

**TEKNOFEST**  
**HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ**  
**BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI**

**PROJE DETAY RAPORU**

**TAKIM ADI**

**Gerbusters**

**PROJE ADI**

***Staphylococcus aureus* Tespitine Yönelik Bakteriyofaj K Temelli  
Biyosensör**

**BAŞVURU ID**

**49332**

**KATEGORİ**

**Biyoteknoloji İnovasyon**



## İçindekiler

### 1. Proje Özeti

Temelde nükleik asit ve protein bileşenlerinden oluşan ve konakçısı bakteriler olan bakteriyofajlar; konakçıların yaşam alanlarında yani kanalizasyonda, dışkıda, toprakta, derin termal sularda, doğal su kütleleri gibi sayısız alanda bulunabilme özelliği ile dünya ekosisteminde popülasyonu en fazla varlıklardır [1]. Bakterileri tanımadaki özgüllüğü ve doğal olarak öldürme yetenekleri ile fajların; tarım, hayvancılık, biyoteknoloji, moleküler biyoloji, sağlık, veterinerlik, biyoinformatik, gıda, çevre, ekoloji, sanayi gibi birçok alanda kullanımı cazip hale gelmeye başlamıştır. Literatürde bakteriyofajların; çiftlik hayvanlarında patojen kolonizasyonunun azaltılması (faj tedavisi), çiğ süt/et ve taze gıdaların dekontaminasyonu (biyokontrol), ekipman ve temas yüzeylerinin dezenfeksiyonu (biyoprezervasyon) gibi uygulamalarda kullanıldığı göze çarpmaktadır [2].

Fajlar, birkaç farklı yaşam döngüsü stratejisine sahiptir; litik, lizojenik, psödosojenik ve kronik enfeksiyon [1]. Bu yaşam döngülerinin her biri en az beş aşamadan oluşmaktadır: adsorbsiyon, nükleik asit enjeksiyonu, virionların birleştirilmesi, virion salınımı ve yayılım [3]. Tanıma ve adsorbsiyon, faj enfeksiyonu özgüllüğünün tanımlanmasında en önemli aşamayı oluşturmaktadır [4]. Bakteri hücresine başarılı bir şekilde nüfuz etme yaşam döngüsünün devam etmesi için temel koşulu oluşturmaktadır. Spesifik bir bakteriyofajın dar bir konakçı aralığını, bir mikrobiyal tür veya suşu enfekte ettiği bilgisi; fajları kullanışlı tespit aracı haline getirmektedir. Bu bilgiler ışığında sunulan bu projede; bakteriyofaj K, *Staphylococcus aureus* bakterisinin tespiti amacıyla kullanılacaktır.

Bakterilerin tespitinde son yıllarda yaygınlaşan fiziko-kimyasal yöntemlerden olan biyosensörler, ortamda bulunan biyolojik örneklerle seçici ve spesifik özellik göstererek yapısal ve fonksiyonel bilgileri ölçülebilir ve işlenebilir sinyallere dönüştüren analitik cihazlardır [5]. Özellikle minimum numune, ön işlemin yokluğu, karmaşık numune matrislerinde geniş bir analit spektrumunun tespitine izin vermesi, yüksek özgüllük ve hassasiyete sahip olmaları önemli avantajlarından [5]. Sinyal iletim yöntemine bağlı olarak biyosensörler; optik, kütle, elektrokimyasal ve termal sensörler olarak dört temel gruba ayrılabilir [6]. Bu çalışmada kullanılacak elektrokimyasal sensör grubu içerisinde bulunan empedans tabanlı biyosensörler, küçük AC voltajının uygulanması üzerine elektrotların katı/sıvı ara yüzündeki hem direnç hem de kapasitans özelliklerdeki değişikliklerin değerlendirilmesi temeline dayanmaktadır [7]. Sunulan projede uygulanacak diğer bir yöntem olan piezoelektrik sensörler ise, temel olarak kristal yüzeyi üzerindeki kütle değişimi sonucu piezoelektrik kristalinin rezonans frekansındaki değişikliklerin ölçülmesi esasına dayanır. Kuartz Kristal Mikrobals (QCM) piezoelektrik cihazlar, hedef analit ile seçici olarak bağlanma sonrası yüzeyde meydana gelen kütle değişimini tespit etmektedir [8].

Sunulan projede; **Bakteriyofaj K'nın sensör yüzeyine kaplanması ile *S. aureus* bakterisine spesifik bağlanması sonucu kütle artımının rezonans frekansında meydana getirdiği değişiklik ve empedanstaki ilk artışın ardından bakteriyel lizis ile empedanstaki azalmadan oluşan ardışık ikili sinyal üretimi esasına bağlı olarak bakteriyofaj K temelli empedans ve QCM biyosensörünün geliştirilmesi amaçlanmıştır.** Bu amaç doğrultusunda;

- Bakteriyofaj K'nın çift tabaka agar tekniği ile kültür ortamında çoğaltılması,
- $10^8$  PFU/mL titredeki bakteriyofaj K'nın QCM ve empedans elektrot yüzeylerine kovalent immobilizasyonu,
- Modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinin farklı konsantrasyonlarda *S. aureus* bakterisi bulduran çözeltilere daldırılması yoluyla yapılan ölçümler sonucu en düşük tespit limiti ve süresi verisinin eldesi,
- İki farklı biyosensör sistem ölçüm sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması ile prototipimize en uygun sens yönteminin belirlenmesi,

hedefleri gerçekleştirilecektir.

## 2. Problem/Sorun:

Bakteriyel patojenler; tespit ve tanılama eksikliği sebebiyle tıp, gıda güvenliği, halk sağlığı ve biyo-güvenlik (biyoterörizm), hayvancılık, tarım dahil olmak üzere çeşitli alanlardaki problemlerin temel kaynağı konumunda olup dünya çapında morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenleri arasında yer almaktadır [9]. Bulaşıcı hastalıkların sebeplerinden olan bakteriyel patojenlerin neden olduğu problemleri üç temel başlık altında incelemek mümkündür (Şekil 1);

### **Bakteriyel patojenlerin tespit ve tanısındaki eksikliğin neden olduğu problem alanı; Sağlık**

Sağlık hizmeti veren kurumlarda ve toplumda antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımı, kendiliğinden evrim, bakterilerin dirençli genlerinin yatay transferi mikrobiyal direncin ortaya çıkmasındaki ana nedenler olarak gösterilebilmektedir [10]. Mevcut çalışmalar incelendiğinde her yıl antibiyotiğe dirençli mikroorganizma enfeksiyonundan yaklaşık 700,000 birey hayatını kaybetmektedir [11]. 2000 yılında en yüksek antibiyotik tüketim oranı ABD, Fransa, İspanya, Yeni Zelanda ve Hong Kong iken 2015 yılında yapılan araştırmalarda en yüksek antibiyotik tüketen ülkelerin Türkiye, Tunus, Cezayir ve Romanya olduğu tespit edilmiştir [11]. Antibiyotik kullanımının artması ile bakterilerin geliştirdikleri direnç arasındaki korelasyon göz önüne alındığında mevcut literatür verilerine göre ülkemiz dirençli bakterilerin neden olduğu problemler açısından son derece riskli görülmektedir. Çoklu ilaç direncine sahip patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlar kötü klinik seyir, daha uzun hastanede kalış süresi, yüksek ölüm oranı ve sağlık hizmeti alt yapısında artan yük ve maliyet problemleri ile doğrudan ilişkilidir [11]. Sağlık alanındaki birbiri ile son derece hassas ilişki içerisinde problemlerin elimine edilmesinin temelinde antibiyotik tedavisinin kritik uygulanma zamanının geciktirilmemesi yani **hızlı, erken, hassas tanı yatmaktadır.**

### **Bakteriyel patojenlerin tespit ve tanısındaki eksikliğin neden olduğu problem alanı; Gıda**

Gıda ve suda bakterilerin sebep olduğu bulaş, gıda kaynaklı hastalıkların başlıca nedenini oluşturmaktadır [12]. Genel olarak gıda zehirlenmesi olarak bilinen gıda kaynaklı hastalıklar yaygın hastalık ve ölüm nedenidir. Yapılan araştırmalarla gıda kaynaklı bakterilerin her yıl tahmini 76 milyon hastalığa, 300.000 hastaneye yatışa ve 5.000 ölüme neden olduğu Amerika Birleşik Devletleri de dahil olmak üzere yüksek gelirli ülkelerde dahi ciddi bir sağlık problemi oluşturduğu tespit edilmiştir [9]. 2015 yılında DSÖ, dünya nüfusunun yaklaşık %10'unun her yıl kontamine gıdalardan hastalandığını vurgulamıştır [13]. Bu nedenle gıda kaynaklı bakterilerin tespiti ve tanımlanması tıp, gıda güvenliği, halk sağlığı ve güvenliğinde büyük önem taşımaktadır. Bu problemin sebep olduğu ölümlerin önüne geçebilmek için patojenle kontamine olmuş **yiyecek veya içeceklerin içerdiği kontamine mikroorganizmaların hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmasının ardından satıştan kaldırılması önem arz etmektedir.** Basında geniş yer tutan Hollanda Rotterdam Üniversite Hastanesi'nin hematoloji ünitesinde 27 hasta ve 14 sağlık çalışanını önemli derecede etkileyen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) salgınında; hastane aşçısının taşıdığı MRSA'nın gıda kontaminasyonu ile sağlık çalışanına, hava yoluyla cerrahi birimlere hızlıca yayıldığı tespit edilmiştir [14]. Bahsi geçen salgının ancak altı ay içinde kontrol altına alınabilmesi ve ölümler ile sonuçlanması, kontamine gıdaların hızlı ve doğru tespit edilerek bulaşın ve salgının önüne geçemedeki önemine işaret etmektedir.

