiği.

Redoks aktivitesi ve iletkenliği belirlenen GCE/TEMPO-ZnPc modifiye çalışma elektrotu AHL sensörü olarak test edilmiştir. Kararlılığı test edildikten sonra modifiye elektrotlar 3 oxo C₁₂ HSL, C₁₀ HSL, C₈ HSL, C₆ HSL, C₄ HSL ile ayrı ayrı titre edilmiş ve artan AHL konsantrasyonuna göre GCE/TEMPO-ZnPc elektrotların SWV ölçümleri kaydedilmiştir. Ölçümler sonucunda test edilen AHL moleküllerinin hepsi için akımda değişimler gözlenmiş fakat elektrot hassasiyetinin her bir AHL molekülü için farklı

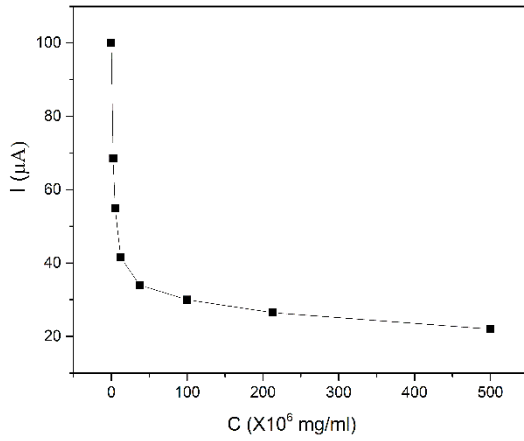
olduğu sonucuna varılmıştır. GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrotla 3 oxo C₁₂ HSL'nin titrasyonu sırasında SWV ölçümleri incelenerek, inceleme sonucunda elde edilen sonuç Şekil 3.7 'de gösterilmiştir. SWV ölçümlerinde GCE/TEMPO-ZnPc elektrotun 3 oxo C₁₂ HSL ile titrasyonunda, bu molekülün diğer AHL moleküllerine göre daha yüksek düzeyde algılandığı tespit edilmiştir. Sensör testinde pik akımındaki değişim tüm AHL molekülleri için gözlenirken, akımın azalmasıyla beraber pik kayması sadece 3 oxo C₁₂ HSL'de gözlenmiştir. Grafikteki pik, TEMPO grubunu temsil etmektedir. Sisteme AHL molekülü eklendiğinde, maddenin AHL ile etkileşiminden dolayı bu pik üzerinde değişim meydana gelmiştir. Grafikten de anlaşıldığı gibi 3 oxo C₁₂ HSL'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak pik akımının azaldığı ve pik potansiyelinin 0.73 V'dan 0.88 V'a kaydığı gözlenmiştir.



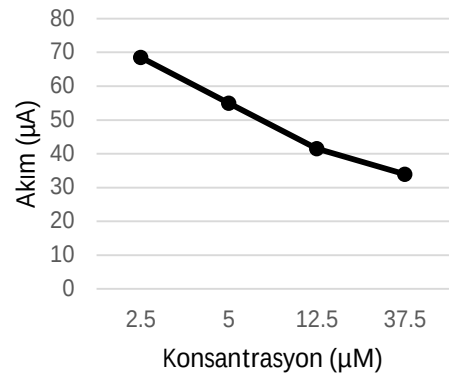
Şekil 3.7. GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrotun farklı konsantrasyonlarda 3 oxo C₁₂ HSL içeren LiClO₄/H₂O içinde SWV ölçüm grafiği.

3 oxo C₁₂ HSL molekülünün artan konsantrasyonuna bağlı olarak akımdaki değişimi gösteren kalibrasyon grafiği verilmiştir (Şekil 3.8). Kalibrasyon grafiğine göre GCE/TEMPO-ZnPc elektrotun 3 oxo C₁₂ HSL molekülünü 2.32×10^{-6} – 39.90×10^{-6} mol dm⁻³ konsantrasyonları arasında lineer grafik elde edilmiştir. Bir biyosensörün uygun bir

kararlılıkla ölçebildiği en düşük analit konsantrasyonu “Algılama sınırı (LOD)” olarak bilinmektedir. Algılama sınırı, $LOD = \frac{3 \times \sigma}{m}$ formülü ile hesaplanmaktadır. Burada “ σ ” elektrot kararlılığını tespit etmede alınan 10 tane SWV ölçümünün standart sapması, “ m ” ise kalibrasyon grafiğindeki eğim değeridir. Kalibrasyon grafiğine bakılarak GCE/TEMPO-ZnPc elektrotun 3 oxo C₁₂ HSL molekülü için algılama sınırı 1.80×10^{-6} mol dm⁻³ olarak bulunmuştur. Bu veriler sonucunda AHL molekülünün amino grupları ile TEMPO-ZnPc molekülündeki TEMPO radikal grupları arasında etkileşim olduğu düşünülmektedir.



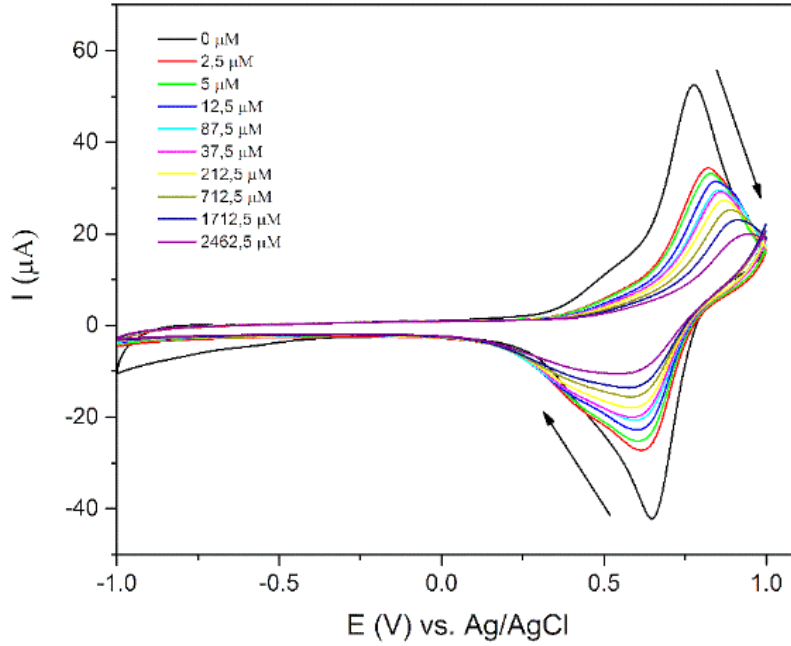
(a)



Equation	y = a + b*x
Plot	B
Weight	No Weighting
Intercept	71.61538 ± 5.68789
Slope	-2.49231 ± 0.71947
Residual Sum of Squares	28.03846
Pearson's r	-0.96077
R-Square(COD)	0.92308
Adj. R-Square	0.84615

(b)

Şekil 3.8. Kalibrasyon grafiği; SWV pik akımı ile LiClO₄/H₂O elektrolitteki 3 oxo C₁₂ HSL konsantrasyonu arasındaki ilişki (a), Akım konsantrasyon grafiği ve grafiğine göre hesaplanan R² değeri (b).



Şekil 3.9. GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrotun farklı konsantrasyonlarda 3 oxo C₁₂ HSL içeren LiClO₄/H₂O içinde 100 mVs⁻¹ tarama hızında kaydedilen CV ölçümü.

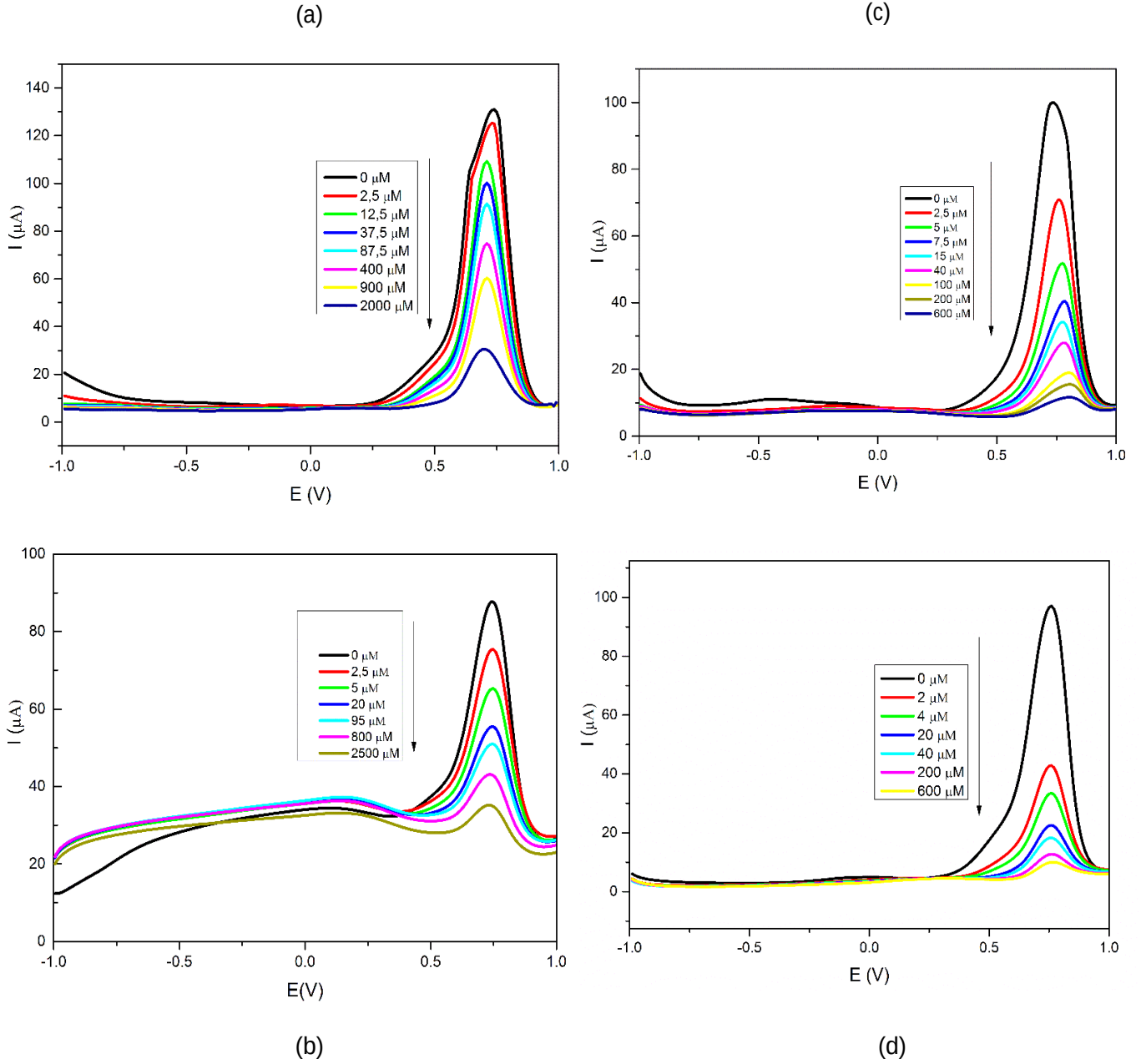
TEMPO-ZnPc modifiye elektrotun 3 oxo C₁₂ HSL'nin farklı konsantrasyonlarında kaydedilen CV ölçümü gösterilmektedir (**Şekil 3.9**). Grafikte AHL molekülünün artan konsantrasyonu ile beraber, maddenin pik akımının azaldığı, pik potansiyelinin ise artarak kayma gösterdiği görülmektedir. GCE/TEMPO-ZnPc elektrotla C₄ HSL, C₆ HSL, C₈ HSL, C₁₀ HSL'nin titrasyonu sırasında kaydedilen SWV ölçümleri gösterilmiştir (**Şekil 3.10**). Daha düşük karbon sayısına sahip diğer AHL'lerin elektrokimyasal sisteme eklenmesiyle ölçümlere göre yine akımda azalma görülürken, TEMPO pikinde kayda değer bir kayma gözlenmemiştir. Diğer AHL molekülleri için algılama aralığı ve LOD değerleri verilmiştir (**Tablo 3.1**). GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrotla AHL moleküllerinin titrasyonu sonucunda kaydedilen SWV ölçümlerinde gözlenen farklı cevaplar AHL moleküllerinin yapısal farklılıkları ile ilişkilendirilmektedir. 3 oxo C₁₂ HSL molekülü amino grubuna yakın 3 karbonil grubuna sahipken, diğer moleküller sadece 2 karbonil grubuna sahiptir. Bu durumun sensör ölçümleri sırasında SWV cevaplarında farklılıklara sebep olduğu düşünülmektedir. Moleküler yapılarına bağlı olarak özellikle diğer AHL molekülleri için pik akımı değişimlerinin gücü 3 oxo C₁₂ HSL'ye göre daha düşük kalmaktadır. Elde edilen bu

bilgiler ışığında GCE/TEMPO-ZnPc elektrotun, 3 oxo C₁₂ HSL molekülünü yüksek hassasiyette ve seçicilikle algıladığı görülmektedir.

Literatüre bakıldığında AHL moleküllerini saptamak için optik ve elektrokimyasal biyosensör çalışmalarının olduğu görülmektedir. Optik çalışmalarda enzim, substrat ve mutant bakteri suşları kullanılmaktadır. Zhongjian Li ve arkadaşları *P. aeruginosa*'nın QS sinyal moleküllerinden olan 3 oxo C₁₂ HSL'yi saptamaya yönelik bakteri bazlı biyosensör çalışması yapmışlardır. Çalışmalarında 3 oxo C₁₂ HSL'yi saptamak için canlı bakteri hücreleriyle biyoelektrokimyasal sistem kurmuş ve potansiyometrik analizler yapmışlardır. Anot ve katottan oluşan elektrokimyasal sistemde AHL moleküllerinin analizinin 115 saate varan uzun süreçler aldığı belirtilmektedir [82]. Buna karşı çalışmamızda kurduğumuz elektrokimyasal sistemde GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrot kullanımıyla ve voltametrik ölçümlerle AHL saptama işlemi 5 dakikaya indirilmiştir. Anjali Struss ve arkadaşları AHL moleküllerine yönelik yaptıkları optik biyosensör çalışmasında, beta galaktosidaz enzimi ve kromojenik substrat olarak X-gal kullandıkları belirtilmektedir. Fakat bu çalışmalarda kullanılan enzimlerin protein yapılarından kaynaklı farklı ısı ve pH'larda yapısal bozulmaya uğraması ve farklı kimyasal maddelerin kullanımından kaynaklı standardizasyon zorluğu gibi dezavantajlar ortaya çıktığı belirtilmektedir [83]. Çalışmamızda, AHL moleküllerini tespit etmede enzim kullanımını yerine daha dayanıklı olduğu düşünülen metaloftalosiyanın kullanılmıştır. Metaloftalosiyanın bazlı elektrokimyasal biyosensör çalışmasının, enzim veya substrat kullanımı olmadan yapılan öncü AHL saptama çalışması olduğu düşünülmektedir.

AHL moleküllerini tespit etmeye yönelik yapılan elektrokimyasal çalışmalara bakıldığında, PQS moleküllerinin ve 3 oxo C₁₂ HSL moleküllerinin algılanabildiği görülmüştür [84-86]. GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrot kullanılarak yaptığımız AHL saptama çalışmasında ise elektrokimyasal sistemde 3 oxo C₁₂ HSL'nin yanısıra, C₄ HSL, C₆ HSL, C₈ HSL ve C₁₀ HSL moleküllerinin de farklı konsantrasyon aralıklarında saptanabildiği SWV ölçümleriyle gösterilmiştir. Literatürde AHL moleküllerini saptamak için 2010 yılında Struss ve arkadaşlarının yaptığı optik biyosensörde 1.00x10⁻⁸ molL⁻¹, 2014 yılında Sahari ve arkadaşlarının yaptığı bakteri bazlı biyosensörde ise 1.00x10⁻⁹ molL⁻¹ algılama limitinde AHL molekülü saptandığı belirtilmektedir.

GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrot ile yaptığımız AHL saptama çalışmasında bu algılama limitinden 100 kat daha az algılama limiti elde edilmiştir.



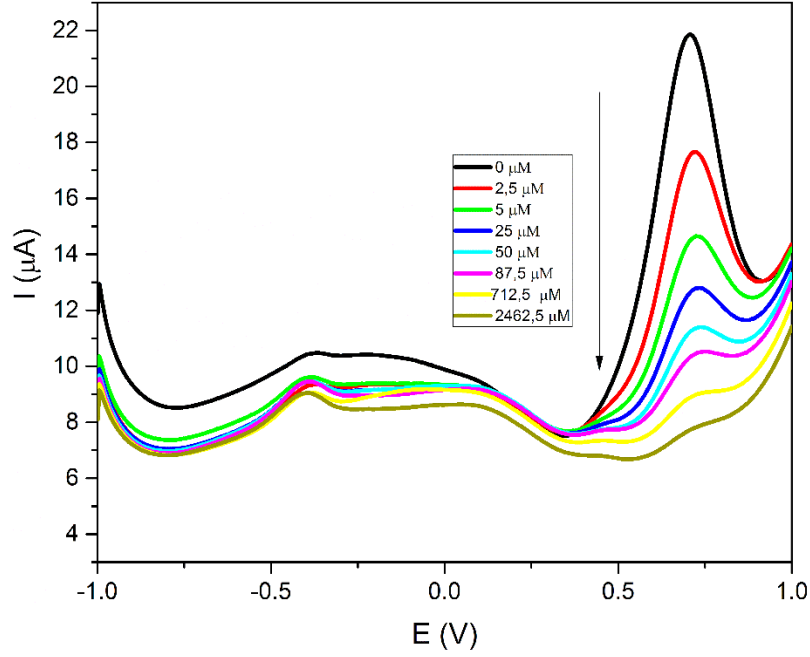
Şekil 3.10. GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrotun farklı konsantrasyonlarda C₄-HSL (a) ve C₆ HSL (b) içeren LiClO₄/H₂O içinde SWV ölçüm grafiği, GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrotun farklı konsantrasyonlarda C₈-HSL (c) ve C₁₀ HSL (d) içeren LiClO₄/H₂O içinde SWV ölçüm grafiği.