### **Bakteriyel patojenlerin tespit ve tanısındaki eksikliğin neden olduğu problem alanı; Biyo-Güvenlik**

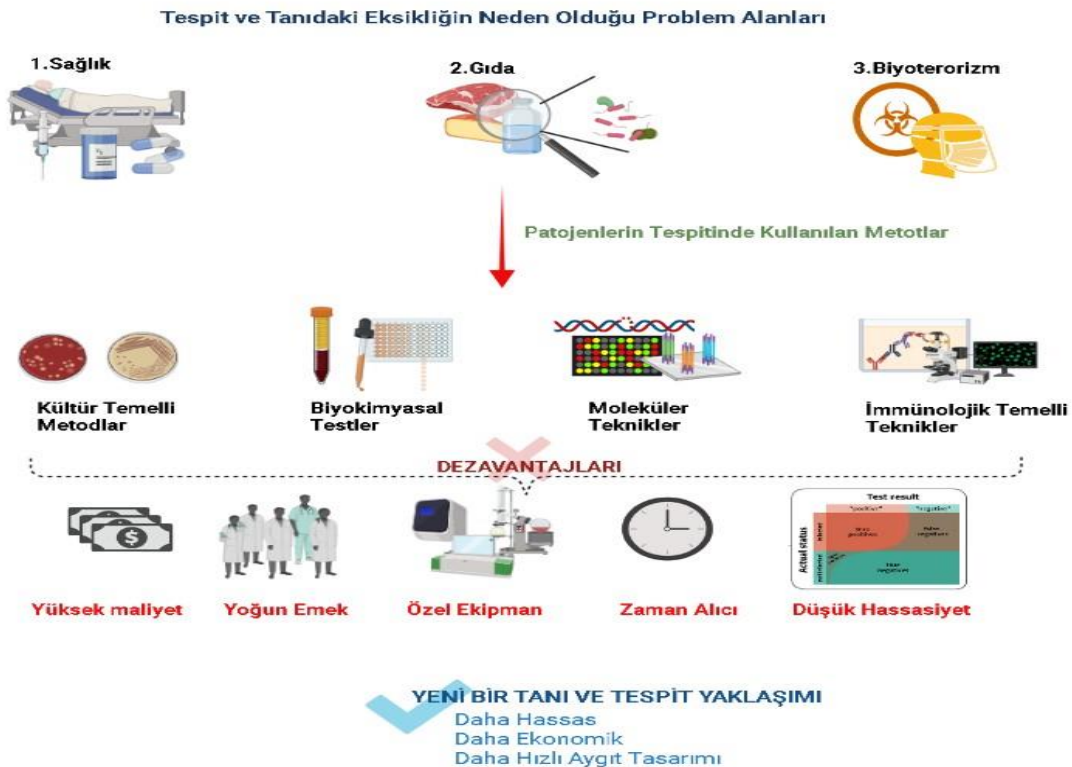
Mevcut kaynaklar incelendiğinde geçen yüzyılda 500 milyondan fazla insanın bulaşıcı hastalıklardan öldüğü ve bu ölümlerin on binlercesinin kasıtlı olarak salınan patojen veya toksinlerden kaynaklandığı gözlemlenmektedir [15, 16]. Uluslararası anlaşmalar ile biyolojik silahların yasaklanması biyo-terorizmi durdurmakta başarılı olamamıştır. Hastalığa neden olan patojenlerin biyolojisi anlaşıldıkça bu alanda yapılacak etik dışı uygulamalar ülkemiz ve dünya açısından tehdit oluşturmaktadır. **Bu tehdidin elimine edilmesi için biyo-savunma**



**sistemlerimizin hazır olması gerekmektedir. Potansiyel olarak kontamine olmuş maddelerin ve enfekte teröristlerin erken ve hızlı uyarı sistemleri ile tespit edilmesi son derece kritik öneme sahiptir.**

Yukarıda bahsedilen problemlerin kaynağı olan patojenlerin tespitinde geleneksel laboratuvar tabanlı bakteri saptama ve tanımlama yöntemleri kullanılmaktadır. Konvansiyonel metotlar mikroskopi, mikrobiyal kültür, biyokimyasal testler ile immünolojik testler ve genetik analizler tanılamada kullanılan yöntemlerdir [17]. Numunelerdeki bakterilerin boyanması ve mikroskop altında incelendiği yöntemler ile morfolojilerinin gözlemlenmesi, kullanılan seçici besiyerlerinde ayırım ile farklı biyokimyasal özelliklerin kullanılması görece spesifik olmasında rağmen zaman alıcı metotlardır. Bunun yanı sıra tüm bakterileri laboratuvar ortamında kültüre etmek de mümkün değildir. Bakteriye özgü belirli determinantların saptanmasını içeren immünolojik testler ise; uzman teknik kadro ve ekipmanlar nedeniyle zaman alıcı ve maliyetli yöntemler olarak nitelendirilebilmektedir. Bakterilerin genetik materyallerine dayalı tanımlanmasını sağlayan ve son derece hassas bir teknik olan moleküler tekniklerde; az miktar DNA'nın yeterli olması avantaj gibi görünmesine rağmen hedef bakteri dizisiyle doğru eşleşen genetik prob/primerlere ihtiyaç duyması, mutasyon bölgelerin varlığının yanlış negatifliklere sebebiyet vermesi, maliyetli ek işlem basamakları ve kimyasalları gerektirmesi dezavantajları arasındadır. Bahsedilen problemleri çözmeye yetersiz kalan bu metotların çoklu işlem basamağı ile uygulanabiliyor olması, belirli reaktifler ve ekipmanlar gerektirmesi, maliyetli olması, yüksek iş gücü gerektirmesi gibi dezavantajlarının elimine edilmesi için patojenlerin **tespitinde hızlı, hassas, ekonomik ve yoğun emek gerektirmeyen bir sistem geliştirilmesi** mevcut metotların dezavantajlarını elimine edecektir.

Bakteriyel enfeksiyonlardan kaynaklı mortalite ve morbiditenin ana sebebi, hastalıkların tespit ve tanının gecikmesi veya yanlışlığıdır. Tespitin geciktirilmesi veya yanlış teşhis geleneksel metotların yukarıda özetle bahsedilen eksikliklerinin sonucudur. Bu nedenle sahada veya bakım noktalarında kullanılmak üzere bakterileri çok aşamalı işleme ve saflaştırma süreçlerini elimine ederek tanımlayabilen daha hızlı, uygun maliyetli ve hassas aygıt ve yöntemlere acil ihtiyaç bulunmaktadır.



Şekil1. Tespit ve tanıdaki eksikliğin neden olduğu problem alanları ve patojenlerin tespitinde kullanılan metotların dezavantajları