Tablo 3.1. GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrot ile çeşitli AHL moleküllerinin titrasyonu sonucu algılanan konsantrasyon aralıkları ve LOD değerleri.

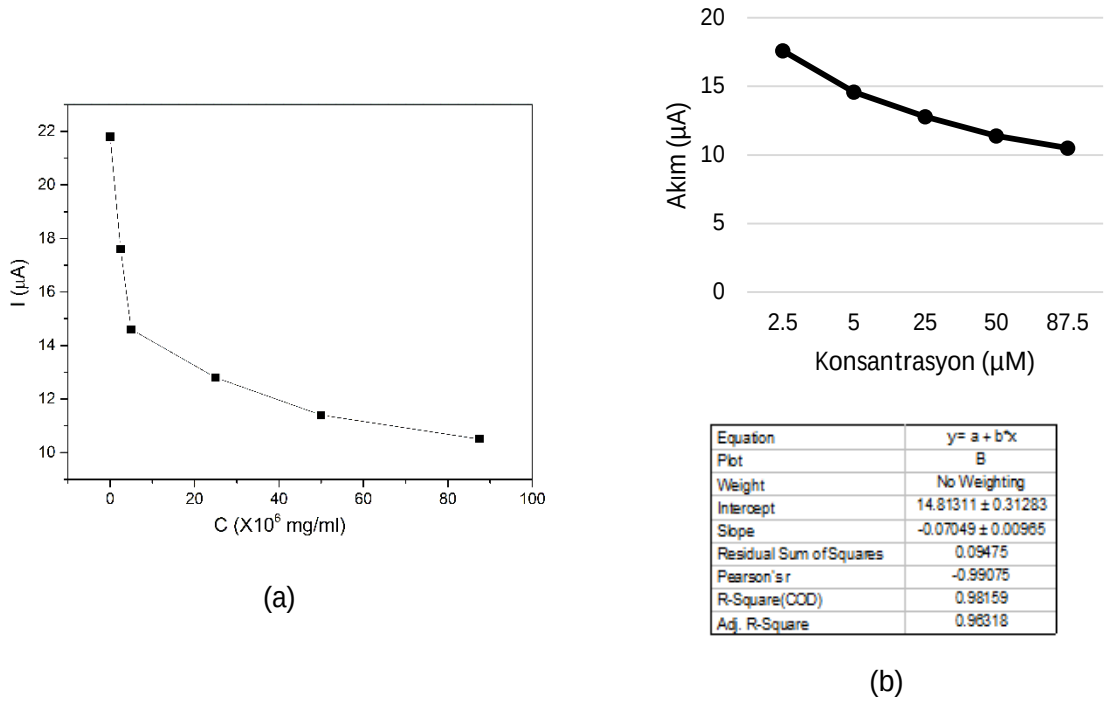
AHL Molekülleri	Algılama Aralığı (mol dm ⁻³)	LOD (mol dm ⁻³)
3 oxo C ₁₂ HSL	2.32x10 ⁻⁶ – 39.90x 10 ⁻⁶	1.80x10 ⁻⁶
C ₁₀ HSL	4.00x10 ⁻⁶ – 40.00x10 ⁻⁶	9.00x10 ⁻⁶
C ₈ HSL	7.50x10 ⁻⁶ - 40.00x10 ⁻⁶	10.00x10 ⁻⁶
C ₆ HSL	5.00x10 ⁻⁶ – 20.00x10 ⁻⁶	4.50x10 ⁻⁶
C ₄ HSL	12.50x10 ⁻⁶ – 87.50x10 ⁻⁶	6.50 x10 ⁻⁶

3.2.2. TEMPO-ZnPc modifiye elektrotla süt içindeki 3 oxo C₁₂ HSL molekülünün algılanması

GCE/TEMPO-ZnPc elektrotun AHL sensörü olarak kullanımını pratikte görmek amacıyla 3 oxo C₁₂ HSL molekülü içeren süt örneği modifiye elektrotla test edilmiştir. 3 oxo C₁₂ HSL molekülü süt içine eklenmeden önce TEMPO grubunun piki 0.72 V olarak kaydedilmiştir. 3 oxo C₁₂ HSL süt içine eklenmiş ve artan konsantrasyonla SWV ölçümlerinde yine pik akımında azalma meydana geldiği ve pik potansiyelinde 0.70 V'dan 0.76 V'a kayma olduğu gözlenmiştir (**Şekil 3.11**). Ölçümlerden elde edilen kalibrasyon grafiği GCE/TEMPO-ZnPc elektrotun, sütte bulunan 3 oxo C₁₂ HSL molekülünü 5.60x10⁻⁶- 87.50x10⁻⁶ mol dm⁻³ konsantrasyon aralığında algıladığını göstermiştir. 3 oxo C₁₂ HSL molekülünün sütte algılanma sınırı 37.50 x10⁻⁶ mol dm⁻³ olarak tespit edilmiştir (**Şekil 3.12**). Bu sonuçlar GCE/TEMPO-ZnPc elektrotun AHL sensörü olarak süt örneği gibi gerçek numunelerde de kullanılabileceği düşünülmektedir.



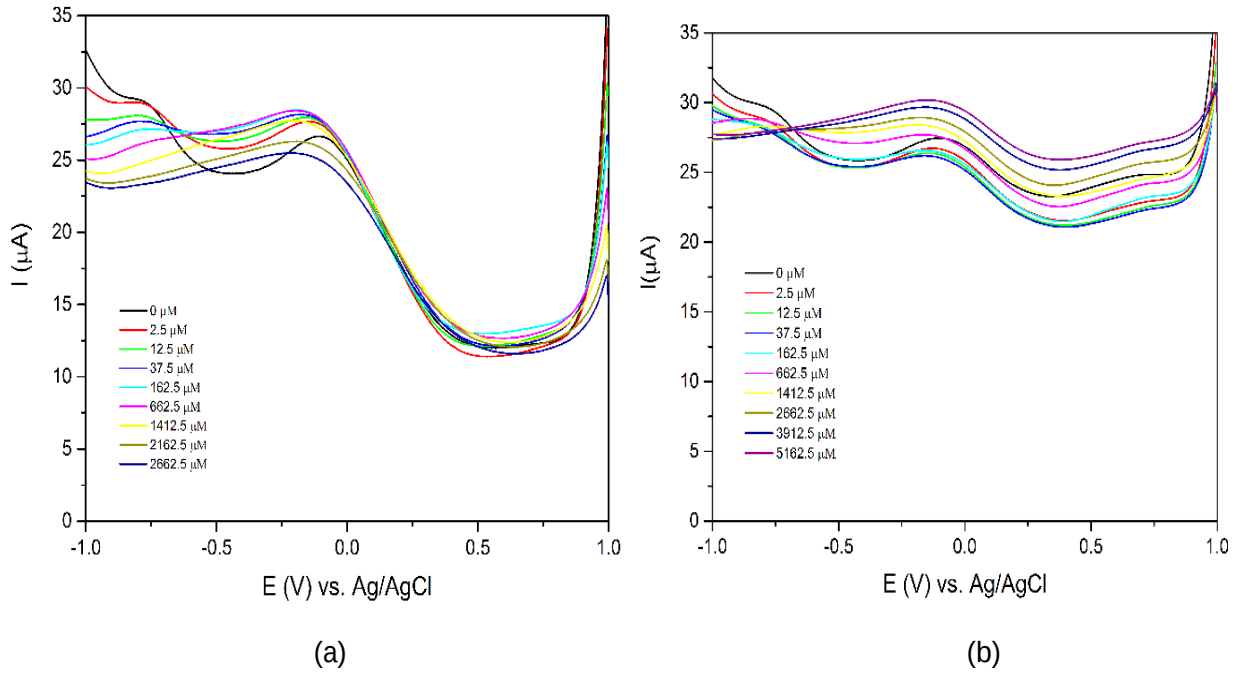
Şekil 3.11. GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrotun farklı konsantrasyonlarda 3 oxo C₁₂ HSL içeren süt örneği içinde SWV ölçüm grafiği.



Şekil 3.12. Kalibrasyon grafiği; SWV pik akımı ile süt örneği içindeki 3 oxo C₁₂ HSL konsantrasyonu arasındaki ilişki (a), Akım konsantrasyon grafiği ve grafiğine göre hesaplanan R² değeri (b).

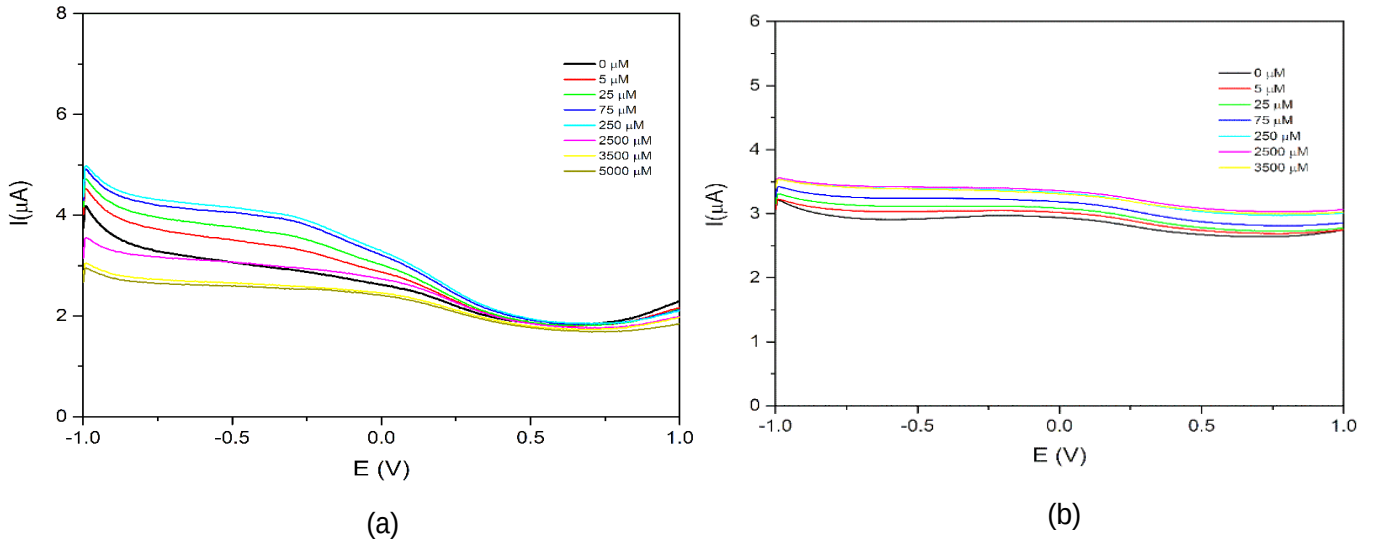
3.2.3. n-MnPc ve TiPc modifiye elektrotların AHL Molekülleri ile titrasyonu

n-MnPc kompleksiyle kaplanan elektrotların önce PBS (Fosfat tamponu) çözeltisi içinde SWV ölçümleriyle kararlılığı belirlenmiştir. Elektrot kararlılığı ölçümünden sonra GCE/n-MnPc modifiye elektrot C₄ HSL, C₆ HSL, C₈ HSL, C₁₀ HSL, 3 oxo C₁₂ HSL ile PBS içinde titre edilmiştir. Uzun karbon zincirine sahip 3 oxo C₁₂ HSL ve kısa karbon zincirli C₄ HSL molekülleri ile GCE/n-MnPc modifiye elektrotun titrasyonu sırasında kaydedilen SWV ölçümünü gösterilmektedir (Şekil 3.13). Grafikte her iki gruptan AHL molekülü için de, artan AHL konsantrasyonu ile birlikte n-MnPc pikinde önemli bir kayma gözlenmemiştir. Bununla beraber madde akımında da önemli bir değişime rastlanmamıştır.



Şekil 3.13. GCE/n-MnPc modifiye elektrotun 0,1 M PBS içinde farklı konsantrasyonlardaki 3 oxo C₁₂ HSL (a) ve C₄ HSL (b) ile titrasyonu sırasında kaydedilen SWV ölçüm grafiği.

TiPc/GCE modifiye elektrotlar farklı AHL molekülleri ile distile su/ LiClO_4 çözeltisi içinde titre edilmiştir. Elektrokimyasal sistemde C_4 HSL, C_6 HSL, C_8 HSL, C_{10} HSL, 3 oxo C_{12} HSL' nin titrasyonu SWV ölçümleriyle incelenmiştir. GCE/TiPc modifiye elektrotun AHL molekülleriyle titrasyonu sırasında kaydedilen SWV ölçüm grafiği verilmiştir (Şekil 3.14). Grafiğe göre çeşitli AHL moleküllerinin artan konsantrasyonuyla birlikte akımda veya maddenin pik değerinde bir değişiklik olmadığı görülmüştür.



Şekil 3.14. GCE/TiPc modifiye elektrotun farklı konsantrasyonlarda 3 oxo C_{12} HSL ve C_4 HSL içeren $\text{LiClO}_4/\text{H}_2\text{O}$ içinde SWV ölçüm grafiği.

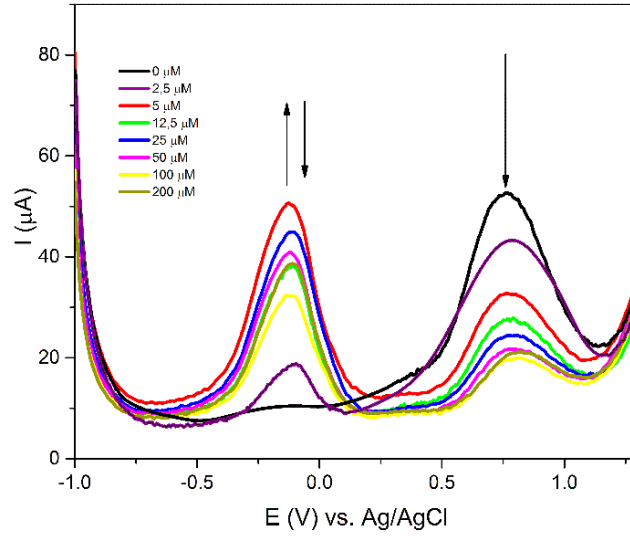
Elde edilen verilere göre TiPc ve n-MnPc ile modifiye edilen elektrotların C_4 HSL, C_6 HSL, C_8 HSL, C_{10} HSL 3 oxo C_{12} HSL molekülleri için sensör özelliği göstermediği ve bu metaloftalosiyeninlerle AHL molekülleri arasında herhangi bir etkileşim olmadığı sonucuna varılmıştır.

3.2.4. PANİ- N_3 -MnPc modifiye elektrotların AHL molekülleri ile titrasyonu

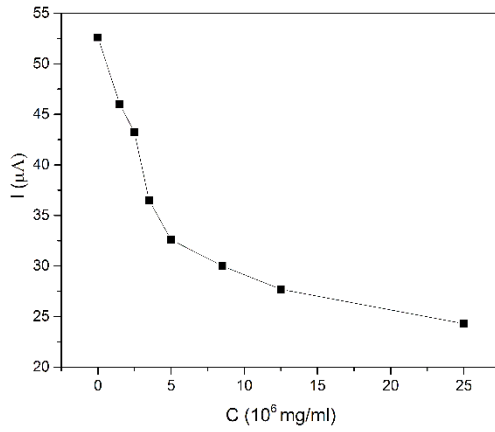
ITO/PANİ- N_3 -MnPc modifiye çalışma elektrotu AHL sensörü olarak test edilmiştir. Kararlılığı test edildikten sonra modifiye elektrotlar C_4 HSL, C_6 HSL, C_8 HSL, C_{10} HSL 3 oxo C_{12} HSL ile ayrı ayrı titre edilmiş ve artan AHL konsantrasyonuna göre GCE/TEMPO-ZnPc elektrotların SWV ölçümleri kaydedilmiştir. Ölçümler sonucunda

test edilen AHL moleküllerinin hepsi için akımda değişimler gözlenmiş fakat elektrot hassasiyetinin her bir AHL molekülü için farklı olduğu sonucuna varılmıştır.

C₁₀ HSL ile titrasyonu sırasında kaydedilen SWV ölçümünü gösterilmektedir (**Şekil 3.15**). Grafiğe göre C₁₀ HSL'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak akımın giderek azaldığı ve modifiye elektrot pikinde 0.76 V'dan 0.85 V'a pik kayması olduğu belirlenmiştir. Ayrıca -0.11 V'da yeni pik çıkışı gözlenmiştir. Elde edilen bu pik kayması C₁₀ HSL'nin amin grupları ile arasındaki etkileşimi göstermektedir. AHL molekülünün artan konsantrasyonuyla birlikte oluşan pik kayması ve akımdaki azalış göz önünde bulundurularak ITO/PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotun potansiyometrik ve amperometrik AHL sensörü olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. ITO/PANİ-N₃-MnPc elektrotun merkezindeki Mn (III)'ün çeşitli elektron alan gruplarla aksiyel olarak koordine olduğu literatürde yer almaktadır [78]. Aksiyel ligand elektron transfer reaksiyonu sırasında çeşitli gruplarla kolayca değişebilmektedir. C₁₀ HSL molekülü ile ITO/PANİ-N₃-MnPc elektrotun titrasyonu sırasında kaydedilen voltametrik ölçümler sonucunda C₁₀ HSL'nin amin grubu ile elektrot merkezindeki Mn (III) arasında etkileşim olduğu düşünülmektedir. C₁₀ HSL'nin Mn (III) merkezine koordinasyonu Mn (III)'ün Mn (II)'ye indirgenme afinitesinde azalma meydana getirmekte, bu sebeple potansiyel kaymasıyla beraber pik Mn (III)/ Mn(II) süreci akım gücünde azalma oluşturmaktadır. AHL moleküllerinin yapısındaki farklılıklar modifiye elektrotun merkezinde bulunan Mn (III)'e bağlanma afinitelerinin gücünü değiştirmektedir. AHL moleküllerinin saptanmasına yönelik birkaç elektrokimyasal çalışma yapılmıştır. Donglei Jiang ve arkadaşları AHL moleküllerinin saptanması için mast hücre bazlı elektrokimyasal çalışma yapmışlar ve 3 oxo C₁₂ HSL için voltametrik değişimler elde edilmiş, diğer AHL moleküllerinde değişim gözlenmemiştir [87,82]. Çalışmamızda, ITO/PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotun sadece 3 oxo C₁₂ HSL için değil C₈ HSL ve C₁₀ HSL içinde seçici sensör olarak kullanılabiliirliğinden bahsedilebilmektedir. C₁₀ HSL molekülünün artan konsantrasyonuna bağlı olarak akımdaki değişimi kalibrasyon grafiği verilmiştir (**Şekil 3.15**).