### 3. Çözüm

Modern biyoteknolojinin uygulamaları incelendiğinde sağlık, tarım, gıda, hayvancılık, güvenlik gibi alanları kapsadığı ve özellikle bu alanlarda patojenlerin sebep olduğu tehlikelerin elemine edilmesi üzerinde yoğun çabaların harcandığı gözlenmektedir. Patojenlerin sebep olabileceği epidemik ve pandemilerin önüne geçebilmek, içinde bulunduğumuz salgın değerlendirildiğinde de ülkemizin refahı için gerekli hususlardan biridir. Sağlığın korunması sağlık hizmetleri sistemleri için bazı durumlarda zorluk oluşturmaktadır bu yüzden erken teşhis yöntemleri hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için kesin bir zorunluluktur. Konvansiyonel metotların uzun işlem süresi, eğitilmiş personel gerektirmesi ve bunların da genel tedavi maliyetlerini önemli ölçüde artırdığı göz önüne alındığında patojenlerin elemine edilmesinde biyoteknolojik yöntemlerin daha avantajlı olduğu görülmüştür. Bu nedenle **patojenlerin erken, etkin ve ekonomik tespiti için son derece güncel biyoteknolojik çalışmalardan olan faj bazlı biyosensörlerin kullanılması hem daha kolay hem de daha ekonomiktir.** Fajlar; ekoloji, gıda endüstrisi, ilaç taşıma sistemleri ve faj görüntüleme teknolojisindeki uygulamalarının yanı sıra akut kronik enfeksiyonların tedavisi için terapötik ajanlar olarak kullanılmaktadır. Biyoteknolojik perspektiften bakıldığında fajlar genetik bilgi içeren doğal konakçıya özgü nanoyapılı parçacıklar olarak kabul edilmektedir. Fajların sahip olduğu bakterilere özgü özgüllük ve farklı pH/sıcaklıklarda mükemmel stabilite nedeniyle biyosensör sistemlerinin algılama araçlarının biyoteknolojik açıdan önemli bir bileşeni konumundadır [18]. Konvansiyonel metotların sahip olduğu numune işleme, ekstra reaktif ihtiyacı, tedavi süresini uzatıcı işlem basamaklarının fazlalığı ve test yöntemlerinin maliyeti dezavantajlarının neden olduğu gıda, sağlık ve askeriyede kritik öneme sahip olan patojenlerin tespitindeki gecikmenin ya da yanlış tespitin sebep olabileceği problemlerin çözümü için önerdiğimiz **bakteriyofaj K temelli biyosensör geliştirme** önerisinin sahip olduğu inovatif özellikler de göz önüne alındığında; mevcut COVID-19 salgınından çıkararak toparlanmaya çalıştığımız bu süreçte dünyanın ve toplumumuzun bir sonraki salgınının bakteriyel patojenler olması senaryosuna karşı hazır bulunabilme gerekliliğini inşa etme kararlılığına sahip olduğumuzu göstermektedir. Hazırlıklı olmanın, acil durum harcamalarından çok daha düşük maliyetli, sağlam bir yatırım olduğu düşünüldüğünde; bakteriyofaj K temelli biyosensör geliştirme proje önerisi ile toplumumuzu olası tehditlerden korumada gerekli olan ulusal harekete katkıda pay sahibi olmak istiyoruz. İfade edilen problemlerin biyoteknolojik açıdan son derece güncel bir yaklaşım olan faj bazlı biyosensör sistemleri ile çözülmesi hedefi ileride kurgulanması düşünülen projeler ile de bu alandaki gelişmelerde ülkemizin kaynakları kullanılarak yapılan prestijli bir yatırım olarak görülmektedir. Problemin çözümünde kullanılması hedeflenen biyosensörlerin özellikleri ve bileşenleri Tablo 1’de gösterilmiştir. Sistemde; biyoreseptör ve dönüştürücü olarak iki temel bileşen bulunmaktadır: Biyoreseptör olarak bakteriyofaj K ve dönüştürücü olarak da SRS QCM200 ve LCR HiTESTER ticari cihazları.

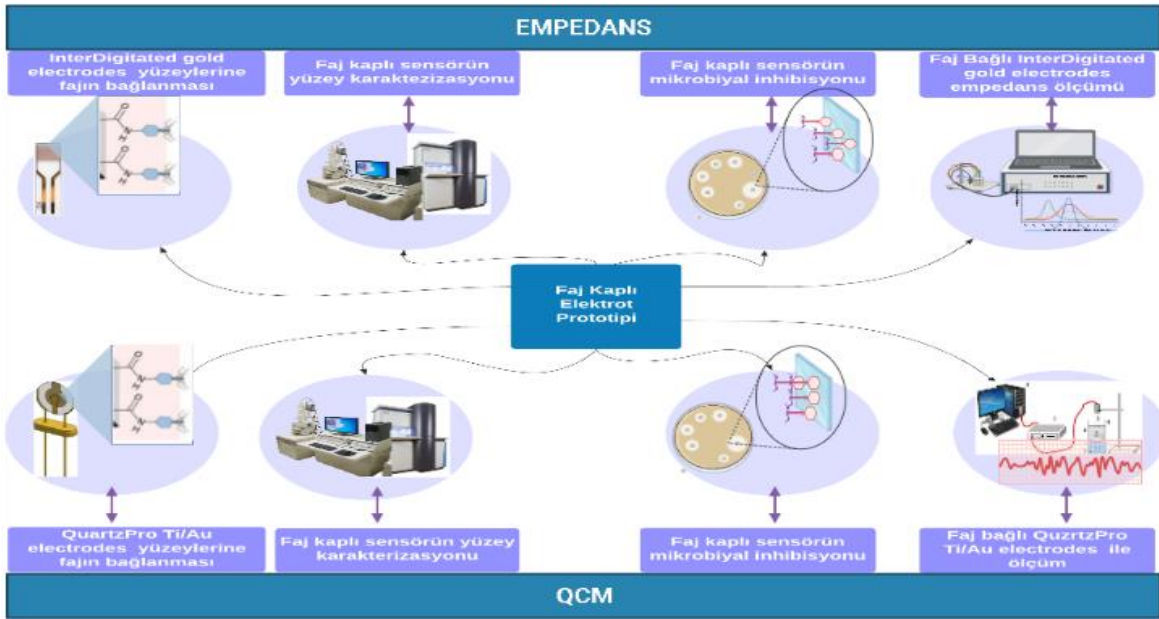
Sunulan projede bakteriyofaj K’nın QCM ve Empedans elektrot yüzeyine kovalent immobilizasyonu sağlandıktan sonra aşağıdaki tabloda ayrıntılı özellikleri açıklanan iki farklı biyosensör sistemi ile içerisinde farklı konsantrasyonlarda *S. aureus* bakterisi bulunan çözeltilerde bakteri tespiti, süre ve limit parametreleri esas alınarak belirlenecektir. Sonrasında her iki sistemle elde edilen veriler istatistiksel olarak karşılaştırılarak prototipimize en uygun biyosensör sistemi belirlenecektir.

Tablo 1. Prototip alt bileşenleri

Prototip	Temel Prensiptir	Bileşenler	Özellikleri	Görevleri
Faj K- QCM biyosensör	Kuars üzerine harici bir elektrik alanının uygulanmasının kristalde mekanik gerilimler ürettiği piezoelektrik etki ilkesine göre çalışmaktadır. Sistemde ölçülen rezonans frekansı, kristal yüzeyinde biriken malzeme kütlelerinin doğrusal bir fonksiyonu olarak değişmektedir. Rezonanstaki direnç, kristal yüzey ile temas halinde olan malzemenin viskozitesi/elastikiyeti ile değişmektedir.	SRS QCM200 cihaz ve sistemi (kontrolör, kristal osilatör elektroniği, kristal tutucu, kuvars kristali ve Windows/Mac yazılımı)	$\Delta f_m$ ; (Hz), yüzey kütlesi $f_0$ ; (Hz), kristalin temel rezonans frekansı; $\Delta m$ , kristal yüzeyde birim alan başına kütle değişimi ( $g\ cm^{-2}$ ); $\rho_q$ ( $g\ cm^{-3}$ ) ve $\mu_q$ ( $g\ cm^{-1}\ s^{-2}$ ) $\mu g$ -ng kadar değişen kütleyi ölçer.	Kristale alternatif bir voltaj uygulayarak kristalin plaka yüzeyine dik yönde salınmasını sağlamak, 5 MHz, AT kesimli kuvars kristalinin rezonans frekansını ve direncini okumak
		Faj K kaplı QCM elektrot	Tek tarafında algılama yüzeyleri görevi gören elektrotlu ince bir kuvars, Ti/Au yüzey, 1 inç çap, Frekans 5 MHz, AT-kesim, plano-plano özellikte	<i>S. aureus</i> hücrelerini yüzeyine bağlama
Faj K- Empedans biyosensör	Bir elektrik devresinin alternatif akıma yanıt olarak bir bileşene karşı etkin direncinin tespit edildiği elektrokimyasal sistemler için en güvenilir ve tekrarlanabilir karakterizasyon yöntemidir.	LCR HiTESTER cihaz ve sistemi (kontrolör, elektrot tutucu, elektrot ve Windows/Mac yazılımı)	Z (ohm); empedans değeri, $\Theta$ ; faz açısı, Rs (ohm); direnç X(ohm); kapasitans reaktans Çift tabaka kapasitansı, difüzyon empedansı ve yük transfer direnci özellikleri belirlenir	Temel empedans (Z) ölçümü için sisteme küçük voltaj farkı uygulama ve ilgili akım tepkisini izleme
		Faj K kaplı empedans elektrot	Bir cam tabaka üzerinde iç içe geçmiş metal iletken yollara sahip iki adet elektrottan (anot ve katot) oluşur. Kapasitif sensör özelliktedir (bir dielektrik katmanla tamamen kaplanmış yüzey) 200 mikron boşluk Au yüzey	<i>S. aureus</i> hücrelerini yüzeyine bağlama



#### 4. Yöntem



Şekil 2. Faj kaplı elektrot prototipi iş-akışı

Sunulan projenin iş akışı Şekil 2’de gösterilmiştir.

**İş paketi 1 (İP1); Bakteriyofaj K’nın yüksek titrede eldesi;** Bu iş paketinin hedefi; sens çalışmalarında kullanılacak sensörlerin yüzeyine kaplanacak Bakteriyofaj K’ların yüksek titrede eldesidir. Bu amaçla;

**Hedef 1.1. Bakteriyofaj K’nın çoğaltılmasında kullanılacak *S. aureus* suşunun geliştirilmesi;** Bakteriyofaj K’nın çoğaltılmasında kullanılacak olan *S. aureus* (ATCC 25923) Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Mikrobiyoloji kültür koleksiyonundaki stok kültüründen Brain Heart Infusion Agar besiyerine (BHI) çizgi metodu ile ekilecektir ve ardından 37°C’de 18-24 saat inkübe edilecektir.