(a)



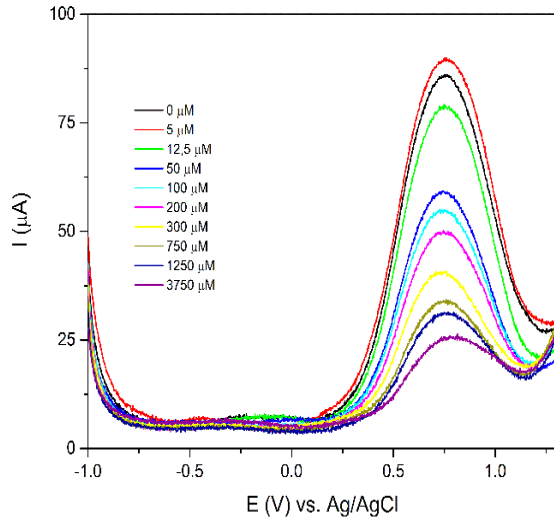
(b)

Equation	$y = a + b \cdot x$
Plot	B
Weight	No Weighting
Intercept	123.1219 ± 1.81212
Slope	$-0.00472 \pm 5.63014E-4$
Residual Sum of Squares	4.38826
Pearson's r	-0.98808
R-Square(COD)	0.97236
Adj. R-Square	0.95854

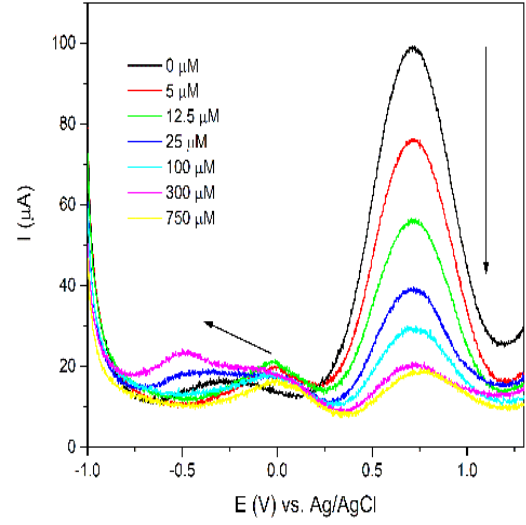
(c)

Şekil 3.15. ITO/PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotun farklı konsantrasyonlarda C₁₀ HSL içeren LiClO₄/H₂O içinde SWV ölçüm grafiği (a), Kalibrasyon grafiği; SWV pik akımı ile LiClO₄/H₂O elektrolitteki C₁₀ HSL konsantrasyonu arasındaki ilişki (b). Kalibrasyon grafiğine göre hesaplanan R² ve eğim değerleri (c).

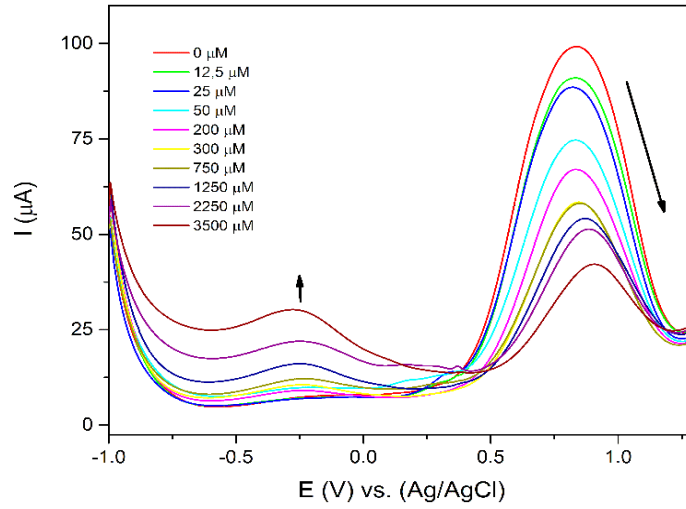
ITO/PANİ-N₃-MnPc elektrotla C₁₀ HSL molekülünün titrasyonu için 2.50×10^{-6} – 12.50×10^{-6} mol dm⁻³ konsantrasyonları arasında lineer bir grafik elde edilmiş ve algılama sınırı 1.30×10^{-6} mol dm⁻³ olarak bulunmuştur. ITO/PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotun diğer AHL molekülleri ile titrasyon grafikleri verilmiştir (**Şekil 3.16**). C₈ HSL için 0.74 V'dan 0.80 V'a pik kayması, 3 oxo C₁₂ HSL için 0.83 V'dan 0.93 V'a pik kayması ve -0.2 V civarında pik akımında artış belirlenmiştir. C₄ HSL için kayda değer pik kayması gözlenmemiştir. SWV ölçümleri sonucunda ITO/PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotun 3 oxo C₁₂ HSL için 12.50×10^{-6} – 300.00×10^{-6} mol dm⁻³ konsantrasyonları arasında 10.00×10^{-6} mol dm⁻³ hassasiyette algıladığı ve C₈ HSL için 12.50×10^{-6} - 50.00×10^{-6} mol dm⁻³ konsantrasyonları arasında 3.00×10^{-6} mol dm⁻³ hassasiyette algıladığı belirlenmiştir. ITO/PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotla yapılan sensör testinde SWV ölçümlerinde görülen elektrokimyasal cevaplardaki değişikliklerin AHL'lerin içerdiği karbon zinciri uzunluğundan ve yapılarındaki farklı substitüentlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Uzun karbon zincirine sahip olan AHL'lerin sisteme eklenmesiyle ITO/PANİ-N₃-MnPc elektrotun pik akımında azalma olduğu ve negatif bölgede yeni pik çıkışı meydana geldiği, kısa karbon zincirli olan C₄ HSL sisteme eklendiğinde ise yeni pik çıkışı olmadığı gözlenmiştir. C₁₀ HSL ile titrasyonunda, bu molekülün diğer AHL moleküllerine göre daha yüksek düzeyde algılandığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmanın diğer AHL saptama metodlarına göre en büyük avantajı testin çok kısa bir sürede sonuç vermesidir. Bunun yanısıra metaloftalosiyanın moleküler yapılarından kaynaklanan yüksek stabilite sebebiyle AHL saptamaya yönelik çeşitli optik yöntemlerdeki enzim, substrat kullanımında karşılaşılan dezavantajları gidermesidir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 3.16. ITO/PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotun farklı konsantrasyonlarda C₄ HSL içeren LiClO₄/H₂O içinde SWV ölçüm grafiği (a), farklı konsantrasyonlarda C₈ HSL içeren LiClO₄/H₂O içinde SWV ölçüm grafiği (b), farklı konsantrasyonlarda 3 oxo C₁₂ HSL içeren LiClO₄/H₂O içinde SWV ölçüm grafiği (c).

Tablo 3.2. GCE/TEMPO-ZnPc ve ITO/PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotlarla çeşitli AHL moleküllerinin titrasyonu sonucu algılanan konsantrasyon aralıkları ve LOD değerleri.