**Hedef 1.2. Bakteriyofaj K’nın eldesi ve stoklanması;** İlgili fajın kültür ortamında çoğaltılması ve depolanmasında çift tabaka agar tekniği kullanılacaktır. Özetle alt agar, BHI içerisine 15 g/l agar eklenerek hazırlanırken; üst agar aynı besiyerine son konsantrasyon 4-6 g/l agar içerecek şekilde hazırlanacaktır. *S. aureus* geliştirilmiş BHI besiyeri içeren tüpe faj lizatı ilave edilerek bir seri dilüsyon hazırlanacaktır. Bu dilüsyon tüplerine 46- 48 °C 'deki üst agar ilave edilerek alt agar plak üzerine hızlıca yayılacak ve bir gece 37°C' de inkübe edilecektir. İnkübasyon sonunda lizis gösteren plaklar seçilerek oluşan lizis plakları steril bisturi ile kazınarak 3 ml BHI içerisine koyulacaktır ve üzerine 100 µL 4 saat 37°C’de inkübe edilmiş *S. aureus* eklenerek, 10 dakika oda sıcaklığında preinkübe edilecektir. Preinkübasyon sonrası 3 ml daha BHI broth besiyeri eklenerek, 18 saat 37°C’de inkübe edilecektir. Sonrasında santrifüjlenerek 0.22 µm filtreden geçirildikten sonra elde edilen faj filtratı %50 (v/v) gliserol ilave edilerek -80°C’de bakteriyofaj K’nın elektrot yüzeyine kaplanması aşamasına kadar saklanması sağlanacaktır [19].

**İP 2; Bakteriyofaj K’nın sensör yüzeylerine kaplanması ve yüzey karakterizasyonu;** Bu iş paketinin hedefi; sens çalışmalarında kullanılacak sensörlerin yüzeyine Bakteriyofaj K bağlanmasını sağlamak ve sonrasında yüzey karakterizasyonu ile bunu doğrulamaktır. Bu amaçla;

**Hedef 2.1. InterDigitated gold electrodes (Empedans) ve QuartzPro Ti/Au (QCM) sensör yüzeylerine fajın bağlanması;** Sensör yüzeyi kaplanmaya başlamadan önce hem organik madde giderimi hem de yüzey hidrosillenmesi amacıyla piranha solüsyonu ile ön yüzü 2 dakika arka yüzü 2 dakika olmak üzere yıkanacaktır. Daha sonra empedans elektrot yüzeyi 5 kez PBS buffer ile yıkanarak yüzeye bağlanmayan bakterifaj uzaklaştırılacaktır. Sonrasında 15 dakika etanol 15 dk steril su ile sonikasyon işlemi yapılacak ve arkasından 120°C’de 1 saat kurutulacaktır. EDC (5 mg/ml) ve NHS (6 mg/ml) içeren çözelti hazırlanarak sensör yüzeylerine kaplama yapılacak ve

sonrasında oda ısısında 1 saat inkübe edilecektir. 12.5 µL Tween20 eklenerek 25 ml SM tampon (v/v %0.05) ile cam yüzeyler yıkandıktan sonra  $10^8$  PFU faj lizati sensör yüzeylerine yayılarak bir gece oda koşulunda inkübe edilecektir. 13 mg BSA 13 ml steril suda çözülerek (1 mg/ml) tüm yüzeye yayılacaktır. Sonrasında sensör yüzeyinde faj bağlanmayan bölgelerin bloklanması sağlamak amacı ile BSA çözeltisi ile muamelesi sağlanacaktır [20]. QCM sensör yüzeyinde ise APTES uygulamasından sonra sisteamin (10 mmol) ve altın elektrot 5 mL su içinde bir gece bekletilecektir. Daha sonra EDC 10 mmol su içinde (1 mL) reaksiyon kabına eklenerek 1 saat bekletilecektir. Elektrot yüzeyi daha sonra petri kabına alınarak üzerine 50 mikrolitre ( $1 \times 10^8$  PFU/ml) bakterifaj süspansiyonu eklenerek bir gece desikatörde bekletilecektir [21].

**Hedef 2.2. Sensör yüzey karakterizasyonu;** Bu iş paketinin hedefi; sens çalışmalarında kullanılacak sensörlerin yüzeyine Bakteriyofaj K'nın bağlandığının karakterize edilmesidir.

**Taramalı elektron mikroskopisi (SEM);** Sensörlerde immobilize edilen fajlar, SM tamponu ile birkaç kez yıkanacaktır. Daha sonra 50 µL *S. aureus* ( $10^8$  cfu/ml) elektrot yüzeyine damlatıldıktan 20 dakika sonra SM tamponu ile yıkanacaktır. Sonrasında elektrot SEM cihazı ile incelenecektir. Hizmet alımı yolu ile gerçekleştirilecektir [22].

**X-Ray Foton Spektroskopisi (XPS);** Elektrot yüzeyi amminosilane ile kaplandıktan sonra XPS analizi ile incelenecektir. X ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), yüzey kimyasını analiz etmek için kullanılan tekniklerdendir. Elektrot yüzeyi N1S analizi yapılarak yüzeydeki  $-NH_2$  grupları incelenecektir. Hizmet alımı yolu ile gerçekleştirilecektir [22].

**Hedef 2.3. Sensör yüzeylerine kaplı fajların mikrobiyal inhibisyonu;** Hedef 2.1'de tarif edildiği üzere  $10^3$  - $10^8$  PFU/ ml titredeki fajlar cam yüzeylere 5 ml yayılarak kaplama işlemi gerçekleştirilecektir. 37 °C'de 18 saat BHI sıvı besiyerinde geliştirilmiş *S. aureus* bakteri konsantrasyonu OD 0.1-0.2 olacak şekilde ayarlanarak Mueller-Hinton agar besiyeri üzerine 100 µl ilave edilerek svapla tüm yüzeye yayılacaktır. Sonrasında faj kaplı hazırlanmış cam yüzeyler bu petrilerin yüzeyine yerleştirilerek 37°C'de 18- 20 saat inkübe edilecektir. Çalışmada kontrol grubu olarak faj kaplanmamış ancak modifiye edilmiş cam yüzey (EDC/NHS veya EDC/Sisteamin) ve hiçbir modifikasyonun yapılmadığı cam yüzey kullanılacaktır. [21]

### **İP 3; Faj kaplı Interdigitated gold elektrotlar kullanılarak empedans ölçülmesi**

Bu iş paketinin hedefi; faj kaplı sensörlerle *S. aureus* suşunun tespitinin sağlanmasıdır. Bu amaçla; **Hedef 3.1. Farklı oranlarda faj kaplı sensörler ile *S. aureus* tespiti;** Empedans ölçümlerini gerçekleştirmek için interdigitated elektrotlar kullanılacak ve 100 kHz-1 Hz arasında değişen frekanslarda küçük bir potansiyel farkı uygulanacaktır. Önce içerisinde hiç bakteri bulunmayan 0,01M PBS solüsyonu ile elektrotlar denge konumuna getirildikten sonra  $10^2$ - $10^8$  kob/mL aralığında *S. aureus* bulunan 0,01M PBS solüsyonlarına daldırılarak Z, Rs, C, F değerleri 3522-50/3532-50 LCR HiTESTER cihazı kullanılarak her 5 s bir olacak şekilde ölçülecektir. Bu çalışmada faj bağlanmamış bir adet elektrot kontrol amaçlı kullanılacaktır. Elektrotun *S. aureus*'a hassasiyetini göstermek için Gram pozitif duvar yapısına sahip *Bacillus anthracis* bakterisi negatif kontrol olarak kullanılacaktır. Elde edilen sonuçlardan çizilecek Nyquist eğrileri, yüksek AC frekans sınırından düşük frekans sınırına kadar çalıştırılarak frekans ölçüm grafikleri de elde edilecektir. Döngülü voltametri deneyleri için Radiometer PST50 cihazı Voltamaster bilgisayar programı (sürüm 4.0) kullanılacaktır [23].

### **Hedef 3.2. Optimize faj kaplı sensörler ile *S. aureus* için LOD tespit**

Önce içerisinde hiç bakteri bulunmayan 0,01M PBS solüsyonu ile elektrotlar denge konumuna getirildikten sonra  $10^2$ - $10^8$  kob/mL aralığında *S. aureus* bulunan 0,01M PBS solüsyonlarına daldırılarak Z, Rs, C, F değerleri 3522-50/3532-50 LCR HiTESTER cihazı kullanılarak her 5 s bir olacak şekilde ölçülecektir. Her bir bakteri konsantrasyonu için denge cevaplarından yararlanarak ölçü eğrileri hazırlanacak ve LOD değerleri hesaplanacaktır. Bu çalışmada faj bağlanmamış bir adet elektrot kontrol amaçlı kullanılacaktır. Elde edilen sonuçlardan çizilecek Nyquist eğrileri, yüksek



AC voltaj frekans sınırından düşük frekans sınırına kadar çalıştırılarak frekans ölçüm grafikleri elde edilecektir. Elektrokimyasal deneyleri (döngülü voltametri) yürütmek ve verileri toplamak için Voltmaster bilgisayar programı (sürüm 4.0) kullanılacaktır [23].