AHL Molekülleri	GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrot		GCE/PANİ-N ₃ -MnPc modifiye elektrot	
	Algılama Aralığı (mol dm ⁻³)	LOD (mol dm ⁻³)	Algılama Aralığı (mol dm ⁻³)	LOD (mol dm ⁻³)
3oxo C ₁₂ HSL	2.32x10 ⁻⁶ – 39.90x10 ⁻⁶	1.80x10 ⁻⁶	12.50x10 ⁻⁶ –300.00x10 ⁻⁶	10.00x10 ⁻⁶
C ₁₀ HSL	4.00x10 ⁻⁵ – 40.00x10 ⁻⁵	9.00x10 ⁻⁵	2.50x10 ⁻⁶ –12.50x10 ⁻⁶	1.30x10 ⁻⁶
C ₈ HSL	7.50x10 ⁻⁶ - 40.00x10 ⁻⁶	10.00x10 ⁻⁶	12.50x 10 ⁻⁶ - 50.00x 10 ⁻⁶	3.00x10 ⁻⁶
C ₆ HSL	5.00x10 ⁻⁶ – 20.00x10 ⁻⁶	4.50x10 ⁻⁶	-	-
C ₄ HSL	12.50x10 ⁻⁶ –87.50x10 ⁻⁶	6.50 x10 ⁻⁶	-	-

Elde edilen bulgular, kurulan elektrokimyasal sistemde TEMPO-ZnPc ve PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotların AHL molekülleri ile etkileşime girerek oksidasyon redüksüyon süreçlerini başlattığını ve buna bağlı olarak AHL moleküllerinin belirli konsantrasyon aralıklarında saptanabildiğini göstermiştir. GCE/TEMPO-ZnPc ve ITO/PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotlarla çeşitli AHL moleküllerinin titrasyonu sonucu algılanan konsantrasyon aralıkları ve LOD değerleri gösterilmiştir (**Tablo 3.2**). TiPc ve n-MnPc modifiye elektrotlarla AHL moleküllerinin titrasyonu sonucunda ise elektrokimyasal sistemde SWV ve CV ölçümleri sonucunda önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. TEMPO-ZnPc ve PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotla çeşitli AHL moleküllerinin sensör testinde kaydedilen SWV ve CV ölçümleri farklı AHL'lerin moleküler yapısındaki farklılıklara göre saptanabilirliğinin ve saptanan konsantrasyon aralığının değiştiği düşünülmektedir. GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrotla 3 oxo C₁₂ HSL'nin, PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotla ise uzun karbon zincirine sahip AHL'lerin algılanmasında en yüksek hassasiyet görülürken, kısa zincirli AHL'ler için değişim görülmemiştir. Leo Eberl ve arkadaşlarının 2010 yılında sensör bakteri suşlarını kullanarak yaptığı AHL saptama çalışmasında da uzun karbon zincirine sahip olan AHL'lerin yüksek düzeyde saptanabildiği, kısa karbon zincirine

sahip AHL'ler için çok hassas sensör bakteri suşlarının gerektiğini belirtmiştir. Brendan P. Burns ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı AHL sensörü çalışmasında yine en yüksek düzeyde 3 oxo C₁₂ HSL, C₁₂ HSL ve C₁₀ HSL'nin tespit edildiği belirtilmiştir. Çalışmamızda elektrokimyasal sistemde ITO/PANI-N₃-MnPc modifiye elektrotla çeşitli AHL moleküllerinin titrasyonu sonucunda, uzun karbon zincirli AHL'lerden C₁₀ HSL, 3 oxo C₁₂ HSL ve C₈ HSL tespit edilmiştir. TEMPO-ZnPc modifiye elektrotla ise yine uzun karbon zincirli 3 oxo C₁₂ HSL en yüksek hassasiyette algılanan molekül olmuştur. Bu bilgiler ışığında literatürdeki AHL saptama çalışması sonuçlarının çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularla örtüştüğü görülmektedir. Jiang H. ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları elektrokimyasal AHL sensörü çalışmasında bakteri süpernatantındaki 2.00x10⁻⁶ mol dm⁻³ AHL molekülü konsantrasyonunun yaklaşık 10⁷ cfu/ml *P. aeruginosa* 'ya denk geldiğini belirtmiş ve AHL moleküllerinin saptanmasıyla ortamdaki bakteri varlığının kantitatif analizinin de sağlanacağını göstermişlerdir [85].

BÖLÜM 4

4. SONUÇLAR

Bakterilerin QS sistemi regülasyonu sonucunda salgıladıkları sinyal moleküllerinden biri olan AHL moleküllerinin bakteri popülasyonuna bağlı olarak üretimi sonucunda patojenite kazandıkları, antibiyotiğe dirençli biyofilm formu oluşturdıkları bilinmektedir. Bu moleküllerin salgılanma aşamasında tespit edilmesi, hastalıkların ve bakterilerin yol açtığı zararlı fizyolojik faaliyetlerden korunmada ve tedavi yönteminin belirlenmesinde önemli bir gelişme sağlayacağı düşünülmektedir. Bu bağlamda AHL moleküllerinden biyomarker olarak yararlanılması için çeşitli yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada AHL moleküllerinin saptanması için reseptör molekül olarak metaloftalosiyanın kullanımı ile elektrokimyasal biyosensör yapımı gerçekleştirilmiştir.

Bu amaç doğrultusunda çalışmamızın ilk aşamasında metaloftalosiyanınlerden TEMPO-ZnPc, n-MnPc, PANİ-MnPc, TiPc molekülleri araştırma gruplarımız tarafından sentezlenmiş, daha sonra elektrotlar sentezlenen metaloftalosiyanınlerle elektropolimerizasyon, klik elektrokimya, damlatıp kaplama gibi teknikler kullanılarak modifiye edilmiştir. Çalışma elektrotu olarak GCE ve ITO elektrotlar kullanılmıştır. Modifiye elektrotların elektrokatalitik özelliği ve sensör testi için uygun olduğu elektrokimyasal analizlerle belirlenmiştir. Çalışmamızın diğer aşamasında AHL moleküllerinin DMSO’da seyreltik çözeltileri hazırlanmış ve sensör testi için üçlü elektrot sistemi kurulmuştur. Modifiye edilen her bir elektrotla AHL molekülleri titre edilerek SWV ve CA ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

GCE/TEMPO-ZnPc modifiye elektrotla çeşitli AHL moleküllerinin titrasyonu sonucunda 3 oxo C₁₂ HSL için 0.73 V’dan 0.88 V’a pik kayması saptanmıştır. Bu pik kayması elektrot ucundaki TEMPO-ZnPc ile 3 oxo C₁₂ HSL arasında bir etkileşim olduğunu ve bu AHL molekülünün elektrokimyasal yöntemle algılandığını göstermektedir. 3 oxo C₁₂ HSL ‘nin 2.32x10⁻⁶ -39.90x10⁻⁶ mol dm⁻³ konsantrasyon aralığında algılandığı belirlenmiştir.

GCE/n-MnPc modifiye elektrot ve GCE/TiPc modifiye elektrotla AHL moleküllerinin titrasyonu sonucunda önemli bir pik kayması veya değişim gözlenmemiştir.

ITO/PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotu yapmak için elektropolimerizasyonla 4 azido grubunu içeren ITO/PANİ filmi oluşturulmuş, daha sonra ITO/PANİ film tabakasının aktif azit uçlarına MnPc klik edilmiştir. ITO/PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotla AHL moleküllerinin titrasyonu sonucunda C₁₀ HSL, 3 oxo C₁₂ HSL ve C₈ HSL için pik kayması gözlenmiş fakat C₄ HSL ve C₆ HSL ile titrasyonu sonucunda elektrokimyasal sistemde önemli bir değişim algılanmamıştır. PANİ-N₃-MnPc modifiye elektrotun C₁₀ HSL' yi 2.50×10^{-6} – 12.50×10^{-6} mol dm⁻³ konsantrasyon aralığında algıladığı tespit edilmiştir.

Elde edilen bu bilgiler ışığında AHL moleküllerinin saptanabilmesi için redoks aktif türler olan metaloftalosiyeninlerin kullanılabilir olduğu yapılan elektrokimyasal biyosensör çalışmasıyla desteklenmiştir. Tez çalışması sonucunda AHL moleküllerinin elektrokimyasal sistemde çok kısa bir sürede ve enzim kullanımı olmadan saptanması sağlanmıştır. Yapılan çalışmanın Gram negatif bakteri ilişkili zararlı fizyolojik faaliyetlerin (QS kaynaklı virülans, biyofilm, sporulasyon) erken tespitinde yardımcı olacak bir yöntem olabileceği ve ileride yapılacak çalışmalarda AHL moleküllerinden biyomarker olarak yararlanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca AHL moleküllerinin tespiti için yapılan elektrokimyasal biyosensör çalışması kimya, biyoloji, fizik gibi farklı bilim dallarını içerdiğinden multidisipliner bir özellik taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Health UDo, Services H (2013) Antibiotic resistance threats in the United States, Atlanta: CDC
- [2] Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. Trends in microbiology, 19 (8):419-426.
- [3] Milan C, Timm C (2015) Virulence factors associated with biofilm formation by *Salmonella enterica*: mini-review. Science and Animal Health ,3 (1):94-102.
- [4] Mataracı E, Gerçeker Aa (2011) Çeşitli Dezenfektanların Minimum Bakterisidal Konsantrasyonlarının *Pseudomonas aeruginosa*'nın Biyofilm Kültürlerine Karşı Araştırılması. Ankem Derg, 25 (4):209-214.
- [5] Carlier A, Pessi G, Eberl L (2015) Microbial Biofilms and Quorum Sensing. In: Principles of Plant-Microbe Interactions. Springer, 45-52.
- [6] Kendall MM, Sperandio V (2014) Cell-to-cell signaling in *E. coli* and *Salmonella*. EcoSal Plus.
- [7] Baldrich E, Muñoz FX, García-Aljaro C (2011) Electrochemical detection of quorum sensing signaling molecules by dual signal confirmation at microelectrode arrays. Analytical chemistry, 83 (6):2097-2103.
- [8] Raut NG (2012) Biosensing Systems for the Detection of Bacterial Quorum Sensing Molecules: A Tool for Investigating Bacteria-related Disorders and Food Spoilage Prevention.
- [9] Churchill ME, Chen L (2010) Structural basis of acyl-homoserine lactone-dependent signaling. Chemical reviews, 111 (1):68-85.
- [10] Engebrecht J, Nealson K, Silverman M (1983) Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. Cell, 32 (3):773-781.
- [11] Shiner EK, Rumbaugh KP, Williams SC (2005) Interkingdom signaling: deciphering the language of acyl homoserine lactones. FEMS microbiology reviews, 29 (5):935-947.
- [12] Yin W-F, Purnal K, Chin S, Chan X-Y, Koh C-L, Sam C-K, Chan K-G (2012) N-acyl homoserine lactone production by *Klebsiella pneumoniae* isolated from human tongue surface. Sensors 12 (3):3472-3483.
- [13] Basavaraju M, Sisnity VS, Palaparthi R, Addanki PK (2016) Quorum quenching: Signal jamming in dental plaque biofilms. Journal of Dental Sciences.