#### **İP4. Faj kaplı sensörlerin QCM ile ölçülmesi;**

Bu iş paketinin hedefi; faj kaplı sensörlerle *S. aureus* suşunun tespitinin sağlanmasıdır. Bu amaçla; **Hedef 4.1. Farklı oranlarda faj kaplı sensörler ile *S. aureus* tespiti;** QCM ölçümlerini gerçekleştirmek için QuartzPro Ti/Au (QCM) elektrodu kullanılacaktır. Temel frekansı 5 MHz olan AT-CUT kuvarslardır. Kuvars kristali ve metal elektrot çapları sırasıyla 1,37 ve 0,6 cm'dir. Sıvı, 200 µL'ye kadar numune hacimlerine izin veren açık bir hücre aracılığıyla kuvars osilatöründe sınırlandırılır. Hücre bir teflon ile kapatılır. Kapak ve tüm algılama modülü, bir su deposu içeren üç boyutlu baskılı bir kapak ile korunmaktadır. Bu, numunenin buharlaşmasını önlemek için çok önemlidir. Hem rezonans frekansı hem de yayılma değerleri, üreticinin yazılımı aracılığıyla gerçek zamanlı olarak kaydedilecektir. Veriler daha sonra QCM200 yazılımı kullanılarak analiz edilecektir. 200 µL 0,01M PBS QCM odasına yüklenecektir ve hem frekans hem de dağılım sinyalleri stabil olduğunda (PBS'in yüklenmesinden yaklaşık 1 saat sonra), 1 µL  $10^2$ - $10^8$  kob/mL aralığında *S. aureus* bulunan 0,01M PBS çözeltileri QCM odasına eklenecektir. Bu çalışmada faj bağlanmamış bir adet elektrot kontrol amaçlı kullanılacaktır. Elektrotun *S. aureus'* a hassasiyetini göstermek için *B. anthracis* negatif kontrol olarak kullanılacaktır. Hem rezonans frekansı hem de dağılım 24 saat izlenecektir. Tüm ölçümler üç kez tekrarlanacaktır [24].

**Hedef 4.2. Optimize faj kaplı sensörler ile *S. aureus* için LOD tespit;** Önce içerisinde hiç bakteri bulunmayan 0,01M PBS solüsyonu ile elektrotlar denge konumuna getirildikten sonra  $10^2$ - $10^8$  kob/mL aralığında *S. aureus* bulunan 0,01M PBS solüsyonlarına daldırılarak rezonans frekansı değerleri QCM200 cihazı kullanılarak gerçek zamanlı olarak ölçülecektir. Bu çalışmada faj bağlanmamış bir adet elektrot kontrol amaçlı kullanılacaktır. Elde edilen sonuçlardan frekans kayması-konsantrasyon ilişkisini gösteren ölçü eğrileri çizilecektir. Elektrokimyasal deneyleri yürütmek ve verileri toplamak için QCM200 yazılımı kullanılacaktır [24].

#### **İP5. İstatistiksel hesaplamalar**

Çalışmalardan elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi tek yönlü ANOVA ve Student t testleri kullanılarak GraphPad Prism yazılımı ile gerçekleştirilecektir. Gruplar arasındaki farklılıklar Duncan's multiple comparison test ve one-way variance analysis kullanılarak gerçekleştirilecektir [25].

#### **5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü**

Mevcut literatür kaynakları incelendiğinde biyoreseptör fonksiyonunda kullanılması planlanan bakteriyofaj K'nın tüm faj partikülü olarak kullanıldığı bir biyosensör çalışması bulunmamaktadır. Sunulan projenin kabulü durumunda hem bakteriyofaj K kaplı elektrotların kaplama metodolojisi hem de iki farklı biyosensör sisteminde prototip olarak üretilen bakteriyofaj K kaplı elektrotların kullanımının optimizasyonu **literatürde ilk defa gerçekleştirilecektir.**

Hastanelerdeki antibiyotik dirençli Stafilokokların tedavisi için polivalan anti-Stafilokok bakteriyofaj K'nın kullanıldığı çalışmaların literatürde yer alması bakteriyofaj K'nın biyoreseptör olmak için ideal faj adayı olduğunu göstermektedir [26]. Ayrıca serbest haldeki Faj K'nın nanoemiyon formülasyonundan daha düşük tedavi edici etkinliğinin bulunduğu da yine aynı çalışma da yer almaktadır [27]. **Bu bilgidен yola çıkarak faj K'nın elektrot yüzeylerine kovalent immobilizasyonun fiziksel immobilizasyonundan daha yüksek verimde bakteriyel tanımayı sağlayacağı öngörülmektedir.** *S. aureus'*a karşı aktif olan K fajının bizmut bazlı kremde stabilite gösterdiği ve bu kremin oda sıcaklığında saklama koşullarında bakterisidal aktivitesinin devam ettiği gözlemlendiğinden [27]; sunulan projede hedeflenen ve ileri aşamalarda ticarileştirilmesi planlanan sensör elektrodunun da **oda sıcaklığında muhafaza edilebilmesi sisteme büyük bir avantaj sağlayacaktır. Ayrıca literatürde bakteriyofaj K'nın farklı sıcaklıklarda ne kadar sürede**

**tanıma işlemini gerçekleştirebileceği ve elektrot yüzeyine immobilize faj K'nın ne kadar süre ile tekrar kullanılabilirliğine dair bilginin bulunmaması da çalışmanın özgünlüğünün göstergesidir.** Çünkü prototip olarak üretilecek elektrotların tekrar kullanım potansiyeli sunulan projede optimizasyon çalışmalarında ilk kez değerlendirilecektir. Mevcut faj bazlı biyosensör kaynakları incelendiğinde tam faj partikülünün kullanıldığı sınırlı çalışmaya ulaşılmıştır. Faj bazlı sensör çalışmaları çeşitli özellikler bakımından Tablo 2'de özetlenmiştir. *S. aureus* faj 12600 ile yürütülen çalışma sunulan projeye en yakın çalışma olup [28]; faj geometrisi, immobilizasyon araçları, konakçı suşları (Projemizde tespit edilecek *S. aureus* ATCC 25923 ilgili çalışmada yer almamaktadır), faj bağlanma protein (reseptör binding domain=RBD) açısından önemli farklılıkları bulunmaktadır. Özellikle QCM sistemlerinde biyoreseptörün kovalent olarak bağlanması reseptörün oryantasyonu açısından oldukça önemlidir. Kuyruklu fajların tanıma işlemi kuyruğu ile gerçekleştiği için bakteriyofaj K'nın kontraktıl kasılabilen kuyruğa sahip olması da QCM sistemlerinin temel mantığı ile bağdaşmaktadır. Çok düşük miktarlardaki bakteriyel varlığın tespitinin hedeflenmesi de hassas faj bazlı QCM sistemleri için **sunulan projede ilk niteliğindedir.**

**Literatürdeki farklı empedans sensör çalışmaları değerlendirildiğinde ise *S. aureus* tespiti için tam faj partikülü ile modifiye edilmiş bir sistemin ve elektrotun olmadığı görüldüğünden sunulan proje bu yönüyle de özgündür.** Ayrıca hem QCM hem de empedans sisteminde yapılması planlanan karşılaştırmalı optimizasyonların sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılarak ticari biyosensör için kullanılacak sensör tipinin belirlenmesi de oldukça önemlidir. **Mevcut çalışmalar incelendiğinde iki sisteminin optimizasyonuna aynı çalışmada karşılaştırmalı olarak yer veren bir çalışmaya rastlanmamıştır.** Mevcut faj bazlı biyosensör sistemleri incelendiğinde genellikle tek örnek ile çalışıldığı ya da tek örnekten tespiti sağlayan sistemler geliştirildiği gözlemlenmiştir. Sunduğumuz projenin desteklenmesi sonucu üretilecek faj K kaplı elektrotlar ile *S. aureus* tespitinin matriks bağımsız olması da yani süt, su, tükürük ve yapay analit içinden tespit yapacak şekilde geliştirilmesi de ileriki çalışmalarda planlanmaktadır. **Üretmeyi planladığımız sensörün sahip olacağı parametreler; maliyet uygunluğu, kolay kullanım, küçük ve taşınabilir olması, ekstra örnek işleme basamağına ihtiyaç duyulmaması, gerçek zamanlı okuma gerçekleştiriyor olacak olması, operatör becerisi gerektirmiyor olması şeklinde sıralanmaktadır.** Faj patent çalışmaları incelendiğinde bütün faj partikülünün kullanıldığı iki biyosensör çalışması olduğu tespit edilmiştir. Bunlardan T4 bakteriyofajı ile empedans ölçümü prensibine dayanarak tasarlanmış screen printed elektrotları kullanılarak *Escherichia coli*'nin tespiti 25 dakika/2x10<sup>4</sup> cfu/mL olarak belirlenmiştir [23]. Mikroorganizmaların besinlerden tespitine yönelik olarak fizikokimyasal durumlardaki değişimlerin ölçülmesi esasına dayanan raportör fajların geliştirilmesinin amaçlandığı diğer çalışmada yabancı tip tam faj partiküllerinin kullanılmadığı genetik olarak modifiye T4 fajının tasarlandığı gözlenmiştir [29]. Bu bilgiler; *S. aureus* tespitine yönelik faj K'nın yer aldığı bir patent çalışmasının bulunmadığını, sunulan projenin desteklenmesi ve başarı ile tamamlanması durumunda uluslararası patent potansiyelinin de yüksek olduğunu göstermektedir.

Tablo 2. Faj bazlı sensör çalışmaları ve özellikleri

Transdüksiyon Araçları	Konakçı Organizma	Faj	Faj Geometri	İmmobilizasyon Araçları	Tespit Limiti
QCM	<i>S. aureus</i>	12600	Kuyruklu	Fizisorpsiyon	Mevcut değil
	<i>M. smegmatis</i> / <i>M. tuberculosis</i>	D29	Kuyruklu	Kovalent	10 <sup>3</sup> cfu/mL
	<i>S.ser. typhimurium</i>	E2	Filamentöz	Fizisorpsiyon	10 <sup>2</sup> cfu/mL
	<i>S.ser. typhimurium</i>	E2	Filamentöz	Fizisorpsiyon	10 <sup>2</sup> cfu/mL





Tablo 4. İhtiyaç listesi

Malzeme Adı	Marka	Tablo 3'e Göre	Ürün Alternatifleri İnternet Siteleri
BHI besiyeri	Merck	1,2	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sial/53286?gclid=CjwKCAjw_JuGBhBkEiwA1xmbReBLWj-5vsyFLqnYH2ERdan1UvJZ0eA9JK1ovrOj4MthFj7hVHHIGBoCDJEQAvD_BwE">https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sial/53286?gclid=CjwKCAjw_JuGBhBkEiwA1xmbReBLWj-5vsyFLqnYH2ERdan1UvJZ0eA9JK1ovrOj4MthFj7hVHHIGBoCDJEQAvD_BwE</a> Erişim Tarihi [14.06.2021]
Petri	Isolab	1,2	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/p5606?gclid=CjwKCAjw_JuGBhBkEiwA1xmbRSMHD95cUaKvEUCqB790mI23vuzz736arEnjLKqRHlmoAuZ6hvQ--xocbTQQAvD_BwE">https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/p5606?gclid=CjwKCAjw_JuGBhBkEiwA1xmbRSMHD95cUaKvEUCqB790mI23vuzz736arEnjLKqRHlmoAuZ6hvQ--xocbTQQAvD_BwE</a> [14.06.2021]
Plastik malzeme (1000-100-10 µl pipet ucu, öze,ependorf, falkon )	Nest	1-9	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/cls4808?gclid=CjwKCAjw_JuGBhBkEiwA1xmbRXXMx5XJOHRqe9xRGE3aBNg06MpsWLB2LRVGm2DZUbnMbwS_qthC-UhoC-TAQAvD_BwE">https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/cls4808?gclid=CjwKCAjw_JuGBhBkEiwA1xmbRXXMx5XJOHRqe9xRGE3aBNg06MpsWLB2LRVGm2DZUbnMbwS_qthC-UhoC-TAQAvD_BwE</a> [14.06.2021] <a href="https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/ep0030122151">https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/ep0030122151</a> [15.06.2021]
0,22 mikron disposable steril şırınga filtre	Aisimo	1,2	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/products/filtration/laboratory-syringe-filters/syringe-filters">https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/products/filtration/laboratory-syringe-filters/syringe-filters</a> [14.06.2021]
BSA	Merk	2,3,4	<a href="https://biotium.com/product/bovine-serum-albumin-30-solution/">https://biotium.com/product/bovine-serum-albumin-30-solution/</a> [15.06.2021]
APTES	Merck	2,3,4	<a href="https://www.gelest.com/product/SIA0610.0/">https://www.gelest.com/product/SIA0610.0/</a> [15.06.2021]
EDC	Merck	2,3,4	<a href="https://www.tcichemicals.com/AU/en/p/E1093">https://www.tcichemicals.com/AU/en/p/E1093</a> [15.06.2021]
NHS	Merck	2,3,4	<a href="https://www.chemicalbook.com/Price/N-Hydroxysuccinimide.htm">https://www.chemicalbook.com/Price/N-Hydroxysuccinimide.htm</a> [15.06.2021]
PBS	Merck	1-9	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/search/pbs-tablets?focus=products&amp;page=1&amp;perPage=30&amp;sort=relevance&amp;term=pbs%20tablets&amp;type=product_name">https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/search/pbs-tablets?focus=products&amp;page=1&amp;perPage=30&amp;sort=relevance&amp;term=pbs%20tablets&amp;type=product_name</a> [14.06.2021]
QuartzPro Ti/Au elektrot	SRS	2-9	<a href="https://www.filtech.com/products/product/quartz-crystals-liquid-plating-5mhz-chrome-gold/">https://www.filtech.com/products/product/quartz-crystals-liquid-plating-5mhz-chrome-gold/</a> [15.06.2021]
İnterdigitad gold elektrot	metrohm	2-9	<a href="https://www.metrohm.com/tr-tr/urunler/elektrokimya/elektrokimya-elektrodlar/G-IDEAU10">https://www.metrohm.com/tr-tr/urunler/elektrokimya/elektrokimya-elektrodlar/G-IDEAU10</a> [15.06.2021]
Sisteamin	Merck	2,3,4	<a href="https://www.goldbio.com/product/13207/cysteamine-hydrochloride">https://www.goldbio.com/product/13207/cysteamine-hydrochloride</a> [15.06.2021]
Demir nanopartikül	Merck	2,3,4	<a href="https://ssnano.com/inc/sdetail/iron-nanoparticles--nanopowder---fe--25nm-/456">https://ssnano.com/inc/sdetail/iron-nanoparticles--nanopowder---fe--25nm-/456</a> [15.06.2021]
Glutaraldehit	Merck	2,3,4	<a href="https://www.alfa.com/en/catalog/A17876/">https://www.alfa.com/en/catalog/A17876/</a> [15.06.2021]
SEM, XPS		2,3,4	Hizmet alımı 5000 tl

## 8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar):

**Projenin hedeflediği kitle;** bakteriyel patojenlerin tespit ve tanısındaki eksikliğin neden olduğu problem alanları olan sağlık, gıda ve biyo-güvenlik alanlarındaki kurum ve kuruluşların her birini kapsama potansiyeline sahiptir. İlgili kurum ve kuruluşların yanı sıra COVID-19 pandemisinin yaşanması ile birlikte halkımız da patojenlerin yol açtığı sağlık, ekonomik ve güvenlik riskleri konusunda hem daha bilinçli hem de daha endişeli ve duyarlı bir düzeye gelmiştir. Sunulan projenin kabulü ve başarı ile tamamlanması ile elde edilecek ürün prototipinin sahip olacağı seçicilik, kullanım ömrü, kalibrasyon, tekrarlanabilirlik, stabilite, hızlı cevap ve geri dönme süresi özellikleri ile her yaş sınıfındaki bireylerin farklı amaçlara yönelik bakteri tespiti amacıyla rahatlıkla ev, hastane, okul, işyerinde kullanabilmesi sağlanacaktır.

## 9. Riskler

İp No	En Önemli Riskler	Risk Yönetimi (B planı)
2	Elektrot yüzeyinin aminosilan (APTES) ile kaplanmaması,	Sisteamin (SHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>2</sub> ) ile altın elektrot yüzeyi tiyol fonksiyonel grup ile bağlanacaktır. Bu kapsamda sisteamin su solüsyonu içinde elektrot ile bir gece bekletilecek daha sonra elektrot yüzeyi su ile yıkama yapıldıktan sonra desikatörde kurutulacaktır.
2	Elektrot yüzeyine yeterli bakteriyofaj bağlanamaması,	Bu kapsamda öncelikle bakteriyofaj ve aminosilan-glutareldehit ile kondensasyon yapıldıktan sonra elektrot yüzeyine kaplama gerçekleştirilecektir.
2	Bakteriyofaj kaplı elektrodun hassasiyetinin düşük olması (tespit aralığının 10 <sup>3</sup> kob dan yüksek olması)	Demir oksit nanopartikül ile yüzey öncelikle aminosilane ve bakteriyofaj ile kaplandıktan sonra elektrot yüzeyine fiziksel kaplama yapılacaktır. Demir nanopartikül eklenmesi ile sinyal hassasiyetinin artması beklenmektedir.
3-4	Yüzey modifikasyonlarının başarılı olması durumunda sensör cevabı alamama riski düşük görülmekle birlikte cihazdan kaynaklı arızalarının tespiti,	Empedans ve QCM ölçümlerinde cihaz arızası olması durumunda fakültemizin diğer birimlerinde bulunan cihazlarla ölçümler yapılacaktır. Ölçüm koşulları (pH, iyonik güç, vb.) değiştirilerek sensör cevaplarının optimizasyonu gerçekleştirilecektir.

## Proje Ekibi (Biyoteknoloji inovasyon yarışma şartnamesine istinaden )

Adı Soyadı	Projedeki Görevi	Üniversite	Bölüm	Projeye veya Probleme ilgili Tecrübesi
Doç. Dr. Tülin Özbek Arasoğlu	Danışman	YTÜ	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	Viroloji ve Mikrobiyal biyoteknoloji alanında uzman
Berna Erdoğan	Takım Lideri	YTÜ	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	Faj geliştirme

Semra Taşdurmazlı	Üye	YTÜ	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	Faj geliştirme
-------------------	-----	-----	--------------------------------------	----------------

### Proje İşbirlikçileri (Biyoteknoloji inovasyon yarışma şartnamesine istinaden)

Adı Soyadı	Projedeki Görevi	Üniversite	Bölüm	Projeye veya Problemlerle Tecrübesi ilgili
Prof. Dr. Hüsnü Cankurtaran	İş birliği	YTÜ	Kimya Bölümü	Analitik Kimya ve Sensörler alanında uzman
Doç. Dr. Tarık Eren	İş birliği	YTÜ	Kimya Bölümü	Yüzey Kaplama ve Biyosensörler alanında uzman
Dr. N. Ceren Süer	İş birliği	YTÜ	Kimya Bölümü	Yüzey Kaplama ve Biyosensörler alanında uzman

**Projemizin ön çalışma sonuçları Ekler kısmında görsel verilerle birlikte sunulmuştur.**

### 10. Kaynaklar

- [1] Brock, Thomas Dale, et al. *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River (NJ): Prentice-Hall, 2003., 2003.
- [2] Temelli, Seran, and Ece Çetin. "Gıdalarda Patojen Kontrolünde Bakteriyo-faj Kullanımı" Use of Bacteriophages in Control of Food Pathogens". *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 30.2 (2011): 45-52.
- [3] Stone, Edel, et al. "Understanding and exploiting phage–host interactions." *Viruses* 11.6 (2019): 567.
- [4] Laskin, Allen I., Joan W. Bennett, and Geoffrey M. Gadd. *Advances in applied microbiology*. Academic Press, 2003.
- [5] Farooq, Umer, et al. "Bacterial biosensing: Recent advances in phage-based bioassays and biosensors." *Biosensors and Bioelectronics* 118 (2018): 204-216.
- [6] Göpel, Wolfgang, and Peter Heiduschka. "Interface analysis in biosensor design." *Biosensors and bioelectronics* 10.9-10 (1995): 853-883.
- [7] Furst, Ariel L., and Matthew B. Francis. "Impedance-based detection of bacteria." *Chemical reviews* 119.1 (2018): 700-726.
- [8] Lim, Hui Jean, et al. "Quartz crystal microbalance-based biosensors as rapid diagnostic devices for infectious diseases." *Biosensors and Bioelectronics* (2020): 112513.
- [9] Ahmed, Asif, et al. "Biosensors for whole-cell bacterial detection." *Clinical microbiology reviews* 27.3 (2014): 631-646.
- [10] Bhattacharya, Sanjay. "Early diagnosis of resistant pathogens: how can it improve antimicrobial treatment?." *Virulence* 4.2 (2013): 172-184.
- [11] Dadgostar, Porooshat. "Antimicrobial resistance: implications and costs." *Infection and drug resistance* 12 (2019): 3903.

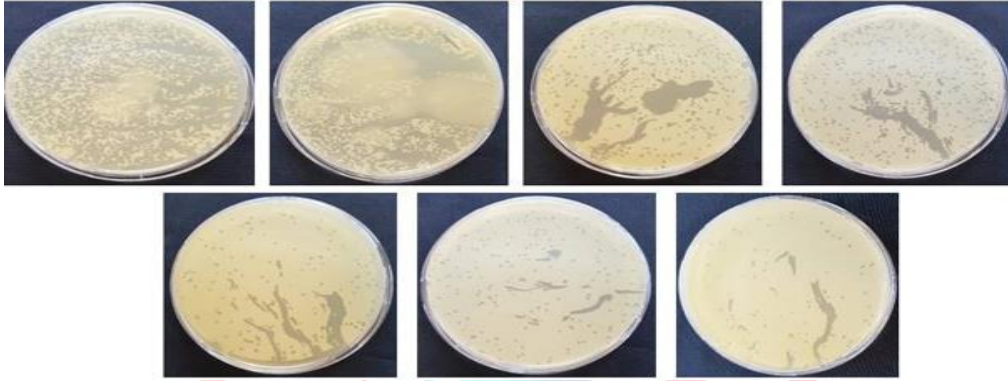


- [12] Erkmen, Osman. "Gıda kaynaklı tehlikeler ve güvenli gıda üretimi." *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 53.3 (2010): 220-235.
- [13] Havelaar, Arie H., et al. "World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010." *PLoS medicine* 12.12 (2015): e1001923.
- [14] Kluytmans, Jan, et al. "Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno-and genotyping." *Journal of Clinical Microbiology* 33.5 (1995): 1121-1128.
- [15] Erenler, Ali Kemal, Murat Güzel, and Ahmet Baydin. "How prepared are we for possible bioterrorist attacks: An approach from emergency medicine perspective." *The Scientific World Journal* 2018 (2018).
- [16] Henderson, D. "The threat of bioterrorism and the spread of infectious diseases. Testimony before the US Senate Foreign relations Committee." *107th Congress, 1st session*. 2001.
- [17] Deussenbery, Carly, Yingying Wang, and Anita Shukla. "Recent Innovations in Bacterial Infection Detection and Treatment." *ACS Infectious Diseases* 7.4 (2021): 695-720.
- [18] Parlak, Onur, and Agneta Richter-Dahlfors. "Bacterial Sensing and Biofilm Monitoring for Infection Diagnostics." *Macromolecular Bioscience* 20.11 (2020): 2000129.
- [19] Kropinski, Andrew M., et al. "Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay." *Bacteriophages*. Humana Press, 2009. 69-76.
- [20] Hosseinidou, Zeinab, Theo GM Van de Ven, and Nathalie Tufenkji. "Bacterial capture efficiency and antimicrobial activity of phage-functionalized model surfaces." *Langmuir* 27.9 (2011): 5472-5480.
- [21] Mutlu, Selma, et al. "Preparation and characterization of ethylenediamine and cysteamine plasma polymerized films on piezoelectric quartz crystal surfaces for a biosensor." *Thin solid films* 516.6 (2008): 1249-1255.
- [22] Kanat, Muhammed, and Tarik Eren. "Synthesis of phosphorus-containing flame retardants and investigation of their flame retardant behavior in textile applications." *Journal of Applied Polymer Science* 136.36 (2019): 47935.
- [23] Shabani, Arghavan, et al. "Phage-based method for the detection of bacteria." U.S. Patent Application No. 12/181,751.
- [24] Ripa, Rosa, Amy Q. Shen, and Riccardo Funari. "Detecting *Escherichia Coli* biofilm development stages on gold and titanium by quartz crystal microbalance." *ACS omega* 5.5 (2020): 2295-2302.
- [25] Bewick, Viv et al. "Statistics review 9: one-way analysis of variance." *Critical care (London, England)* vol. 8,2 (2004): 130-6. doi:10.1186/cc2836
- [26] O'Flaherty, Sarah, et al. *Molecular characterisation of bacteriophage K towards applications for the biocontrol of pathogenic staphylococci*. Teagasc, 2006.
- [27] O'flaherty, S., et al. "Potential of the polyvalent anti-*Staphylococcus* bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals." *Applied and environmental microbiology* 71.4 (2005): 1836-1842.
- [28] Guntupalli, Rajesh, et al. "Detection and identification of methicillin resistant and sensitive strains of *Staphylococcus aureus* using tandem measurements." *Journal of microbiological methods* 90.3 (2012): 182-191.
- [29] Elias, Anastasia, et al. "Bacteriophage-based biosensor for microbial detection." U.S. Patent No. 9,921,219. 20 Mar. 2018.

## EKLER

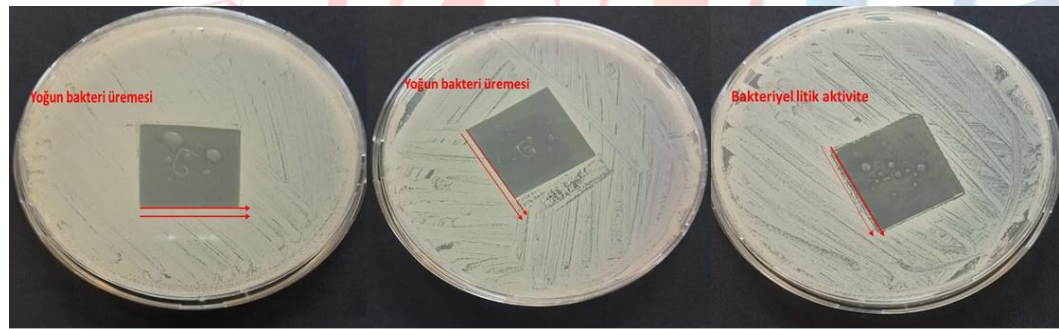
### Ön çalışma sonuçları;

**İP1. Hedef 1.1-1.2;** Ticari olarak temin edilen Bakteriyofaj K (ATCC® 19685-B1™)'nın *S. aureus* (ATCC 25923) bakteri kültür ortamında çoğaltılmasında çift tabaka agar tekniği kullanıldı. Şekil 3'deki lizis plaklarının bulunduğu petripler elde edildi. Stok fajın titre hesabı için  $10^{-7}$  dilüsyonlu faj içeren petride 62 lizis plağı sayıldı. Stok fajın PFU/ml hesabı: Petrideki zon sayısı/ Dilüsyon faktörü x Petriye eklenen faj miktarı (ml) formülüne göre hesaplanmıştır.



Şekil 1. Bakteriyofaj K'nın *S. aureus* kültür ortamında çoğaltılması

**İP2. Hedef 2.3;** Hareketsizleştirilmiş fajın enfektivitesi mikrobiyal inhibisyon tekniği kullanılarak doğrulandı. Çalışmada sonuçlar, disklerin etrafındaki lizis bölgeleri açısından incelendi. Negatif kontrol olarak faj içermeyen APTES kaplı diskler kullanıldı. Hareketsizleştirilmiş fajlar, mikrobiyal inhibisyon yöntemi kullanılarak enfektivite açısından doğrulandı. Modifiye edilmiş cam yüzeylerinde fajların, *S. aureus* agar plakası üzerindeki lizis etkisinin yaklaşık 0,2 mm çapında olduğu ve cam etrafındaki bakterileri parçalayabildiğinden dolayı enfektif oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4). Modifiye edilmiş cam yüzeylerinde ise lizis görülmemiştir. En belirgin lizis bölgesi  $10^8$  PFU/mL faj ile modifiye edilmiş cam yüzeyinde görülmüştür (sayfa yetersizliğinden  $10^{3-4-5-6-7}$  PFU/mL fajlar gösterilmemiştir).



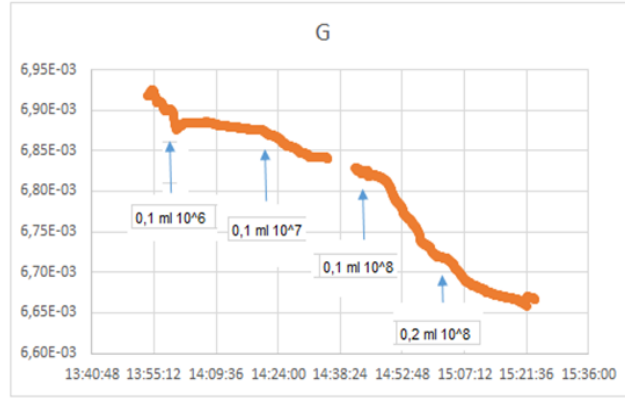
İşlem görmemiş cam

Aptes muamele cam

$10^8$  PFU faj kaplı cam

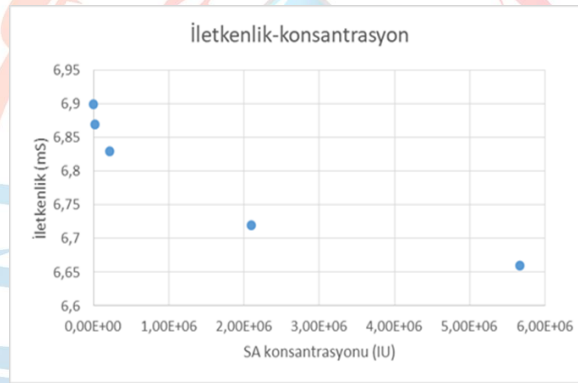
Şekil 2. Modifiye edilmemiş, sadece APTES ile muamele edilmiş ve  $10^8$  PFU/mL faj ile modifiye edilmiş cam yüzeylerin inhibisyon zon karşılaştırması

**İP3. Hedef 3.1.;** Bakteriyofaj kaplı olan ve olmayan interdigitated gold elektrotların PBS tamponu içeren çözeltide *S. aureus* ilaveleri durumunda elektriksel parametrelerinde meydana gelen değişimler sabit AC frekansı (1 kHz) altında zamana bağlı olarak ölçülmüştür. Buna ek olarak bakteri ilavesi öncesinde ve sonrasında 100 kHz-1 Hz AC frekansı aralığında empedans spektrumları kaydedilmiştir. Şekil 5'te gittikçe artan konsantrasyonda *S. aureus* ilavelerine karşı bakteriyofaj bağlanmış sensörün iletkenlik değerinde zamanla meydana gelen değişim görülmektedir.



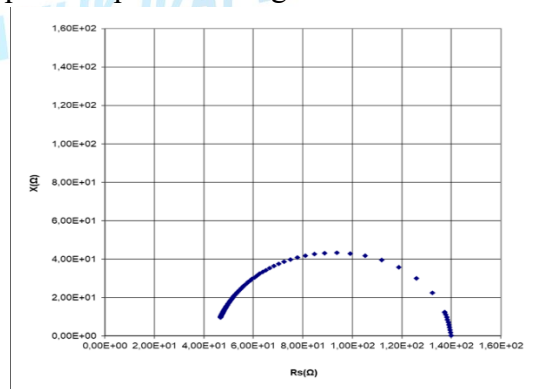
Şekil 3. Bakteriofaj modifiye sensörün *S. aureus* ilaveleri sırasında iletkenlik değeri içinde meydana gelen değişim. Potansiyel farkı: 100 mV, AC frekansı: 1 kHz.

Bakteri derişimi arttıkça iletkenlik değeri gittikçe azaldığı görülmüştür. Çözeltideki toplam bakteri derişimine karşı dengedeki iletkenlik değeri Şekil 6’da verilmiştir.



Şekil 4. *S. aureus* konsantrasyonu ve sensörün denge iletkenlik değeri arasındaki ilişki

Görüldüğü gibi,  $10^4$  kob/mL derişiminde ilk bakteri ilavesinde iletkenlik değeri ölçülebilir bir değişim olmakta ve bakteri derişimi daha da artırıldığında iletkenlik değeri içindeki değişim yavaşlamaktadır. Ön çalışmalarda  $10^6$  kob/mL mertebelerinde bakteri derişimine kadar inceleme yapılmış ve bu derişimlere kadar ölçülebilir bir değişim elde edilebileceği görülmüştür. Şekil 6 ve 7’de sırasıyla tampon çözeltiye ve  $5.66 \times 10^6$  kob/mL bakteri içeren tampon çözeltiye maruz kalan elektrot için kaydedilen empedans spektrumları görülmektedir.



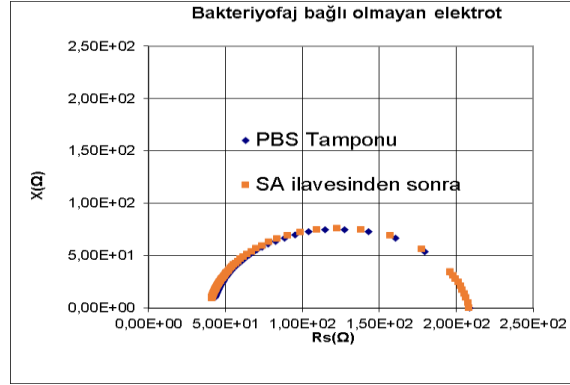
Şekil 5. Bakteriofaj modifiye sensörün PBS tampon çözelti içinde kompleks empedans spektrumu.

Potansiyel farkı: 100 mV, AC frekansı: 100 kHz-1 Hz.

Spektrumlarından görüldüğü gibi, bakteri varlığında empedansın direnç bileşeninde bir artış olmaktadır. Bu sonuç, yüzeyde bakterinin bağlanmasıyla elektrotlar arasındaki iyonik yüklerin azaldığına ve çözelti direncinin arttığına işaret etmektedir. Nitekim, bakteriyofaj bağlı olmayan



elektrot için aynı koşullarda ( $9 \times 10^6$  kob/mL *S. aureus*) kaydedilen spektrumlarında (Şekil 8) önemli bir fark olmaması bakteriyofaj bağlı sensörün bakterilerin yüzeye bağlanmasında rol oynadığını göstermektedir.



Şekil 6. Faj bağlanmamış elektrodun PBS tampon çözeltisinde ve  $9 \times 10^6$  *S. aureus* çözeltilerindeki kompleks impedans spektrumları. Potansiyel farkı: 100 mV, AC frekansı: 100 kHz-1 Hz.

Bu sonuçlar bakteriyofaj K'nın *S. aureus* tespitine yönelik sensör olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Çalışmalar diğer bakterilere karşı seçicilik ve duyarlık çalışmaları ile yöntemin optimizasyonu ve gerçek örneklerle uygulanması şeklinde devam ettirilecektir.