- [14] Mohamed JA, Huang DB (2007) Biofilm formation by enterococci. *Journal of medical microbiology*, 56 (12):1581-1588.
- [15] Alfaro JF, Zhang T, Wynn DP, Karschner EL, Zhou ZS (2004) Synthesis of LuxS inhibitors targeting bacterial cell-cell communication. *Organic letters*, 6 (18):3043-3046.
- [16] González JE, Keshavan ND (2006) Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70 (4):859-875.
- [17] Schauder S, Bassler BL (2001) The languages of bacteria. *Genes & Development*, 15 (12):1468-1480.
- [18] Kendall MM, Sperandio V (2007) Quorum sensing by enteric pathogens. *Current opinion in gastroenterology*, 23 (1):10-15.
- [19] Papenfort K, Bassler BL (2016) Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14 (9):576-588.
- [20] van Kessel JC, Rutherford ST, Cong J-P, Quinodoz S, Healy J, Bassler BL (2015) Quorum sensing regulates the osmotic stress response in *Vibrio harveyi*. *Journal of bacteriology*, 197 (1):73-80.
- [21] Antunes LCM, Ferreira RB (2009) Intercellular communication in bacteria. *Critical reviews in microbiology*, 35 (2):69-80.
- [22] Nagar V, Sinha V, Bandekar JR (2015) Diverse Profiles of N-acyl Homoserine l-Lactones, Biofilm, Virulence Genes and Integrins in Food-Borne *Aeromonas* Isolates. *Journal of food science*, 80 (8):M1861-M1870.
- [23] Tay SB, Yew WS (2013) Development of quorum-based anti-virulence therapeutics targeting Gram-negative bacterial pathogens. *International journal of molecular sciences*, 14 (8):16570-16599.
- [24] Kokare C, Chakraborty S, Khopade A, Mahadik K (2009) Biofilm: Importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology*, 8 (2):159-168.
- [25] Santos P, Santos P, Bello A, Freitas-Almeida A (2011) Association of *Aeromonas caviae* polar and lateral flagella with biofilm formation. *Letters in applied microbiology*, 52 (1):49-55.
- [26] Yajima A (2014) Recent progress in the chemistry and chemical biology of microbial signaling molecules: quorum-sensing pheromones and microbial hormones. *Tetrahedron Letters*, 55 (17):2773-2780.

- [27] Bhattacharjee A, Nusca TD, Hochbaum AI (2016) Rhamnolipids Mediate an Interspecies Biofilm Dispersal Signaling Pathway. ACS Chemical Biology.
- [28] Hawver LA, Jung SA, Ng W-L (2016) Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. FEMS Microbiology Reviews, 40 (5):738-752
- [29] Bassler BL, Miller MB (2013) Quorum sensing. In: The prokaryotes. Springer, 495-509.
- [30] Kumari A, Pasini P, Deo SK, Flomenhoft D, Shashidhar H, Daunert S (2006) Biosensing systems for the detection of bacterial quorum signaling molecules. Analytical chemistry, 78 (22):7603-7609.
- [31] Smith RS, Iglewski BH (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. Current opinion in microbiology, 6 (1):56-60.
- [32] Wang M, Schaefer AL, Dandekar AA, Greenberg EP (2015) Quorum sensing and policing of *Pseudomonas aeruginosa* social cheaters. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112 (7):2187-2191.
- [33] Boşgelmez-Tınaz G, Ulusoy S (2008) Characterization of N-butanoyl-L-homoserine lactone (C4-HSL) deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbial pathogenesis 44 (1):13-19.
- [34] Miller MB, Bassler BL (2001) Quorum sensing in bacteria. Annual Reviews in Microbiology, 55 (1):165-199.
- [35] Rasamiravaka T, El Jaziri M (2016) Quorum-Sensing Mechanisms and Bacterial Response to Antibiotics in *P. aeruginosa*. Current microbiology, 73 (5):747-753.
- [36] Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA (2003) Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Journal of bacteriology, 185 (3):1027-1036.
- [37] Penesyan A, Gillings M, Paulsen IT (2015) Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. Molecules, 20 (4):5286-5298.
- [38] Karatuna O, Yağcı A (2008) *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg, 38 (1):42-51.
- [39] Tseng BS, Majerczyk CD, da Silva DP, Chandler JR, Greenberg EP, Parsek MR (2016) Quorum sensing influences *Burkholderia thailandensis* biofilm development and matrix production. Journal of Bacteriology:JB, 00047-00016.

- [40] Middleton B, Rodgers HC, Cámara M, Knox AJ, Williams P, Hardman A (2002) Direct detection of N-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum. *FEMS microbiology letters*, 207 (1):1-7.
- [41] Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI, Iglewski BH (2003) Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *Journal of bacteriology*, 185 (7):2080-2095.
- [42] Truchado P, Tomás-Barberán FA, Larrosa M, Allende A (2012) Food phytochemicals act as quorum sensing inhibitors reducing production and/or degrading autoinducers of *Yersinia enterocolitica* and *Erwinia carotovora*. *Food Control*, 24 (1):78-85.
- [43] Eberl L (2006) Quorum sensing in the genus *Burkholderia*. *International Journal of Medical Microbiology*, 296 (2):103-110.
- [44] Irie Y, Parsek M (2008) Quorum sensing and microbial biofilms. In: *Bacterial biofilms*. Springer, 67-84.
- [45] Morohoshi T, Shiono T, Takidouchi K, Kato M, Kato N, Kato J, Ikeda T (2007) Inhibition of quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by synthetic analogs of N-acylhomoserine lactone. *Applied and environmental microbiology*, 73 (20):6339-6344.
- [46] Fekete A, Frommberger M, Rothballer M, Li X, Englmann M, Fekete J, Hartmann A, Eberl L, Schmitt-Kopplin P (2007) Identification of bacterial N-acylhomoserine lactones (AHLs) with a combination of ultra-performance liquid chromatography (UPLC), ultra-high-resolution mass spectrometry, and in-situ biosensors. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387 (2):455-467.
- [47] Deng X, Zhuang G, Ma A, Yu Q, Zhuang X (2014) Construction of a dual fluorescence whole-cell biosensor to detect N-acyl homoserine lactones. *Journal of Environmental Sciences*, 26 (2):415-422.
- [48] Fletcher MP, Diggle SP, Cámara M, Williams P (2007) Biosensor-based assays for PQS, HHQ and related 2-alkyl-4-quinolone quorum sensing signal molecules. *Nature protocols*, 2 (5):1254-1262.
- [49] Abasıyanık MF, Şakalar E, Şenel M Biyosensörlere genel bir bakış ve biyosavunmada kullanılan biyosensörler.
- [50] Clark LC, Lyons C (1962) Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of sciences*, 102 (1):29-45.

- [51] Reder-Christ K, Bendas G (2011) Biosensor applications in the field of antibiotic research—A review of recent developments. *Sensors*, 11 (10):9450-9466.
- [52] Toprakkıran Mert N (2010) İçeceklerde kafein tayini için yeni bir biyosensör hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, Türkiye.
- [53] Pilolli R, Monaci L, Visconti A (2013) Advances in biosensor development based on integrating nanotechnology and applied to food-allergen management. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 47:12-26.
- [54] Baş SZ (2011) Ksantin tayini için amperometrik enzim elektrotlarının geliştirilmesi., Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, Türkiye.
- [55] Goode J, Rushworth J, Millner P (2014) Biosensor regeneration: a review of common techniques and outcomes. *Langmuir*, 31 (23):6267-6276.
- [56] Iqbal MA, Gupta S, Hussaini S (2012) A Review on Electrochemical Biosensors: Principles and Applications. *Advances in Bioreserach*, 3 (4):158-164.
- [57] Baldrich E, Gómez R, Gabriel G, Muñoz FX (2011) Magnetic entrapment for fast, simple and reversible electrode modification with carbon nanotubes: application to dopamine detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (5):1876-1882.
- [58] Kimmel DW, LeBlanc G, Meschievitz ME, Cliffel DE (2011) Electrochemical sensors and biosensors. *Analytical Chemistry*, 84 (2):685-707
- [59] Yeniceli D, Dogrukul A (2010) The determination of bupropion hydrochloride in pharmaceutical dosage forms by original UV and second derivative UV spectrophotometry, potentiometric and conductometric methods. *Turk J Pharm Sci*, 7:99-110
- [60] Karabudak F, Yılmaz V Voltametik Yöntemler Ve Uygulamaları.
- [61] Karabilgin EE (2012) Camsı karbon elektrot yüzeyinde 4-nitro-1-naftilaminin elektrokimyasal oksidasyonu ile yeni bir modifiye elektrot hazırlanması. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, Türkiye.
- [62] Wang J (2006) *Analytical electrochemistry*. John Wiley & Sons,
- [63] Çekirdek P (2005) Voltametik Metotlarla Ditiyofosfonat Anyonlarının Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.

- [64] Mirceski V, Gulaboski R, Lovric M, Bogeski I, Kappl R, Hoth M (2013) Square-Wave Voltammetry: A Review on the Recent Progress. *Electroanalysis*, 25 (11):2411-2422.
- [65] Osteryoung JG, Osteryoung RA (1985) Square wave voltammetry. *Analytical Chemistry*, 57 (1):101A-110A.
- [66] Sivanesan A, John SA (2008) Amino group positions dependent morphology and coverage of electropolymerized metallophthalocyanine (M= Ni and Co) films on electrode surfaces. *Electrochimica Acta*, 53 (22):6629-6635.
- [67] Sehlotho N, Nyokong T, Zagal JH, Bedioui F (2006) Electrocatalysis of oxidation of 2-mercaptoethanol, l-cysteine and reduced glutathione by adsorbed and electrodeposited cobalt tetra phenoxypyrrole and tetra ethoxythiophene substituted phthalocyanines. *Electrochimica acta*, 51 (24):5125-5130.
- [68] Hu X (2014) The Development of Polymer-coated Electrodes for Chemical Detection.
- [69] Çerlek H (2015) Farklı süstitüentler içeren kurşun ftalosiyeninler. *Fen Bilimleri Enstitüsü*,
- [70] Güzel E, Koca A, Gül A, Koçak MB (2015) Microwave-assisted synthesis, electrochemistry and spectroelectrochemistry of amphiphilic phthalocyanines. *Synthetic Metals*, 199:372-380.
- [71] Arıcı M, Arıcan D, Uğur AL, Erdoğan A, Koca A (2013) Electrochemical and spectroelectrochemical characterization of newly synthesized manganese, cobalt, iron and copper phthalocyanines. *Electrochimica Acta*, 87:554-566.
- [72] Leznoff C, Lever A Phthalocyanines Properties and Applications (VCH, New York, 1989).
- [73] Li B, Zhou X, Wang X, Liu B, Li B (2014) Hybrid binuclear-cobalt-phthalocyanine as oxygen reduction reaction catalyst in single chamber microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 272:320-327.
- [74] Jakubik WP, Urbańczyk MW, Kochowski S, Bodzenta J (2003) Palladium and phthalocyanine bilayer films for hydrogen detection in a surface acoustic wave sensor system. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 96 (1):321-328.

- [75] Korkut SE, Akyüz D, Özdoğan K, Yerli Y, Koca A, Şener MK (2016) TEMPO-functionalized zinc phthalocyanine: synthesis, magnetic properties, and its utility for electrochemical sensing of ascorbic acid. *Dalton Transactions*.
- [76] Çakır V, Kantekin H, Bıyıklıoğlu Z, Koca A (2014) Synthesis, electrochemistry, spectroelectrochemistry and electropolymerization of metal-free and metallophthalocyanines. *Polyhedron*, 81:525-533.
- [77] Jaymand M (2013) Recent progress in chemical modification of polyaniline. *Progress in Polymer Science*, 38 (9):1287-1306.
- [78] Çakır D, Arslan T, Biyiklioglu Z (2015) An effect of the substituent position and metal type on the electropolymerization properties of chalcone substituted metallophthalocyanines. *Dalton Transactions*, 44 (48):20859-20866.
- [79] Rodrigues NP, Obirai J, Nyokong T, Bedioui F (2005) Electropolymerized pyrrole-substituted manganese phthalocyanine films for the electroassisted biomimetic catalytic reduction of molecular oxygen. *Electroanalysis*, 17 (2):186-190.
- [80] Chauke V, Matemadombo F, Nyokong T (2010) Remarkable sensitivity for detection of bisphenol A on a gold electrode modified with nickel tetraamino phthalocyanine containing Ni–O–Ni bridges. *Journal of hazardous materials*, 178 (1):180-186.
- [81] Becer CR, Hoogenboom R, Schubert US (2009) Click Chemistry beyond Metal-Catalyzed Cycloaddition. *Angewandte Chemie International Edition*, 48 (27):4900-4908.
- [82] Li Z, Rosenbaum MA, Venkataraman A, Tam TK, Katz E, Angenent LT (2011) Bacteria-based AND logic gate: a decision-making and self-powered biosensor. *Chemical Communications*, 47 (11):3060-3062.
- [83] Struss A, Pasini P, Ensor CM, Raut N, Daunert S (2010) Paper strip whole cell biosensors: a portable test for the semiquantitative detection of bacterial quorum signaling molecules. *Analytical chemistry*, 82 (11):4457-4463.
- [84] Zhou L, Glennon JD, Luong JH, Reen FJ, O’Gara F, McSweeney C, McGlacken GP (2011) Detection of the *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) by cyclic voltammetry and amperometry using a boron doped diamond electrode. *Chemical Communications*, 47 (37):10347-10349
85. Jiang H, Jiang D, Shao J, Sun X (2016) Magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles based electrochemical sensor for the measurement of Gram-negative

bacterial quorum signaling molecules (N-acyl-homoserine-lactones). Biosensors and Bioelectronics 75:411-419.

[86] Shang F, Muimhneacháin EÓ, Reen FJ, Buzid A, O’Gara F, Luong JH, Glennon JD, McGlacken GP (2014) One step preparation and electrochemical analysis of IQS, a cell–cell communication signal in the nosocomial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 24 (19):4703-4707.

[87] Jiang D, Feng D, Jiang H, Yuan L, Yongqi Y, Xu X, Fang W (2016) Preliminary study on an innovative, simple mast cell-based electrochemical method for detecting foodborne pathogenic bacterial quorum signaling molecules (N-acyl-homoserine-lactones). Biosensors and Bioelectronics.

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI : Şevval Maral ÖZCAN
YAZIŞMA ADRESİ : Bozkurt mah. Dericiler sokak No:76 D:5
Şişli/İSTANBUL
DOĞUM TARİHİ VE YERİ: 05.01.1993 Şişli/ İSTANBUL
E-POSTA : sevvalmaral@gmail.com
ÖĞRENİM DURUMU : Yüksek Lisans

Derece	Alan	Üniversite	Başlangıç Yılı
Ortaöğretim	Sayısal	Kurtuluş Lisesi	2006
Lisans	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2010
Yüksek Lisans	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2015

Yayınlar

Ulusal ve uluslar arası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Electrochemical Detection of N –Acyl Homoserine Lactone with TEMPO Zinc Phthalocyanine Modified Electrode, 4th International Bahçeşehir University (BAU) Drug Design Congress, İstanbul, 2016.

Antibacterial effect of resveratrol against *Propionibacterium acnes*, 8th International conference on Image Processing, Wavelet and Applications Congress, 2016

Açıl Homoserin Laktonların Elektrokimyasal Metot ile Algılanması, 2nd IVEK International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, 2015.

Patent başvurusu

“Açıl Homoserin Lakton Moleküllerinin Elektrokimyasal Metod ile Algılanması” isimli tez çalışması kapsamında Türk Patent Enstitüsüne 201600482 numaralı patent başvurusu yapılmıştır.

Katılımcı olarak yer alınan kongreler ve çalıştaylar

Ekim 2016- 4. Uluslararası İlaç Dizayn Kongresi

Eylül 2015 - II. Ulusal Mikoloji Günleri

Ağustos 2015 - Liken Kültürü Yöntem ve Uygulamaları Çalıştayı – organizasyon görevlisi ve katılımcı

Mayıs 2014- Uluslararası İTÜBİOTECH Kongresi

Mart 2014- 3. Cerrahpaşa Bilim Günleri

Nisan 2013- Oksidatif Stres, DNA Hasarı, DNA Onarımı ve Hastalıklarla İlişkiler

Aralık 2013 – 1. KUGEN MBG Bilim Toplantısı, Koç Üniversitesi

Aralık 2013 – 4. Kök Hücre Sempozyumu

Temmuz 2011 – 18. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi