T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOSENSÖR VE ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİK GÖSTEREN POLİMERLERİN SENTEZİ VE UYGULAMASI

Naime Ceren SÜER

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Fizikokimya Programı

Danışman

Prof. Dr. Tarık EREN

Haziran, 2021

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOSENSÖR VE ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİK GÖSTEREN POLİMERLERİN SENTEZİ VE UYGULAMASI

Naime Ceren SÜER tarafından hazırlanan tez çalışması 10.06.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Fizikokimya Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tarık EREN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Tarık EREN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Hüsnü CANKURTARAN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ, Üye
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi _____

Doç. Dr. Demet KARACA BALTA, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Vezir KAHRAMAN, Üye
Marmara Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Tarık EREN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Biyosensör ve Antibakteriyel Özellik Gösteren Polimerlerin Sentezi ve Uygulaması başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Naime Ceren SÜER

İmza

Bu çalışma, TÜBİTAK 2211/C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Lisansüstü Burs Programı ve Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü' nün FDK-2018-3455 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Aileme

ve

Arkadaşlarıma

Together we stand, divided we fall (Pink Floyd)

TEŞEKKÜR

Tez çalışması süresince bilgisini ve emeğini benden esirgemeyen, her geçen gün yeni bir şeyler öğrenmemize teşvik eden, sadece tez konusunda kalmayıp her türlü yardımını öğrencilerine gösteren danışmanım Prof. Dr. Tarık EREN'e;

Yaptıkları çalışmaları ile tezimde yardımcı olan Prof. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ, Prof. Dr. Hüsnü CANKURTARAN, Prof. Dr. Markus Gallei, Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU, Doç. Dr. Mustafa OKUTAN ve Doç. Dr. Nimet YILMAZ CANLI'ya;

Okumam için büyük emek gösteren, hayatta her daim bana destek olan ve destek olacak olan babam Osman Nuri SÜER, annem Güler SÜER ve ağabeyim Cenap Cem SÜER'e;

Lise hayatım boyunca bana güveni ve inancı ile desteğini benden esirgemeyen fizik öğretmenim İpek KARAGÜR ÖZTOP'a;

Doktora tezime mali destekte bulunan TÜBİTAK BİDEB 2211/C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı' na ve Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (YTÜ-BAPK);

Bana her zaman güvendiğini göstererek doktora tezimde yanımda olan Filiz YILMAZ İNAN'a; hayatımda önemli yerleri olan arkadaşlarım Ceren DEMİR ÖZMEN, Ecem IŞIKSEL, Elçin BAŞARAN AĞTAŞ, Emel BARAN AZİMLİ, Esra SARIAL KUĞUOĞLU, Fulya SALGUN, Dr. Gizem KAHRAMAN ÇEPER, Gözde YILMAZ YILDIZ, Özgen ALGÜL, Sezen GEZGİN, Sultan Merve ŞEN KILAZ, Şenay ER ULUSOY, Tuğçe TUNCA, laboratuvar arkadaşlarım İlay Ceren ACAR ÇETİNKAYA, Dr. İlayda ACAROĞLU DEGITZ, Dr. Muhammad Nazrul ISLAM ve Eren Araştırma Grubuna;

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Naime Ceren SÜER

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ x

KISALTMA LİSTESİ xi

ŞEKİL LİSTESİ xii

TABLO LİSTESİ xviii

ÖZET xix

ABSTRACT xxi

1 GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1

1.2 Tezin Amacı 4

1.3 Hipotez 5

2 BAKTERİLER 6

2.1 Tanımı 6

2.2 Bakterilerin Sınıflandırılması 6

2.2.1 Gram Boyadan Etkilenmelerine Göre Bakteriler 6

2.3 Bakterilerin Hücresel Yapıları ve Özellikleri 7

2.3.1 Gram-pozitif ve Gram-negatif Hücre Duvarı 8

2.3.2 Fosfolipitler 10

3 ELEKTROKİMYASAL SENSÖR 13

3.1 Tanımı 13

3.2 Elektrokimyasal Algılama 13

3.2.1 Elektrokimyasal Hücreler 14

3.3 Elektrokimyasal Sensör Çeşitleri 15

3.3.1 Potansiyometrik Algılama 15

3.3.2 Kondüktometrik Algılama 15
3.3.3 Amperometrik Algılama 15
3.3.4 Voltametrik Algılama 15
3.3.5 Empedans Algılama 17
3.4 Uygulama Alanları 17
4 HALKA AÇILMA METATEZ POLİMERİZASYONU (ROMP) 19
4.1 Genel Bilgi 19
4.2 Polimerizasyonun Mekanizması ve Termodinamiği 21
5 DENEYSEL ÇALIŞMALAR VE BULGULAR 27
5.1 Materyal ve Yöntem 27
5.1.1 Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler 27
5.1.2 Deneyde Kullanılan Cihazlar ve Yardımcı Gereçler 27
5.2 Monomerlerin Sentezi 28
5.2.1 Furan Maleik Anhidrit Diels Alder Ürününün (4,10-Dioxa-tricyclo [5.2.1.$0^{2,6}$] dec-8-ene-3,5-dione) Sentezi (Ürün 1) 28
5.2.2 Bromookzanorbornen (4-(3-bromopropyl)-10-oxa-4-azatricyclo [5.2.1.$0^{2,6}$]dec-8-ene-3,5-dione) Sentezi (Ürün 2) 29
5.2.3 Trifenilfosfonyum Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi 29
5.2.4 Furan Maleimit Diels Alder Ürününün (exo-oxabicyclo-[2.2.1] hept-5-ene-2,3- dicarboximide) Sentezi (Ürün 3) 29
5.2.5 Fosfonat Esteri İçeren Okzanorbornen (3,5-Dioxo-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.$0^{2,6}$]dec-8-en-4-ylmethyl)-phosphonic acid diethyl ester) Sentezi (Monomer 2) 30
5.2.6 Amino Piridin Fonksiyonel Gruplu Okzanorbornen ((3aR,4S,7R)-2-(pyridin-3-ylmethyl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-4,7-epoxyisoindole-1,3(2H)-dione) Sentezi (Ürün 4) 30
5.2.7 Hekzilpiridinyum Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi 31

5.2.8 Tiyol Asetat İçeren Okzanorbornen Sentezi (Monomer 4) 31

5.3 Grubbs Üçüncü Jenerasyon Katalizörünün Sentezi 32

5.4 Monomerlerin ROMP Metodu ile Kopolimerizyonları 32

5.4.1 Poly A_1 Serisi (Fenilfosfonyum Tuzu (Monomer 1) ve Fosfonat Esteri (Monomer 2) İçeren Okzanorbornenlerin Kopolimerizasyonu) 33

5.4.2 Poly A_2 Serisi (Hekzilpiridinyum Tuzu (Monomer 3) ve Fosfonat Esteri (Monomer 2) İçeren Okzanorbornenlerin Kopolimerizasyonu) 33

5.4.3 Poly B_1 Serisi (Fenilfosfonyum Tuzu (Monomer 1) ve Tiyol Asetat (Monomer 4) İçeren Okzanorbornenlerin Kopolimerizasyonu) .. 34

5.4.4 Poly B_2 Serisi (Hekzilpiridinyum Tuzu (Monomer 3) ve Tiyol Asetat (Monomer 4) İçeren Okzanorbornenlerin Kopolimerizasyonu) 34

5.5 Fosfonat Esteri İçeren Okzanorbornen Kopolimerlerinin (Poly A_1 ve Poly A_2 Serisi) Fosfonik Aside Dönüştürülmesi 34

5.5.1 Poly A_1 Serisinin Fosfonik Aside Dönüştürülmesi 34

5.5.2 Poly A_2 Serisinin Fosfonik Aside Dönüştürülmesi 35

5.6 Fe_3O_4 Nanopartiküllerinin Ko-Çökeltme Yöntemi İle Sentezlenmesi ve Fosfonik Asit İçeren Kopolimerlere (Poly A_1 ve Poly A_2 esaslı) Bağlanması 35

5.7 Poly B_1 ve Poly B_2 Serisine Altın Nanopartikül Bağlanması 36

5.8 Yüzey Kaplamaları 36

5.8.1 Spin Kaplama İle Cam Yüzeylerinin Kaplanması 36

5.8.2 Altın Elektrot Yüzeylerinin Kaplanması 37

5.9 Katı Yüzeyde Antibakteriyel Etkinlik 37

5.9.1 Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması 37

5.9.2 Cam Yüzeyde Antibakteriyel Aktivite Testi 37

5.9.3 Disk Difüzyon Testi 38
5.10 Empedans Ölçümü 38
5.11 Döngüsel Voltametri 39
6 DENEYSEL VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ 40
6.1 Monomerlerin Sentezi ve Karakterizasyonu 43
6.2 Kopolimelerin Sentezi ve Karakterizasyonu 56
6.2.1 Poly A Serisi Sentezi ve Karakterizasyonu 56
6.2.2 Poly B Serisi Sentezi ve Karakterizasyonu 83
6.3 Elektrot Yüzeyi Kaplanması 96
6.3.1 Poly A Serisinin Elektrot Yüzeyine Kaplanması 96
6.3.2 Poly B Serisinin Elektrot Yüzeyine Kaplanması 100
6.4 Katı Yüzeyde Antibakteriyel Etkinlik 102
6.4.1 Poly A Serisi Antibakteriyel Etkinlik 102
6.4.2 Poly B Serisi Antibakteriyel Etkinlik 106
6.5 Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi 109
6.5.1 Poly A Serisi Empedans Sonuçları 110
6.5.2 Poly B Serisi Empedans Sonuçları 116
6.6 Döngülü Voltametri Ölçümleri 127
7 SONUÇ VE ÖNERİLER 131
KAYNAKÇA 134
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 145

SİMGE LİSTESİ

rpm	Dakikadaki devir sayısı
Da	Dalton
°C	Derece santigrat
g	Gram
kcal	Kilokalori
kDa	Kilodalton
kHz	KiloHertz
cfu	Koloni oluşturan birim (colony forming units)
L	Litre
McF	Mcfarland
MHz	MegaHertz
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mmol	Milimol
mM	Milimolar
mV	Milivolt
ppm	Milyonda bir birim
n	Mol
M	Molar
nm	Nanometre
cm	Santimetre
cm^2	Santimetrekare

KISALTMA LİSTESİ

ADMET	Asiklik Dien Metatez
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
AMP	Antimikrobiyal Peptit
ANp	Altın Nanopartikül
CM	Çapraz Metatez
CV	Siklik Voltametri
DMAc	*N,N*-Dimetilasetamid
DMF	*N,N*-Dimetilformamid
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DONP	Demir Oksit Nanopartikülü
EIS	Elektrokimyasal Empedans Spektroskopi
ELISA	Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GPC	Jel Geçirgenlik Kromatografisi
LOD	Saptama Sınırı
MEMS	Mikroelektromekanik Sistem
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NP	Nanopartikül
PBS	Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi
PDI	Polidispersite İndeks
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QCM	Kuvars Kristal Mikro Terazi
RCT	Yük Transfer Direnci
RBC	Kırmızı Kan Hücresi
RCM	Halka Kapama Metatez
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROM	Halka Açılma Metatez
ROMP	Halka Açılma Metatez Polimerizasyonu
SEC	Boyut Dışlama Kromatografisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SHE	Standart Hidrojen Elektrot
SPR	Yüzey Plazmon Rezonansı
THF	Tetrahidrofuran
TLC	İnce Tabaka Kromotografisi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Gram boyama testi prosedürü[43] 7
Şekil 2.2 Bakteri hücresi şekli [44] 8
Şekil 2.3 Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri hücre duvarı yapısı [47] 8
Şekil 2.4 Fosfolipitlerin şematik gösterimi 11
Şekil 2.5 Hücre membranında bulunan lipitlerin yapısal gösterimi[51] 11
Şekil 3.1 Üç döngüde gerçekleştirilen genel döngüsel voltamogram E_{pa}: Anodik tepe potansiyeli, E_{pc}: Katodik tepe potansiyeli, karşılık gelen tepe akımları şu şekilde belirtilir: i_{pa} ve i_{pc} [65] 16
Şekil 3.2 Empedansa göre çalışan birbirine bağlı elektrot sensörü[69] 17
Şekil 4.1 Halka açılma metatez polimerizasyonuna (ROMP) genel bir örnek 19
Şekil 4.2 Norbornenin ROMP gösterimi ve polinorbornenin ozonolizi 20
Şekil 4.3 Metatez yolları: ADMET (polimerizasyon), ROMP, RCM, ROM ve çapraz metatez (CM) 21
Şekil 4.4 Tipik bir ROMP reaksiyonunun mekanizması 22
Şekil 4.5 ROMP reaksiyonlarda ikincil metatez (moleküller arası zincir transfer ve molekül içi zincir transfer) reaksiyonların örnekleri 24
Şekil 4.6 Halka açılma metatez polimerizasyonu için kullanılan en yaygın metal-karben kompleksleri 26
Şekil 6.1 Çalışmada sentezlenen Poly A serisi kopolimerlerin yapısal gösterimi 41
Şekil 6.2 Çalışmada sentezlenen Poly A serisi kopolimerlerin fosfonik asit yapısal gösterimi 42
Şekil 6.3 Çalışmada sentezlenen Poly B serisi kopolimerlerin yapısal gösterimi 43
Şekil 6.4 Çalışma kapsamında sentezlenen ürün 1, ürün 2 ve monomer 1'in sentetik şeması 44
Şekil 6.5 Furan maleik anhidritin (ürün 1) ^{1}H NMR spektrumu 45
Şekil 6.6 Furan maleik anhidritin (ürün 1) ^{13}C NMR spektrumu 45
Şekil 6.7 Bromookzanorbornen'in (ürün 2) ^{1}H NMR spektrumu 46
Şekil 6.8 Bromookzanorbornen'in (ürün 2) ^{13}C NMR spektrumu 47
Şekil 6.9 Monomer 1'in ^{1}H NMR spektrumu 48
Şekil 6.10 Monomer 1'in ^{13}C NMR spektrumu 48
Şekil 6.11 Monomer 1'in ^{31}P NMR spektrumu 49
Şekil 6.12 Çalışma kapsamında sentezlene ürün 3 ve monomer 2'nin sentetik şeması 49
Şekil 6.13 Monomer 2'nin ^{1}H NMR spektrumu 50
Şekil 6.14 Monomer 2'nin ^{13}C NMR spektrumu 50
Şekil 6.15 Monomer 2'nin ^{31}P NMR spektrumu 51
Şekil 6.16 Ürün 4 ve monomer 3'ün sentez şeması 51
Şekil 6.17 Ürün 4'ün ^{1}H NMR spektrumu 52
Şekil 6.18 Ürün 4'ün ^{13}C NMR spektrumu 53
Şekil 6.19 Monomer 3'ün ^{1}H NMR spektrumu 53
Şekil 6.20 Monomer 3'ün ^{13}C NMR spektrumu 54
Şekil 6.21 Monomer 4'ün sentez şeması 54
Şekil 6.22 Monomer 4'ün ^{1}H NMR spektrumu 55
Şekil 6.23 Monomer 3'ün ^{13}C NMR spektrumu 55
Şekil 6.24 Blok kopolimer 2a ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu 57

Şekil 6.25 Blok kopolimer 2a ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu 57
Şekil 6.26 Blok kopolimer 2b (Mn,th = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu 58
Şekil 6.27 Blok kopolimer 2b ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu 58
Şekil 6.28 Rastgele kopolimer 2c ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu 59
Şekil 6.29 Rastgele kopolimer 2c ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu 59
Şekil 6.30 Blok kopolimer 2d ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu 60
Şekil 6.31 Blok kopolimer 2d ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu 60
Şekil 6.32 Blok kopolimer 2e ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu 61
Şekil 6.33 Blok kopolimer 2e ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu 61
Şekil 6.34 Blok kopolimer 3a ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu 62
Şekil 6.35 Blok kopolimer 3a ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu 62
Şekil 6.36 Blok kopolimer 3b ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu 63
Şekil 6.37 Blok kopolimer 3b ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu 63
Şekil 6.38 Rastgele kopolimer 3c ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu 64
Şekil 6.39 Rastgele kopolimer 3c ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu 64
Şekil 6.40 Blok kopolimer 3d ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu 65
Şekil 6.41 Blok kopolimer 3d ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu 65
Şekil 6.42 Blok kopolimer 3e ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu 66
Şekil 6.43 Blok kopolimer 3e ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu 66
Şekil 6.44 Kopolimer 2b'nin GPC grafiği 69
Şekil 6.45 Kopolimer 3a'nın GPC grafiği 69
Şekil 6.46 Blok kopolimer 2a* asit formu ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu 70
Şekil 6.47 Blok kopolimer 2a* asit formu ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu 70
Şekil 6.48 Blok kopolimer 2b* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu 71
Şekil 6.49 Blok kopolimer 2b* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu 71

Şekil 6.50 Rastgele kopolimer 2c* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu 72
Şekil 6.51 Rastgele kopolimer 2c* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu 72
Şekil 6.52 Blok kopolimer 2d* asit formu ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu 73
Şekil 6.53 Blok kopolimer 2d* asit formu ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu 73
Şekil 6.54 Blok kopolimer 2e* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu 74
Şekil 6.55 Blok kopolimer 2e* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu 74
Şekil 6.56 Blok kopolimer 3a* asit formu ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu 75
Şekil 6.57 Blok kopolimer 3a* asit formu ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu 75
Şekil 6.58 Blok kopolimer 3b* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu 76
Şekil 6.59 Blok kopolimer 3b* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu 76
Şekil 6.60 Rastgele kopolimer 3c* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu 77
Şekil 6.61 Rastgele kopolimer 3c* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu 77
Şekil 6.62 Blok kopolimer 3d* asit formu ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu 78
Şekil 6.63 Blok kopolimer 3d* asit formu ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu 78
Şekil 6.64 Blok kopolimer 3e* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu 79
Şekil 6.65 Blok kopolimer 3e* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu 79
Şekil 6.66 Bromotrimetilsilan-DMF (BTMS-DMF), 3a ve 3a* FTIR spektrumları 81
Şekil 6.67 Bromotrimetilsilan-DMF model bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu 81
Şekil 6.68 Bromotrimetilsilan-DMF model bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu 82
Şekil 6.69 Demir oksit (yüzeyi kaplanmamış) nanopartikül bağlanması sonrası polimerler ((a) Poly A_2 serisi (b) Poly A_1 serisi (c) polimersiz) 83
Şekil 6.70 Blok kopolimer 4a ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu 84
Şekil 6.71 Blok kopolimer 4a ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu 84
Şekil 6.72 Blok kopolimer 4b ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu 85
Şekil 6.73 Blok kopolimer 4b ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu 85
Şekil 6.74 Rastgele kopolimer 4c ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol Kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu 86
Şekil 6.75 Rastgele kopolimer 4c ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol Kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu 86

Şekil 6.76 Blok kopolimer 4d ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu 87
Şekil 6.77 Blok kopolimer 4d ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu 87
Şekil 6.78 Blok kopolimer 4e ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu 88
Şekil 6.79 Blok kopolimer 4e ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu 88
Şekil 6.80 Blok kopolimer 5a ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu 89
Şekil 6.81 Blok kopolimer 5b ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu 89
Şekil 6.82 Rastgele kopolimer 5c ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu 90
Şekil 6.83 Blok kopolimer 5d ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu 90
Şekil 6.84 Blok kopolimer 5e ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu 91
Şekil 6.85 Poly B_1 serisi (4a-e) kopolimerlerinin GPC grafiği 94
Şekil 6.86 Poly B_2 serisi (5a-e) kopolimerlerinin GPC grafiği 94
Şekil 6.87 Altın napopartikül bağlı kopolimerlerin UV-VIS absorpsiyon spektrumları 95
Şekil 6.88 Altın nanopartikül bağlı kopolimerlerin TEM görüntüleri (a) 4b-AN, (b) 4e-AN, (c) 5b-AN (d) 5e-AN 96
Şekil 6.89 2b*-DONP'nin altın elektrot yüzeyine bağlanması için tiyol-en reaksiyonu 97
Şekil 6.90 Kaplanmamış, 2b* ile kaplanmış ve 2b*-DONP ile kaplanmış elektrot yüzeylerinin FTIR spektrumları 98
Şekil 6.91 (a) Kaplanmamış elektrot (b)2b* kaplı elektrot (c) 2b*-DONP kaplı elektrot yüzeylerinin sem görüntüleri 99
Şekil 6.92 (a) Kaplanmamış elektrot (b)2b* kaplı elektrot (c) 2b*-DONP kaplı elektrot yüzeylerinin AFM görüntüleri 100
Şekil 6.93 Kaplanmamış, 4b ile kaplanmış ve 5b ile kaplanmış elektrot yüzeylerinin FTIR spektrumları 101
Şekil 6.94 (a) Kaplanmamış elektrot (b)4b kaplı elektrot (c) 5b kaplı elektrot yüzeylerinin SEM görüntüleri 101
Şekil 6.95 Fosfonik aside dönüştürülmüş Poly A serisi kopolimerlerin % antibakteriyel etkinlikleri 104
Şekil 6.96 Demir oksit (yüzeyi kaplanmamış) nanopartikül bağlanmış Poly A serisi kopolimerlerin % antibakteriyel etkinlikleri 104
Şekil 6.97 *S. aureus* ve *E. coli'ye* karşı Poly A serisi kopolimerlerin log azalma ve % öldürme sonuçları 106
Şekil 6.98 *S. aureus* ve *E. coli'ye* karşı Poly B serisi kopolimerlerin log azalma ve % öldürme sonuçları 107
Şekil 6.99 Poly B serisi kopolimerlerinin *S. aureus* ve *E. Coli* ile maruz bırakıldıktan sonraki petri görüntüleri (SC: Solvent kontrol, NC: Kaplamasız cam kontrol) 108
Şekil 6.100 4b-AN ve 5b-AN kopolimerlerinin disk difüzyon testi sonuçları 108
Şekil 6.101 Elektrotların empedans ölçümleri 109

Şekil 6.102 Ölçüm öncesi ve ölçüm sonrası elektrot yüzeyleri 110
Şekil 6.103 2b* Kopolimerinin *S. aureus*'a karşı empedans-frekans grafiği 112
Şekil 6.104 2b* Kopolimerinin *E. coli*'ye karşı empedans-frekans grafiği 112
Şekil 6.105 2b* Kaplı elektrodun çeşitli konsantrasyonlardaki *S. aureus*'a karşı empedans-zaman grafiği 113
Şekil 6.106 2b* Kaplı elektrodun çeşitli konsantrasyonlardaki *E. coli*'ye karşı empedans-zaman grafiği 113
Şekil 6.107 Antibakteriyel polimer 2b* sensörünün sabit frekansta (100 Hz) çeşitli *S. aureus* ve *E. coli* konsantrasyonlarında gerçek zamanlı empedimetrik yanıtı 114
Şekil 6.108 2b*-DONP kopolimerinin *S. aureus*'a karşı empedans-frekans grafiği 114
Şekil 6.109 2b*-DONP kopolimerinin *E. coli*'ye karşı empedans-frekans grafiği 115
Şekil 6.110 2b*-DONP+3a* kopolimerinin *S. aureus*'a karşı empedans-frekans grafiği 115
Şekil 6.111 2b*-DONP+3a* kopolimerinin *E. coli*'ye karşı empedans-frekans grafiği 116
Şekil 6.112 (a) 2b* kaplı elektrot yüzeyi (b) *S. aureus* ile kontamine edildikten sonra (c) *E. coli* ile kontamine edildikten sonraki 2b* kaplı elektrotların SEM görüntüleri 116
Şekil 6.113 4b kopolimerinin *S. aureus*'a karşı empedans-frekans grafiği 121
Şekil 6.114 4b kopolimerinin *E. coli*'ye karşı empedans-frekans grafiği 121
Şekil 6.115 4b Kaplı elektrodun çeşitli konsantrasyonlardaki *S. aureus*'a karşı empedans-zaman grafiği 122
Şekil 6.116 4b Kaplı elektrodun çeşitli konsantrasyonlardaki *E. coli*'ye karşı empedans-zaman grafiği 122
Şekil 6.117 Antibakteriyel polimer 4b sensörünün sabit frekansta (100 Hz) çeşitli *S. aureus* ve *E. coli* konsantrasyonlarında gerçek zamanlı empedimetrik yanıtı 123
Şekil 6.118 5b kopolimerinin *S. aureus*'a karşı empedans-frekans grafiği 123
Şekil 6.119 5b kopolimerinin *E. coli*'ye karşı empedans-frekans grafiği 124
Şekil 6.120 5b Kaplı elektrodun çeşitli konsantrasyonlardaki *S. aureus*'a karşı empedans-zaman grafiği 124
Şekil 6.121 5b Kaplı elektrodun çeşitli konsantrasyonlardaki *E. coli*'ye karşı empedans-zaman grafiği 125
Şekil 6.123 5b kopolimeri kaplı elektrodun bakteri kontamine süt örneğinin empedans-zaman grafiği (___):10^7 cfu/mL *S. aureus* 600. saniye eklendi (___):10^7 cfu/mL *S. aureus* kontamine süt örneği ölçümü (____):10^7 cfu/mL *E.coli* kontamine süt örneği ölçümü 126
Şekil 6.124 5b kopolimeri kaplı elektrodun atık suyun *S. aureus* ile kontaminasyonunun empedans-zaman grafiği 126
Şekil 6.125 (a) 5b kaplı elektrot yüzeyi (b*) S. aureus* ile kontamine edildikten sonra (c) *E. coli* ile kontamine edildikten sonraki 5b kaplı elektrotların SEM görüntüleri 127
Şekil 6.126 (___): PBS tampon, 0,01 M $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks prob bakteri eklemeden önce (____) ve (___)10^7 cfu/mL *S. aureus* ile bekletildikten sonrası CV sonuçları 128
Şekil 6.127 (___): PBS tampon, 0,01 M $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks prob bakteri eklemeden önce (____) ve (___)10^5 cfu/mL *S. aureus* ile bekletildikten sonrası CV sonuçları 129

Şekil 6.128 (___): PBS tampon, 0,01 M $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks prob bakteri eklemeden önce (____) ve (___)10^7 cfu/mL *E. coli* ile bekletildikten sonrası CV sonuçları.....129
Şekil 6.129 (___): PBS tampon, 0,01 M $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks prob bakteri eklemeden önce (____) ve (___)10^5 cfu/mL *E. coli* ile bekletildikten sonrası CV sonuçları.....130
Şekil 6.130 (___): PBS tampon, 0,01 M $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks prob bakteri eklemeden önce (____) ve (___)10^7 cfu/mL *E. coli* ile ve (___)10^5 cfu/mL *E. coli* ile bekletildikten sonrası CV sonuçları.....130

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Gram-Pozitif ve Gram-Negatif bakteri arasındaki farklar 9
Tablo 2.3 Farklı hücrelerde bulunan lipitlerin dağılımı*.....12
Tablo 4.1 Geçiş metali karben komplekslerinin fonksiyonel grup toleransı 26
Tablo 6.1 Poly A_1 ve A_2 serilerinin karakterizasyonları.....67
Tablo 6.2 Poly B_1 ve B_2 serilerinin karakterizasyonları.....92
Tablo 6.3 Poly A_1 ve A_2 serilerinin çözünürlükleri 103
Tablo 6.4 Poly A serisi kopolimerlerinin *S. aureus* ve *E. Coli* ile maruz bırakıldıktan sonraki petri görüntüleri 106

ÖZET

Biyosensör ve Antibakteriyel Özellik Gösteren Polimerlerin Sentezi ve Uygulaması

Naime Ceren SÜER

Kimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Tarık EREN

Dünya çapında bakteriyel patojenler, hastalık ve enfeksiyon esaslı ölümlerin ana nedenidir. Özellikle antibiyotiğe dirençli patojenlerin ortaya çıkışı, bu sorunun ciddiyetini arttırmıştır. Buna ek olarak, gıda ve su kaynaklarında görülen mikrobiyal kontaminasyon; insan ve çevre sağlığının yanısıra ekonomik etkisi ile de dünya genelinde önemli bir problem teşkil ettiği görülmektedir. Bu kapsamda özellikle gıda ve su sektörleri gibi insanlar için hayati önem taşıyan sektörlerde üretilen ürünlerin sterilizasyonu ve gerekli kontrollerden geçmesi gerekmektedir. Bakterilerin tespiti için laboratuvar ortamında hücre kültürü çalışmalarının yanı sıra biyosensör uygulaması da bulunmaktadır. Sensör uygulamalarında patojenlerin tespit edilmesi ve tanımlanması için kullanılan nanoparçacıkların boyutu ve özellikleri, sensörün algılamasını yükselterek hassasiyetin artmasına neden olmaktadır. Bu ilkeye dayanarak, son yıllarda birçok biyosensör geliştirilmiştir.

Önceki çalışmalarımızda trifenilfosfonyum ve hekzilpiridinyum tuzları içeren ROMP (halka açılma metatez polimerizasyonu) tipi polimerlerin biyosidal etkinliğinin cam yüzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir. Tez kapsamında iki farklı polimer (ROMP tipi) esaslı sensör geliştirilmiştir. Bu çalışmalar sırası ile (i) POLY A serisi olan; trifenilfosfonyum-tiyoasetat, hekzilpiridinyum-tiyoasetat esaslı kopolimerler ve bunların altın nanopartikül içeren türevleri ve (ii) POLY B serisi

olan; trifenilfosyonyum-fosfonat, hekzilpiridinyum-fosfonat esaslı kopolimerler ve bunların demir nanopartikül içeren türevleridir. Bu polimerlerin molekül ağırlığı 3.000 ve 10.000 g/mol olarak ve rastgele ve blok kopolimerleri sentezlenmiştir. Bu polimerlerin empedans sinyal gücünü ve biyosidal etkinliğini artıracağı düşünüldüğü için demir oksit (Fe_3O_4) ve altın nanopartikülleri polimerlerin yapısına eklenmiştir. Polimerlerin öncelikle cam yüzeydeki biyosidal etkinliği *E. coli* ve *S. aureus*'a incelenmiştir. Antibakteriyel etkin seçilen polimerler daha sonra altın elektrot üzerine kaplandıktan sonra biyosensör özelliği farklı konsantrasyondaki *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı incelenmiştir. Altın elektrot yüzeyindeki bakteri ile antimikrobiyal polimer arasındaki etkileşim, elektrokimyasal empedans spektroskopisi ve siklik voltametri kullanılarak ölçüldü. Kopolimerlerin ve nanopartiküllerin karakterizasyonu için ^{1}H, ^{13}C ve ^{31}P NMR, FTIR, SEM, AFM ve TEM teknikleri kullanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antibakteriyel polimer, ROMP, bakteri sensörü, elektrokimyasal empedans spektroskopisi, siklik voltametri

ABSTRACT

Synthesis and Application of Polymers for Biosensor and Antibacterial Properties

Naime Ceren SÜER

Department of Chemistry

Doctor of Philosophy Thesis

Advisor: Prof. Dr. Tarık EREN

Bacterial pathogens are the main cause of morbidity and infectious deaths worldwide. In particular, the emergence of antibiotic-resistant pathogens has increased the severity of this problem. In addition, microbial contamination in food and water sources; it is seen that it constitutes an important problem worldwide with its economic impact as well as human and environmental health. In this context, products produced in sectors that are vital for humans such as food and water sectors must be sterilized and controlled. In addition to cell culture studies in the laboratory for the detection of bacteria, there is also a biosensor application. The size and properties of nanoparticles used for detecting and identifying pathogens in sensor applications cause to enhance the sensitivity with increasing the detection of sensor. Based on this principle, many biosensors have been developed in recent years.

In our previous studies, it has been observed that the biocidal activity of ROMP (ring opening metathesis polymerization) type polymers containing triphenylphosphonium and hexylpyridinium salts was high on the glass surface. Within the scope of the thesis, two different polymer (ROMP type) based sensors

have been developed. These studies are respectively (i) POLY A series; triphenylphosphonium-thioacetate, hexylpyridinium-thioacetate based copolymers and their derivatives containing gold nanoparticles and (ii) POLY B series; triphenylphosionium-phosphonate, hexylpyridinium-phosphonate based copolymers and their derivatives containing iron nanoparticles. Random and block copolymers with a molecular weight of 3,000 and 10,000 g/mol were synthesized. Iron oxide (Fe_3O_4) and gold nanoparticles have been added to the structure of polymers as it is thought to increase the impedance signal strength and biocidal efficiency of these polymers. First of all, the biocidal activity of polymers on glass surface was investigated against *E. coli and S. aureus.* The interaction between bacteria on the gold electrode surface and the antimicrobial polymer was measured using electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry. ^{1}H, ^{13}C and ^{31}P NMR, FTIR, SEM, AFM and TEM techniques were used for the characterization of copolymers and nanoparticles.

Keywords: Antibacterial polymers, ROMP, bacteria sensor, electrochemical impedance spectroscopy, cyclic voltammetry

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Antibiyotiğe dirençli mikroorganizmaların evrimi, en büyük küresel tehditlerden biridir ve bakteriyel patojenler, dünya çapında insan ve veteriner tıbbında ana ölüm nedenidir [1-4]. Son yıllarda yapılan araştırmalar, gelişmekte olan ülkelerde neonatal enfeksiyonların her yıl 1,5 ile 2 milyon arasında ölüme neden olduğunu göstermiştir [5, 6]. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezlerine göre *Salmonella* 1,2 milyon Amerikalıda hastalığa neden olduğu, her yıl 23.000 hastaneye yatışı ve 450 kişinin ölüme yol açtığı tespit edilmiştir. Bu vakaların yaklaşık 1 milyonu gıda kaynaklarından kaynaklanmaktadır [7]. İçme suyu da enfeksiyonun yayılması için başka bir kaynaktır. Amerika ve Avrupa'daki ülkeler için genellikle önceden paketlenmiş olan güvenli içme suyuna erişim norm iken dünyanın her yerinden birçok insan, özellikle kurak iklimlerde yaşayanların içme suyuna erişimi yoktur. Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre her yıl 5 milyondan fazla insan su kaynaklı bakteriler tarafından gıda ve su kaynaklarından kirlenme nedeniyle ölmektedir. Bu tür bakterilerin ishal hastalığına neden olduğu bilinmektedir [8, 9]. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ve *Escherichia coli* (*E. coli*) özellikle hastane ve tıbbi ortamlarda tehlikelidir [10]. Ayrıca *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* ve *E. coli*, gıda kaynaklı birincil ve en yaygın patojenlerdendir [1]. Bazı mikroorganizma türlerinin varlığı maliyetli ve insan sağlığına zararlı olabilir hatta ölümle sonuçlanabilir. Bu nedenle gıda üretimi veya su kaynakları gibi birçok farklı alanda mikroorganizmaların tespiti için yeni ve basit yöntemlerin geliştirilmesine yönelik artan bir ihtiyaç vardır.

Bakteri tespiti için birçok teknik geliştirilmiştir. Son yıllarda biyosensörler, patojenik bakterilerin saptanmasında giderek daha önemli bir rol oynamaktadır. Sensörlerin geliştirilmesi; kirliliğe neden olan bakterilerin gerçek zamanlı tespiti için yüksek bir önceliktir [11, 12]. Yıllar geçtikçe birçok biyolojik prosedür

basitleştirildi ve önemli ölçüde azaltılmış test süreleri ve artırılmış hassasiyetle tespit için daha hızlı yöntemler geliştirildi. En önemlisi; "hızlı tespit teknikleri" olarak adlandırılan bu gelişmiş biyoteknolojik analizler, artık yalnızca agar ortamına dayalı olmayan yeni nesil analitik yöntemleri ortaya çıkarmıştır [13]. Enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve darbeli alan jel elektroforezi gibi mikrobiyal patojenleri tespit etmeye yönelik mevcut teknolojiler kantitatif, yüksek hassasiyetli ölçümler sunar [6, 14, 15]. Bununla birlikte bu yöntemler genellikle zaman alıcıdır ve pahalı laboratuvar ekipmanları ile kalifiye teknik uzmanlar gerektirir. Mikroelektromekanik sistem (MEMS) tabanlı biyosensörler, bu sorunların bazılarından kaçınmak için son zamanlarda bakteriyel algılama için geliştirilmiştir [16]. Genel olarak, bu teknolojiler antijen bağlanması için yüksek seçicikleri nedeniyle moleküler tanıma için antikorlara dayanır [17]. Bununla birlikte antikor bazlı MEMS biyosensörleri; yüksek sıcaklık ortamlarında sınırlı stabiliteye sahiptir ve her hedef için oldukça spesifik antikor-antijen çiftleri gerektirir. Hızlı, ucuz, yüksek hassasiyetli analiz için floresan elektrokimyasal empedans, kuvars kristal mikro terazi (QCM) ve yüzey plazmon rezonansı (SPR) kullanılarak hedef bakteri hücrelerinin antijenitesine dayalı çeşitli immünosensörler geliştirilmiştir [6, 18-22]. Bugüne kadar geliştirilen patojen biyosensörleri, esas olarak immünosensörleri ve DNA tabanlı saptamayı içerir. Aptamerlere (tipik olarak DNA veya RNA bazlı oligonükleotit sekansları) dayalı biyoalgılama, yeni nesil hedef reseptörler için popüler hale gelmektedir [23]. Nanomalzemeler, benzersiz fizikokimyasal özellikleri nedeniyle biyosensörlerin performansını artırabilir. Özellikle nanomalzemeler, geniş yüzey alanlarından dolayı biyoalgılama olayları sırasında analitleri daha verimli bir şekilde yakalamada etkili olabilir [24, 25]. Özellikle altın nanopartiküller (ANp), yüzey işlevselleştirme olasılığı ve olağanüstü optik ve elektriksel özellikleri nedeniyle biyosensörlerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılan nanomateryallerden biri olmuştur [4]. Benzer şekilde, demir oksit nanopartiküllerini içermesi elektrot performanslarını artırabilir [26]. Biyolojik ve kimyasal patojenlerin tespiti alanında demir oksit nanopartiküllerinin kompozitlerinin algılama uygulaması kullanılmıştır [27, 28]. Örneğin; antikor

etiketli çok işlevli Au-Fe_3O_4 nanokompozitler, ultra düşük konsantrasyonlarda *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) tespiti için kullanılmıştır [29].

Antimikrobiyal peptidler (AMP), mikroorganizmalara karşı düşük konsantrasyonda yüksek biyosidal etkinliğe sahiptir [21]. Bu durum da onları patojenik biyoalgılama uygulamaları için özellikle umut verici kılar.[30] Bakterilerileri öldürme mekanizması net belirli olmasa da, AMP'lerin hücreyi parçalamadan önce bakteri hücrelerine yapıştığı bildirilmiştir [31-33]. Bu prensibe dayanarak son yıllarda peptit bazlı biyosensörlerin geliştirildiği görülmektedir [21]. Mannoor ve arkadaşları Magainin I tabanlı biyosensör kullanarak bakteri tespiti bildirdi [19]. Birbirine bağlı altın elektrotlar kullandılar ve peptit ile bakteriler arasındaki bağlanma aktiviteleri elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile izlendi. Sonuçlar Magainin I'in *E. coli* için yaklaşık 10^3 cfu/mL saptama sınırı sağladığını gösterdi. Etayash ve arkadaşları Leucocin A AMP'yi bir altın elektroda kovalent olarak bağlayarak empedans değişimlerini ölçtü [13]. 1 hücre/µL konsantrasyonunda peptid-bakteri etkileşimlerini tespit eden tekrarlanabilir empedans spektrumları ürettiler. Ek olarak *Listeria monocytogenes*, ortamda diğer Gram-pozitif suşların varlığında 10^3 cfu/mL konsantrasyonunda seçici olarak tespit edilmiştir. Daha sonra süt örneği *Listeria monocytogenes* ile kirletilerek süt örneğinin analizi yapılmıştır. Fakat burada iyi sonuçlar elde edilememiş ve empedans ölçümlerinde pozitif ve negatif sapmalar görülmüştür. Fosfat tampon tuz çözeltisinin (PBS) aksine süt; yağ, şeker, enzim ve proteinlerden oluşan bileşenleri nedeniyle çok yüksek bir molekül yoğunluğuna sahiptir. Sapmaların sebebi, bu bileşenlerin elektrot yüzeyine bağlanması sonucu bakteri hücrelerinin bağlanmasını etkilemesi ve sensör duyarlılığının kaybolmasına sebep olmasıdır. Jiang ve arkadaşları Colicin V AMP'yi altın bir elektroda immobilize etti ve bunu *E. coli* ile kontamine olmuş su örnekleri için bakteri sensörü olarak kullandı.[34] Sensör, 10^2 cfu/mL konsantrasyonunda seçici olarak *E. coli* saptadı. Sensörün pH 7–9 aralığında ve 10^2–10^6 cfu/mL konsantrasyonlarında su örneklerinde *E. coli* saptayabildiği kanıtlanmıştır. Miranda ve arkadaşları gram-negatif bakterilerin saptanması için Clavanin A peptidi ve sistein ile modifiye edilmiş altın nanopartiküllerini kullanmışlardır [4]. Elektrot modifikasyonu aşamaları, sistem bileşenlerinin adsorpsiyonu sonrasında

yük transfer direncinin (RCT) aşamalı olarak artmasıyla 100 MHz–100 kHz frekans aralığında elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) kullanarak değerlendirmişlerdir. *S. Typhimurium* ve *E. coli* için daha yüksek tepki seviyeleri gözlemlemişlerdir. Ayrıca, -0,2–0,7 V tarama aralığında siklik voltametri tekniği (CV) kullanılmıştır. Sonuçlar, sensörün 10^1 ile 10^4 cfu/mL arasındaki konsantrasyonları etkili bir şekilde ayırt ettiğini göstermiştir. Bu nedenle önerilen biyolojik sensör, bakteriyel tespit için uygulanabilir ve kantitatif tespit için olası bir alternatif olarak düşünülmüştür.

Son yıllarda, polimerlerden türetilen doğal peptitlerinin sentetik taklitleri özellikle malzeme bilimi, biyoloji ve biyomedikal bilim alanlarında uygulamaları için kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bunların arasında özellikle katyonik polimerler; sürekli bir inhibitör etki, geniş spektrumlu antibakteriyel aktivite, kolay sentez ve maliyet etkinliği gibi çeşitli faydalı özelliklere sahiptir [35]. Örneğin; zıt yüklü polielektrolit (polietilenimin (PEI) ve poli (sodyum 4-stirensülfonat) (PSS)) katmanları ile peş peşe olarak kaplanmış bir sensör yüzeyi, *E.coli* için 20 dakikada 10^1 cfu/mL kadar düşük bir algılama sınırı gösterdiği görülmüştür [36].

1.2 Tezin Amacı

Su, insanların temel ihtiyacı olduğu için içindeki bakteriyel kirlilik insan sağlığını tehdit etmektedir. Bu nedenle dünya çapında canlıların ölümüyle karşı karşıya kalınmaktadır. Bu konu hakkında ulusal ve uluslararası mevzuatlar bulunmaktadır (Yüzeysel Su Kalitesi Yönetimi Yönetmeliği (RG: 28483, 30.11.2012), Yüzeysel Sular ve Yeraltı Sularının İzlenmesine Dair Yönetmelik (RG: 28910, 11.02.2014)). Sulardaki bakteri analizinin bakteriye spesifik olması ve düşük saptama sınırı (LOD) büyük sorun teşkil etmektedir. Bakteri konsantrasyonu azaldıkça bakteriyi tayin etmek zorlaşmaktadır. Sentetik antibakteriyel polimerlerin amfifilik yapısı sayesinde bu polimerler, bakterilerin fosfolipit yapıları ile etkileşime girerek bakterileri öldürmeden önce bakteri yüzeylerine yapışmaktadır. Doğal katyonik peptitlerin biyosensör uygulamaları literatürde bulunmaktadır. Yapısal benzerliğe (hidrofobik/katyonik) sahip olan polimerlerin benzer şekilde sensör uygulaması bu tez kapsamında çalışılmıştır. Bu kapsamda literatürde ilk defa doğal peptit

türevlerinin sentetik taklitleri olan biyosidal polimerlerin (bu çalışmada kullanılan ROMP tipi polimerler) bakteri sensörü çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Önceki çalışmalarımızda trifenilfosfonyum ve hekzilpiridinyum tuzları içeren ROMP (halka açılma metatez polimerizasyonu) tipi polimerlerin biyosidal etkinliğinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada, antibakteriyel özellik gösteren iki farklı kopolimer sentezi (POLY A ve POLY B Serisi) gerçekleştirilmiştir. Kopolimerlerin (i) POLY A serisi (trifenilfosfonyum-tiyoasetat, hekzilpiridinyum-tiyoasetat esaslı) ve (ii) POLY B serisi (trifenilfosyonyum-fosfonat, hekzilpiridinyum-fosfonat esaslı) cam yüzeydeki biyosidal aktivitesi incelenmiştir. Bu polimerlerin sinyal gücünü ve biyosidal etkinliğini artıracağı düşünüldüğü için demir oksit (Fe_3O_4) ve altın nanopartikülleri polimer yapısına bağlanmıştır. Demir oksit nanopartikülünü bağlamak için trifenilfosyonyum-fosfonat, hekzilpiridinyum-fosfonat esaslı kopolimer yapıları; altın nanopartikül bağlamak için trifenilfosfonyum-tiyoasetat, hekzilpiridinyum-tiyoasetat esaslı polimer yapıları kullanılmıştır. Bu polimerlerin molekül ağırlığı 3.000 ve 10.000 g/mol olarak ve rastgele ve blok kopolimerleri sentezlenmiştir.

Antibakteriyel etkin seçilen polimerler altın elektrot üzerine kaplandı ve *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinin tespiti için farklı konsantrasyonlarda biyosensör özellikleri incelenmiştir. Altın elektrot yüzeyindeki bakteri ile antimikrobiyal polimer arasındaki etkileşim, elektrokimyasal empedans spektroskopisi ve siklik voltametri kullanılarak ölçüldü.

1.3 Hipotez

Atık suların bakteri içermesi, bu bakterilerin insan ve veteriner sağlığını etkilemesinden dolayı bakteri sensörleri geliştirilmiştir. Tezimizde EIS ve CV yöntemleri kullanılarak bakterilerin tespiti maliyeti düşük, kısa sürede cevap alınan ve uygulaması kolay yöntem ile atık sulardaki bakteriler kolayca tespit edilebilmesi düşünülmektedir ve düşük saptama sınırı (LOD) değeri öngörülmektedir. Ayrıca literatüre baktığımızda sentetik antibakteriyel ROMP polimerleri kullanılarak bakteri analizi bir ilk olacaktır. Bu polimerlerin antimikrobiyal peptilerden daha kararlı olması, kolay sentezlenebilir olması da önemli bir avantajıdır.

2
BAKTERİLER

2.1 Tanımı

Bakteriler, çeşitli ortamlarda hayatta kalabilen tek hücreli mikroskobik organizma olarak tanımlanabilir. Prokaryot hücre yapısına sahip, gözle görülemeyen, ancak mikroskopla saptanabilen yararlı ve zararlı işlevleri olan tek hücreli canlılardır. Bakterilerin bir kısmı insanlar için yararlı olsa da (mayanın fermantasyonu, sütün kesilmesi, sindirim sistemine yardımcı olası) diğer bakterilerin bazıları zatürre, kolera ve benzeri ölümcül hastalıklara neden olmaktan sorumludur [37, 38].

2.2 Bakterilerin Sınıflandırılması

Bakteriler; fiziksel şekillerine (çomaksı, yuvarlak, spiral), beslenme şekillerine (ototrof, heterotrof), Gram boyadan etkilenmelerine (Gram-pozitif, Gram-negatif) ve oksijene duydukları ihtiyaca (aerob, anaerob, fakültatif, mikroaerofil) göre sınıflandırılmaktadır [39, 40].

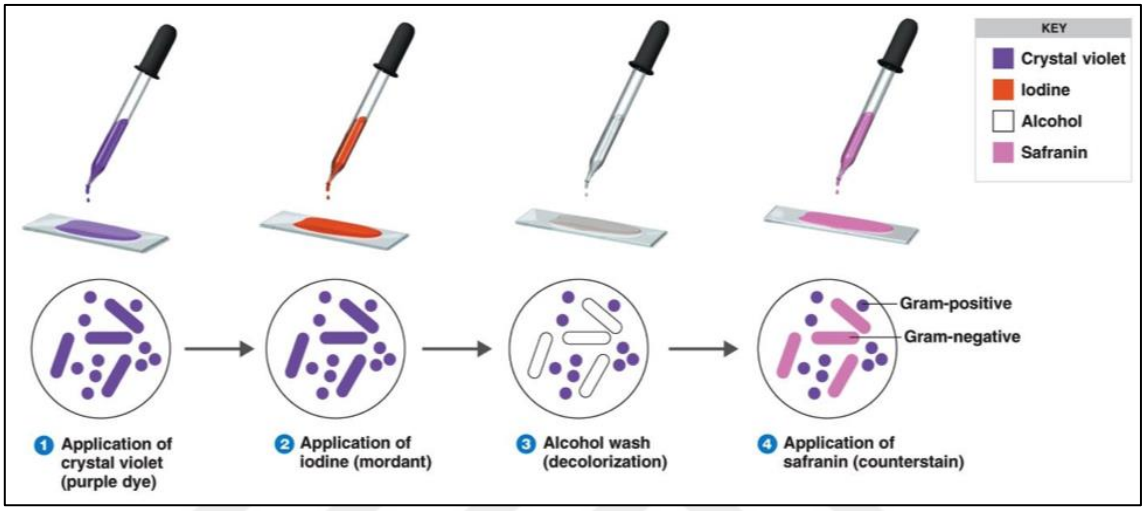
2.2.1 Gram Boyadan Etkilenmelerine Göre Bakteriler

Gram boyama testi, bakterileri hücre duvarlarının fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre sınıflandırmak için kullanılır. Bu teknik, adını 1884'te geliştiren Danimarkalı bilim insanı Hans Christian Gram'dan almıştır[41].

Şekil 2.1'de Gram boyama testi uygulaması görülmektedir. Slaytlar sırayla kristal menekşe, iyot ile boyanır, ardından alkolle boyanır ve safranin ile karşı boyanır. Gram-pozitif bakteriler mavi-mor boyar ve Gram-negatif bakteriler kırmızı-pembe boyar. İki grup arasındaki farkın, Gram-pozitiflerde çok daha büyük bir peptidoglikandan (hücre duvarı) kaynaklanmaktadır. Hücre duvarlarının ağsı ve kat kat peptidoglikandan oluşan yapısı boya parçacıklarını tutar. Sonuç olarak, iyot ve kristal menekşe, kalınlaşmış hücre duvarında çöker ve kristal menekşenin bakterilerden kolayca ayrıştırıldığı Gram-negatiflerinin aksine alkolle yıkanmaz. Gram-pozitifler birinci boyayla mora boyandıkları için ikinci boya onların rengini

etkilemez ama Gram-negatif olanlarda alkolle kristal menekşe, iyot gittiği için safranin nedeni ile pembe-kırmızı olurlar.

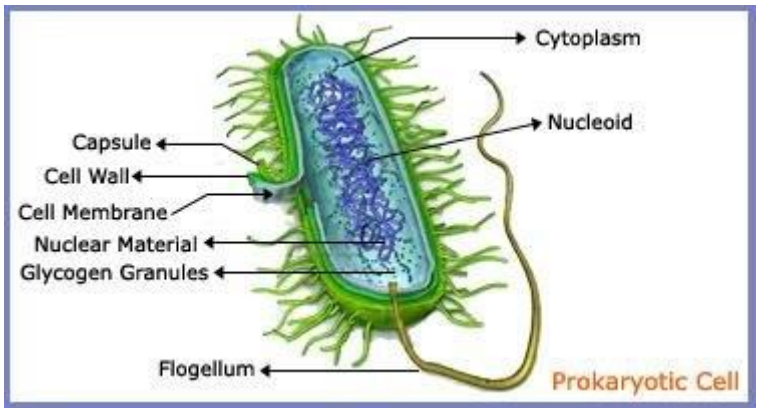
Mycobacterium (tüberküloza neden olan bakteri) gibi bazı bakteriler, peptidoglikanın büyük lipid içeriği nedeniyle güvenilir şekilde boyanmaz. Bu nedenle, daha uzun ilk boyamadan sonra boyanmaya karşı dirençten yararlanan alternatif boyama teknikleri (Kinyoun veya asit-fast boyama) kullanılır [42].



Şekil 2.1 Gram boyama testi prosedürü[43]

2.3 Bakterilerin Hücresel Yapıları ve Özellikleri

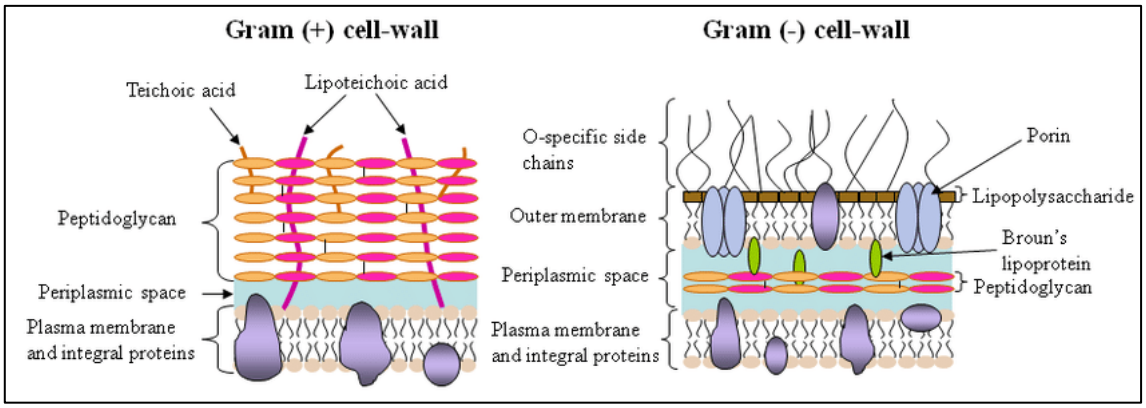
Bakteriyel hücre dış yapılarının anatomisi, hücre duvarı ve kapsül olarak bilinen hücre duvarının dışında koruyucu jelatinimsi kaplamaya sahiptir. Bunun dışında bazı bakteriler, hücre yüzeyinden çıkıntı yapan ipliksi uzantılara, flagella ve fimbriaya sahiptir. Yüzey yapıları hücre zarının dışından kaynaklanır, bazen ona bağlanır ve ortama doğru uzanır [44]. Bakteriler iç yapı olarak; sitoplazmik zar (hücre zarı veya plazma zarı), sitoplazma, mezozom, çekirdek(nucleus, kromozom, DNA), plazmid, ribozomdan vb. Oluşmaktadır [45]. Şekil 2.2'de tipik bir bakteri hücresinin şekli gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Bakteri hücresi şekli [44]

2.3.1 Gram-pozitif ve Gram-negatif Hücre Duvarı

Şekil 2.3 Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri hücre duvarı yapısını göstermektedir. Gram pozitif bakteriler, 20-80 nm kalınlığında olan sacculus adı verilen sürekli bir hücre duvarı içerir. Hücre duvarı, murein olarak bilinen peptidoglikandan oluşur. Peptidoglikanlar, hem N-asetillenmiş muramik asit hem de glukozaminden oluşan bir glikan omurgası içerir. Gram pozitif bakterilerde, bu glikan omurgası, oligopeptitlerle yüksek oranda çapraz bağlanmıştır. β-laktam antibiyotikleri, çapraz bağlanmada rol oynayan transpeptidaz enzimini hedefler. Bazı gram pozitif bakterilerde, peptidoglikan omurgasına kovalent olarak bağlı teikoik asit bulunur. Teikoik asit, güçlü bir negatif yük taşır ve güçlü bir antijeniktir [46].



Şekil 2.3 Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri hücre duvarı yapısı [47]

Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı (7,5-10 nm) ince peptidoglikan içeren tek tabakadır. Peptidoglikan omurgası, gram negatif bakterilerde kısmen çapraz bağlıdır. Teikoik asit, gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunmaz. Gram negatif bakteriler, hücre duvarının dışında dış zar denilen hücre zarfından oluşur, Gram negatif bakterilerin dış zarında endotoksin görevi gören lipopolisakkaritler bulunur. Dış zar, kovalent olmayan bir şekilde lipoproteinlere tutturulur ve buna, peptidoglikan tabakasına kovalent olarak bağlanan Braun lipoproteinleri denir [43]. Tablo 2.1'de Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri hücre duvarı farkları gösterilmiştir.

Tablo 2.1 Gram-Pozitif ve Gram-Negatif bakteri arasındaki farklar [48]

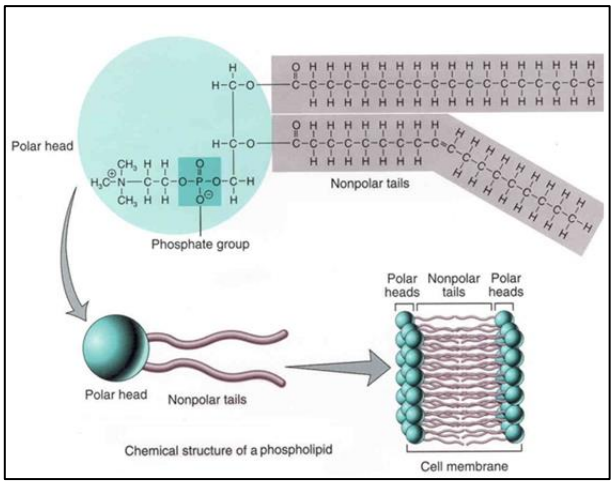
	GRAM-POZİTİF	**GRAM-NEGATİF**
Peptidoglikan Katmanı	kalın (çok katmanlı)	ince (tek katmanlı)
Hücre Duvarı Kalınlığı	20-80 nm	10 nm
Duvardaki Katman Sayısı	1	2
Peptidoglikan İçeriği	>%50	%10-20
Hücre Duvarındaki Teikoik Asit Varlığı	var	yok
Lipit ve Lipoprotein İçeriği	düşük (aside dayanıklı bakteriler peptidoglikan bağlantılı lipitleri olması)	yüksek (dış zar varlığı)
Protein İçeriği Oranı	0%	9%
Lipopolisakkarit (LPS) İçeriği	neredeyse hiç	yüksek
Periplazmik Boşluk	yok	var
Dış Zar	yok	var
Kamçılı Yapı	temel vücutta 2 halka	temel vücutta 4 halka
Toksin Üretimi	ekzotoksin	ekzotoksin ve endotoksin

Tablo 2.2 Gram-Pozitif ve Gram-Negatif bakteri arasındaki farklar[48] (devamı)

Fiziksel Bozulma Direnci	yüksek	düşük
Lizozim ile Hücre Duvarı Parçalanması	yüksek	düşük (dış membrane bozma ön işlemi gerektirir)
Sülfoamid ve Penisiline Duyarlılık	yüksek	düşük
Streptomisini Kloroamfenikol ve Tetrasiklin Duyarlılığı	düşük	yüksek
Temel Boya (Basic Dyes) İnhibisyonu	yüksek	düşük
Anyonik Deterjanlara Duyarlılık	yüksek	düşük
Sodyum Azid Direnci	yüksek	düşük
Kurumaya Direnci	yüksek	düşük

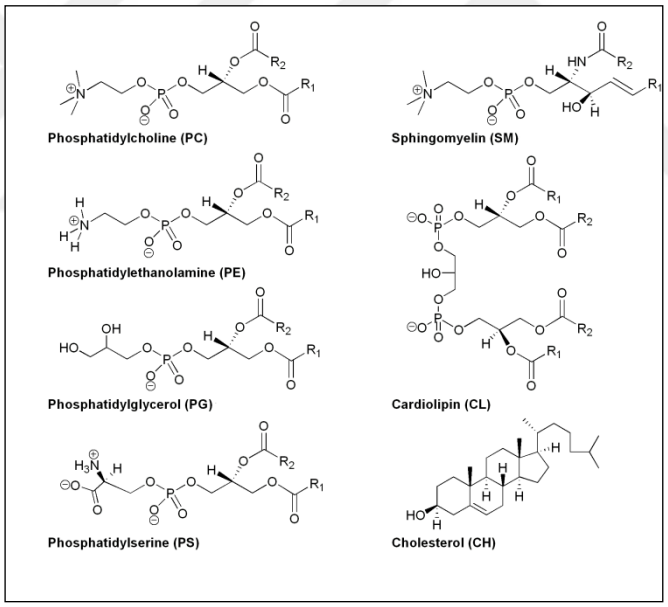
2.3.2 Fosfolipitler

Fosfolipitler, hücre membranının en önemli bileşenidir. Bir fosfolipid molekülünün yapısı tipik olarak iki hidrofobik yağ asidi kuyruktan ve bir fosfat grubundan oluşan bir hidrofilik baştan oluşur. Bu iki bileşen bir gliserol molekülü ile birleştirilir. Fosfat grubu, kolin gibi basit organik moleküller ile değiştirilebilir. Fosfat grubunun amfifilik özelliğinden dolayı sulu ortamda fosfolipitler, hidrofobik kuyruklarını yan yana ve uç uca yerleştirerek, sadece hidrofilik başların suyla temas ettiği bir çifte tabaka oluştururlar. Oluşan bu tabaka esnek, kısmen geçirgen ve sıvı kristaller gibi akışkandır [49, 50]. Şekil 2.4'te fosfolipitlerin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.4 Fosfolipitlerin şematik gösterimi

Fosfolipitler; fosfatın bulunduğu baş kısım bölgesi ile fosfolipitin nötral, asidik ve bazik olmak üzere üç ana kategoriye ayrılarak yükünü etkiler [49]. Şekil 2.5'te hücrelerdeki lipitler ve baş gruplarından dolayı lipitlerin yükleri görülmektedir.



Şekil 2.5 Hücre membranında bulunan lipitlerin yapısal gösterimi[51]

Tablo 2.2'de kırmızı kan hücrelerinin (RBC), bazı Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerinin hücre membranında bulunan lipitlerin türüne göre dağılımı gösterilmiştir. Kan hücrelerinde fosfatidil gliserol (PG) olmaması hücre çeperini nötral yapar. Bununla birlikte bakterilerde PG bulunması (-) yüklü çeper olmasına sebep olur ve böylece katyonik maddelerle elektrostatik etkileşime girebilir [52].

Tablo 2.3 Farklı hücrelerde bulunan lipitlerin dağılımı*

Hücre Türü	**PC**	**PE**	**PG**	**PS**	**SM**	**CL**	**CH**
E. coli (Gram-negatif)	-	%80	%20	-	-	%5	-
S. typhimurium (Gram-negatif)	-	%60	%33	-	-	%7	-
P. cepacia (Gram-negatif)	-	%82	%18	-	-	-	-
B. subtilis (Gram-pozitif)	-	%12	%70	-	-	%4	-
S. aureus (Gram-pozitif)	-	-	%57	-	-	%43	-
Kırmızı kan hücreleri-RBC (dış kısım)	%33	%9	-	-	%18	-	%25
Kırmızı kan hücreleri-RBC (iç kısım)	%10	%25	-	%10	%5	-	-

* PC: Fosfatidilkolin; PE: Fosfatidiletanolamin; PG: Fosfatidilgliserol; PS: Fosfatidilserin; SM: Sfingomiyelin; CL: Kardiyolipin; CH: Kolesterol

3
ELEKTROKİMYASAL SENSÖR

3.1 Tanımı

Elektrokimyasal dönüştürücü vasıtasıyla çalıştırılan biyosensörler; elektrokimyasal biyosensörler olarak tanımlanmaktadır. Enzimler, tam hücreler, spesifik ligandlar ve dokular gibi biyolojik materyallerin yanı sıra biyolojik olmayan matrisleri de tespit edebilirler [53].

Biyosensör çağı, Clark ve Lyons tarafından geliştirilen ilk glikoz ölçeri icat edilerek 1962'de başladı [54]. Daha sonra biyo-teletıp, biyoloji, çevresel izleme, ilaç keşfi, gıda güvenliği kontrolü ve diğerleri gibi alanlarda yayılmaya başladı. Teknolojinin gelişmesiyle makinelerin daha küçük kullanım amaçlı cihazlara dönüşümü biyosensörlere ilginin artmasına sebep olmuştur. Biyolojik faktörlerin elektronik cihazlara uygulanması, gelişmiş hassasiyet, seçicilik, tespit limitleri (LOD'lar) ve niceleme limitlerine (LOQ'lar) sahiptir [55]. Biyosensörler beş ana bileşenden oluşur: (i) biyo-alıcı, (ii) arayüz, (iii) dönüştürücü eleman, (iv) bilgisayar yazılımı ve (v) bir kullanıcı arayüzü. Biyoreseptör, analite seçici olarak bağlanır ve arayüz, ölçülen sinyale yol açan seçilmiş bir biyolojik olayın meydana geldiği yerdir. Elektrokimyasal biyosensörlerde bu sinyal dönüştürücü bir elektrokimyasal dönüştürücüdür ve bu nedenle de sinyali elektronik sinyale dönüştürür. Bilgisayar yazılımı sayesinde ise bu sinyaller, anlamlı bir şekilde yorumlanabilecek fiziksel bir parametre haline gelir. Bu daha sonra kullanıcı arabirimi aracılığıyla operatöre sunulur [53].

3.2 Elektrokimyasal Algılama

Elektrokimyasal biyosensörler, biyokimyasal reseptörleri sayesinde kantitatif veya yarı kantitatif analitik bilgi sağlarlar. Analitin indirgenme/oksidasyon reaksiyonlarından kaynaklanan akım veya potansiyel değişiklikler ölçülerek analiz edilebilir. Burada prensip her zaman kararlı referans elektroduna göre ölçülen elektrotların üretimi veya tüketimi nedeniyle çözelti ortamı özelliklerinin

değişmesidir. Süreç, çalışma elektrot yüzeyine odaklandığından, çözelti konsantrasyonuna değil tür aktivitesine bağlıdır. Ayrıca, direkt elektron akışının kullanılmadığı, redoks reaksiyonuna odaklanılmayan elektrokimyasal teknikler de mevcuttur. Örneğin, yüzey biyofonksiyonel hale getirilmesinden ve antijen-antikor, reseptör-ligand ve diğerleri gibi moleküler etkileşimlerden kaynaklanan elektrot yüzeyindeki değişiklikler analiz edilir. Bu durumda empedans, kapasitans veya direnç patametreleri ölçülür. Ayrıca, reseptör olarak kullanılan çoklu elektrot malzemeleri ve bunların immobilizasyon yöntemleri mevcuttur [56, 57].

3.2.1 Elektrokimyasal Hücreler

Geleneksel elektrokimyasal hücre çalışma, yardımcı ve referans olmak üzere üç ayrı elektrot içerir. Çalışma elektrodu kimyasal olarak kararlı iletken malzemeler olan altın, karbon, platin gibi malzemelerden yapılır ve her malzemenin potansiyel penceresi, kapasitesi gibi farklı parametreleri olduğu için ölçümü etkilemektedir. Ayrıca malzemenin toksisite ve maliyeti de önemlidir. Çalışma elektrodu yüksek tekrarlanabilirlik ve S/N (sinyal/gürültü) özellikleri göstermelidir. Çalışma elektrodunda redoks olayı yüzeyde gerçekleştiğinden dolayı analiz edilen reaksiyona bağlı olarak hem katodik hem de anodik olarak polarize edilebilir. Yardımcı elektrot, çalışma elektrodu ile arasında elektron akışını sağlar ve hücredeki mevcut devreyi kapatır. Genellikle yardımcı elektrot olarak karbon, platin tel kullanılır. Referans elektrot, tüm hücrede sabit potansiyel üretir ve çalışma elektrodu reaksiyonunu dengeler. En yaygın yardımı elektrot, sıfır yarı hücre potansiyeline sahip standart hidrojen elektrotu (SHE) veya gümüş klorürle kaplı gümüş teldir [56, 58].

Üç elektrotlu geleneksel elektrokimyasal hücre dışında varyasyonlar da mevcuttur. Mikroakışkan hücreler konsepti, daha kolay örnekleme ve temizleme, artırılmış hassasiyet ve azaltılmış girişimler sunar [59]. Açıkça daha az reaktif tüketilir ve daha az atık üretilir. Örneğin, mikrobiyal yakıt hücresi (MFC) organik substratları mikrobiyal katabolizma yoluyla elektrik sinyaline dönüştürebilir.[60] Çip üstü laboratuvar cihazlarında (LOC), üç elektrot sistemi, birden fazla laboratuvar işlevi ile birkaç santimetre kare platforma kadar minyatürleştirilmiştir. Çok küçük sıvı hacimlerini (pikolitre seviyesi) işlemek mümkündür. Ekran baskılı elektrotlar

(SPE'ler), üç mini elektrotlar, ultra ince ölçüm sistemi oluşturan polimer substrat üzerine yerleştirilir. Yüksek tekrarlanabilirlik ve düşük maliyetle seri üretilirler. Bu set, çalışma elektrodu yüzeyinin kolay modifikasyonuna izin verir [61].

3.3 Elektrokimyasal Sensör Çeşitleri

3.3.1 Potansiyometrik Algılama

Potansiyometrik sensörlerin prensibi, bir elektrottaki potansiyelin başka bir elektroda göre değişikliğinin ölçülmesine dayanmaktadır. Elektriksel potansiyel farkı veya elektromotor kuvveti (EMF) sıfır akım değerinde ölçülür [62]. Reaksiyon, Nernst denklemi ile tanımlanır. Konsantrasyon tepkisi logaritmiktir ve çok küçük değişikleri bile algılayabilir [56, 58].

3.3.2 Kondüktometrik Algılama

Akım akışının veya elektriksel ilektenliği değiştiren bir çözeltinin iyonik gücünün değişiminin ölçülmesine dayalı elektrokimyasal algılamalardır. Düşük maliyetli ince film uygulamaları, doğrudan gerçek zamanlı izleme, minyatürleştirme gibi avantajları olmasına rağmen dezavantaj olarak diğer elektrokimyasal algılamalara göre düşük hassasiyet göstermektedir [56, 58, 62].

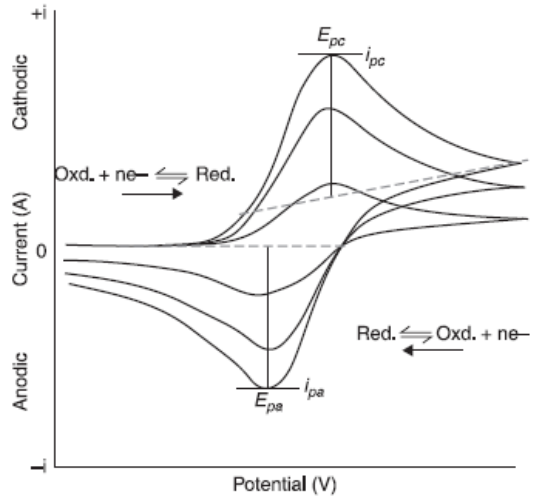
3.3.3 Amperometrik Algılama

Bu dönüştürücülerin çalışma prensibi çalışma elektroduna uygulanan sabit bir potansiyel altında redoks reaksiyonundan gelen doğru akımın ölçülmesine dayanmaktadır. Tanıma elemanının aktivitesi, hedef molekül ile etkileşimden sonra değişir. Ürün, elektroaktif olmalı ve redoks reaksiyonu göstermelidir [63]. Akım, aktarılan elektronların oranıdır ve analit konsantrasyonu ile orantılıdır.

3.3.4 Voltametrik Algılama

Voltammetrik dönüştürücüler, akım-potansiyel ilişkisini ölçen, çoğunlukla biyoalgılama analizlerinde kullanılan en kapsamlı dönüştürücülerdir [63]. Redoks zirvelerinin göründüğü potansiyel, mevcut tepe boyutu türlerle orantılıdır ve incelenen türlere özel olduğu için tek bir ölçümde farklı karakteristik potansiyele sahip birçok bileşiğin tespitini mümkün kılmaktadır. Voltametrik yöntemler; döngüsel voltametri (CV), diferansiyel puls voltametri (DPV), sıyırma voltametri,

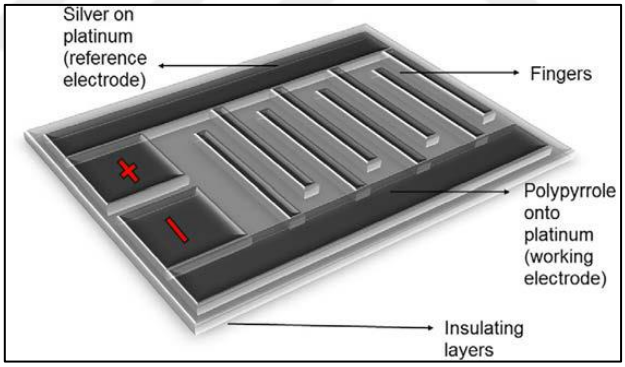
AC voltametri, polarografi, doğrusal süpürme voltametrisi (LSV) ve benzeri olarak ayrılır. Bu voltametrik yöntemlerin içinden en çok kullanılanlar CV, LSV ve DPV'dir. Bu yöntemlerdeki fark, potansiyel uygulama yolu farklılıklarından kaynaklanmaktadır. En basit yöntem olan LSV'de, çalışma elektroduna uygulanan potansiyel zamanla doğrusal olarak artmaktadır. Akan akım, faradaik akımdan (Faraday yasalarının akması, aktif bileşiğin boşaltılması anlamına gelir) ve kapasitif akımdan (çözelti ile elektrot arasındaki çift elektrik tabakası büyümesi nedeniyle üretilen) oluşur. Tespit limitleri mg/L seviyesinde gösterir [64]. CV'de taramanın üçgen bir şekil özelliği vardır. Elde edilen voltamogram, redoks zirveleri olan kapalı bir eğridir (işlem tersine çevrilebilirse iki, işlem geri döndürülemezse bir eğri). Dezavantaj olarak düşük hassasiyet göstermesi nedeniyle CV kantitatif analiz için uygulanamamaktadır. DPV'de, doğrusal tarama sırasında tepe grafiği veren periyodik sabit potansiyel darbesi uygulanır ve darbeden önce ve sonra oluşan akım arasındaki fark ölçülür. Bu teknik, 10-100 µg/L sınırındaki algılamalarda çok hassastır [55]. Şekil 3.1'de genel döngüsel voltamograma örnek gösterilmektedir.



Şekil 3.1 Üç döngüde gerçekleştirilen genel döngüsel voltamogram E_{pa}: Anodik tepe potansiyeli, E_{pc}: Katodik tepe potansiyeli, karşılık gelen tepe akımları şu şekilde belirtilir: i_{pa} ve i_{pc} [65]

3.3.5 Empedans Algılama

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) olarak adlandırılan yöntem, özellikle biyolojik malzeme ile modifiye edilmiş elektrotların yapısını ve işlevini karakterize eder [66, 67]. Çözeltideki redoks probunun varlığına/yokluğuna bağlı olarak ayrıca Faradaik veya Faradaik olmayan olarak sınıflandırılabilir. İkincisi, reaktif gerektirmediğinden bakım noktası (POC) cihazlarında daha çok tercih edilir. Sensör yüzeyindeki etiketsiz etkileşimlerin tespiti, elektrot yüzeyinin hareketsiz hale getirilmesi sırasında, çift katmanın direnci ve kapasitansı değişmesi sonucu oluşan empedanstaki değişikliğin ölçülmesi ile gerçekleştirilir.En popüler ifade edilen sonuçlar Nyquist ve Bode grafikleridir. EIS sensörleri esas olarak kendiliğinden birleştirilmiş tek katman (SAM) veya iletken bir polimer temel katman yöntemi ile oluşturulur. Tespit limitlerinin amperometrik ve potansiyometrik algılama yöntemlerine göre düşük olması dezantajıdır. Elektrolitlerden türetilen yanlış pozitif sonuçlar ana dezavantajdır [58, 68]. Şekil 3.2'de empedansa göre çalışan birbirine bağlı elektrot sensörü gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Empedansa göre çalışan birbirine bağlı elektrot sensörü[69]

3.4 Uygulama Alanları

Birçok biyosensör, yalnızca laboratuvarda kullanım olarak kalmamış günlük taşınabilir kullanım alanına da girmiştir. Biyo cihazların temel amacı tıp alanında uygulamaktır. İnsan ölümlerinin başlıca nedenleri arasında bakteriler, virüsler, mantarlar gibi patojenler bulunmaktadır. Bu patojenler ayrıca hayvan ve bitkilere de bulaşabilirler ve kontrol altına alınamayan patojenler pandemiye neden olabilir.

[70]. Erken teşhis en güçlü önlemlerden biri olmasına rağmen yüksek maliyetler, sıkı numune hazırlama mekanizmaları ve uzun süreli analizler patojenlerin kontrolünü zorlaştırmaktadır. Yeni teknolojiler sayesinde biyosensör cihazlarının minyatürleştirilmesi ve hızlı verilerin elde edilmesi ile bu zorluklar azalmıştır. Günümüzde, virüs istilaları gibi yaygın hastalıklardan ciddi tümörlere kadar, çok çeşitli biyoreseptörler ve yukarıda bahsedilen ölçüm teknikleri kapsamında tespit mümkündür. İnsan sağlığı dışındaki biyosensör uygulamalarına örnek olarak, gıda işleme/izleme, fermantasyon süreçleri, askeri biyolojik savunma ve benzeri sayılabilir [71].

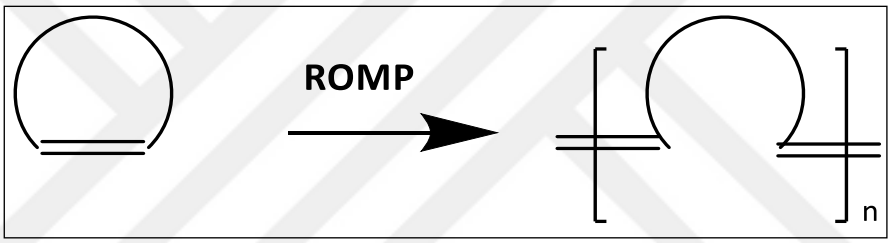
Biyosensörler; µg/mL mertebesinde veya daha az gösterdikleri duyarlılıkları, yüksek seçicilikleri, yüksek fayda/maliyet oranları, kolay kullanımları, hızlı veri elde edilmesi gibi özellikleri nedeniyle farmasötik ve biyomedikal analizlerde yüksek ilgi görmektedir. Bu çalışmalarda, ayrıca nanopartiküllerin de kullanılması; hassasiyeti yüksek sensörlerin geliştirilmesi için önemlidir.

Büyük iletkenlik, biyouyumluluk, yüksek yüzey-hacim oranı ve hibridizasyon, sol-jel, kendiliğinden birleşen tek tabakalı (SAM) ve diğer yöntemlerle modifikasyon olasılıkları nedeniyle metal nanopartiküller (NP'ler) çok popülerdir ve piyasada mevcuttur. Günümüzde nanomateryaller, artan duyarlılık ve tespit limitleri nedeniyle biyo-cihazlarda gereklidir [72]. İyi bilinenler AuNP'ler, AgNP'ler, PtNP'ler ve bunların alaşımları Au-Ag, Au-Pt, Ag-Pt'dir [73, 74].

4
HALKA AÇILMA METATEZ POLİMERİZASYONU (ROMP)

4.1 Genel Bilgi

Kısaca halka açılma metatez polimerizasyonu (ROMP), bir siklik olefinin doymamış halkasının açıldığı ve doymamış bağların sayısının polimer omurgasında tutulduğu özel bir polimerizasyon türüdür. Olefin metatezi, endüstrinin çocuğu olarak tanımlanabilir [75]. Şekil 4.1'de ROMP genel örneği gösterilmiştir.



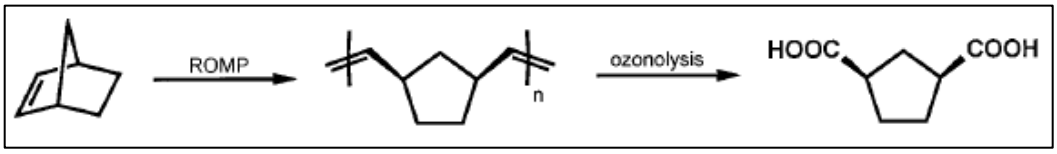
Şekil 4.1 Halka açılma metatez polimerizasyonuna (ROMP) genel bir örnek

Polimerizasyon yöntemlerinden biri olan halka açılma metatez polimerizasyonu (ROMP), özellikle iyi tanımlanmış (well defined) yapılara sahip makromolekülleri sentezlemek için güçlü ve geniş yelpazede uygulanabilir bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır [76-78]. ROMP'un kökenleri, olefinleri içeren yeni dönüşümleri ve reaktiviteleri ortaya çıkarmak için çeşitli metaller ve reaktiflerin birleştirildiği 1950'lerin ortalarına kadar izlenebilir [79]. Bu reaksiyon 1950'lerde etilenin oligomerizasyonu sırasında keşfedilmiştir ve çeşitli yöntemlerle polimerlerin sentezinde kullanılmıştır.

1950'lerin ortasında Anderson ve Merckling'in (DuPont), $TiCl_4$/EtMgBr katalizörleri ile yaratılan norbornenin Ziegler-Natta polimerizasyonu üzerine çalışmaları sırasında başladı [80]. 1957'de Eleuterio (DuPont), $LiAlH_4$ ile aktive

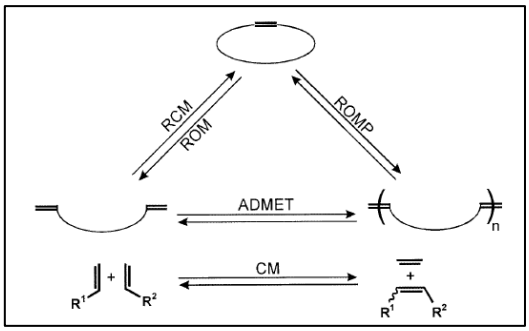
edilmiş MoO_3/Al_2O_3 katalizörlerinin yanı sıra birkaç siklik olefinin polimerizasyonunu açıklayan bir patent başvurusunda bulundu [81].

Bir norbornen polimerinin ozonolizi, cis-siklopentan-1,3-dikarboksilik asit ürününü verdi, böylece bu yeni polimerizasyon reaksiyonunun, çift bağların sayısını koruyan özelliğini ortaya koydu (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Norbornenin ROMP gösterimi ve polinorbornenin ozonolizi

Uzun yıllar boyunca ROMP ve aynı anda incelenen asiklik olefinlerin metatezi, literatürde başlangıçta olefin bölünmesi olarak kabul edildi ve iki farklı reaksiyon olarak kabul edildi. Calderon 1972'de aynı madalyonun iki yüzü olduklarını fark etti ve bu reaksiyon türü için olefin metatezi terimini tanıttı [82]. Netlik sağlamak için, belirli substrata ve dönüşüme bağlı olarak metatez temel olarak birkaç alt tipte gruplandırılmıştır. Siklik olefinleri içeren halka kapama metatez (RCM), halka açılma metatezi (ROM) ve ROMP Şekil 4.6'da şematik olarak gösterilmektedir. Bu katkı esas olarak rutenyum bazlı katalizörler kullanan ROMP aracılığıyla polimer sentezi alanındaki son gelişmelerle ilgilenir. Bu polimerizasyon yöntemi Tim Swager tarafından California Teknoloji Enstitüsü'nde (Caltech) R. H. Grubbs'ın laboratuvarında yüksek lisans öğrencisiyken ROMP olarak ifade edilmiştir [83, 84]. 2005 yılında, Yves Chauvin, Robert H. Grubbs ve Richard R. Schrock, organik sentezde metatez yönteminin geliştirilmesi ile ilgili çalışmaları üzerine kimyadaki Nobel ödülünü paylaşmıştır [85-87].



Şekil 4.3 Metatez yolları: ADMET (polimerizasyon), ROMP, RCM, ROM ve çapraz metatez (CM)

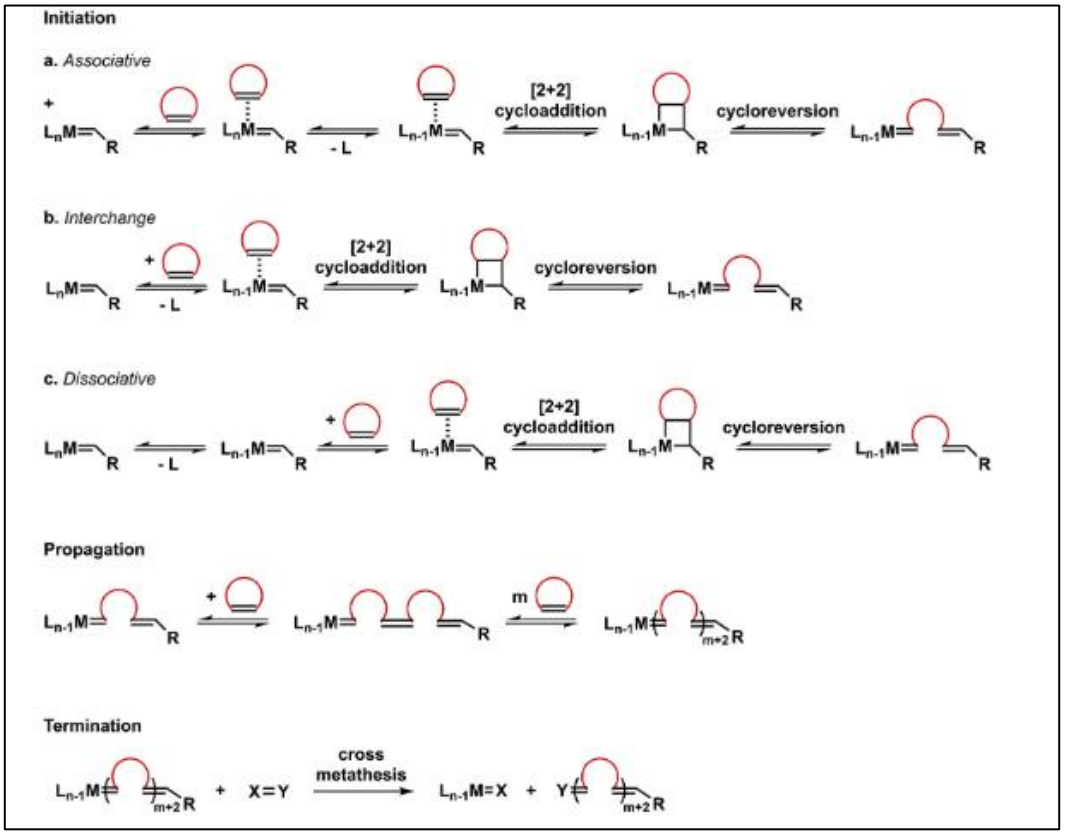
ROMP ve asiklik dien metatez (ADMET) ile elde edilen polimerlerin genel yapıları, Şekil 4.3'te aynı şekilde açıklanabilmesine rağmen, polimerizasyon kinetiği açısından tamamen farklı bir işlem gereklidir. İlki zincir polimerizasyonunu içerirken, ikincisi aşamalı büyüme polimerizasyon sürecidir.[88]

ADMET tipi polimerler ROMP metoduna göre daha az uygulanmıştır [75]. ADMET, düzenli aralıklı fonksiyonel grup dallarına ve yüksek termal stabiliteye ve kristalliğe sahip poliolefinlerin sentezi için 1987'ten beri Wagener ve grubu tarafından geliştirildiği görülmektedir. ADMET, zincir içi işlevsellik içeren polimerik materyallerin sentezlenmesi için de faydalıdır.

4.2 Polimerizasyonun Mekanizması ve Termodinamiği

Polimerizasyon mekanizması, metal aracılı karbon-karbon çift bağ (C=C) değişim süreci olan olefin metatezine dayanmaktadır. Sonuç olarak, monomerle ilişkili herhangi bir doymamışlık, polimere dönüştürülürken korunur. Bu, ROMP'nu tipik olefin katılma polimerizasyonlarından (örneğin, etilen → polietilen) ayıran önemli bir özelliktir [79]. ROMP'un diğer zincir büyümesi polimerizasyon yöntemlerine göre önemli bir ayırt edici özelliği olan omurgasındaki C=C bağları, oksidasyona karşı duyarlılıkları nedeniyle dezavantajlı olarak görülmüştür. Aslında omurga C=C bağlarının hidrojenasyonu, stabilitenin artmasının istendiği durumlarda sıklıkla kullanılmıştır. Bununla birlikte, birkaç grup, basit sülfonasyon, epoksidasyon ve fotokimyasal ve termal olarak indüklenen yollarla radikal çapraz bağlanmayla sınırlı raporlarla, bir postpolimerizasyon değişikliği fırsatı olarak bu çift bağlardan yararlanmıştır [89].

1971'de Hérisson ve Chauvin, metatez reaksiyonları ailesinin, kabul gören metatez mekanizmasına yol açan bir metalosiklobütan ara ürün yoluyla ilerlediğini öne süren ilk kişilerdi [90]. ROMP genel mekanizması Şekil 4.4'te gösterilmektedir. Başlama, bir geçiş metali alkilidin kompleksinin bir siklik olefine koordinasyonu ve bu koordinasyonun [2+2] siklo katılma ile büyüyen bir polimer zincirinin başlangıcını oluşturan dört üyeli bir metalasiklobütan ara ürününü vermesi ile gerçekleşir. Bu gerilmiş ara ürün, bir olefin ürünü ve yeni bir metal alkiliden elde etmek için siklogeridönme yolu ile olur.



Şekil 4.4 Tipik bir ROMP reaksiyonunun mekanizması

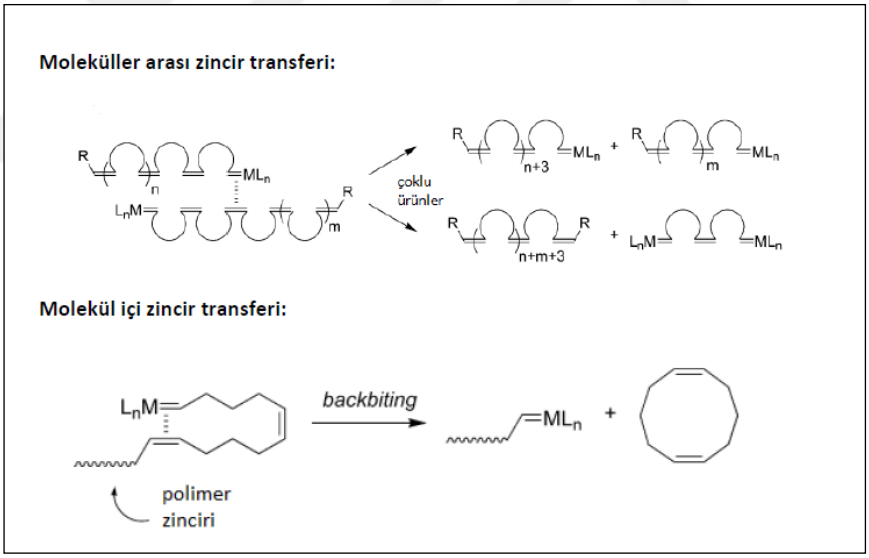
Katalizörün başlatılması için üç makul mekanizma vardır. Birincisi, olefin ligand yer değiştirmesinden önce metal alkilidin katalizörüne koordine olan bir "birleştirici" mekanizma; ikincisi, olefin bağlanmasından önce bir ligandın kaybolduğunu varsayan bir "ayrışma" mekanizması; üçüncüsü, olefin bağlanması ve bir ligand kaybının ortak bir geçiş durumu vasıtasıyla aynı anda meydana geldiği bir "değiş tokuş" mekanizması şeklindedir [91]. Başlama, katalizöre bağlı olduğu için, başlama mekanizması ve hızı, metal merkez çevresindeki ligandların

stereoelektronik doğası değiştirilerek ayarlanabilir [92]. Büyüme aşamasında, polimerizasyon reaksiyonu sona erene kadar benzer adımlar tekrarlanır ve monomerin tamamı tüketilir, bir reaksiyon dengesine ulaşılır veya reaksiyon yanlışlıkla veya kasıtlı olarak sona erdirilir. Yaşayan ROMP tipi polimerler genellikle özel bir kimyasal reaktifin eklenmesiyle bilinçli olarak sonlandırılır [88]. Bu reaktifin işlevi; geçiş metalini büyüyen polimer zincirinin sonundan seçici olarak çıkarmak ve devre dışı bırakmak, ayrıca metalin yerine bilinen bir fonksiyonel grup kurmaktır. Rutenyum aracılı polimerizasyonların çoğu için bu reaktif, [Ru]=CHOEt tipi bir kompleks ve bir metiliden uçtan işlevselleştirilmiş polimer sağlayan etil vinil eterdir; Molibden aracılı polimerizasyonlar için bu reaktif, bir [Mo]=O tipi kompleks ve bir benziliden uç başlıklı polimer sağlayan benzaldehittir [79].

Metal ligandı esaslı ROMP reaksiyonları ile ilgili üç önemli özellik vardır. İlk olarak, büyüyen polimer zincirleri üzerinde yayılan metal merkezlerinin ya metalasiklobütan ya da metal alkilidin formunda mevcut olabileceğine dikkat etmek önemlidir. Bu fark, geçiş metaline ve bunun bağlantılı ligandlarına ve ayrıca reaksiyon koşullarına bağlıdır. İkinci olarak, çoğu olefin metatez reaksiyonu gibi, ROMP genellikle geri dönüşümlüdür. Böylece, Şekil 4.4'te gösterilen temel mekanizma, gösterildiği gibi ters yönde ilerleyebilir. Çoğu ROMP reaksiyonu tersine çevrilebilir olduğundan, bunlar denge kontrollü reaksiyonlardır ve dengenin konumu (reaktanlara karşı ürünler) polimerizasyon reaksiyonunun termodinamiği dikkate alınarak tahmin edilebilir. Bu nedenle klasik ROMP'un arkasındaki itici güç, halka gerginliğinin ($\Delta H<0$) azaltılmasıdır. ROMP reaksiyonu ayrıca entropide karşılık gelen bir düşüş ($\Delta S<0$) olmaktadır. Bu nedenle, Gibbs serbest enerji yasasına göre: $\Delta G = \Delta H-T\Delta S$; entropik bariyerin, entalpi katkısından daha ağır bastığı ve pozitif bir G'ye yol açtığı kritik bir sıcaklık vardır. Polimerizasyonu desteklemek için, reaksiyonlar tipik olarak düşük sıcaklıklarda (yani oda sıcaklığında veya altında) büyük bir halka gerginliğine (>5 kcal/mol) sahip olan monomerler kullanılarak gerçekleştirilir [93, 94]. ROMP için, norbornen, oksanorbornen, siklopropen, siklobüten ve siklookten türevleri gibi çok çeşitli yüksek halka gerginliğindeki mononomerler kullanılmıştır. Siklopenten veya sikloheksen ve bunların türevleri gibi halka açıkldığında siklik olefini yeniden

oluşturmak için geri tepkimeye kolaylıkla dönebilen monomerler, polimerizasyon dengesini polimer ürününe doğru yönlendirmek için düşük sıcaklıklarda polimerize edilmelidir [95].

ROMP tipi polimerizasyon sırasında genellikle Şekil 4.5'te gösterildiği gibi moleküller arası ve molekül içi zincir transfer reaksiyonları eşlik eder. Moleküller arası zincir transferinde, ucunda bir aktif metal alkilidin bulunan bir polimer zinciri, başka bir polimer zincirindeki bir çift bağ ile reaksiyona girer. Ayrı polimer zincirleri, toplam polimer zincirlerinin sayısını değiştirmeden tutarak, buna göre moleküler ağırlıkta artar veya azalır. Molekül içi zincir transfer reaksiyonunda (geri dönüş), bir polimer zincirinin karben terminali, azaltılmış moleküler ağırlığa sahip bir polimer zinciri oluşturmak ve bir siklik oligomeri serbest bırakmak için kendisiyle reaksiyona girer. Moleküller arası ve/veya molekül içi zincir transferlerinin her ikisi de, polimer ürününün zincir dağılımını (polidispersite) arttırır [93].

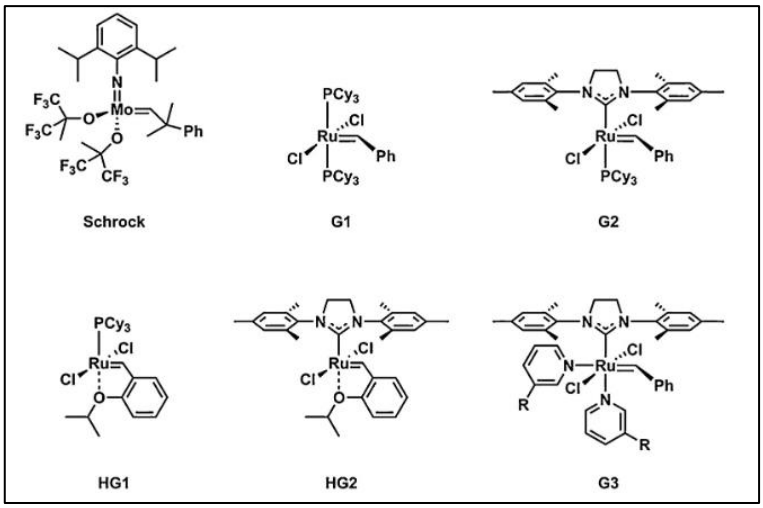


Şekil 4.5 ROMP reaksiyonlarda ikincil metatez (moleküller arası zincir transfer ve molekül içi zincir transfer) reaksiyonların örnekleri

ROMP gibi denge kontrollü polimerizasyonların bir başka anlamı, siklik oligomerleri oluşturma eğilimidir. Jacobson-Stockmayer'in halka-zincir dengesi teorisine göre, siklik oligomerlerin oluşumu her zaman yüksek moleküler ağırlıklı polimer oluşumuna eşlik edecektir. Mevcut siklik türlerin toplam miktarı, çözücü, polimer omurgasının cis/trans oranı, monomerin sertliği, reaksiyon süresi ve

konsantrasyon gibi faktörlere bağlıdır. Döngüsel türlerin oluşumu, daha yüksek sıcaklıklarda ve daha düşük konsantrasyonlarda tercih edilir ve kritik değer yukarıda belirtilen faktörlere bağlıdır. Bu yan reaksiyonlar, yaşayan bir polimerizasyon düşünüldüğünde kesinlikle dezavantajlı olmakla birlikte, reaksiyonu nispeten seyreltik koşullar altında basitçe gerçekleştirerek neredeyse tamamen döngüsel türlerden oluşan materyalleri sentezlemek için kullanılmıştır [79].

ROMP için itici güç, siklik monomerin halka gerginliğidir, ancak polimerizasyonun meydana gelmesi için bir metal başlatıcı (katalizör) gereklidir. İlk ROMP reaksiyonları, $TiCl_4/Et_3Al$, $MoCl_5/Et_3Al$, $WCl_6/EtAlCl_2/EtOH$, Re_2O_7/Al_2O_3, $RuCl_3$/polar çözücüler ve daha pek çoğu gibi tanımlanmamış katalitik sistemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.[96] Daha sonra, molibden ve tungsten bazlı iyi tanımlanmış metal karben kompleksleri Schrock grubu tarafından geliştirildi. 1995'te Grubbs, ROMP için yeni Ru bazlı katalizörün sentezi ve aktiviteleri hakkında rapor verdi. Grubbs katalizörü olarak bilinen bu kompleks, birkaç sikloolefinin polimerizasyonunda bir katalizör olarak çok yüksek aktivite göstermiştir [97]. (Şekil 4.6) Bu iyi tanımlanmış metal-karben komplekslerinin çoğu, yaşayan polimerlerin sentezine izin verir. Burada, hızlı başlayan bir kompleks, istenmeyen zincir transferi veya sonlandırma reaksiyonları gibi önemli yan reaksiyonların yokluğunda monomerin hepsini tüketir [84, 98].



Şekil 4.6 Halka açılma metatez polimerizasyonu için kullanılan en yaygın metal-karben kompleksleri

Bununla birlikte, bugün mevcut olan farklı metal-karben kompleksleri, sadece reaktiviteleri açısından değil, aynı zamanda fonksiyonel grup toleransları açısından da büyük ölçüde farklılık göstermektedir [99, 100]. Tablo 4.1'de katalistlerin fonskiyonel gruplara karşı toleransını göstermektedir. Tungsten karben kompleksleri, olefin metatezi sırasında mevcut olan esterleri ve amidleri tolere eder ve molibden karben kompleksleri ayrıca ketonları tolere eder. Bununla birlikte, her ikisi de Wittig benzeri reaksiyonlarda aldehitlerle reaksiyona girerek aldehit kalıntısını polimerin zincir ucuna aktararak reaksiyonu sonlandırır. Rutenyum karben kompleksleri, en fonksiyonel grup toleranslı metatez aktif kompleksleridir ve bu nedenle yaygın olarak kullanılmaktadır [75, 98, 101].

Tablo 4.1 Geçiş metali karben komplekslerinin fonksiyonel grup toleransı

Titanyum	Tungsten	Molibden	Rutenyum
Karboksilik asitler	Karboksilik asitler	Karboksilik asitler	Olefinler
Alkoller, Su	Alkoller, Su	Alkoller, Su	Karboksilik asitler
Aldehitler	Aldehitler	Aldehitler	Alkoller, Su
Ketonlar	Ketonlar	Olefinler	Aldehitler
Esterler, Amitler	Olefinler	Ketonlar	Ketonlar
Olefinler	Esterler, Amitler	Esterler, Amitler	Esterler, Amitler

Reaktivite Artışı

5
DENEYSEL ÇALIŞMALAR VE BULGULAR

5.1 Materyal ve Yöntem

5.1.1 Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Furan, maleik anhidrit, 3-bromopropil hidrobromür, 1-bromohekzan, 3-amino metilpiridin, trifenilfosfin, maleimit, dietil (hidroksimetil)fosfonat, diizopropil azodikarboksilat (DIAD), bromotrimetilsilan, sisteamin, altın (III) klorür, sodyum borhidrür, etilvinil eter, 3-bromopiridin, sodium asetat, tetrahidrofuran (THF), petrol eteri, dietil eter, *N,N*-dimetil formamid (DMF), *N,N*-dimetilasetamid (DMAc), diklorometan (DCM), kloroform, pentan, metanol, dimetil sülfoksit (DMSO), etil asetat, asetik anhidrit, hekzan, asetonitril, Grubbs ikinci jenerasyon katalizörü Sigma-Aldrich'ten temin edildi. Mueller-Hinton sıvı besiyeri, Mueller-Hinton sıvı besiyeri Difco/BD Diagnostic Systems (USA)'dan satın alındı. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (ATCC numarası: 25923) ve *Escherichia coli* (*E. coli*) (ATCC numarası: 25922) Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden temin edildi. DMF ve THF destilasyon yöntemi ile kuru hale getirilmiştir.

5.1.2 Deneyde Kullanılan Cihazlar ve Yardımcı Gereçler

Infrared spektrumları ATR cihazı ile "Perkin-Elmer, FT-IR" spektrofotometresinde Yıldız Teknik Üniversitesi Enstrümantel Analiz Laboratuvarında alındı. Altın nanopartikül ölçümleri Shimadzu UV-2600 spektrometresinde Yıldız Teknik Üniversitesi Aletli Analiz Laboratuvarında alındı. Altın nanopartiküllerin görüntüsü Saarland Üniversitesi Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) "JEOL JEM-2100 LaB6-cathode (200 kV) kamera Gatan Orius SC1000 CCD" kullanılarak görüntülendi. Nükleer manyetik rezonans spektrumları (^{1}H NMR (500 MHz) ve ^{13}C NMR (75 MHz) spektrumları) Yıldız Teknik Üniversitesi NMR Laboratuvarında "Bruker-500 MHz NMR" cihazı ile, çözücü olarak DMSO-d_6, $CDCl_3$, D_2O ve standart olarak TMS kullanılarak alındı. Ayrıca ^{31}P NMR spektrumları Boğaziçi Üniversitesi

İleri Teknolojiler Ar-Ge Merkez Laboratuvarları NMR Araştırma Laboratuvarında "The Varian Mercury-VX 400 MHz BB" cihazı ile alındı. Antibakteriyel test için cam yüzeyleri Yıldız Teknik Üniversitesi Fizikokimya Laboratuvarında bulunan "Spincoat G3-8 Spin Coating System" kullanılarak kaplandı. Kaplanan elektrot yüzeylerindeki polimer görüntüleri ve bulundurduğu Fe (demir) miktarları analizi için Boğaziçi Üniversitesi R&D Merkezindeki "Philips-FEI XL_{30} ESEM-FEG Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Dağılımlı X-Işınları Analizörü /Görüntü Analizleri Sistemi" kullanıldı. Fe miktarı ayrıca Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarındaki ICP-OES "Shimadzu ICPE 9000" ile analiz edildi. Elektrot yüzeylerindeki polimerlerin görüntüsü için Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı Atomik Kuvvet Mikroskobu "Shimadzu SPM-9600" kullanıldı. Polimerlerin ortalama moleküler ağırlıkları ve polidispersite indeksleri (PDI) için Almanya Saarland Üniversitesi "Boyut Dışlama Kromatografisi (SEC) Waters 515 pompası, RI Waters 2410 ve PSS GRAM 1.000 kolonu (60 °C'de, akış hızı 1 mL/dak, mobil faz olarak DMF (3 g/L LiBr ile birlikte)" kullanıldı. Polimer Standart Servisinden (PSS, Mainz, Almanya) pullulanlar standart olarak kullanıldı. Empedans ölçümleri, Yıldız Teknik Üniversitesi Fizik Bölümündeki "Hioki 3532 LCR metre" kullanılarak oda sıcaklığında analiz edildi. Siklik voltametri (CV) ölçümleri; radyometre analitik PST050 potansiyostat, Voltmaster 4.0 yazılımını çalıştıran PC arabirimi kullanılarak gerçekleştirildi.

5.2 Monomerlerin Sentezi

5.2.1 Furan Maleik Anhidrit Diels Alder Ürününün (4,10-Dioxa-tricyclo [5.2.1.$0^{2,6}$] dec-8-ene-3,5-dione) Sentezi (Ürün 1)

63 g (642 mmol) maleik anhidrit, THF içerisinde çözüldü ve 48 mL (660 mmol) furan ortama pipet ile eklendi. 5 dakika azot gazı altında karışım yapıldıktan sonra reaksiyon durduruldu ve oda sıcaklığında, karanlıkta 4 gün bekletildi. 4 günün sonunda reaksiyon kabı içerisinde beyaz okzanorbornen kristalleri görüldü. Saflaştırma işlemi için kristaller soğuk THF ile yıkandı. Diels-Alder ürünün hepsi ekzo-okzanorbornen olarak elde edildi. (Verim %78)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 6.6, 5.5, 3.2.

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 172, 137, 82, 48.

5.2.2 Bromookzanorbornen (4-(3-bromopropyl)-10-oxa-4-azatricyclo [5.2.1.$0^{2,6}$]dec-8-ene-3,5-dione) Sentezi (Ürün 2)

$NaHCO_3$ (5,44 gram, 65 mmol) reaksiyon kabı içerisinde 50 mL suda çözüldü. Çözelti üzerine yavaşça 3-bromopropilamin hidrobromür (14,24 gram, 65 mmol) eklendi. Birkaç dakika karıştırıldıktan sonra Ürün 1 (10 gram, 60,24 mmol) reaksiyon ortamına eklendi ve reaksiyon oda sıcaklığında 30 dakika boyunca karıştırıldı. Vakum altında su ve dietil eter ile yıkanarak saflaştırıldı ve vakum etüvünde kurutuldu. İkinci aşamada, sodyum asetat (0,72 gram, 8,28 mmol) ve asetik anhidrit (16 mL) süspansiyonu 2 boyunlu balon içerisinde 90 °C'de, 10 dakika karıştırıldı. Bu karışımın üzerine, ilk aşamada sentezlenen beyaz ürün (4 gram, 13,16 mmol) eklendi ve 1 saat, 90 °C'de karıştırıldı. 1 saat sonra reaksiyon kabındaki çözelti, beher içinde bulunan 20 gram buzun içine döküldü ve üzerine 50 mL kloroform eklendi. Kloroform fazı, 3 kere 30 mL %5'lik $NaHCO_3$ ve 1 kere 30 mL %10'luk NaCl ile ekstraksiyon yapıldıktan sonra, $MgSO_4$ eklenerek kurutuldu, süzüldü ve çözücü evaporatör ile uzaklaştırıldı. Kolon kromotografisi (Etilasetat-Hekzan 1:1 v/v) yapılarak saflaştırıldı ve beyaz katı madde elde edildi [102]. (Verim %40)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 6.5, 5.25, 3.62, 3.33, 2.85.

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 177.23, 137.14, 81.05, 47.87, 37.3, 32.0, 31.15.

5.2.3 Trifenilfosfonyum Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi (Monomer 1)

Ürün 2 (0,5 gram, 1,75 mmol) ile trifenilfosfin (1,38 gram, 5,24 mmol) 11 mL etil asetat bulunan basınca dayanıklı cam bir reaktörde, 50°C'de, azot gazı altında 24 saat karıştırıldı. 24 saat sonunda reaksiyon kabı oda sıcaklığına soğutulduktan sonra ürün etil asetat, THF ve dietil eter ile yıkama yapılarak saflaştırıldı ve azot altında kurutuldu [103]. (Verim %30)

5.2.4 Furan Maleimit Diels Alder Ürününün (exo-oxabicyclo-[2.2.1] hept-5-ene-2,3- dicarboximide) Sentezi (Ürün 3)

5,36 g maleimit (55,2 mmol) basınca dayanıklı cam bir reaktöre kondu ve üzerine 30 mL etil asetat eklendi. Azot gazı altında üzerine 3,8 mL furan (61,3 mmol) ilave

edildi. 90 °C'de, gece boyu karıştırıldı. Reaksiyon sonunda furan maleimit ürününün beyaz kristaller halinde çöktüğü gözlendi. Kristaller süzülüp soğuk dietil eter ile yıkama yapıldı ve vakum fırınında kurutuldu [104]. (Verim %75)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 2.89 (s, 2H), 5.31 (d, 2H), 6.52 (d, 2H), 8.10 (br, 1H).

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 175.91, 136.55, 80.95, 48.68.

5.2.5 Fosfonat Esteri İçeren Okzanorbornen (3,5-Dioxo-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.$0^{2,6}$]dec-8-en-4-ylmethyl)-phosphonic acid diethyl ester) Sentezi (Monomer 2)

Ürün 3 (3,01 g, 13,2 mmol), kuru THF (30 mL) içinde 60 °C'de çözüldü. Karışım oda sıcaklığına geldiğinde üzerine dietil (hidroksimetil)fosfonat (2,8 mL, 19,0 mmol) ve trifenilfosfin (4,75 g, 18,1 mmol) ilave edildi. Reaksiyon balonu N_2 altında, oda sıcaklığında karıştırıldı ve diizopropil azodikarboksilat (DIAD) (3,8 mL, 19,4 mmol) damla damla şırınga ile reaksiyon balonu içine verildi. Reaksiyon oda sıcaklığında 48 saat karıştırıldı. Reaksiyon karışımı vakum altında konsantre edildi ve dietil eter ile çöktürüldü. Ürün, silika jel kullanılarak kolon kromotografisi yapıldı (etil asetat/metanol/hekzan (4:1:1, v/v/v) [105]. (Verim %60)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 6.52 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 4.10-4.20 (m, 4H), 3.90 (d,2H), 2.91 (s, 2H), 1.32 (t, 6H).

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 174.7 (C=O), 136.5 (C=C), 80.9 (CO), 62.9 ve 62.8 (O-CH_2-CH_3-fosfonat), 47.5 [CH-C(=O)], 35.09 ve 35.03 (d, CH_2P), 16,32 ve 16,24 (CH_3-fosfonat)

^{31}P NMR (δ): 18.15 ppm

5.2.6 Amino Piridin Fonksiyonel Gruplu Okzanorbornen ((3aR,4S,7R)-2-(pyridin-3-ylmethyl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-4,7-epoxyisoindole-1,3(2H)-dione) Sentezi (Ürün 4)

2,4 mL (22 mmol) 3-aminometilpiridin, 1,92 g (11 mmol) ürün 1 ve 6 mL *N,N*-dimetilasetamid bir balona konularak 60 °C sıcaklıkta 20 dakika süreyle karıştırıldı. Katalitik miktarda sodyum asetat (0,5 g, 5 mmol), 12 mL asetik

anhidritin içerisinde çözülerek karışıma eklendi, reaksiyon ısısı 90 °C'ye yükseltildi ve 2 saat daha karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığına soğutulduktan sonra etil asetatla seyreltildi, ardından %10'luk NaCl çözeltisi ile ekstraksiyon yapıldı. Ürünü saflaştırmak için THF:Hekzan (3:1, v/v) çözücüsü yardımıyla kolon kromatografisi yapılarak beyaz renkte saf madde elde edildi [106]. (Verim %50)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 8.5 (2H, m), 7.6 (1H, m), 7.2 (1H, m), 6.5 (2H, s), 5.3 (2H, s), 4.6 (2H, s), 2.8 (2H, s).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 176.2, 148.9, 148.1, 136.7, 136.6, 132.7, 123.3, 81.1, 47.6, 40.1.

5.2.7 Hekzilpiridinyum Tuzu İçeren Okzanorbornen Sentezi (Monomer 3)

Ürün 4, (0,52 g, 2 mmol) tek boyunlu reaksiyon balonuna konulduktan sonra üzerine 12 mL asetonitril ilave edilerek oda sıcaklığında çözülmesi sağlandı. Bu çözelti üzerine1-bromohekzan (1,57 g, 9,51 mmol) ilave edildi ve azot gazı altında ve geri soğutucu altında 60 °C sıcaklıkta, 24 saat karıştırıldı. Oluşan ürün 200 mL dietileter içerisinde çöktürüldü. Santrifüj işlemiyle dietil eter ile yıkandı ve vakum altında çözücüsünden uzaklaştırılarak azot altında kurutuldu [106]. (Verim %60)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 9.3 (2H, m), 8.3 (1H, m), 8.0 (1H, m), 6.5 (2H,s), 5.2 (2H, s), 4.8 (2H, s), 3.1 (2H, s), 1.9 (2H, m), 1.3 (8H, m), 0.8 (3H, t).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 176.12, 144.25, 143.67, 136.84, 136.52, 128.39, 81.13, 62.28, 48.31, 39.08, 31.83, 31.15, 25.70, 22.40, 14.00.

5.2.8 Tiyol Asetat İçeren Okzanorbornen Sentezi (Monomer 4)

Ürün 1 (0,5 g, 3,01 mmol) ve sisteamin (0,28 g, 3,61 mmol) iki boyunlu reaksiyon balonuna kondu. Üzerine 5 mL kuru DMAc eklendi. Reaksiyon balonu alüminyum folyoya sarılarak geri soğutucuda, azot gazı altında, 30 dakika, 60 °C'de karıştırıldı. Katalitik miktarda sodyum asetat (0,11 g, 1,36 mmol) ve 3,5 mL asetik anhidrit süspansiyonu reaksiyona ilave edildi ve reaksiyon 90 °C'de 2 saat karıştırıldı. Madde oda sıcaklığına gelince etil asetat ile seyreltildi ve %20'lik NaCl çözeltisi ile ekstraksiyon yapıldı ve ürün kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. (Etil asetat: Hekzan (1:1, v/v)). (Verim %35)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 6.49 (2H, s), 5.24 (2H, s), 3.67 (2H, t), 3.08 (2H, t), 2.82 (2H, s), 2.29 (3H, s).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 195.23, 176.16, 136.90, 81.20, 47.80, 38.36, 30.86, 26.94.

5.3 Grubbs Üçüncü Jenerasyon Katalizörünün Sentezi

Grubbs üçüncü jenerasyon katalizörü, Grubbs ikinci jenerasyon katalizöründen literature göre sentezlenmektedir [107]. 0,2 g Grubbs ikinci jenerasyon katalizörü septum kapaklı vial içine konuldu ve üzerine 0,5 mL 3-bromopridin eklenerek azot gazı altında 10 dakika süreyle karıştırıldı. Daha sonra pentan ile çöktürülüp yine pentan ile yıkama yapıldı. Azot gazı ile kurutulup ışıktan etkilenmesi önlenmesi için alüminyum folyoya sarılarak +4 °C'de buzdolabında muhafaza edildi. (Grubbs üçüncü jenerasyon kalalizörünün molekül ağırlığı M_A: 884,48 g/mol).

5.4 Monomerlerin ROMP Metodu ile Kopolimerizyonları

Bütün kopolimerler, 3.000 ve 10.000 g/mol olmak üzere iki farklı ortalama molekül ağırlığında hesaplanarak blok ve rastgele olarak 8:2 7:3 (ağırlıkça) oranlarında sentezlenmiştir. Teorik 3.000 ve 10.000 g/mol ağırlığındaki kopolimerlerin sentezi monomer konsantrasyonunun Grubbs katalizör konsantrasyonuna oranı ayarlanarak elde edilmektedir. Aşağıdaki sentez prosedürü formülünde 10.000 g/mol ağırlığındaki 8:2 (monomer 1: monomer 2, m/n) oranındaki kopolimerinin sentezi hakkında bilgi verilmektedir.

$$\mathrm{DP} = \frac{8.000}{\text{Monomer 1 Molekül Ağırlığı}} = \mathrm{m} \tag{5.1}$$

$$\mathrm{m} = \frac{[\text{monomer 1}]}{[\text{katalizör}]} \tag{5.2}$$

$$\mathrm{DP} = \frac{2.000}{\text{Monomer 2 Molekül Ağırlığı}} = \mathrm{n} \tag{5.3}$$

$$[\text{monomer 2}] = \mathrm{n}[\text{katalizör}] \tag{5.4}$$

DP: Polimerizasyon Derecesi

5.4.1 Poly A_1 Serisi (Fenilfosfonyum Tuzu (Monomer 1) ve Fosfonat Esteri (Monomer 2) İçeren Okzanorbornenlerin Kopolimerizasyonu)

Burada örnek olarak 10.000 g/mol (m/n, 8:2) molekül ağırlığındaki blok kopolimerlerin sentezi verilecektir. 0,2 g monomer 2 mL kuru kloroformda çözüldü ve oda sıcaklığında, N_2 altında karıştırıldı. Ayrı bir yerde 0,0221 g Grubbs üçüncü jenerasyon katalizörü 0,5 mL kuru diklorometanda çözüldü ve karışan monomer 1'in üzerine eklendi, 2 saat karıştırıldı. Reaksiyon ortamındaki monomerin tükendiği ince tabaka kromatografisi yöntemi ile kontrol edilmiştir. 0,05 g monomer 2, 0,5 mL kuru diklorometanda çözüldükten sonra cam pipet ile reaksiyona eklendi. 2 saatin sonunda ortama polimerizasyonu sonlandırmak için 0,5 mL %30'luk etilvinil eter (diklorometan içinde) eklendi ve yarım saat daha karıştırıldı. Daha sonra reaksiyon dietil eter ile çöktürülerek yıkandı.

Rastgele kopolimerler için monomer 1 ve monomer 2 aynı vial içinde çözüldü ve Grubbs katalizi eklendikten sonra 2 saat karıştırıldı. İnce tabaka kromotografisinde (TLC) ortamda monomer kalmadığı görüldükten sonra 0,5 mL %30'luk etilvinil eter (diklorometan içinde) eklenerek polimerizasyon sonlandırıldı.

5.4.2 Poly A_2 Serisi (Hekzilpiridinyum Tuzu (Monomer 3) ve Fosfonat Esteri (Monomer 2) İçeren Okzanorbornenlerin Kopolimerizasyonu)

0,2 g monomer 3, 2 mL kuru DMF'te çözüldü ve oda sıcaklığında, N_2 altında karıştırıldı. Ayrı bir yerde 0,0221 g Grubbs üçüncü jenerasyon katalizörü 0,5 mL kuru diklorometanda çözüldü ve karışan monomer 3'ün üzerine eklendi, 2 saat karıştırıldı. Reaksiyon ortamındaki monomerin tükendiği ince tabaka kromatografisi yöntemi ile kontrol edilmiştir. 0,5 mL kuru diklorometanda çözülmüş olan monomer 2 (0.05 gram) cam pipet ile reaksiyona eklendi. 2 saatin sonunda ortama polimerizasyonu sonlandırmak için 0,5 mL %30'luk etilvinil eter (DMF içinde) eklendi ve yarım saat daha karıştırıldı. Daha sonra reaksiyon dietil eter ile çöktürülerek yıkandı.

5.4.3 Poly B_1 Serisi (Fenilfosfonyum Tuzu (Monomer 1) ve Tiyol Asetat (Monomer 4) İçeren Okzanorbornenlerin Kopolimerizasyonu)

0,2 g monomer 1, 2 mL kuru kloroformda çözüldü ve oda sıcaklığında, N_2 altında karıştırıldı. Ayrı bir yerde 0,0221 g Grubbs üçüncü jenerasyon katalizörü 0,5 mL kuru diklorometanda çözüldü ve karışan monomer 1'in üzerine eklendi, 2 saat karıştırıldı. Reaksiyon ortamındaki monomerin tükendiği ince tabaka kromatografisi yöntemi ile kontrol edilmiştir. 0,05 g 0,5 mL kuru kloroformda çözülmüş monomer 4 cam pipet ile reaksiyona eklendi. 2 saatin sonunda ortama 0,5 mL %30'luk etilvinil eter (diklorometan içinde) eklendi ve yarım saat daha karıştırıldı. Daha sonra reaksiyon dietil eter ile çöktürülerek yıkandı.

5.4.4 Poly B_2 Serisi (Hekzilpiridinyum Tuzu (Monomer 3) ve Tiyol Asetat (Monomer 4) İçeren Okzanorbornenlerin Kopolimerizasyonu)

0,2 g monomer 3, 2 mL kuru DMF'te çözüldü ve oda sıcaklığında, N_2 altında karıştırıldı. Ayrı bir yerde 0,0221 g Grubbs üçüncü jenerasyon katalizörü 0,5 mL kuru diklorometanda çözüldü ve karışan monomer 3'ün üzerine eklendi, 2 saat karıştırıldı. Reaksiyon ortamındaki monomerin tükendiği ince tabaka kromatografisi yöntemi ile kontrol edilmiştir. 0,5 mL kuru kloroformda çözülmüş olan monomer 4 (0,05 g) cam pipet ile reaksiyona eklendi. 2 saatin sonunda ortama 0,5 mL %30'luk etilvinil eter (DMF içinde) eklendi ve yarım saat daha karıştırıldı. Daha sonra reaksiyon dietil eter ile çöktürülerek yıkandı.

5.5 Fosfonat Esteri İçeren Okzanorbornen Kopolimerlerinin (Poly A_1 ve Poly A_2 Serisi) Fosfonik Aside Dönüştürülmesi

Fosfonat esterlerin fosfonik aside dönüştürülmesi literatüre göre yapılmıştır. [105] Fosfonat esterlerinin fosfonik aside dönüştürülme amacı, fosfonik asit grubundan polimerlere Fe_3O_4 nanopartikülleri bağlamak ve altın elektrot yüzeyine polimerlerin daha iyi bağlanmasını sağlamaktır.

5.5.1 Poly A_1 Serisinin Fosfonik Aside Dönüştürülmesi

Molekül ağırlığı 3.000 g/mol olan kopolimerlerin 0,1 gramı 5 mL kuru kloroformda 2 boyunlu balonda çözüldü. Molekül ağırlığı 10.000 g/mol olanlar ise 4 mL kuru kloroform üzerine 6 damla kuru DMF eklenerek çözüldü. N_2 altında karıştırılırken

2 mL bromotrimetilsilan (fazla miktarda) damla damla oda sıcaklığında şırınga ile reaksiyona eklendi. 40 ˚C'de, N_2 altında, alüminyum folyoya sarılarak, geri soğutucu altında reaksiyon 4 saat karıştırıldı. Döner buharlaştırıcıda solvent uzaklaştırıldı ve yaklaşık 2 mL çözücü kalacak kadar bırakıldı. Üzerine 6 mL MeOH (kalan miktar x 3) eklendi ve oda sıcaklığında, alüminyum folyoya sarılarak 3 gece karıştırıldı. 3 günün sonunda döner buharlaştırıcıda çözücü uçuruldu, dietileter eklenerek çöktürüldü ve dietileter ile yıkama yapıldı.

5.5.2 Poly A_2 Serisinin Fosfonik Aside Dönüştürülmesi

Molekül ağırlığı 3.000 g/mol olan kopolimerlerin 0,1 gramı 5 mL kuru kloroform üzerine 6 damla kuru DMF eklenerek 2 boyunlu balonda çözüldü. Molekül ağırlığı 10.000 g/mol olanlar ise 5 mL kuru DMF eklenerek çözüldü. N_2 altında karıştırılırken 2 mL bromotrimetilsilan (fazla miktarda) damla damla oda sıcaklığında şırınga ile reaksiyona eklendi. 40 ˚C'de, N_2 altında, alüminyum folyoya sarılarak, geri soğutucu altında reaksiyon 4 saat karıştırıldı. Döner buharlaştırıcıda solvent uzaklaştırıldı. DMF uzaklaştırılamadığı için üzerine 15 mL MeOH (kalan miktar x 3) eklendi ve oda sıcaklığında, alüminyum folyoya sarılarak 3 gece karıştırıldı. 3 günün sonunda döner buharlaştırıcıda çözücü uçuruldu, dietileter eklenerek çöktürüldü ve dietileter ile yıkama yapıldı.

5.6 Fe_3O_4 Nanopartiküllerinin Ko-Çökeltme Yöntemi İle Sentezlenmesi ve Fosfonik Asit İçeren Kopolimerlere (Poly A_1 ve Poly A_2 esaslı) Bağlanması

500 mL ceketli cam reaktöre 80 mL destile su kondu ve 60 °C'de mekanik karıştırıcı ile 200 rpm ile karıştırılırken 30 dakika azot gazı destile su içinden geçirildi. Reaktöre 0,282 g (1,6 mmol) demir (III) klorür ($FeCl_3$) ve 0,242 g (0,8 mmol) demir (II) sülfat heptahidrat ($FeSO_4.7H_2O$) eklendi. Sarı-turuncu renkli çözelti 15 dakika karıştırıldı. Başka bir kapta 0,514 g NaOH, 10 mL destile su içinde çözüldü ve reaktöre ilave edildi, azot gazı kapatıldı. Çözeltinin rengi, manyetit fazının oluşumunu gösteren siyah-kahverengiye döndüğü gözlendi. Bu çözelti 30 dakika karıştırıldı. Kolloidal manyetik nanopartikülleri çökeltmek için santrifüj

tüplerine konulup üzerine aseton ilave edildi. Üst faz atıldı, alt katı faz iki kez aseton ile santrifüjlendi ve vakum fırınında kurutuldu [108, 109].

Elde edilen demir oksit nanopartikülün yüzeyi daha sonra fosfonik asit esaslı kopolimerler ile kaplanmasına çalışıldı. Bu kapsamda, 48 mg fosfonik asit içeren kopolimerler 6 mL DMSO içinde çözüldü ve üzerine 0,1 g demir oksit nanopartikülü (yüzeyi kaplanmamış) eklendi. Oda sıcaklığında, 30 dakika sonike edildi. Analiz için çözelti fazı kullanıldı.

5.7 Poly B_1 ve Poly B_2 Serisine Altın Nanopartikül Bağlanması

Kopolimerlere altın nanopartikül bağlanması literatüre göre yapılmıştır [110]. Tiyol asetat içeren kopolimer (0,05 g, 0,01 mmol) 12,5 mL DMSO'da çözüldü ve 50 mL'lik balon içerisinde karıştırıcıya kondu. Üzerine 6,2 mL DMSO'da çözülmüş altın tuzu (0,0294 g, 0,0748 mmol) eklendi. Reaksiyon hızlı bir şekilde karışırken 3,12 mL suda çözülmüş $NaBH_4$ (0,0451 g, 1,246 mmol) çözeltisi reaksiyon ortamına hızlı bir şekilde eklendi. Solüsyonun rengi hemen koyu renge (siyah) döndü ve solüsyon bir gece karıştırıldı. Diyaliz membrana (100-500 Da, 3 gün) koyularak saflaştırma yapıldı.

5.8 Yüzey Kaplamaları

5.8.1 Spin Kaplama İle Cam Yüzeylerinin Kaplanması

Konsantre (%95) H_2SO_4:(%35) H_2O_2 (3:1, v/v) oranında pirana çözeltisi hazırlandı. Lameller (2,5x2,5 cm) petri kaplarına tek sıra şeklinde dizildi. Üzerine pirana çözeltisi döküldü ve 5 dakika beklendi. Lamellerin diğer yüzeyleri çevrildi ve 5 dakika daha bekletildi. Camlar beher içindeki destile suya kondu ve karıştırıldı. Daha sonra su içinden alınıp beher içinde bulunan izopropil alkole eklendi ve cam bagetle tekrar karıştırıldı. Pens yardımı ile ısı tabancası kullanılarak kurutuldu [111]. DMSO içinde çözülmüş (konsantrasyon 8 mg/mL) kopolimerlerden 0,7 mL'si lamel yüzeyine damlatıldı ve 30 saniye 2000 rpm'de (1000 devir/ s hızlanma) spin kaplama tekniği ile kaplandı. 70 °C'de 2 saat süre ile fırında cam yüzeyleri kurutuldu. Kaplanan cam yüzeyleri antibakteriyel test için kullanıldı.

5.8.2 Altın Elektrot Yüzeylerinin Kaplanması

Elektrot yüzeyleri 30 dakika boyunca izopropanol içinde sonikatör kullanılarak temizlendi ve daha sonra argon gazı altında kurutuldu. DMSO içindeki 10 µL kopolimer çözeltileri (konsantrasyon 8 mg/mL) elektrot yüzeyine damlatıldı ve çözücü uzaklaşıp ince film elde etmek için 70 °C'de 2 saat kurutuldu. Poly B_1 ve Poly B_2 kopolimerlerinin altın elektrota bağlanması için 5 saat 70 ° C'de kurutma işlemi uygulanmıştır.

5.9 Katı Yüzeyde Antibakteriyel Etkinlik

5.9.1 Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan bakteriyel süspansiyonlar, Mueller-Hinton agar (MHA) plakalarından Mueller-Hinton sıvı besiyeri (MHB) içine birkaç iyi izole edilmiş koloninin süspanse edilmesi suretiyle hazırlandı ve bir gece boyunca çalkalamalı bir inkübatörde 37 °C'de ve 200 rpm'de inkübe edildi. Süspansiyonlar daha sonra, spektrofotometrik olarak 475 nm'de 0,28 ± 0,02 absorbansa sahip olana kadar steril tampon çözeltisi ile seyreltildi. Bu ölçülen değer, 1,5-3,0 × 10^8 CFU/mL konsantrasyonuna karşılık gelmektedir.

5.9.2 Cam Yüzeyde Antibakteriyel Aktivite Testi

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan her bir bakteri süspansiyonundan 10 µL, antibakteriyel polimer kaplı cam malzemelerin yüzeyine damlatıldı. Bu cam yüzeyler, 37 °C'de ve % 90'ın üzerinde bağıl nemde, 1 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra, cam malzemelerin yüzeyinde hayatta kalan mikroorganizmaları geri kazanmak için, 10 mL MHB ortamı ile steril kaplara alındı. Bu kap oda sıcaklığında 30 dakika tutuldu. Sürenin sonunda, bu kaplardan numune alınarak 10 kat seri seyreltmeler yapıldı. Her bir dilüsyondan 100 µL alındı ve çubukla MHA agar plakalarına yayıldı. Plakalar 24 saat, 37 °C'de inkübe edildi ve koloni oluşturan birimler için sayıldı [112]. Bu çalışmada boş cam yüzey ve DMSO ile kaplanmış cam yüzey kontrol örnekleri olarak kullanılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır.

$$\log \text{azalma} = \log(\text{kontrol hücre sayısı}) - \log(\text{test malzeme yüzeyindeki hücre sayısı}) \quad (5.5)$$

$$\%\ \text{öldürme} = \frac{\text{kontrol hücre sayısı} - \text{test malzeme yüzeyindeki hücre sayısı}}{\text{kontrol hücre sayısı}} \times 100 \quad (5.6)$$

5.9.3 Disk Difüzyon Testi

Disk difüzyon testi EUCAST standart metodu modifiye edilerek uygulanmıştır [113]. Cam yüzeyler, altın nanopartükil bağlı kopolimerler ile 8 mg/mL konsantrasyonda, DMSO'da çözülerek spin kaplama ile kaplandı. 0,1 mL, 0,5 McFarland bakteri süspansiyonu ile MHA plakalar inoküle edildi. Altın veya demir nanopartikül içeren kopolimerler MHA plakalara yerleştirildi ve plakalar 37 °C'de gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün, bakteri kolonileri sayıldı ve zon ölçümü yapıldı.

5.10 Empedans Ölçümü

Kompleks empedans genellikle şu şekilde tanımlanır:

$$Z^*(\omega) = Z'(\omega) - iZ''(\omega) = R(\omega) - iX(\omega) \quad (5.7)$$

Burada; $\omega = 2\pi f$ açısal frekans, f frekans, $Z'(\omega)$ gerçek kısım ve $Z''(\omega)$ ise kompleks impedansın imgesel kısmıdır. Açısal frekansın bir fonksiyonu olarak karmaşık empedans Z, mutlak empedans için $IZI = \sqrt{(Z')^2 + (Z'')^2}$ şeklinde gösterilir. Frekansa bağlı empedans değerleri oda sıcaklığı RMS 0,1 gerilimlerinde, interdigital transdüser (IDT) eletrotları ile ölçülmüştür. UV absorbans ölçümünden sonra, analiz için yeni hazırlanmış bakteri solüsyonlarının konsantrasyonu belirlenmiş ve deney setinde hemen kullanılmıştır. Antibakteriyel polimerler ile kaplı olan elektrotların çalışma frekansını bulmak için elektrotlar PBS içerisinde çözülmüş olan 10^1, 10^3, 10^5 ve 10^7 konsantrasyonlarındaki *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri çözeltilerine ve sadece PBS'e karşı 10 Hz ile 1 kHz frekans aralığında empedans ölçümleri alındı. Empedans değerleri arasında en fazla fark görülen 100 Hz çalışma frekansı olarak ayarlandı. Antibakteriyel polimer kaplı altın elektrotlar 600 saniye boyunca PBS çözeltisinde bekletilerek empedans ölçümleri kaydedildi. 600 saniye sonrasında analiz ortamına çeşitli konsantrasyonlarda *E. coli* ve *S. aureus* eklenerek empedans ölçümleri yapıldı. Toplam analiz süresi her bir elektrot için 2400 saniyedir.

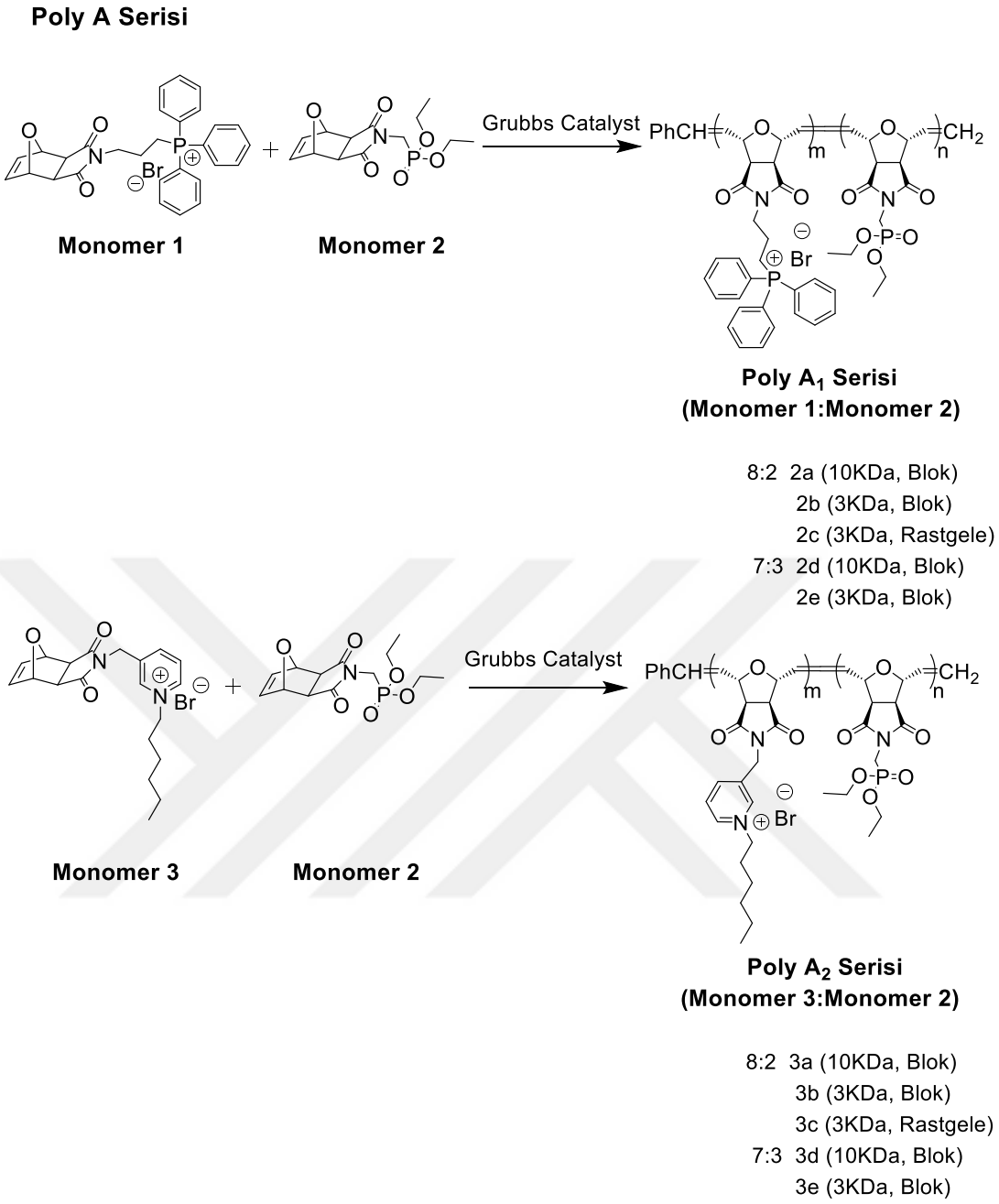
5.11 Döngüsel Voltametri

CV çalışmasında, IDEA, platin tel ve kalomel (3 M KCl) elektrotları sırasıyla çalışan, yardımcı ve referans elektrot olarak kullanıldı. 0,01 M $K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi PBS içinde hazırlandı. 100 mV/s tarama hızında -400-(+800) mV aralığında döngüsel voltametri antibakteriyel polimer ile kaplanmış IDEA elektrotları ile kaydedildi. İlk adım olarak antibakteriyel polimer kaplı elektrotların CV ölçümleri, PBS içerisinde iken alındı. İkinci adım olarak ise elektrotların CV ölçümleri PBS içerisinde hazırlanan 0,01 M $K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içinde alındı. Daha sonra her bir polimer kaplı elektrot 10^5 ve 10^7 cfu/mL olmak üzere iki farklı konsantrasyonda PBS içerisinde çözülmüş *S. aureus* ve *E.coli* solüsyonları içerisinde 15 dakika bekletildi. 15 dakika sonunda tekrardan PBS içerisinde hazırlanan 0,01 M $K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde elektrotların CV ölçümleri kaydedildi.

6
DENEYSEL VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

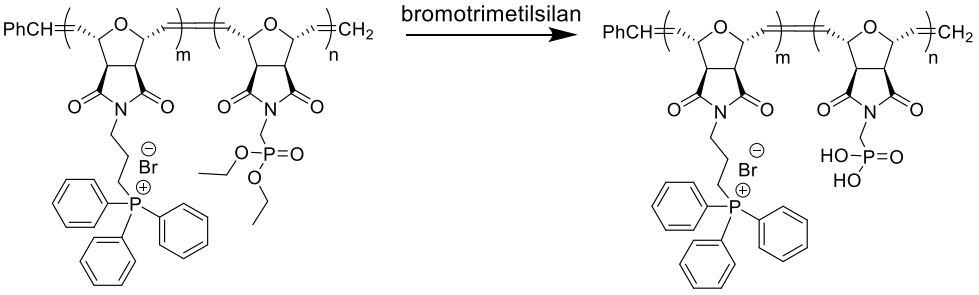
ROMP, düşük ağırlık dağılımları (PDI) ve kontrollü bir molekül ağırlığı ile iyi tanımlanmış polimer hazırlamak için yaygın olarak kullanılan bir polimerizasyon yöntemidir. Özellikle, Tew ve arkadaşları etkin antibakteriyel polimerlerin hazırlanması için ROMP'u kullanarak farklı moleküller sentezlemişlerdir [114, 115]. Sentezlenen bu polimerler, polinorbornen türevleri primer amin trifloroasetik asit tuzları ve çeşitli alkil grupları içeriyordu. Yan zincirleri farklı kuaterner piridinyum tuzları ile amfifilik polinorbornen de Eren ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir [106, 116]. Ayrıca Eren ve arkadaşları fosfonyum tuzları içeren antibakteriyel polimerler sentezlemişlerdir ve bu polimerlerin sıvı fazda ve katı yüzeyde antibakteriyel etkinliklerini incelemişlerdir [103, 117].

Çalışmamızda yüksek antibakteriyel özellik gösteren hekzilpiridinyum tuzu ve fenilfosfonyum tuzu içeren okzanorbornenlerin; demir oksit nanopartikülü ve altın nanopartiküllerini bağlamak için farklı fonksiyonel gruplarına sahip (fosfonik asit ve tiyol asetat) monomerler ile kopolimerizasyonu yapılmıştır. Kopolimer yapıları (Poly A ve Poly B serileri) Şekil 6.1 ve 6.3'de gösterilmiştir. Bu kopolimerlerin empedans spektrometri ve siklik voltametri ölçümleri yapılarak suda bulunan bakterilerin analizi amaçlanmıştır. Şekil 6.2 de Poly A serisinin fosfonik asit türevlerinin sentez şeması gösterilmektedir.



Şekil 6.1 Çalışmada sentezlenen Poly A serisi kopolimerlerin yapısal gösterimi

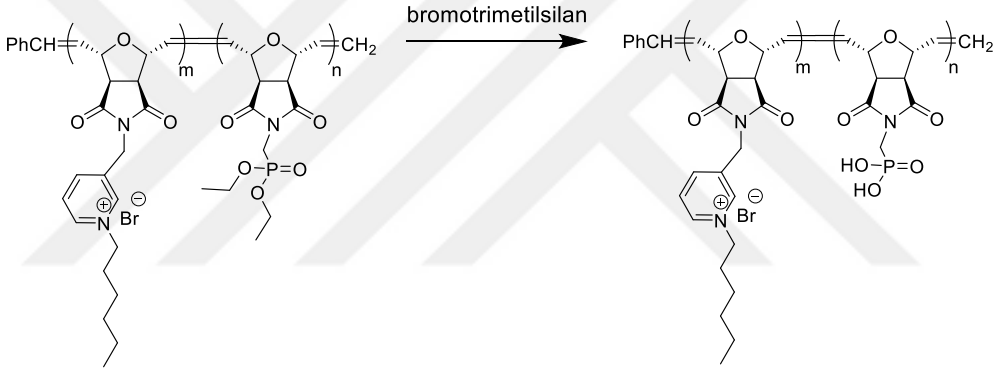
Poly A_1 Aside Dönüstürülmesi



Monomer 1:Monomer 2
8:2 2a (10KDa, Blok)
2b (3KDa, Blok)
2c (3KDa, Rastgele)
7:3 2d (10KDa, Blok)
2e (3KDa, Blok)

Monomer 1:Monomer 2
8:2 2a* (10KDa, Blok)
2b* (3KDa, Blok)
2c* (3KDa, Rastgele)
7:3 2d* (10KDa, Blok)
2e* (3KDa, Blok)

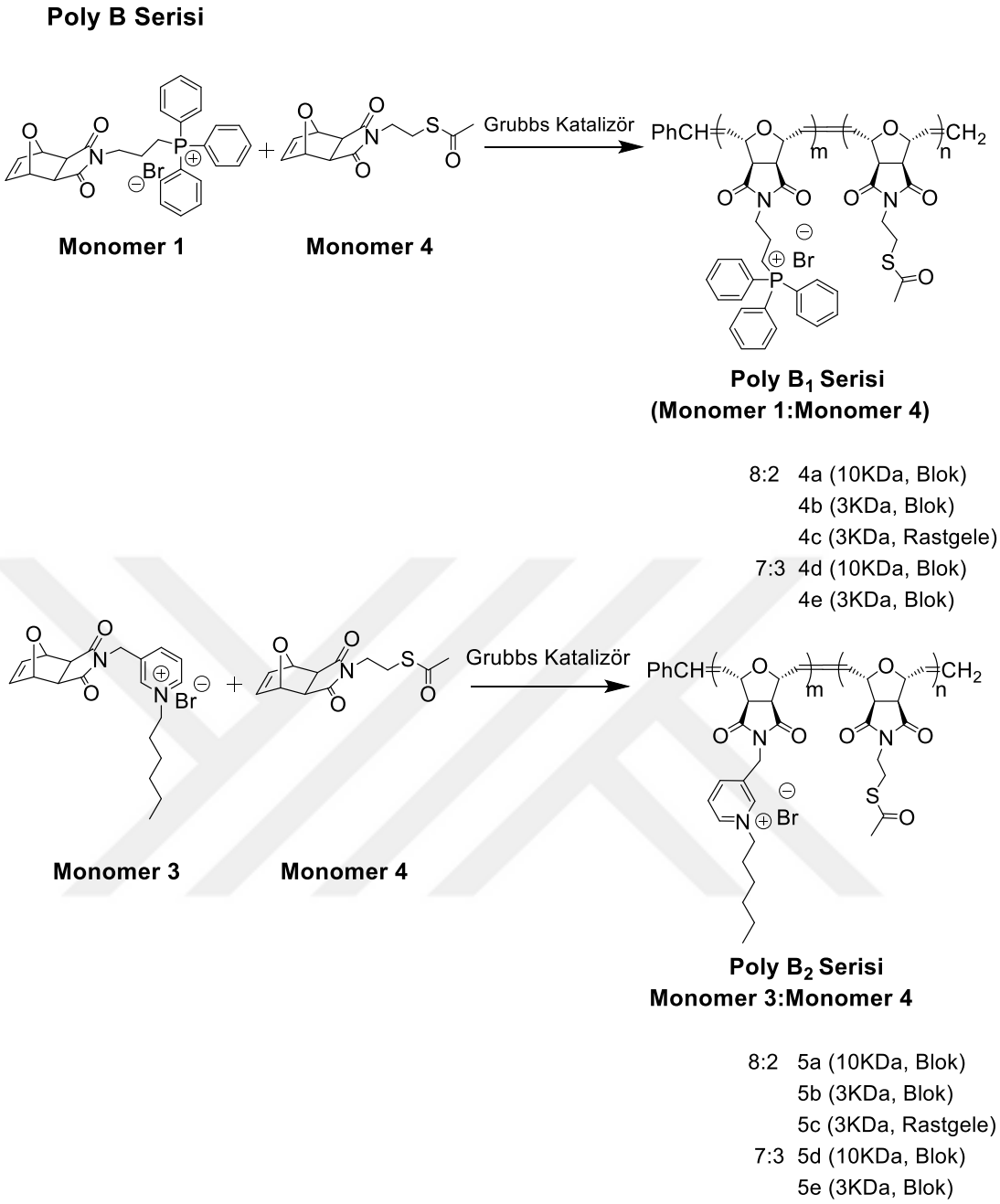
Poly A_2 Aside Dönüstürülmesi



Monomer 3:Monomer 2
8:2 3a (10KDa, Blok)
3b (3KDa, Blok)
3c (3KDa, Rastgele)
7:3 3d (10KDa, Blok)
3e (3KDa, Blok)

Monomer 3:Monomer 2
8:2 3a* (10KDa, Blok)
3b* (3KDa, Blok)
3c* (3KDa, Rastgele)
7:3 3d* (10KDa, Blok)
3e* (3KDa, Blok)

Şekil 6.2 Çalışmada sentezlenen Poly A serisi kopolimerlerin fosfonik asit yapısal gösterimi

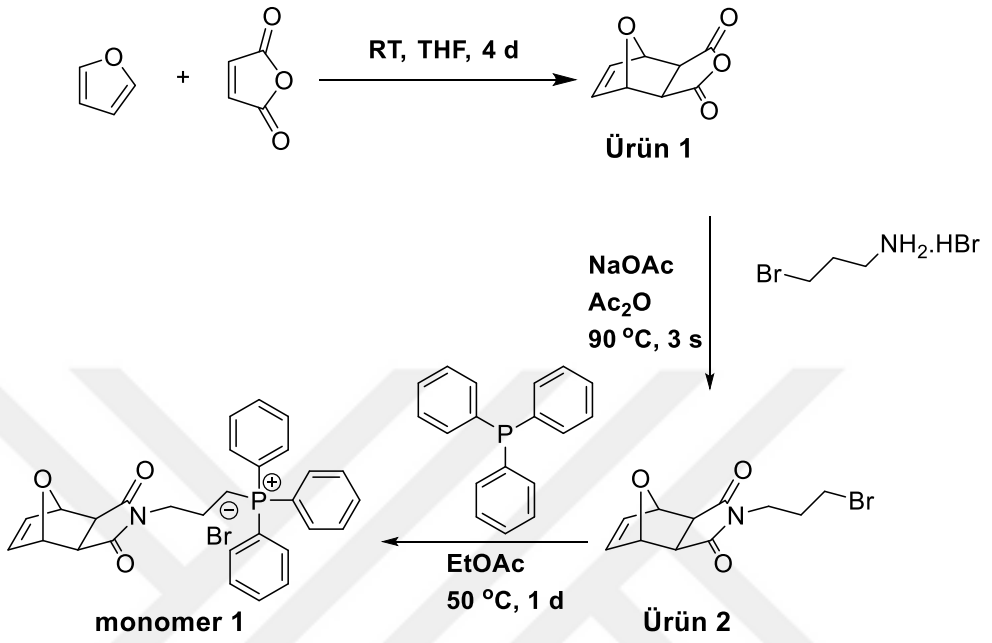


Şekil 6.3 Çalışmada sentezlenen Poly B serisi kopolimerlerin yapısal gösterimi

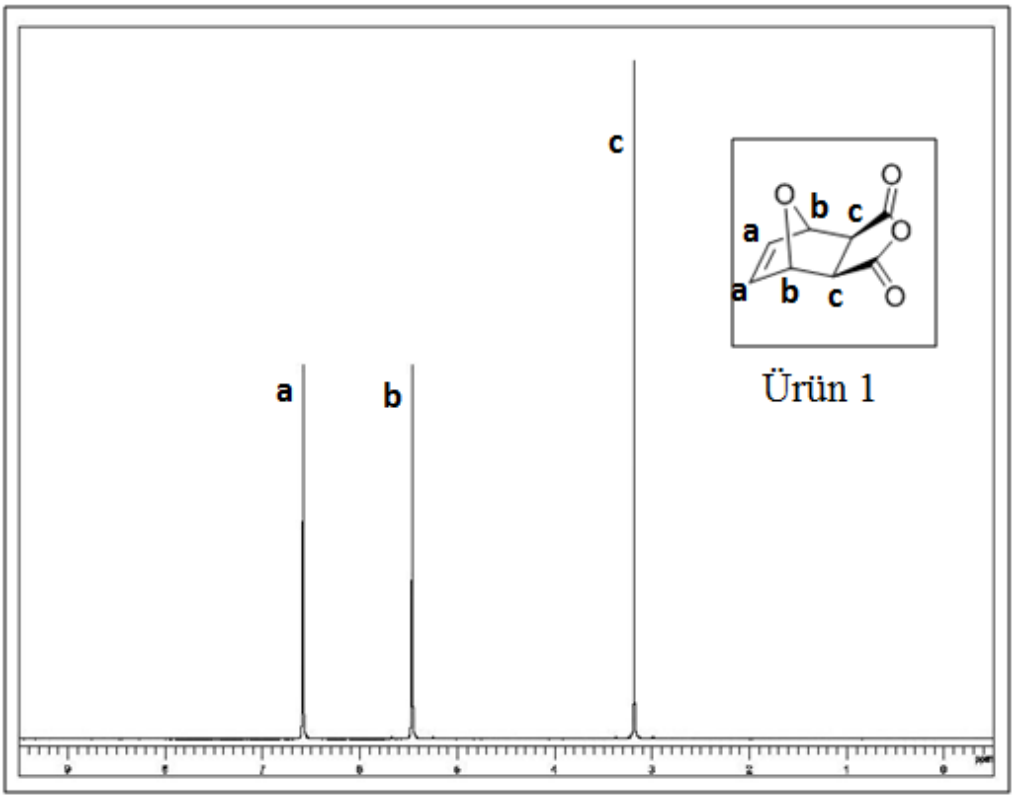
6.1 Monomerlerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Çalışma kapsamında kullanılan ürün 1, ürün 2 ve monomer 1'in sentetik şeması Şekil 6.4'de gösterilmektedir. Sentez sırasında öncelikle furan ve maleik anhidritin Diels-Alder reaksiyonu sonucu 4,10-Dioxa-tricyclo [5.2.1.$0^{2,6}$] dec-8-ene-3,5-dione (Ürün 1) oluşturulmuştur. Karakterizasyon kapsamında ^{1}H ve ^{13}C analizi yapılmış ve NMR analizi sonucu ürünün %100 ekzo yapıda olduğu görülmüştür.

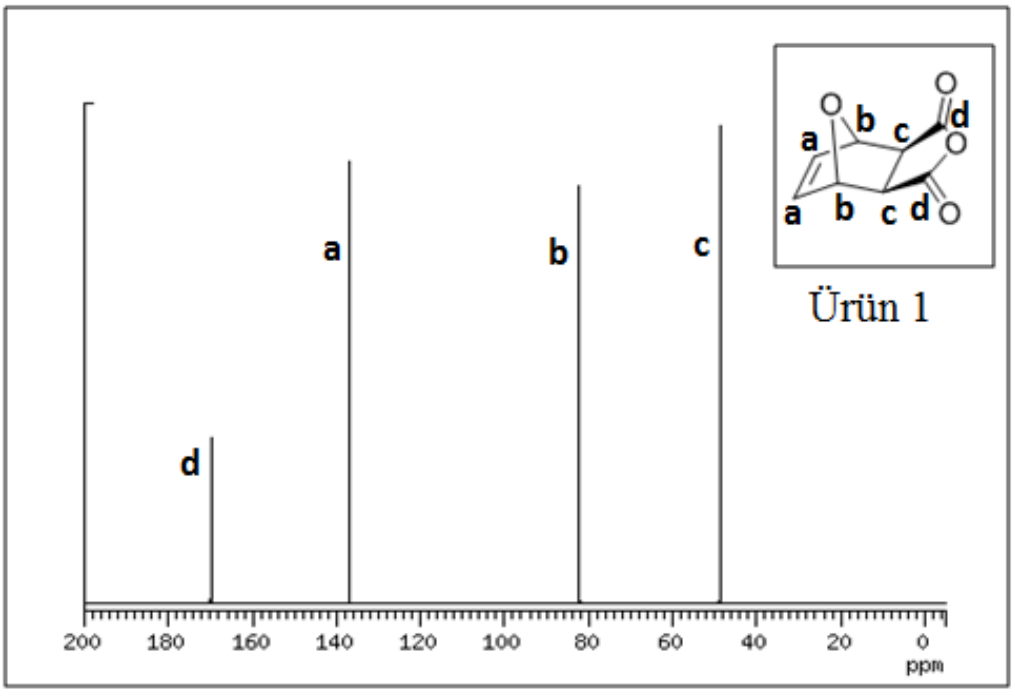
Okzanorbornen halkasındaki çift bağlı yapıda bulunan protonlar 6.5 ppm civarında gelmektedir (Şekil 6.5). ^{13}C NMR analizinde okzanorbornen halkasındaki çift bağ karbon pikleri 137 ppm ve anhidrit karbonil grubu 172 ppm de görülmüştür (Şekil 6.6).



Şekil 6.4 Çalışma kapsamında sentezlenen ürün 1, ürün 2 ve monomer 1'in sentetik şeması

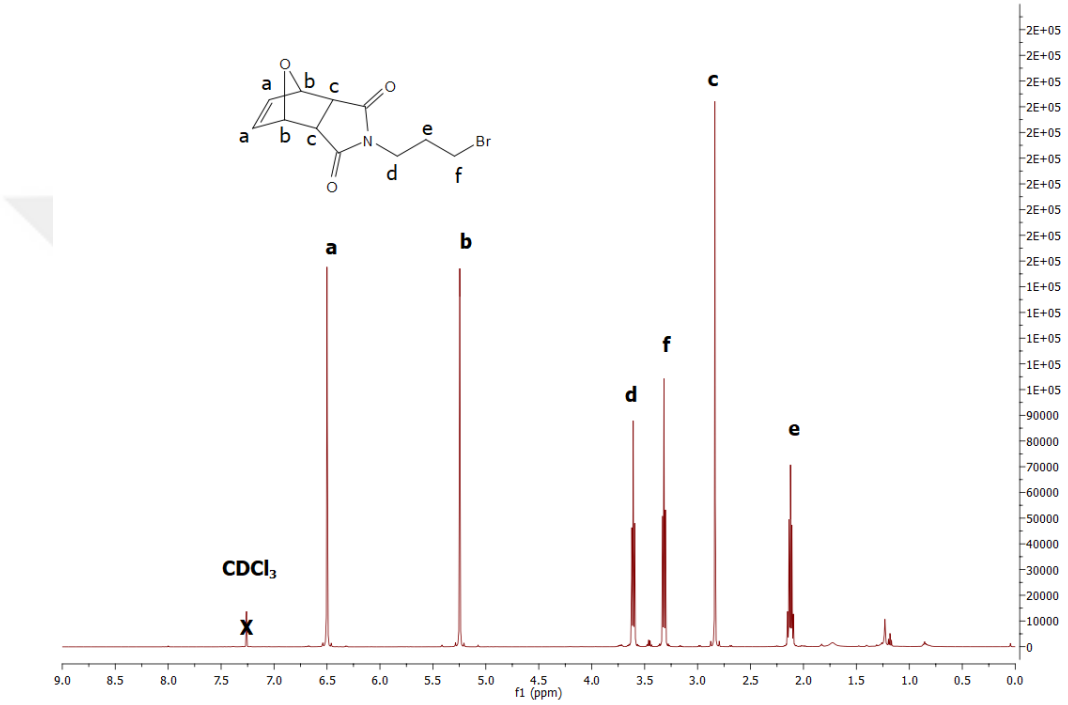


Şekil 6.5 Furan maleik anhidritin (ürün 1) ^{1}H NMR spektrumu

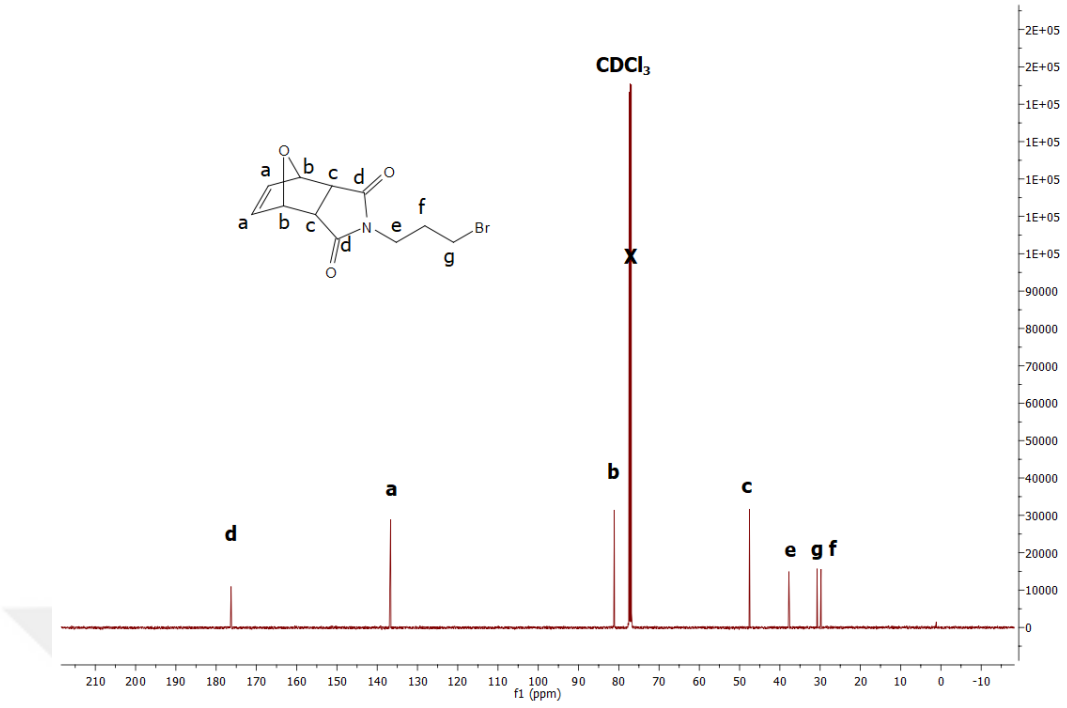


Şekil 6.6 Furan maleik anhidritin (ürün 1) ^{13}C NMR spektrumu

Ürün 2 sentezi, imit mekanizmasının izlenmesi ile elde edilmiştir. Sentez kapsamında ürün 1, 3-bromo propilamin ile sodyum asetat katalizörlüğünde elde edilmiştir. Saflaştırma işlemi etil asetat:hekzan (1:1, v/v) kolon kromatografisi kullanılarak yapılmış ve %40 verimde saf beyaz katı elde edilmiştir. Şekil 6.7, ürün 2'nin ^{1}H NMR; Şekil 6.8 ise ürün 2'nin ^{13}C NMR spektrumlarını göstermektedir. Okzanorbornen halkasındaki protonların 6.5, 5.2 ve 2.9 ppmde, CH_2-Br protonu ise 3.2 ppmde olduğu görülmüştür.

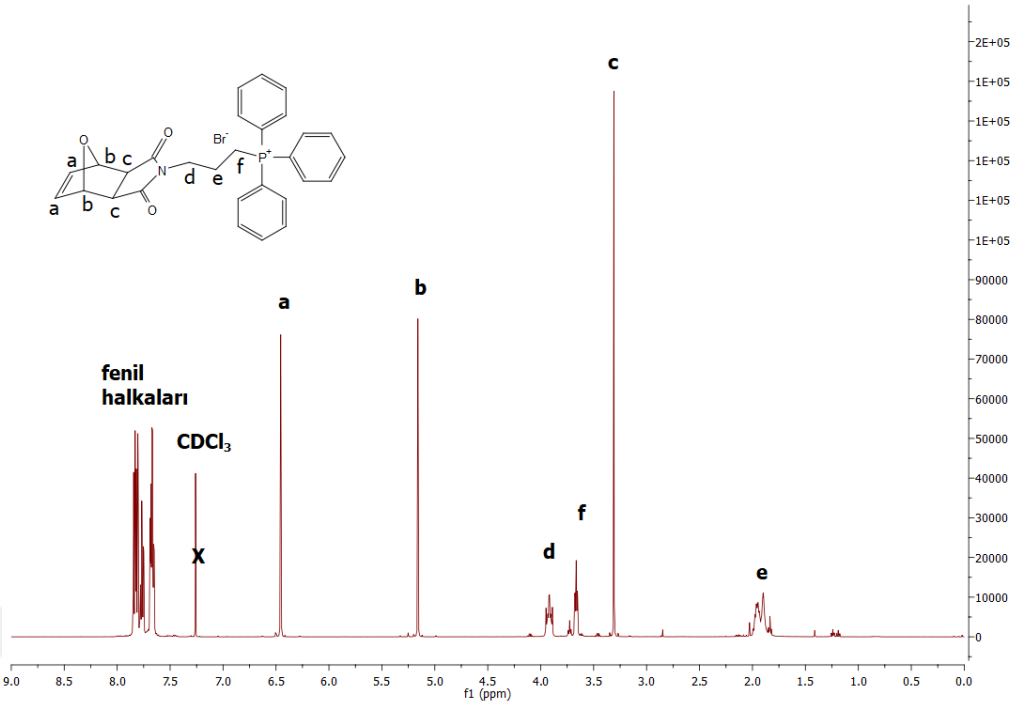


Şekil 6.7 Bromookzanorbornen'in (ürün 2) ^{1}H NMR spektrumu

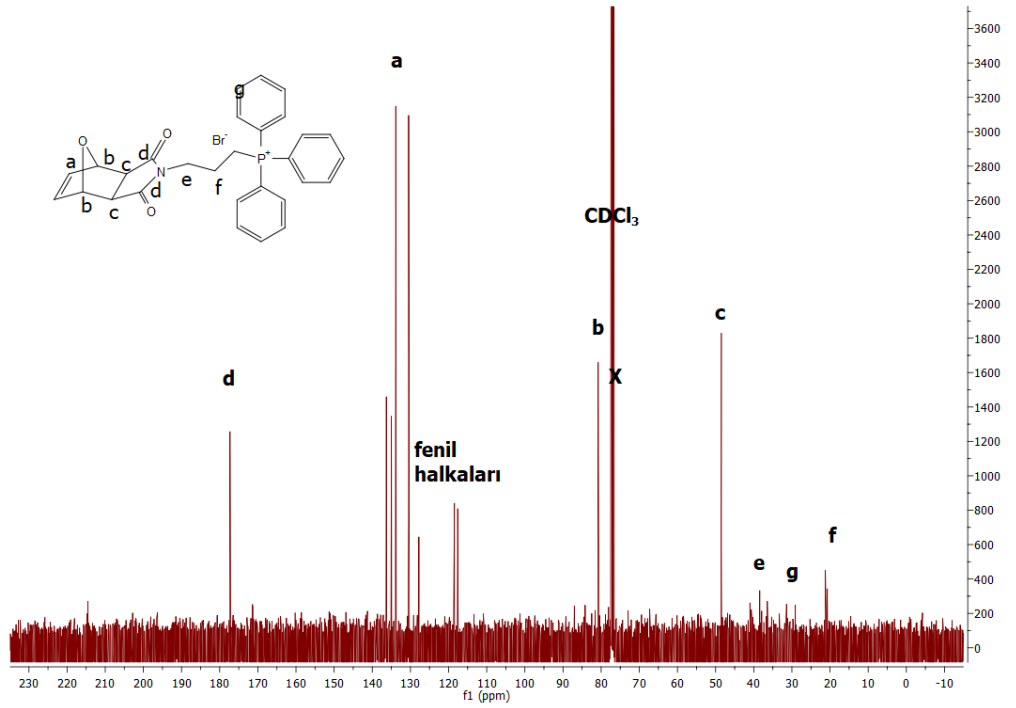


Şekil 6.8 Bromookzanorbornen'in (ürün 2) ^{13}C NMR spektrumu

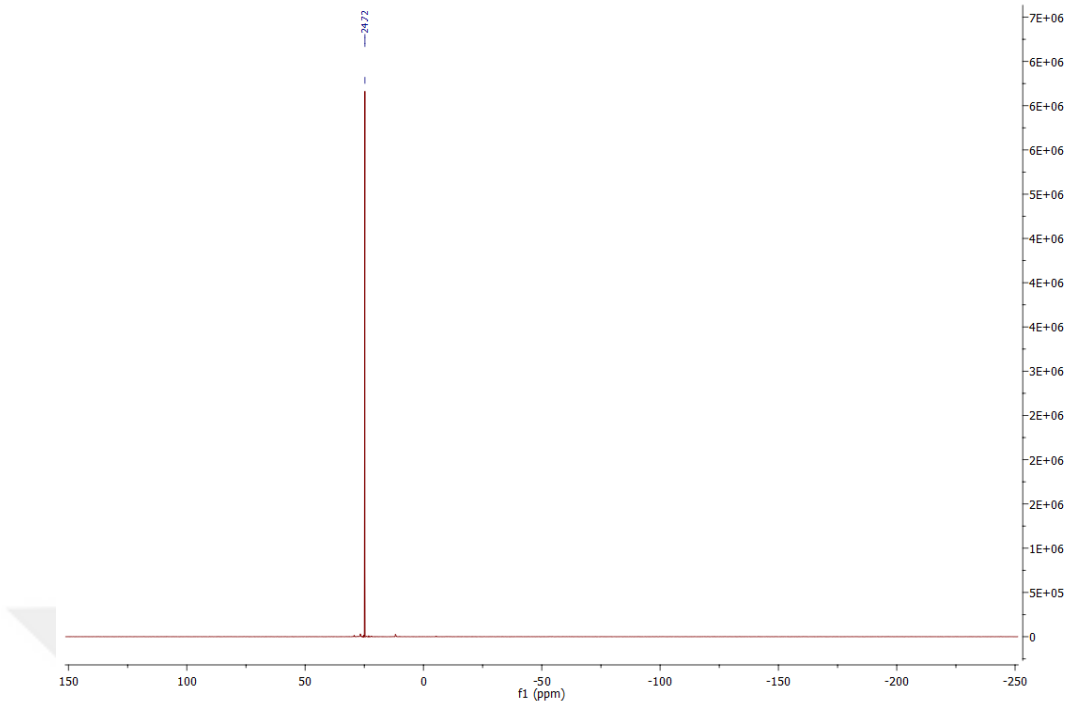
Monomer 1 sentezi, sodyum asetat katalistliğinde 3-bromopropil hidrobromür ile 4,10-diokza-trisiklo[5.2.1.$0^{2,6}$]dec-8-en-3,5-dion'un (Ürün 1) reaksiyonu sonucu 4-(3-bromopropil)-10-okza-4-azatrisiklo[5.2.1.$0^{2,6}$]dec-8-en-3,5-dion (Ürün 2) elde edilerek bu ürünün trifenilfosfin ile reaksiyonu ile tuz oluşturularak gerçekleştirilmiştir. Yapısal analiz, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR ve ^{31}P NMR ile yapılmıştır. Monomer 1'in ^{1}H NMR spektrumu incelendiğinde, fenil halkalarına ait sinyaller 7.6-7.8 ppm arasında görülmektedir. Fosfora bağlı karbondaki protonlar (CH_2-P^+) 3.6 ppmde görülmektedir. Okzanorbornen halkasındaki çift bağlı yapıda bulunan protonların monomerlerde 6.5 ppm civarında geldiği ^{1}H NMR'ında görülmektedir. (Şekil 6.9) ^{13}C NMR spektrumu incelendiğinde ise fenil halkasındaki karbon yapıları 120-135 ppm aralığında, fosforun bağlı olduğu CH_2 ise 20 ppmde görülmüştür (Şekil 6.10). Şekil 6.11'deki ^{31}P NMR spektrumunda P^+-CH_2 sinyalinin 24.72 ppmde olduğu görülmüştür.



Şekil 6.9 Monomer 1'in ^{1}H NMR spektrumu

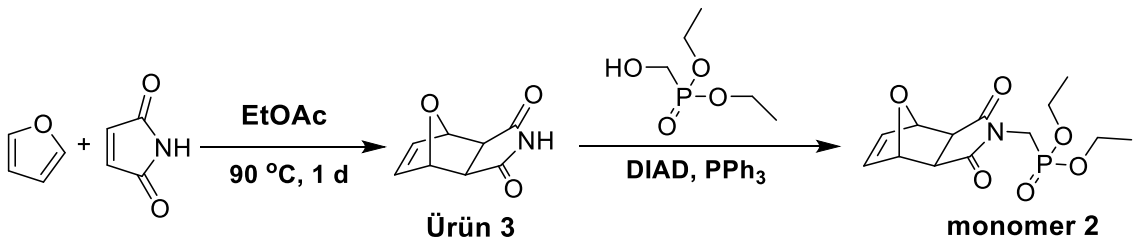


Şekil 6.10 Monomer 1'in ^{13}C NMR spektrumu



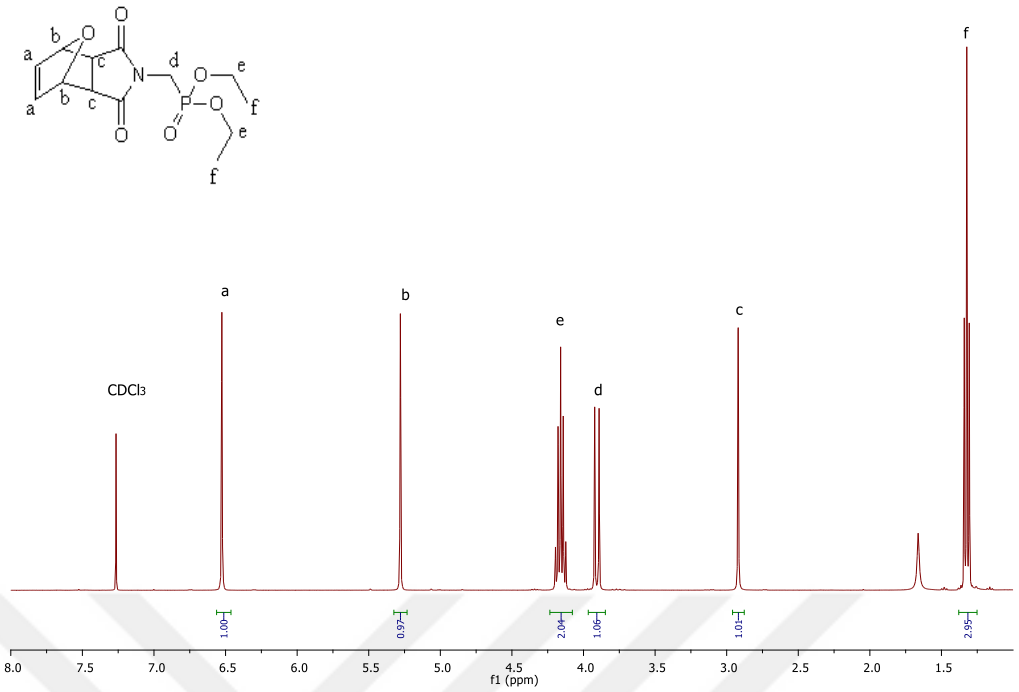
Şekil 6.11 Monomer 1'in ^{31}P NMR spektrumu

Ürün 3 (furan maleimit) ve Monomer 2'nin sentez şeması Şekil 6.12'de gösterilmiştir. Furan ve maleimidin Diels-Alder reaksiyonu sonucu exo-oxabicyclo-[2.2.1] hept-5-ene-2,3-dicarboximide (Ürün 3) elde edilmiştir. ^{1}H NMR analizi sonucu elde edilen ürünün ekzo yapıda olduğu ispat edilmiştir ve okzanorbornen halkasının protonları 2.9, 5.3 ve 6.5 ppm'de görülmüştür. (Şekil 6.13)

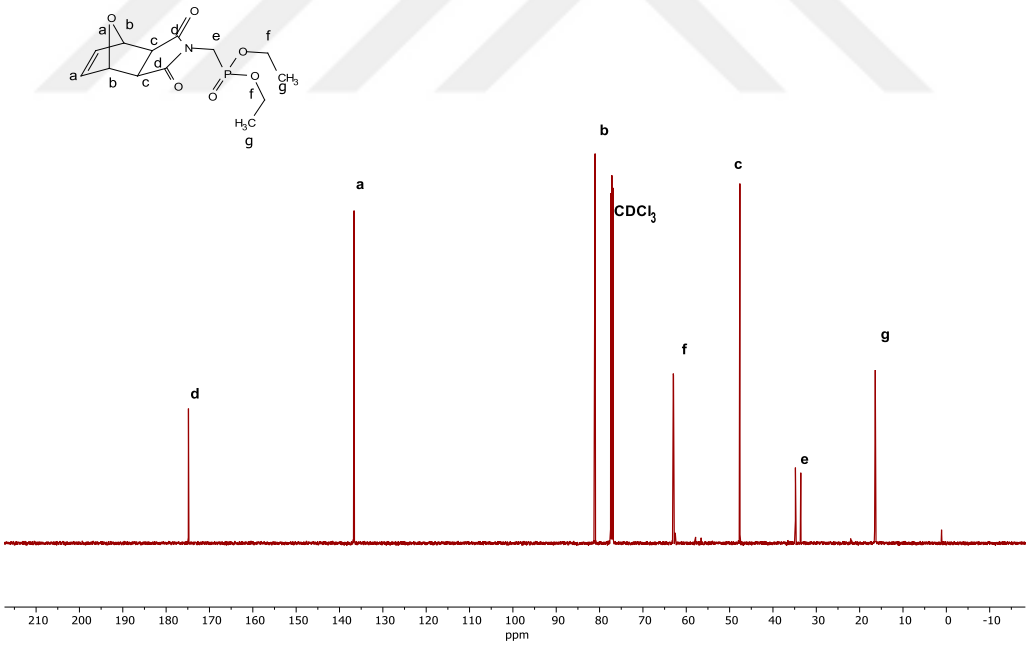


Şekil 6.12 Çalışma kapsamında sentezlene ürün 3 ve monomer 2'nin sentetik şeması

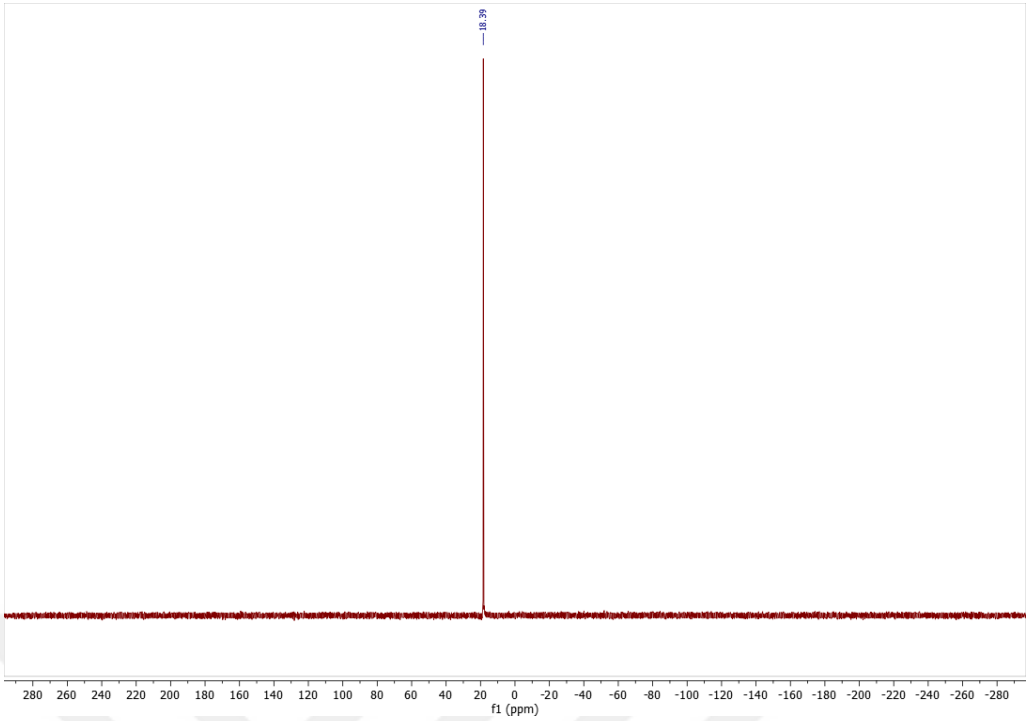
Monomer 2'nin karakteristik piki olan fosfonat esterinin piki 4.16 ppm'de belirmiştir (Şekil 6.13). ^{13}C NMR spektrumunda (O-CH_2-CH_3-fosfonat) 62.9 ve 62.8 ppm, 47.5 (CH_3-fosfonat) ise 16.32 ve 16.24 ppm'de görülmüştür (Şekil 6.14). Ayrıca fosfonat esterinin fosfor piki ^{31}P NMR'ında 18.39 ppm'de görülmektedir. (Şekil 6.15).



Şekil 6.13 Monomer 2'nin ^{1}H NMR spektrumu

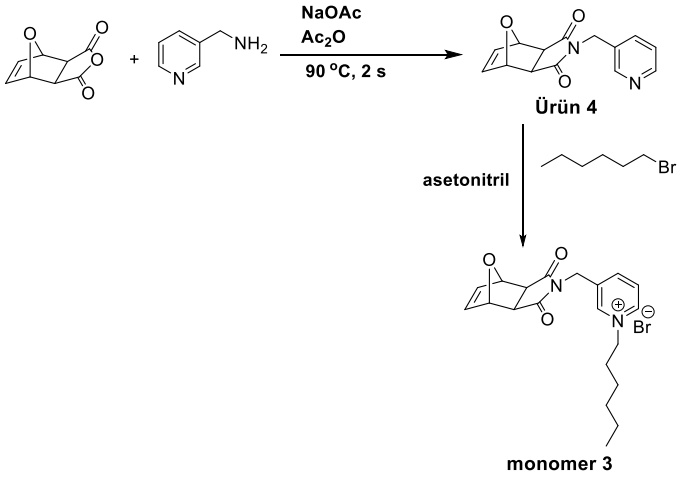


Şekil 6.14 Monomer 2'nin ^{13}C NMR spektrumu



Şekil 6.15 Monomer 2'nin ^{31}P NMR spektrumu

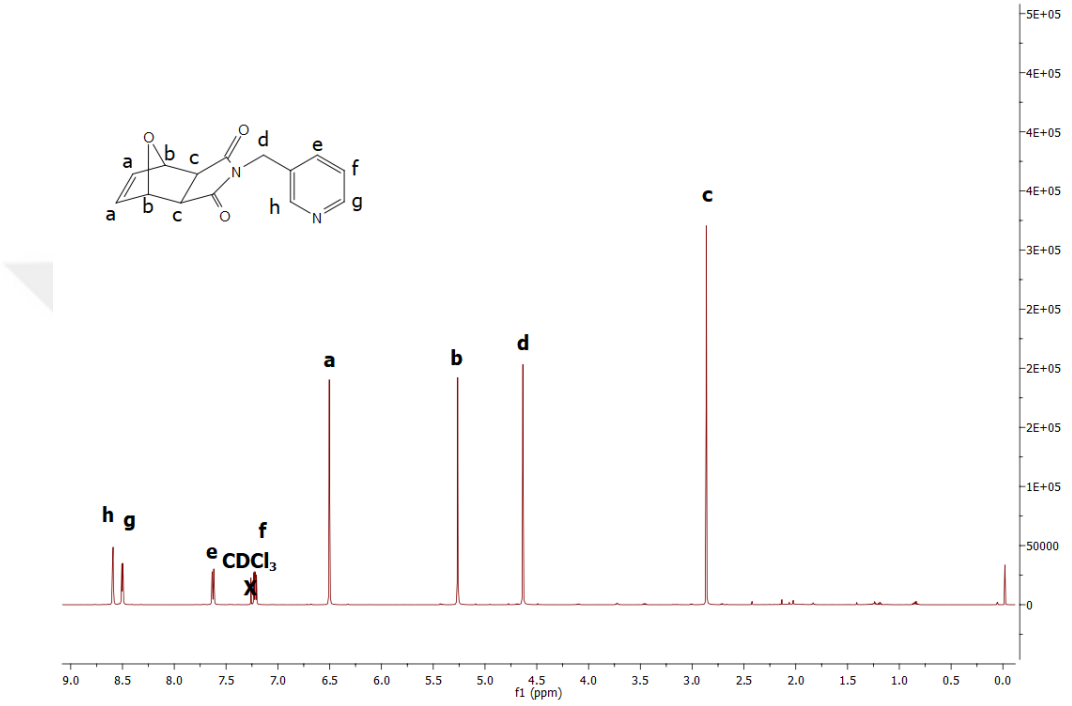
Ürün 4 ve monomer 3'ün sentez şeması Şekil 6.16'da verilmiştir. Sentez aminopiridin ile okzanorbornenin imide transformasyonu sonucu önce piridin fonksiyonel okzanorbornen (ürün 4) elde edilmiştir. Kolon kromatografisi ile saflaştırma sonrası elde edilen katı ürün bromohekzan ile kuaternizasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.



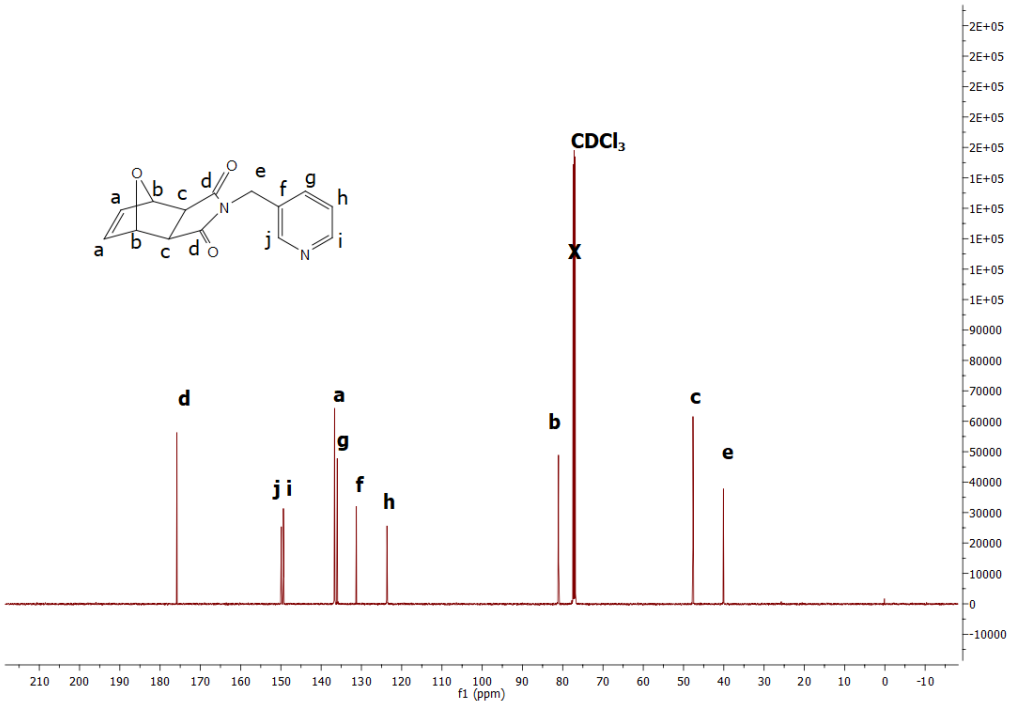
Şekil 6.16 Ürün 4 ve monomer 3'ün sentez şeması

Ürün 4'ün ^{1}H NMR analizinde pridin halkasındaki protonlar (C=C-H) 8.5, 7.5 ve 7.0 ppm civarında olduğu görülmüştür (Şekil 6.17). ^{13}C NMR analizinde ise azota bağlı

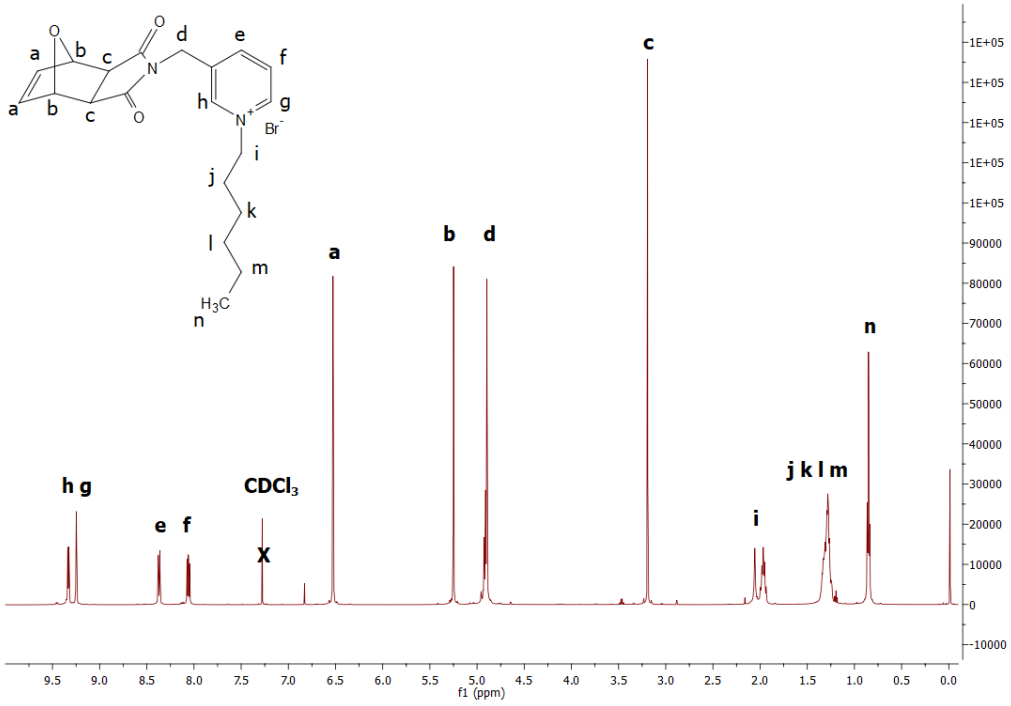
durumdaki karbonlar (C-N) 148 ppm civarıda gözükmüştür (Şekil 6.18). Ürün 4 daha sonra bromohekzan ile reaksiyona sokularak katyonik tuz haline getirilmiş ve Monomer 3 elde edilmiştir. Monomer 3'ün ^{1}H NMR analizinde azota bağlı metilen karbonları ($-CH_2-N^+$) 2.0 ppm civarında gelmiştir. Piridin halkasındaki protonlar ise 9.29, 8.41 ve 8.09 ppm görünmüştür (Şekil 6.19). Şekil 6.20'deki monomer 3'ün ^{13}C NMR spekturumundaki piridin halkaları 144.2 ile 128.3 ppm arasında gelmiştir.



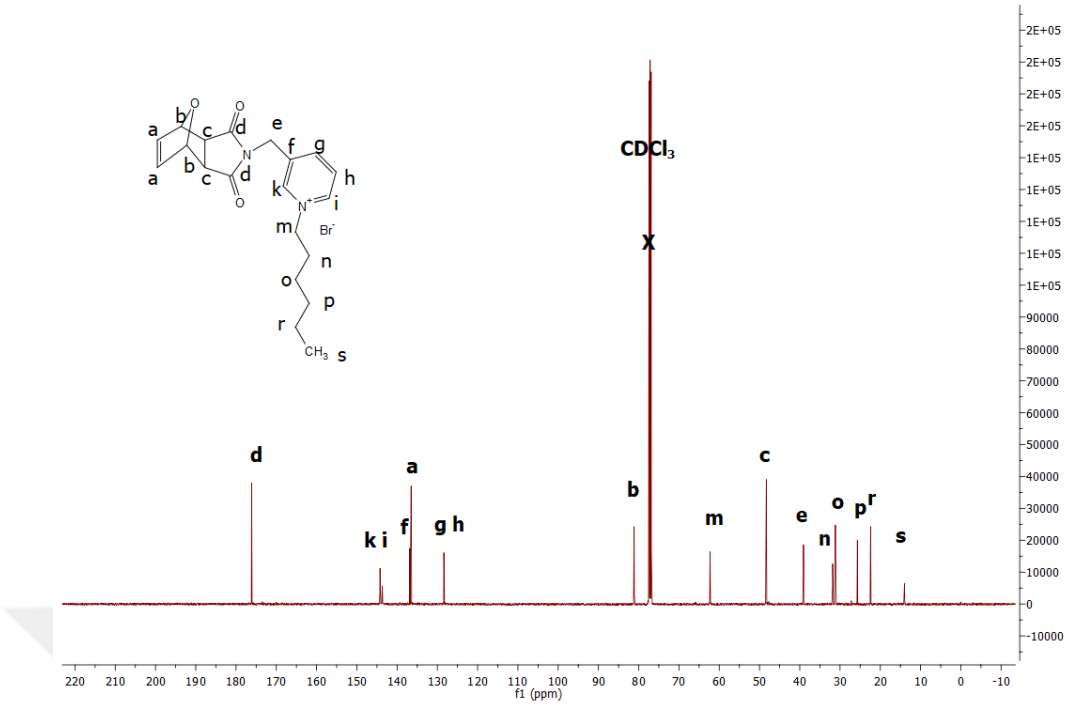
Şekil 6.17 Ürün 4'ün ^{1}H NMR spektrumu



Şekil 6.18 Ürün 4'ün ^{13}C NMR spektrumu

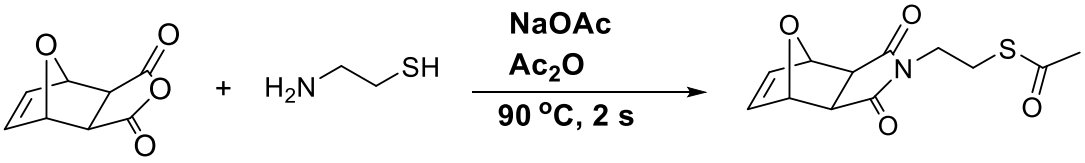


Şekil 6.19 Monomer 3'ün ^{1}H NMR spektrumu



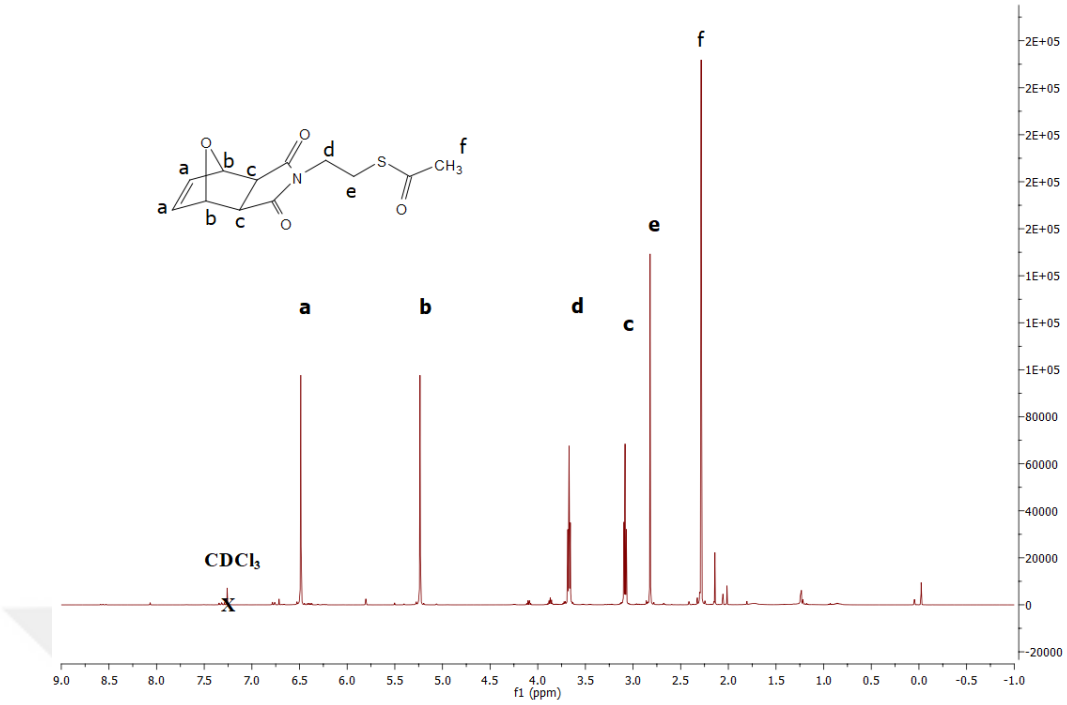
Şekil 6.20 Monomer 3'ün ^{13}C NMR spektrumu

Monomer 4'ün sentez şeması Şekil 6.21'de gösterilmiştir. Monomer 4'ün sentezinde kullanılan asetik anhidridin; sisteaminin amin grubundan okzanorbornene bağlandıktan sonra serbest halde bulunan SH grubuna bağlandığı NMR ile ispat edilmiştir.

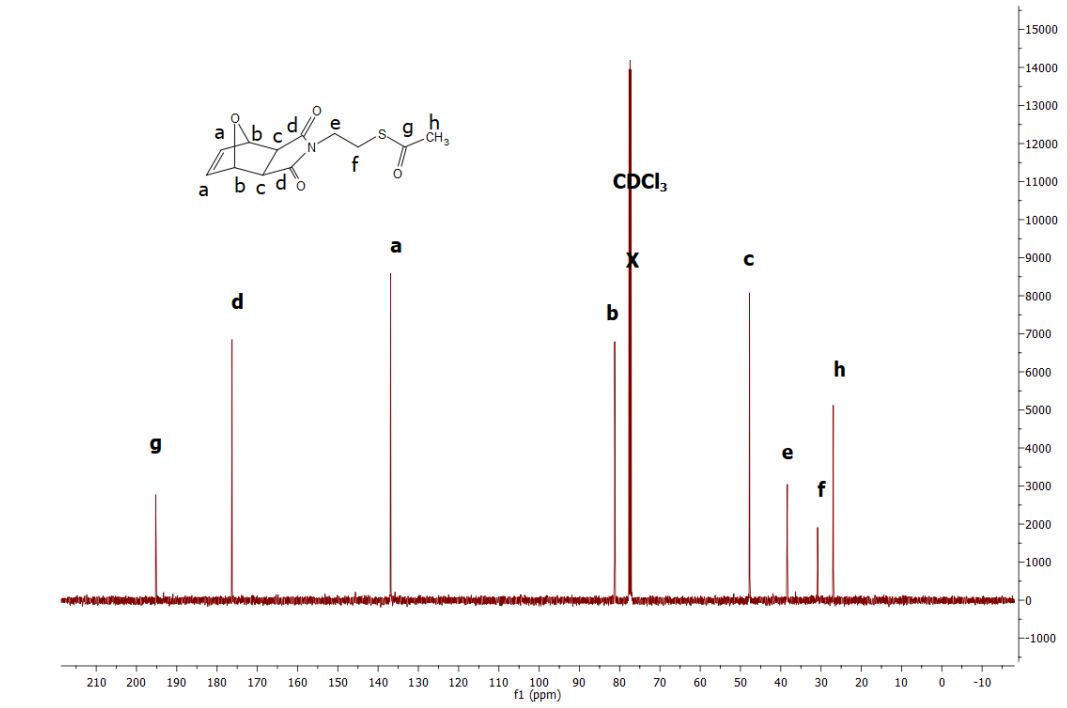


Şekil 6.21 Monomer 4'ün sentez şeması

Şekil 6.22'deki ^{1}H NMR'ına baktığımızda 6.49, 5.24 ve 3.08 ppm'de gelen pikler okzanorbornene aittir. 2.29 ppm'de $-CH_3$ grubuna ait pik görülmektedir. Ayrıca Şekil 6.23'deki ^{13}C NMR'ı incelendiğinde 195.23 ppm'de –C=O grubunun ve 26.94 ppm'de $-CH_3$ grubu görülmüştür.



Şekil 6.22 Monomer 4'ün ^{1}H NMR spektrumu



Şekil 6.23 Monomer 3'ün ^{13}C NMR spektrumu

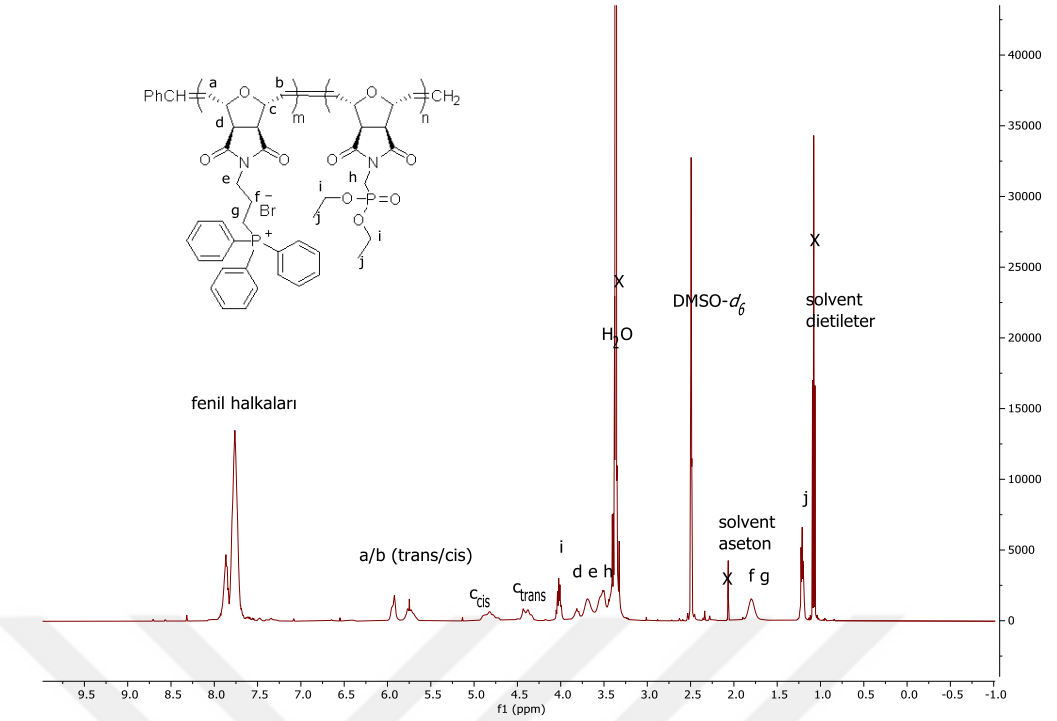
6.2 Kopolimelerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Trifenil fosfonyum veya hekzilpiridinyum tuzu ve fosfonat esteri içeren blok ve rastgele kopolimerler Grubbs 3 katalizörü kullanılarak hedef ortalama moleküler ağırlıkları 3.000 ve 10.000 g/mol olacak şekilde ağırlıkça 8:2 ve 7:3 oranlarında ROMP metodu ile sentezlendiler. Trifenil fosfonyum tuzu-fosfonat esteri kopolimerleri Poly A_1, hekzilpiridinyum tuzu-fosfonat esteri kopolimerleri ise Poly A_2 olarak gösterilmiştir.

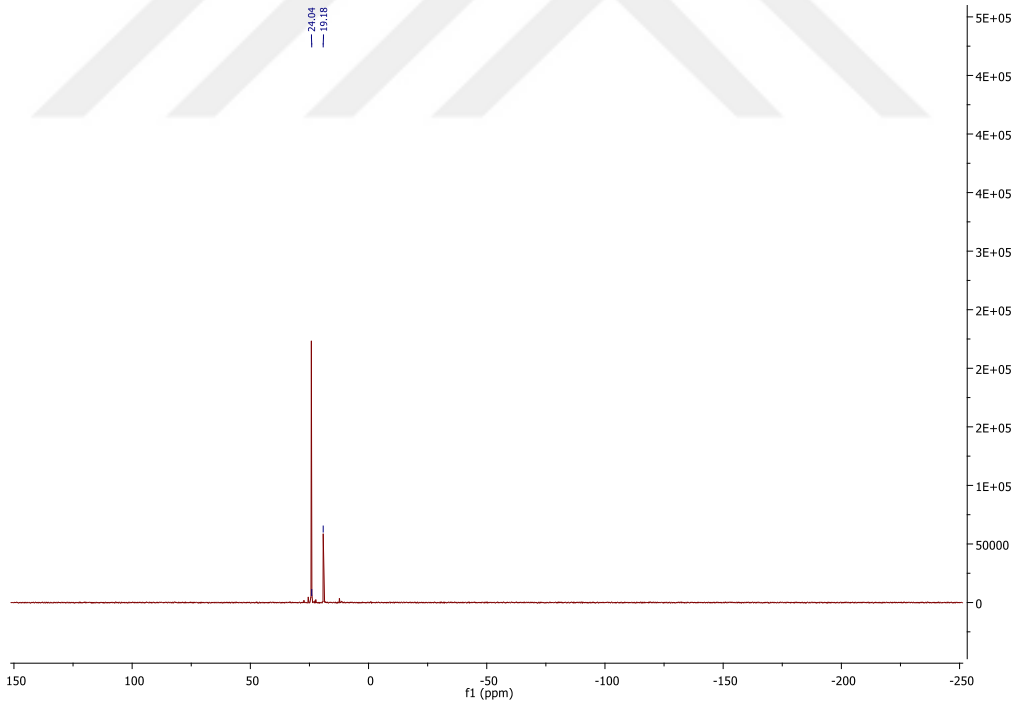
6.2.1 Poly A Serisi Sentezi ve Karakterizasyonu

Poly A_1'in (2a-e) ^1H ve ^{31}P NMR'ları Şekil 6.24-6.33 arasında, Poly A_2'nin (3a-e) ^1H ve ^{31}P NMR'ları ise Şekil 6.34-6.43 arasında gösterilmektedir. ^1H NMR'larında, 6.49 ppm'deki okzanorbornen halkasının spesifik çift bağı (-CH=CH-) polimerizasyon sonucu açıldığı için yok olduğu ve 5.5-6.0 ppm arasında a/b trans/cis'e dönüştüğü görülmüştür. 4.5-5.0 ppm arasındaki (-0-CH-CH-) bağının c_{cis} ve c_{trans} olarak geldiği görülmüştür. Poly A_1 serisine ait spesifik fenil halkaları 7.6-7.9 ppm arasında geldiği analiz edilmiştir. Poly A_2 serisine ait spesifik piridin halkaları 8.0-9.5 ppm arasında görülmüştür. Poly A_1 serisinin ^{31}P NMR spekturumlarında; trifenil fosfonyum grubuna ait monomer 1'den gelen pikin ~24.0 ppm'de, fosfonat esteri grubuna ait monomer 2'den gelen pikin ise ~19 ppm'de geldiği analiz edilmiştir. (Şekil 6.25, 6.27 ve 6.29) Poly A_2 serisinin ^{31}P NMR spekturumlarında ise sadecce monomer 2'den gelen fosfonat esteri grubu bulunduğu için ~19 ppm'de tek pik görülmektedir. (Şekil 6.33 ve 6.36)

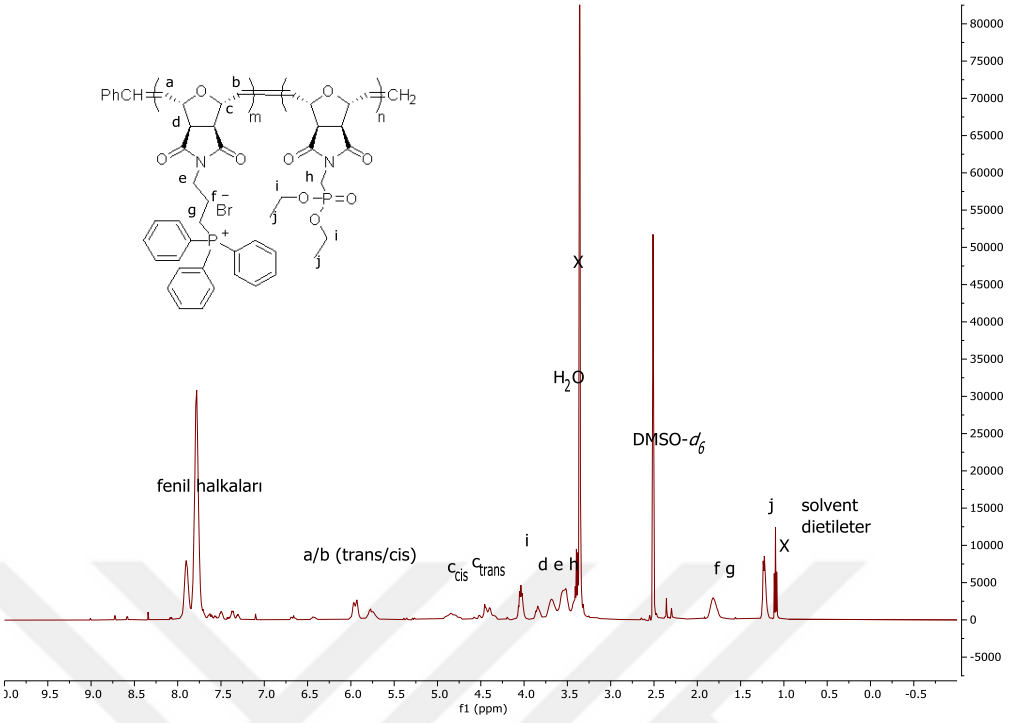
6.2.1.1 Poly A_1 Serisi Karakterizasyonu



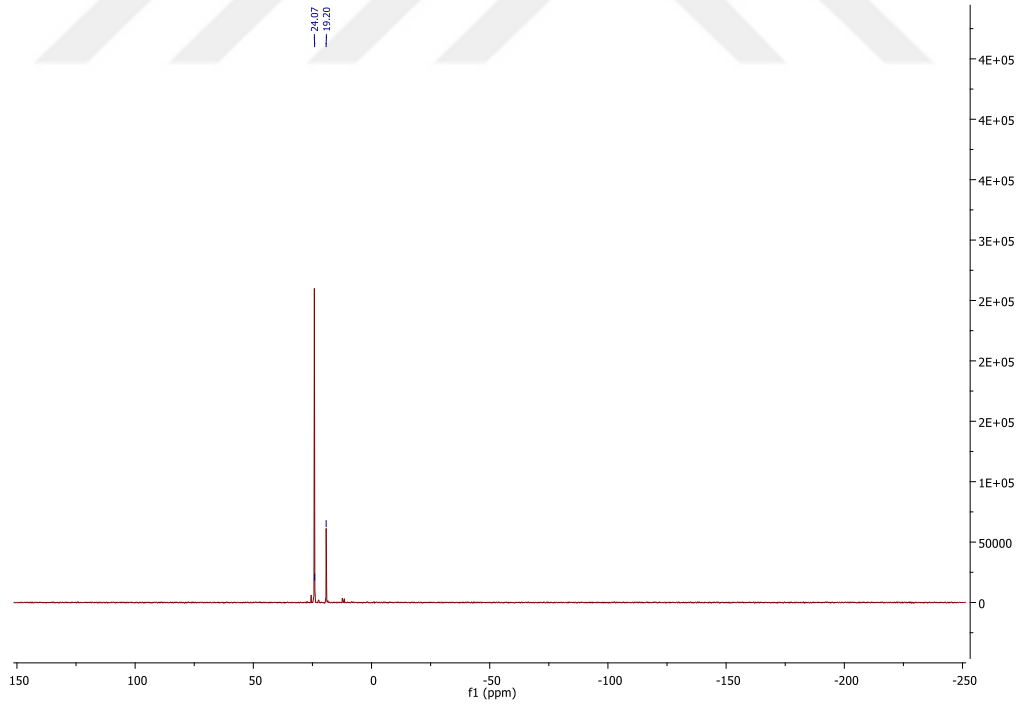
Şekil 6.24 Blok kopolimer 2a ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu



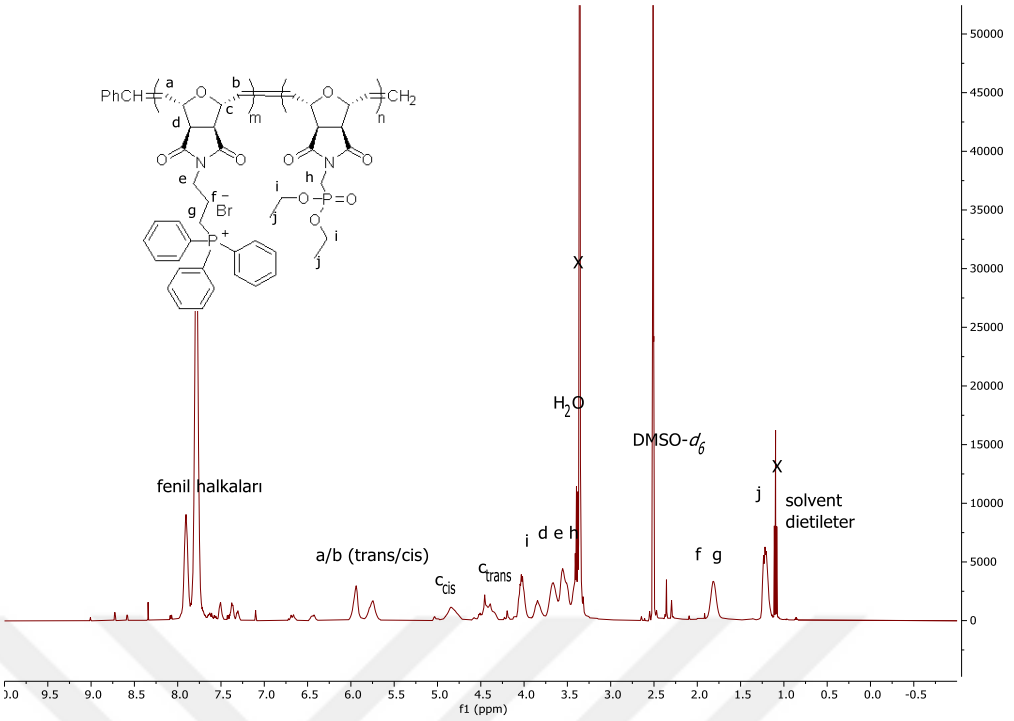
Şekil 6.25 Blok kopolimer 2a ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu



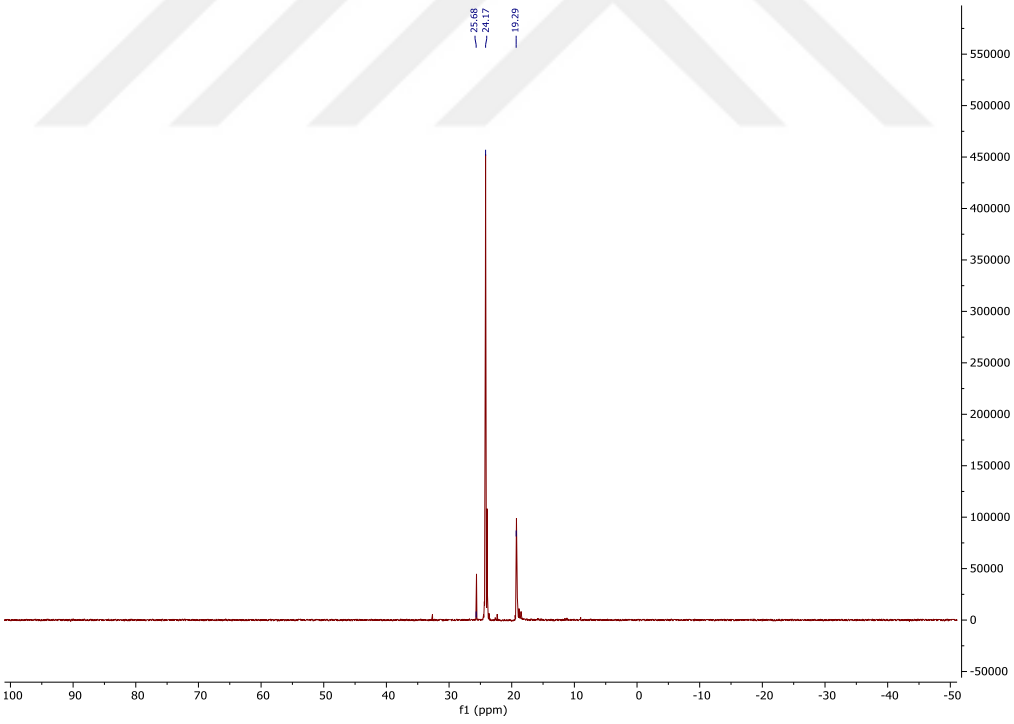
Şekil 6.26 Blok kopolimer 2b (Mn,th = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu



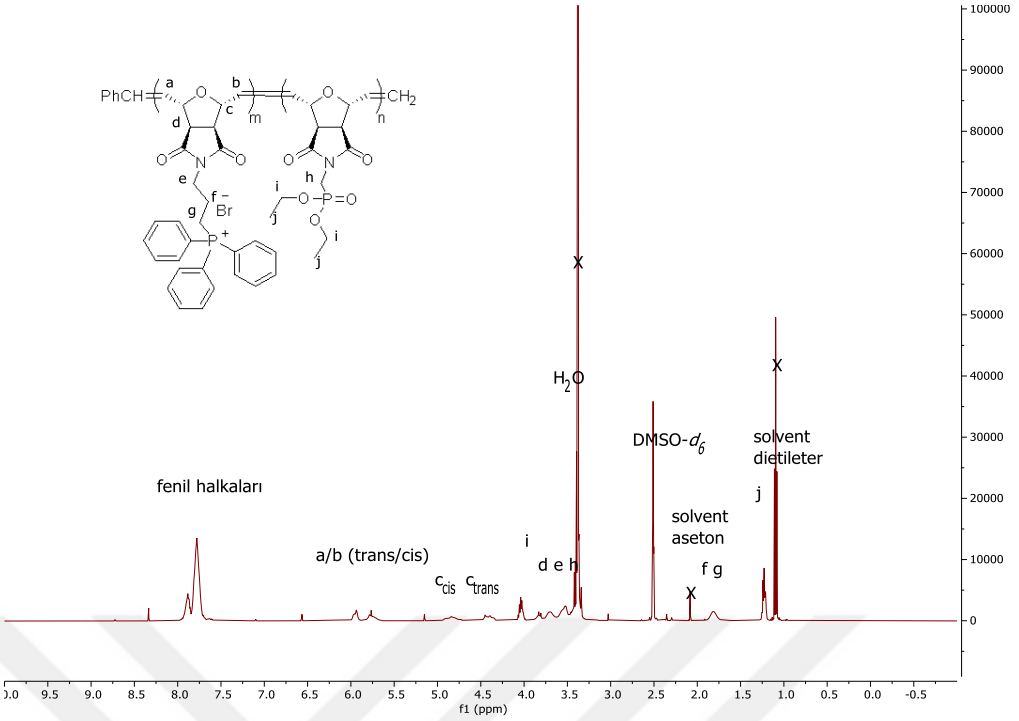
Şekil 6.27 Blok kopolimer 2b ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu



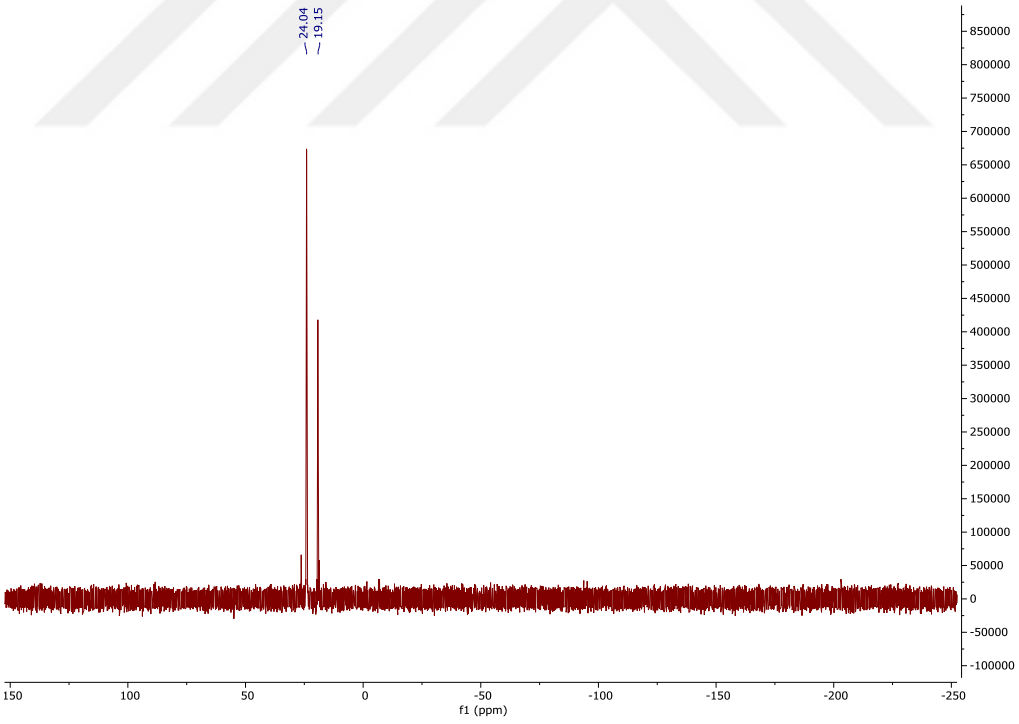
Şekil 6.28 Rastgele kopolimer 2c ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu



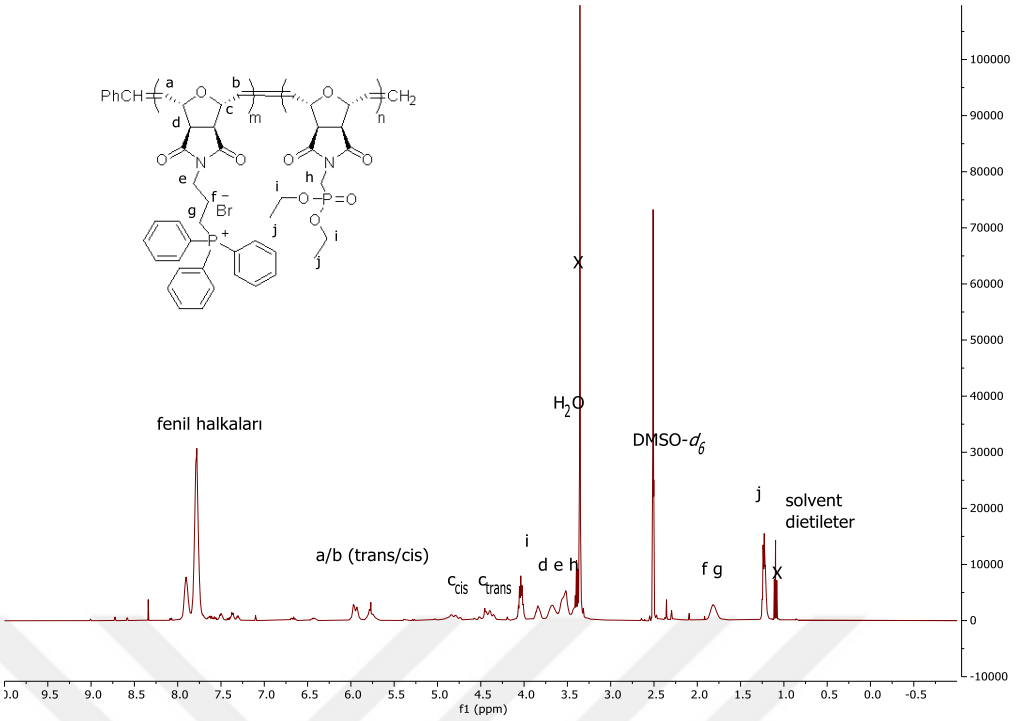
Şekil 6.29 Rastgele kopolimer 2c ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu



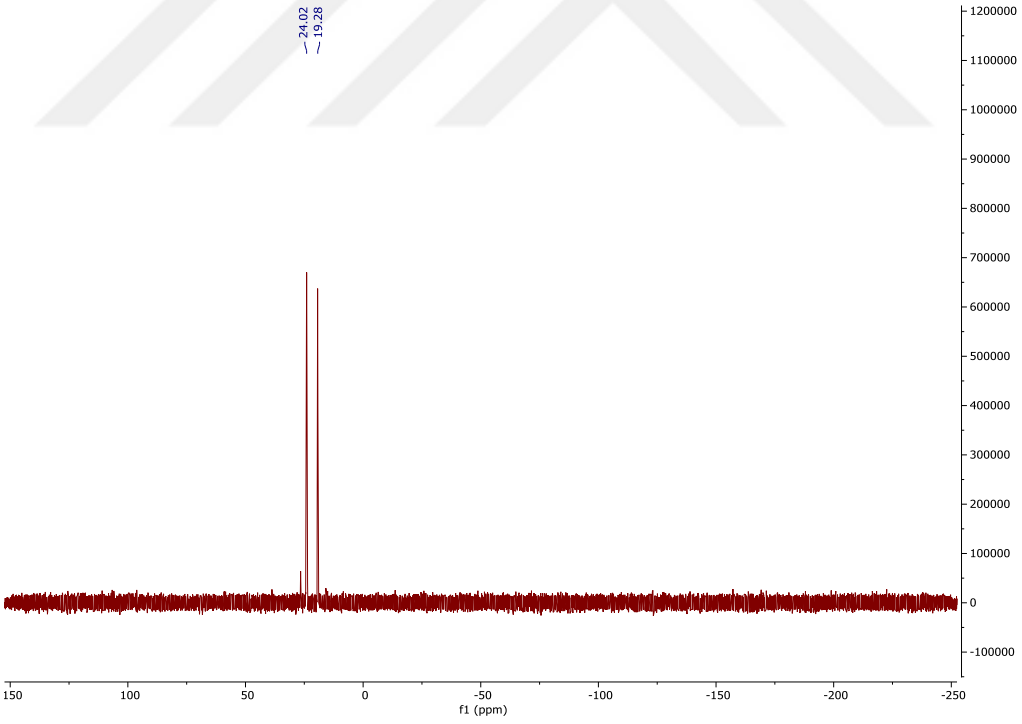
Şekil 6.30 Blok kopolimer 2d ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu



Şekil 6.31 Blok kopolimer 2d ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu

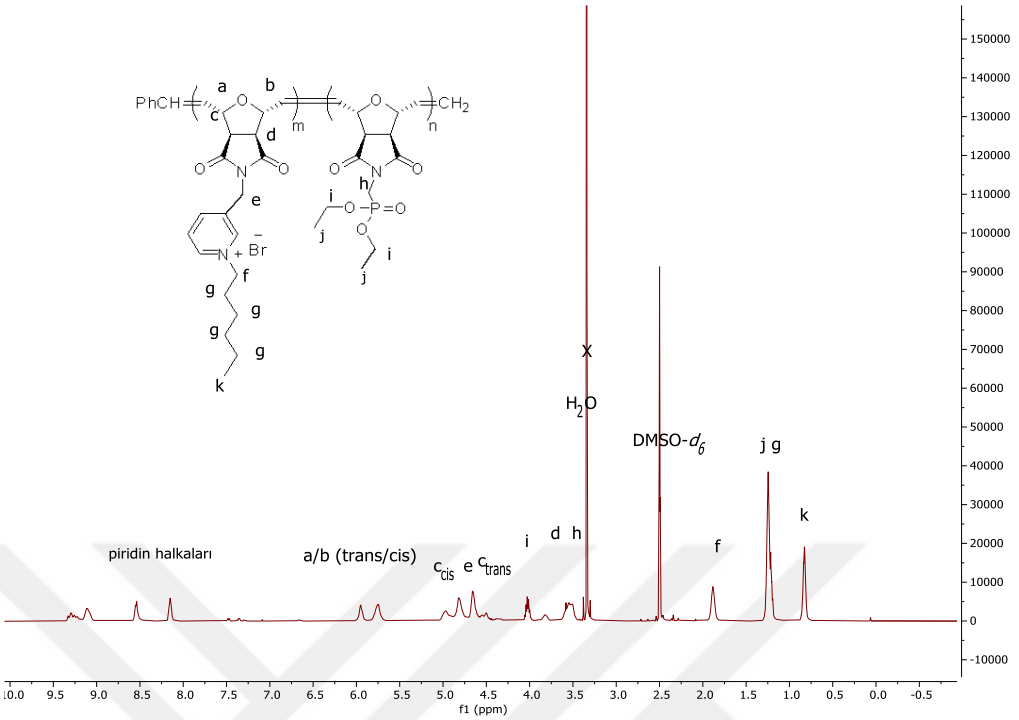


Şekil 6.32 Blok kopolimer 2e ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu

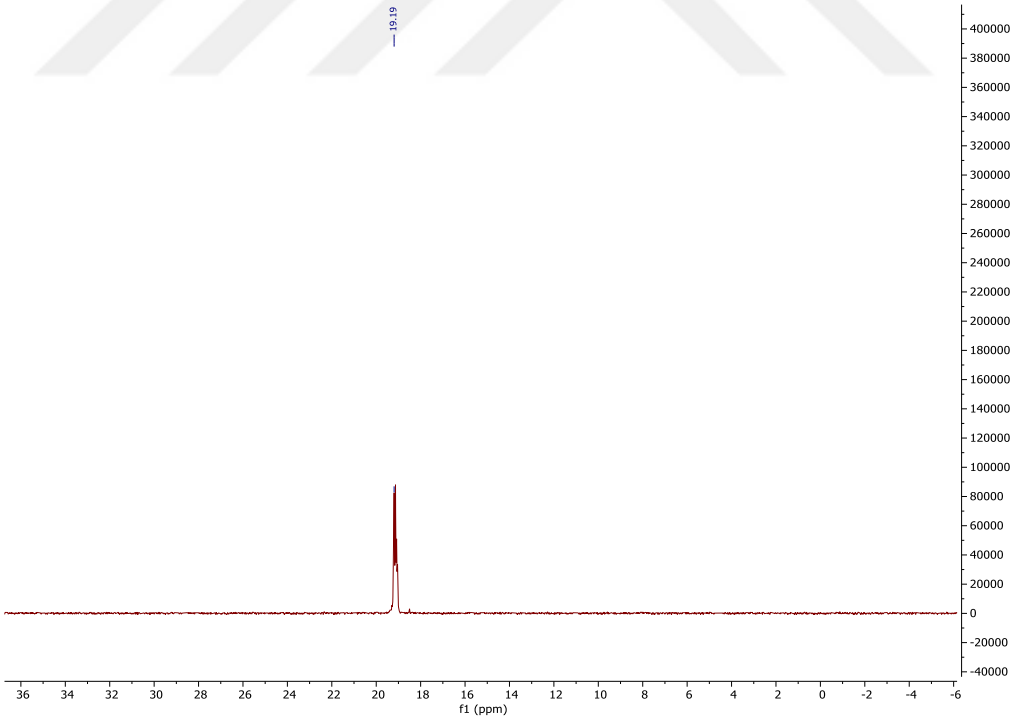


Şekil 6.33 Blok kopolimer 2e ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu

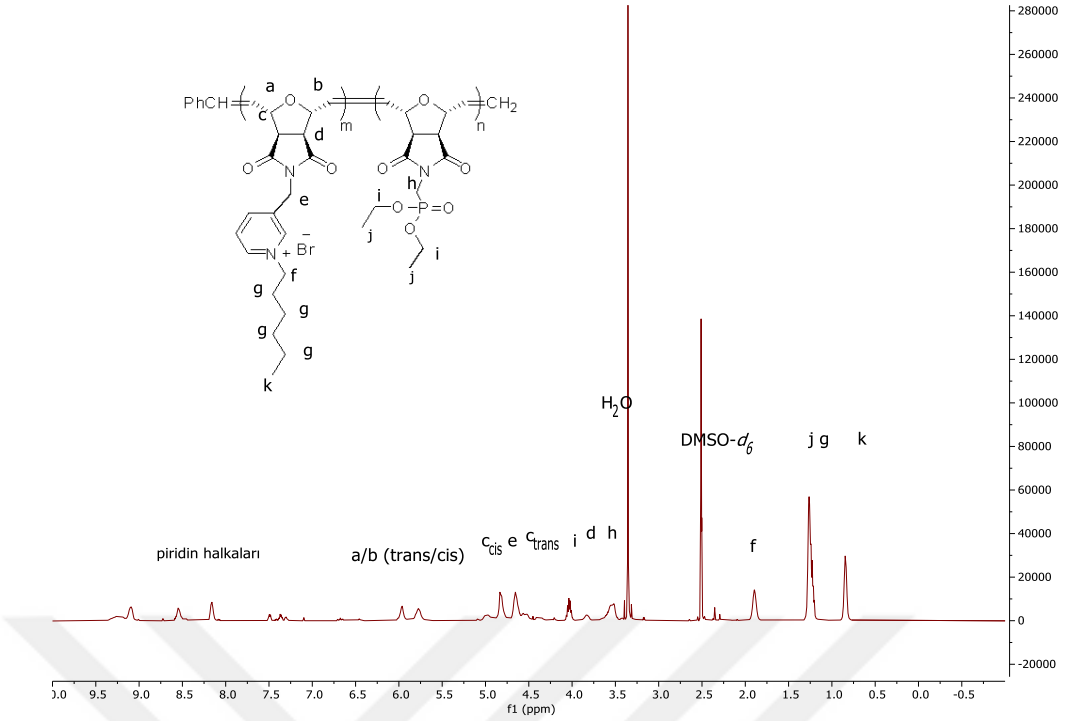
6.2.1.2 Poly A_2 Serisi Karakterizasyonu



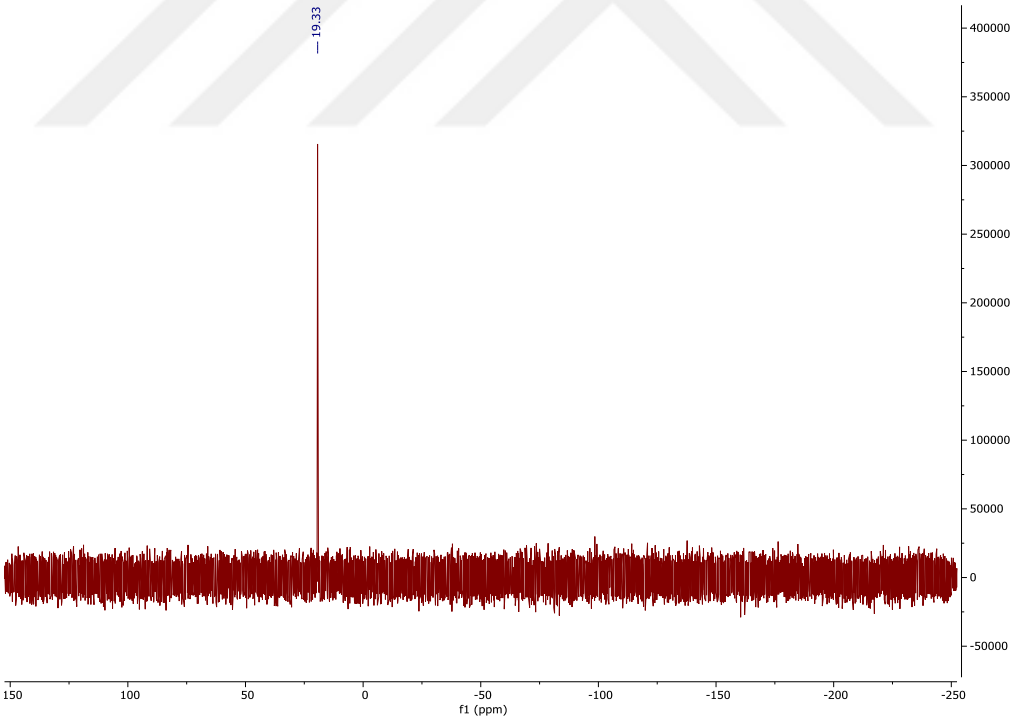
Şekil 6.34 Blok kopolimer 3a ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu



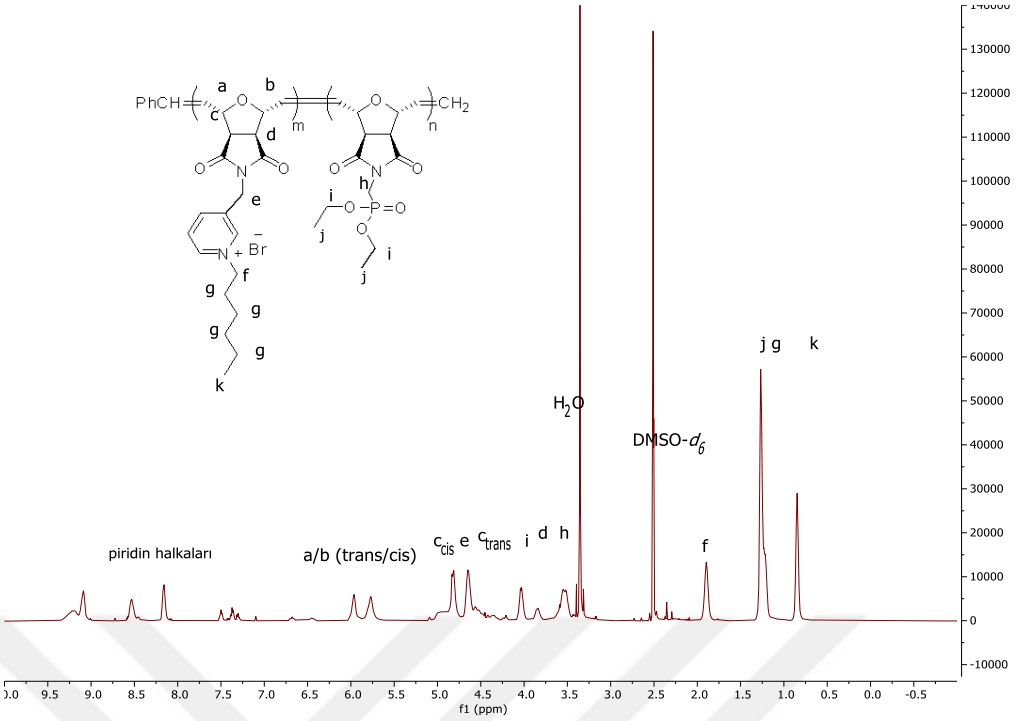
Şekil 6.35 Blok kopolimer 3a ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu



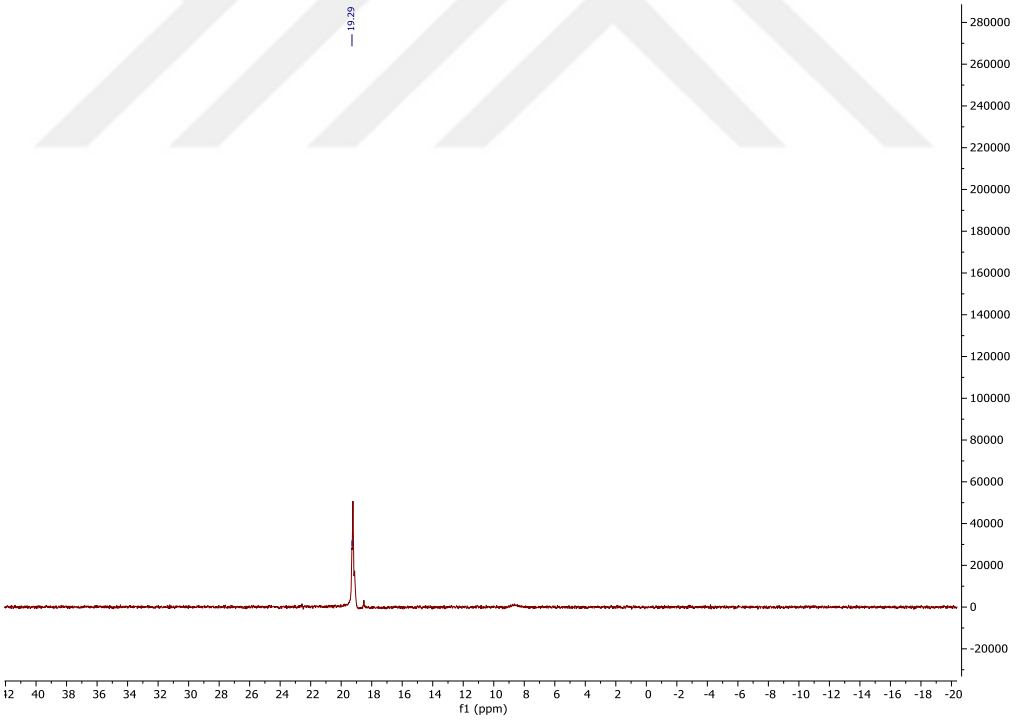
Şekil 6.36 Blok kopolimer 3b ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu



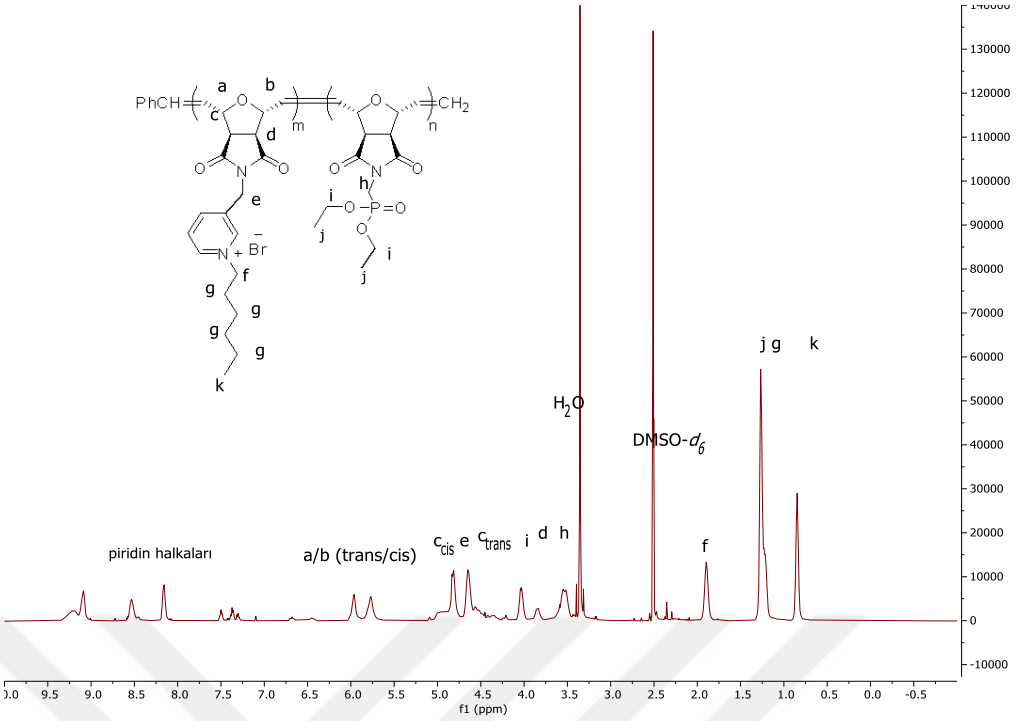
Şekil 6.37 Blok kopolimer 3b ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu



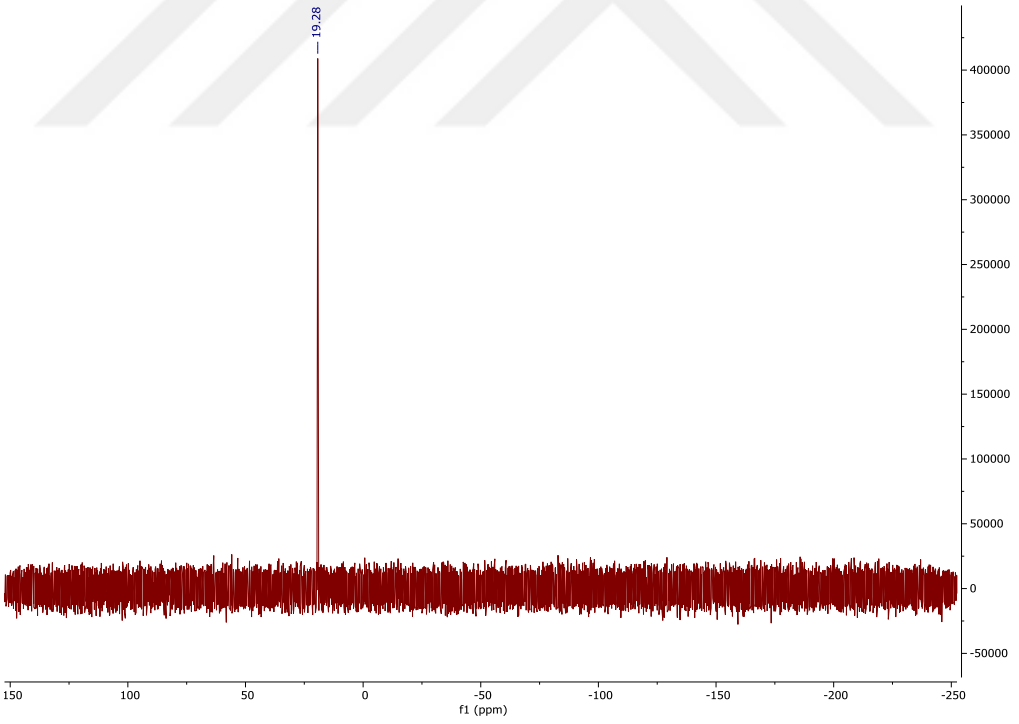
Şekil 6.38 Rastgele kopolimer 3c ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu



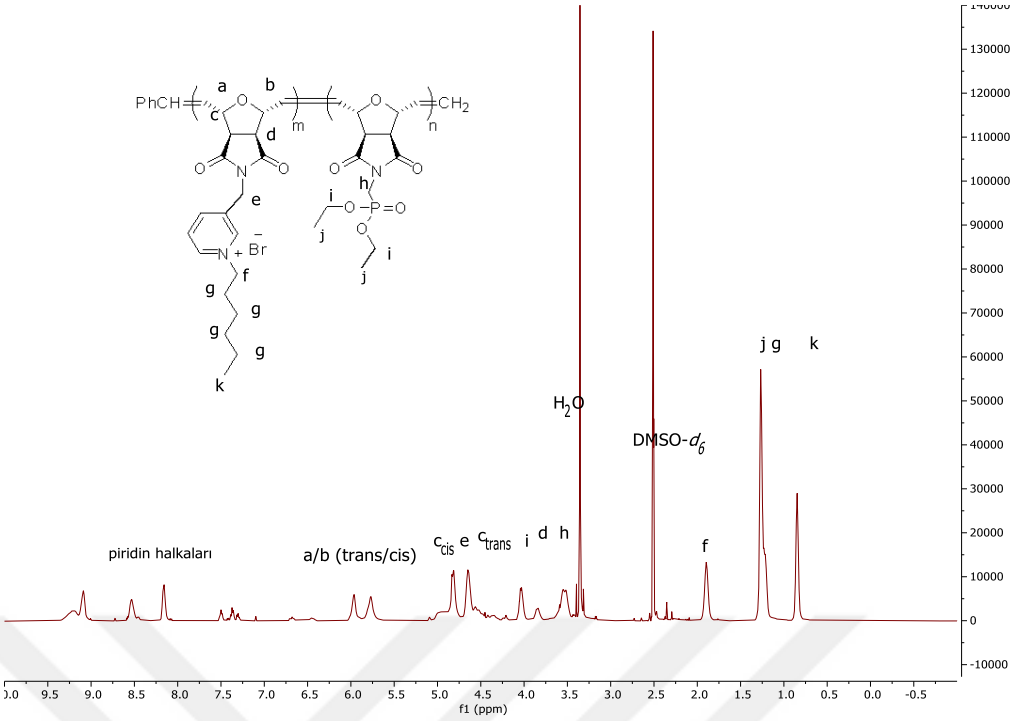
Şekil 6.39 Rastgele kopolimer 3c ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu



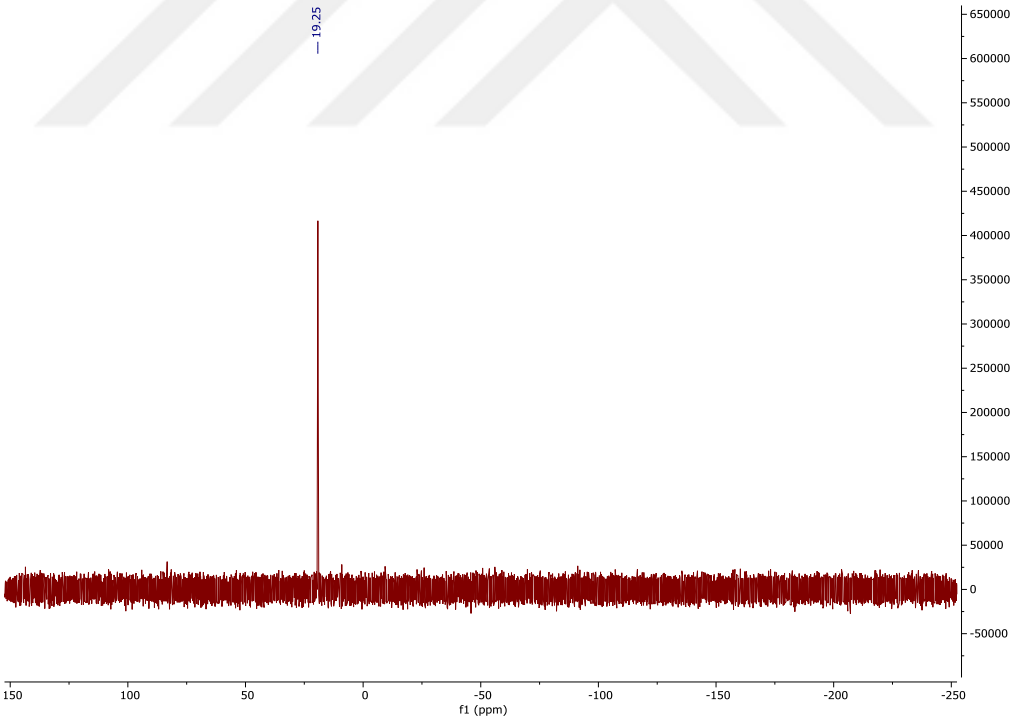
Şekil 6.40 Blok kopolimer 3d ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu



Şekil 6.41 Blok kopolimer 3d ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu



Şekil 6.42 Blok kopolimer 3e ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu



Şekil 6.43 Blok kopolimer 3e ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu

Tablo 6.1'de Poly A_1(2a-e) ve A_2 (3a-e) serisi kopolimerlerinin polimerizasyon dereceleri (teorik ve NMR hesapsal), ortalama molekül ağırlıkları (teorik, NMR hesapsal ve SEC hesapsal) ve PDI'ları verilmiştir. Hesapsal olarak polimerizasyon dereceleri ^{1}H NMR'ı ile analiz edilmiştir. Örnek hesaplama olarak 2b kopolimerinin m ve n değerlerinin bulunması anlatılacaktır. Monomer 1'den gelen trifenil fosfonyum tuzunun fenil halkaları grubu 7.6-7.9 ppm arasında gelmektedir ve 15 tane proton içermektedir. Grubbs 3 katalizöründen gelen stirenik son grup ise 7.2-7.5 ppm arasında görülmektedir ve 5 tane proton içermektedir. Bu piklerin integrasyonlarının birbirine oranı m değeri olan 5.08 değerini vermektedir. Monomer 2'ye ait olan fosfonat esteri grubundaki (-P-$(OCH_2)_2$-) bağları 4.0 ppm'de görülmektedir ve 4 proton içermektedir. Bu grubun integrasyonunun stirenik son grubun integrasyonuna oranı bize n değeri olan 1,97'yi vermektedir. Aynı işlem diğer kopolimer serilerinin polimerizasyon derecelerini bulmak için uygulanmıştır. Polimerizasyon derecesi bize polimerde tekrarlanan grup sayısını vermektedir.

Ortalama molekül ağırlık hesapları, bulunan m ve n değerleri kullanılarak yapılmıştır. Örneğin, 2b kopolimeri; teorik ortalama moleküler ağırlığı 3.000 g/mol'dür. NMR ile hesaplanmış ortalama molekül ağırlığı ise (5,08 × monomer 1'in molekül ağırlığı (548 g/mol) + (1,97 ×monomer 2'nin molekül ağırlığı (315 g/mol) = 3.404 g/mol) şeklindedir.

Tablo 6.1 Poly A_1 ve A_2 serilerinin karakterizasyonları

Kopolimer Kodu	m[a]	n[b]	m/n[c]	m/n[d]	Mn[e] (g/mol)	Mn[f] (g/mol)	Mn[g] (g/ mol)	Đ [h]
(2a)	12,31	9,3	2,29	1,32	10.000	9.675		
(2b)	5,08	1,97	2,29	2,57	3.000	3.404	2.106	1,19
(2c)	4,82	2,26	2,29	2,13	3.000	3.353		
(2d)	21,45	10,10	1,34	2,15	10.000	14.936		
(2e)	4,54	2,93	1,34	1,54	3.000	3.410		
(3a)	32,32	9,0	2,99	3,59	10.000	16.441	6.166	1,58

Tablo 6.1 Poly A_1 ve A_2 serilerinin karakterizasyonları (devamı)

(3b)	7,95	2,12	2,99	3,75	3.000	4.014		
(3c)	7,92	2,37	2,99	3,34	3.000	4.080		
(3d)	32,12	13,63	1,74	2,35	10.000	17.815		
(3e)	6,70	3,02	1,74	2,21	3.000	3.772		

[a]H NMR'ı ile hesaplanmış monomer 1 veya monomer 3'ün polimerizasyon derecesi

[b]H NMR'ı ile hesaplanmış monomer 2'nin polimerizasyon derecesi

[c]Kopolimerdeki monomerlerin teorik mol oranları

[d]Monomerlerin ^{1}H NMR'ı ile hesaplanmış mol oranları

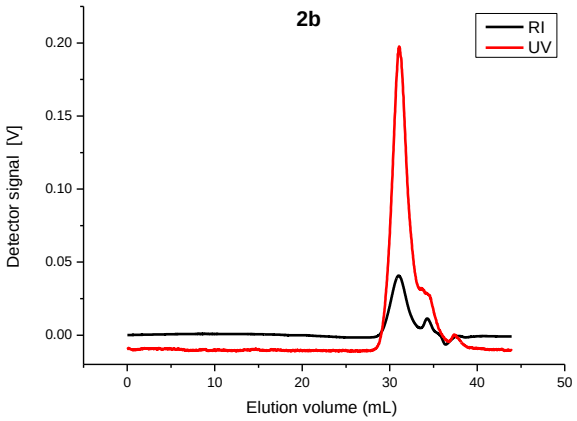
[e]Kopolimerlerin teorik sayıca ortalama molekül ağırlıkları

[f]Kopolimerlerin ^{1}H NMR'ı ile hesaplanmış ortalama molekül ağırlıkları

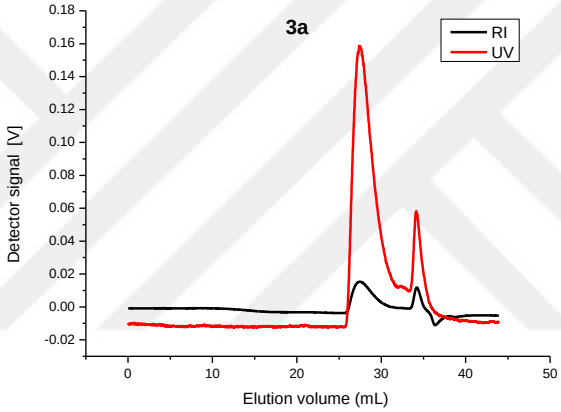
[g]Kopolimerlerin Boyut Dışlama Kromatografisi (SEC) ile ortalama molekül ağırlıkları

[h]SEC ile kopolimerlerin polidispersite indeksleri (PDI)((DMF, 3 g/L LiBr)

SEC ile ortalama molekül ağırlığı ve PDI analizleri antibakteriyel etkinliği yüksek olan 2b ve 3a kopolimerleri için yapılmıştır. 2b kopolimerinin ortalama molekül ağırlığı 2 106 g/mol ve PDI'ı 1,19 bulunurken; 3b kopolimerinin ortalama molekül ağırlığı 6 166 g/mol ve PDI'ı 1,58 bulunmuştur. Her iki kopolimerde de SEC sonucu molekül ağırlıkları, teorik molekül ağırlıklarından daha düşük bulunmuştur. SEC kalibrasyonu için kullanılan doğrusal, iyonik olmayan pullulan standartları, katyonik bazlı polimerlere kıyasla farklı hidrodinamik hacimlere neden olabileceği ve bu durumun da güçlü bir sapmaya yol açabileceği düşünülmektedir [118]. (2b teorik ortalama molekül ağırlığı: 3.000 g/mol; 3a teorik ortalama molekül ağırlığı 10.000 g/mol). Şekil 6.44 ve 6.45'te 2b ve 3a kopolimerlerinin GPC grafikleri 2 farklı dedektöre göre verilmiştir. (RI ve UV)



Şekil 6.44 Kopolimer 2b'nin GPC grafiği



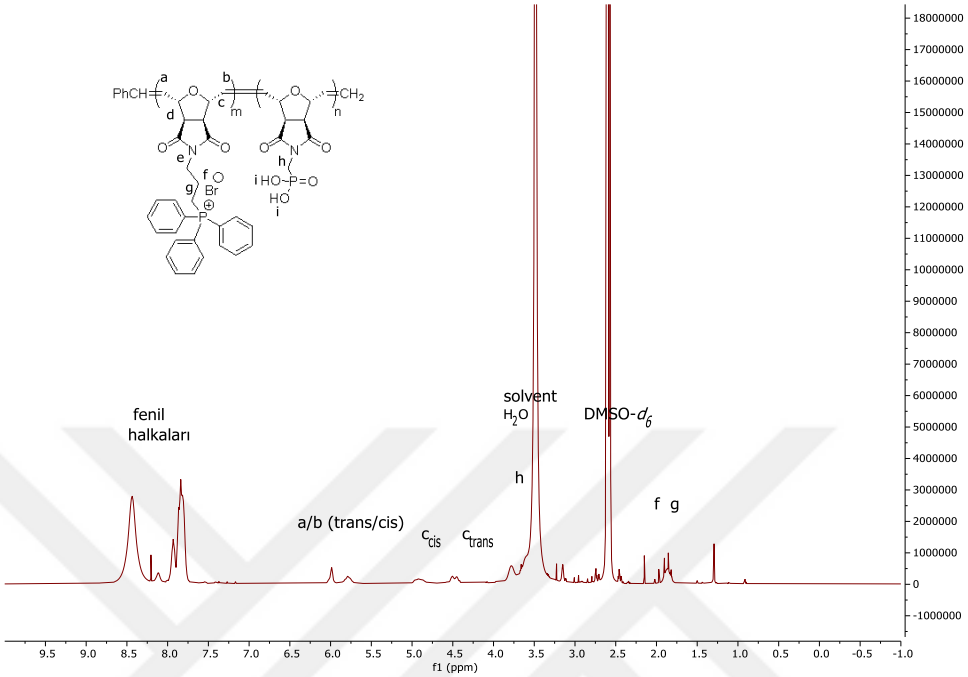
Şekil 6.45 Kopolimer 3a'nın GPC grafiği

6.2.1.3 Poly A Serisi Fosfonik Aside Dönüştürülmesi

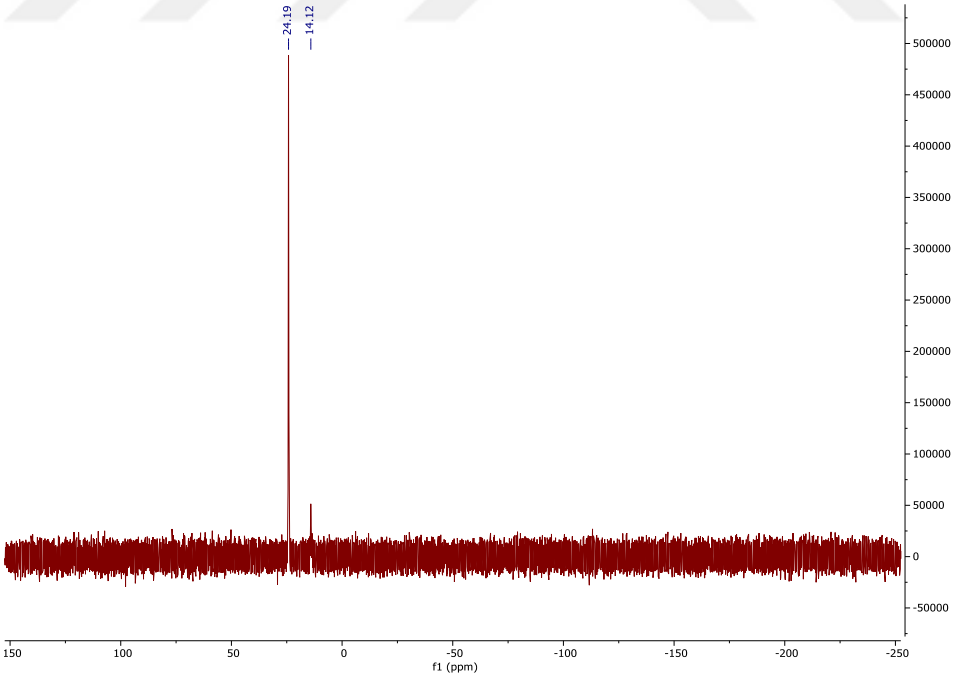
Kopolimer omurgasında fosfonik asit işlevselliğinin varlığı, polimerin altın yüzeyine bağlanma etkinliğini artırabileceği ve ayrıca demir oksit nanopartiküllerinin kopolimer omurgasına güçlü bir şekilde bağlanmasını sağlayacağı için fosfonat ester grupları fosfonik asit grubuna dönüştürülmüştür [119]. (Fosfonik aside dönüştürülen kopolimerler * işareti ile gösterilmektedir. 2a*–e*, 3a*–e*).

Şekil 6.46-6.65 arasında kopolimerlerin ^{1}H ve ^{31}P NMR'ları verilmiştir. ^{1}H NMR sonuçlarına baktığımızda; fosfonat ester grubunda bulunan 1.2 ppm'de görülen metil gruplarına (O-CH_2-CH_3-) ait pikin yokolması; fosfonat esteri gruplarının

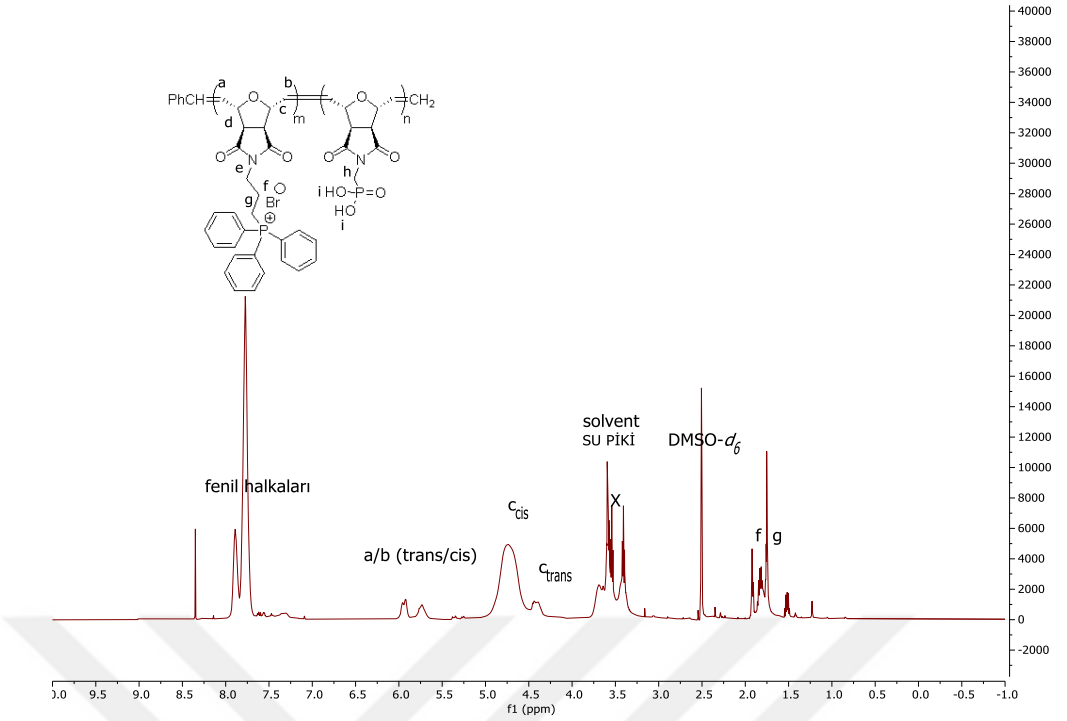
fosfonik asit gruplarına dönüştüğünü kanıtlamaktadır. Ayrıca ^{31}P NMR'larında fosfonat esterine ait ~19.0 ppm'deki pikin kaybolduğu ve fosfonik asite ait ~14.0 ppm'de yeni bir pikin oluştuğu görülmüştür.



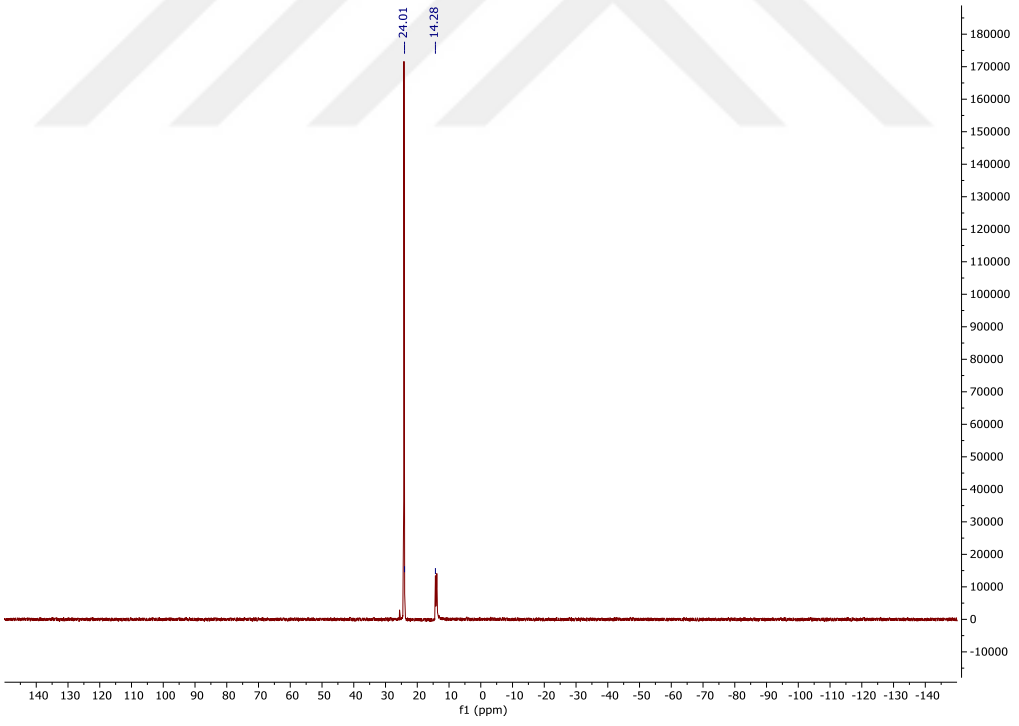
Şekil 6.46 Blok kopolimer 2a* asit formu ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu



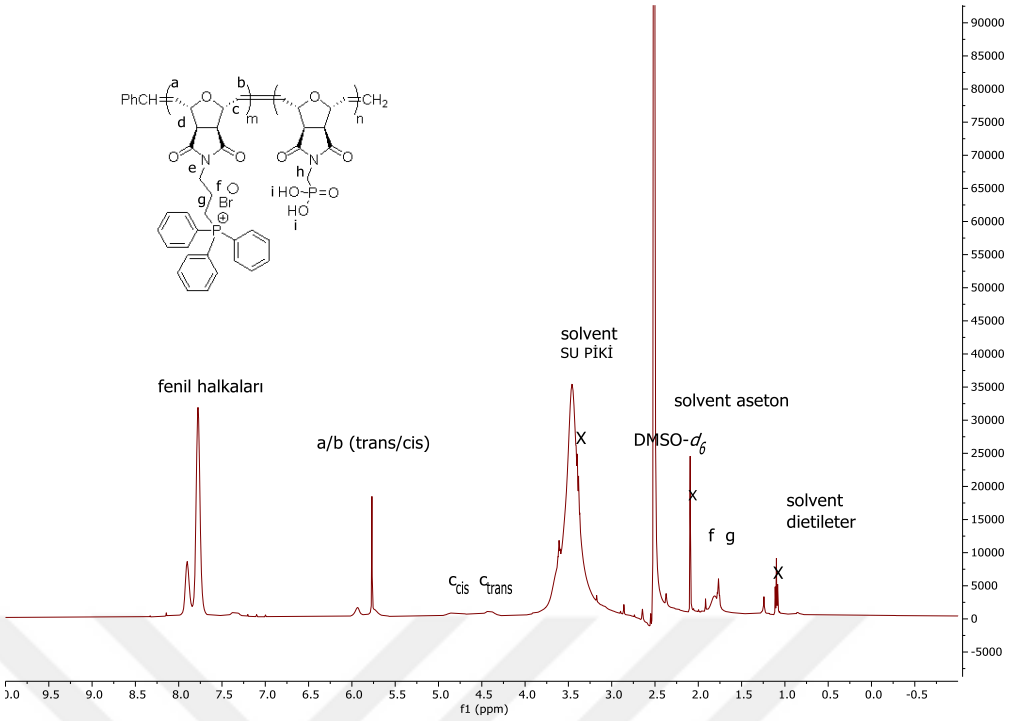
Şekil 6.47 Blok kopolimer 2a* asit formu ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu



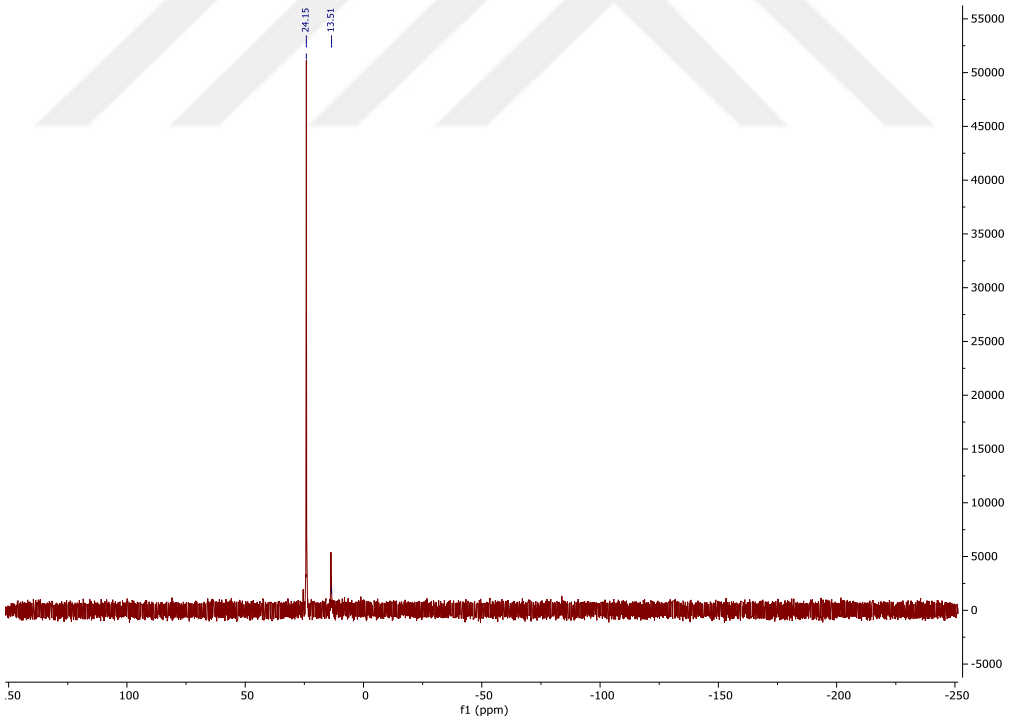
Şekil 6.48 Blok kopolimer 2b* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu



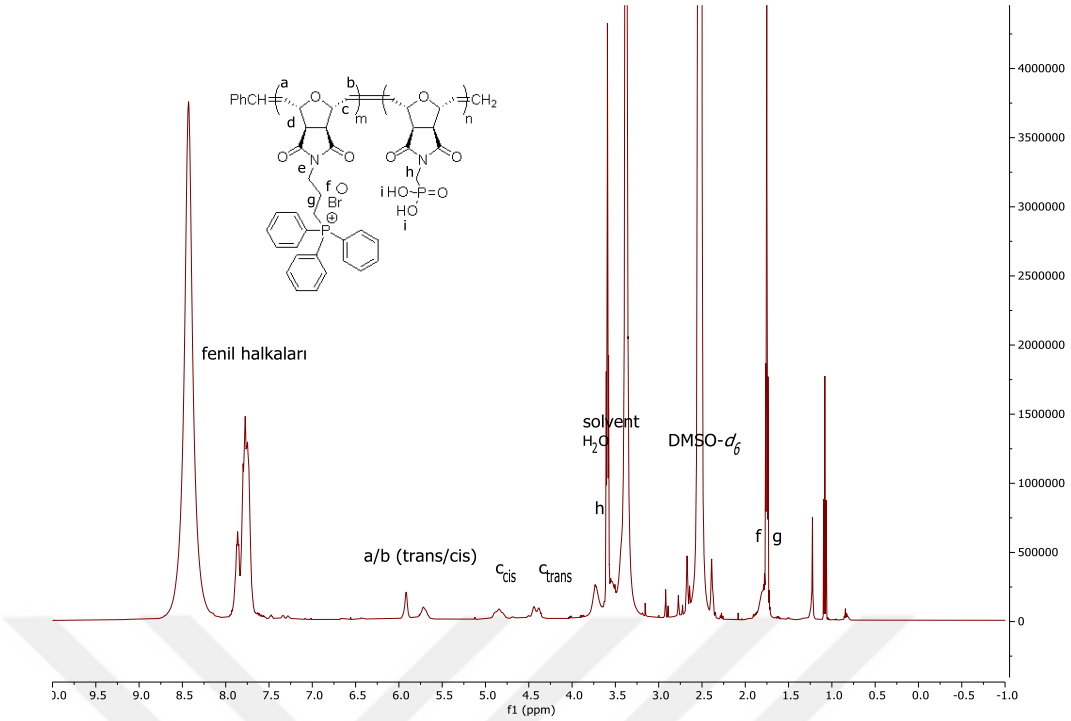
Şekil 6.49 Blok kopolimer 2b* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu



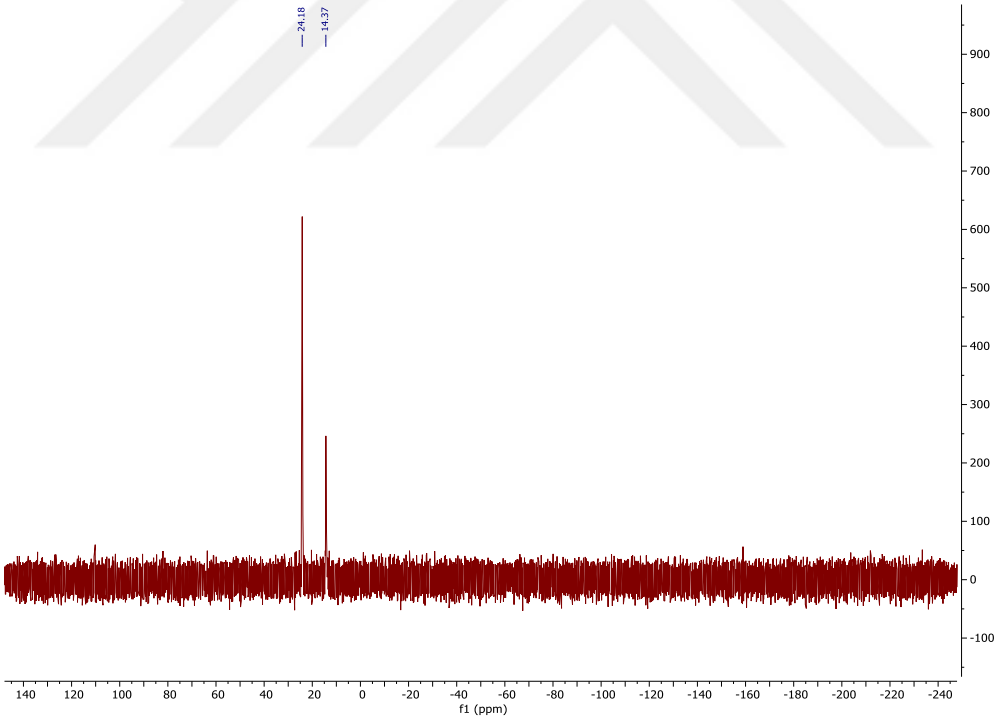
Şekil 6.50 Rastgele kopolimer 2c* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu



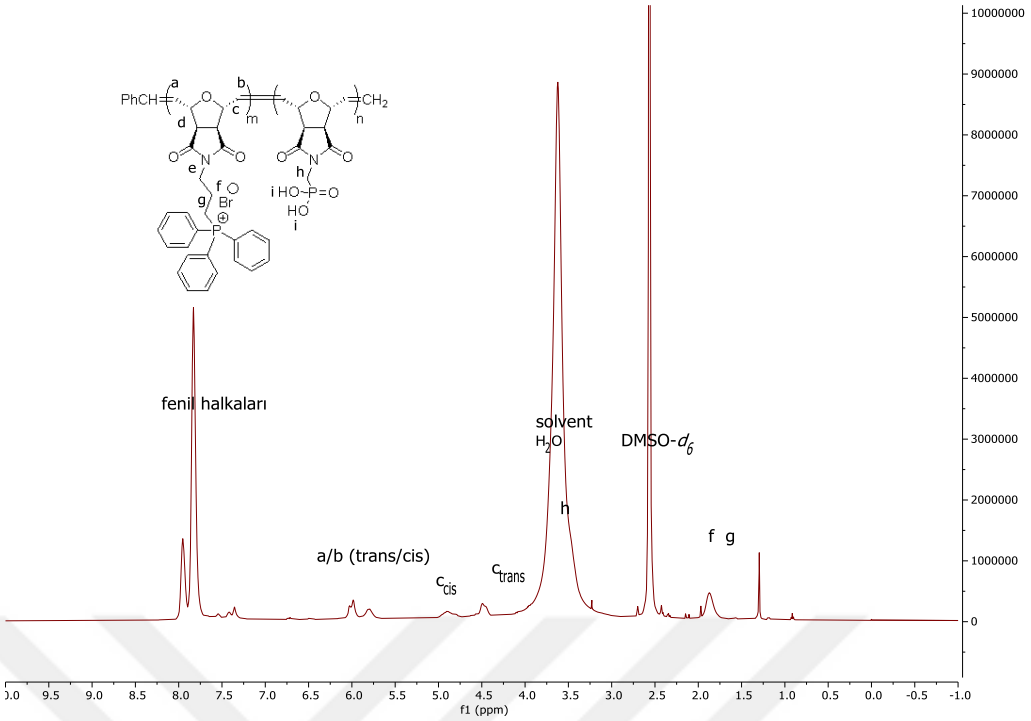
Şekil 6.51 Rastgele kopolimer 2c* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu



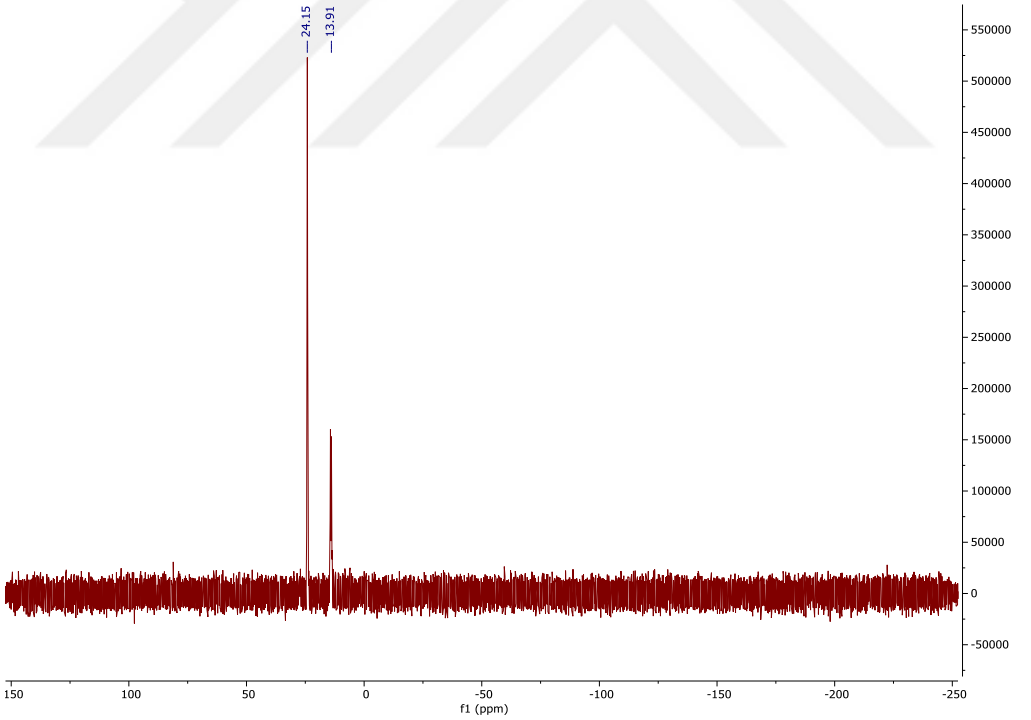
Şekil 6.52 Blok kopolimer 2d* asit formu ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu



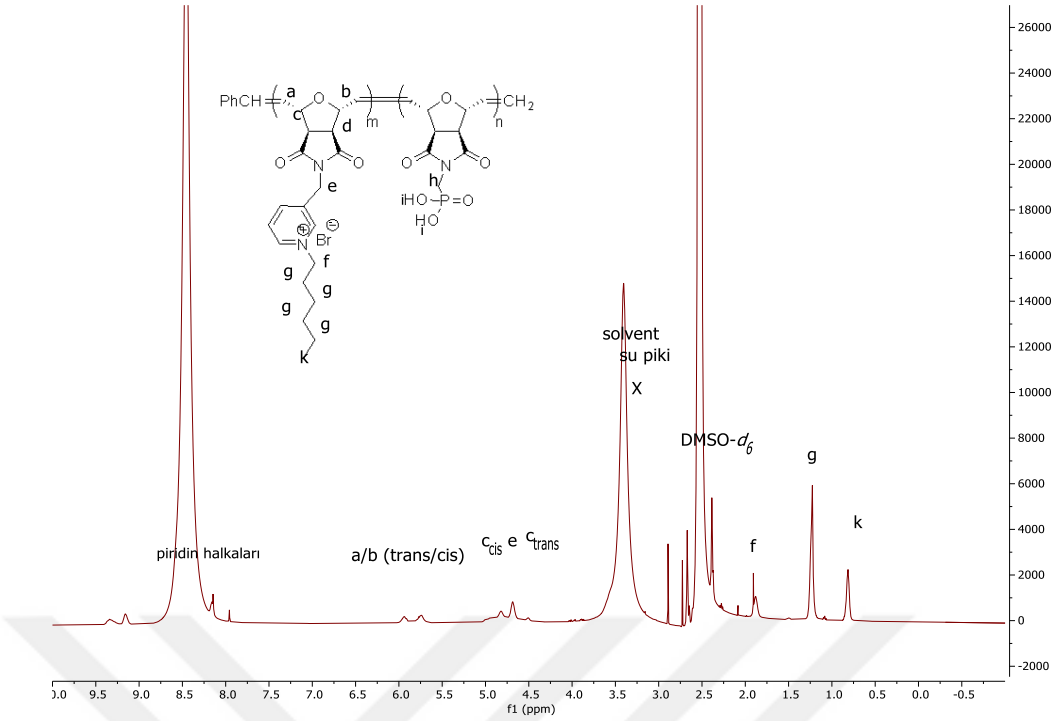
Şekil 6.53 Blok kopolimer 2d* asit formu ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu



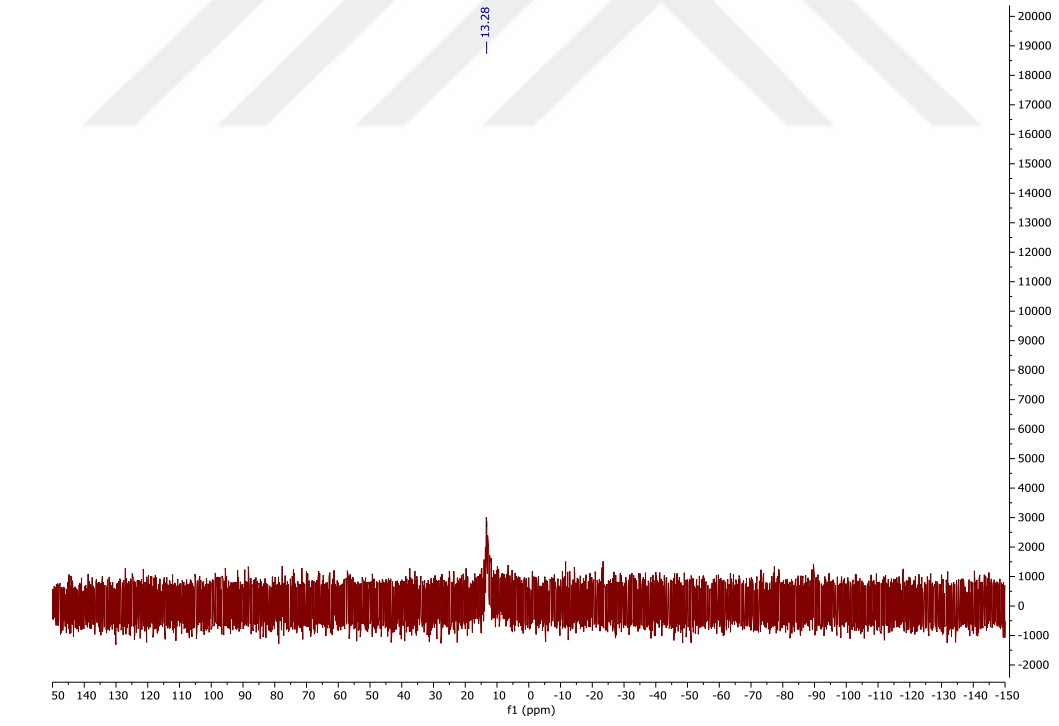
Şekil 6.54 Blok kopolimer 2e* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu



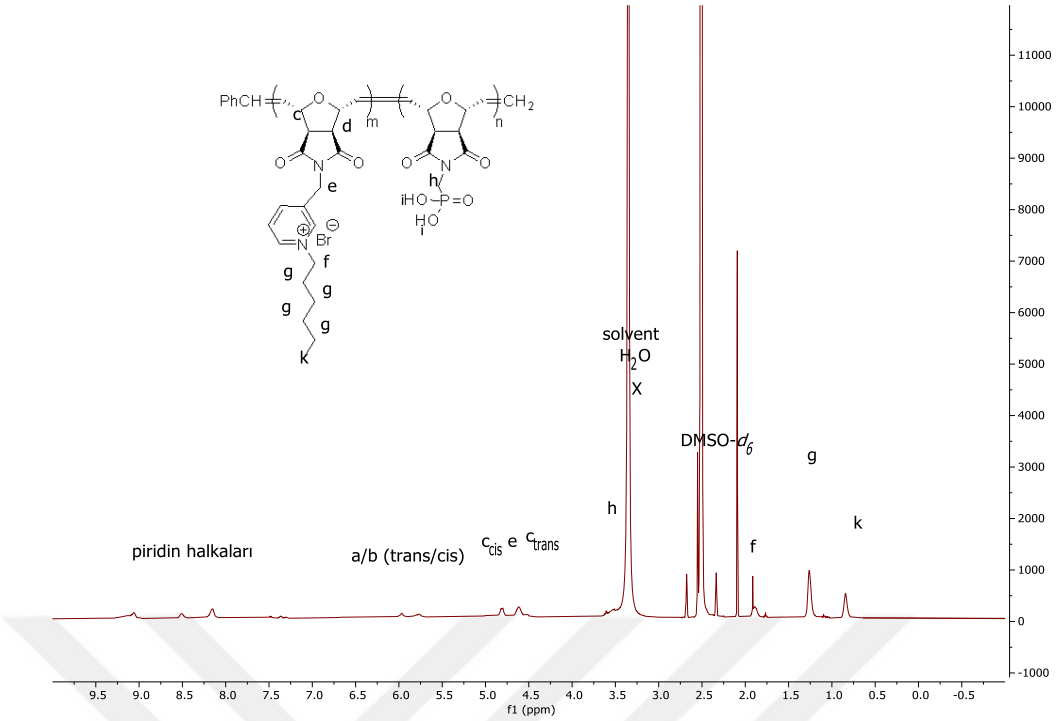
Şekil 6.55 Blok kopolimer 2e* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu



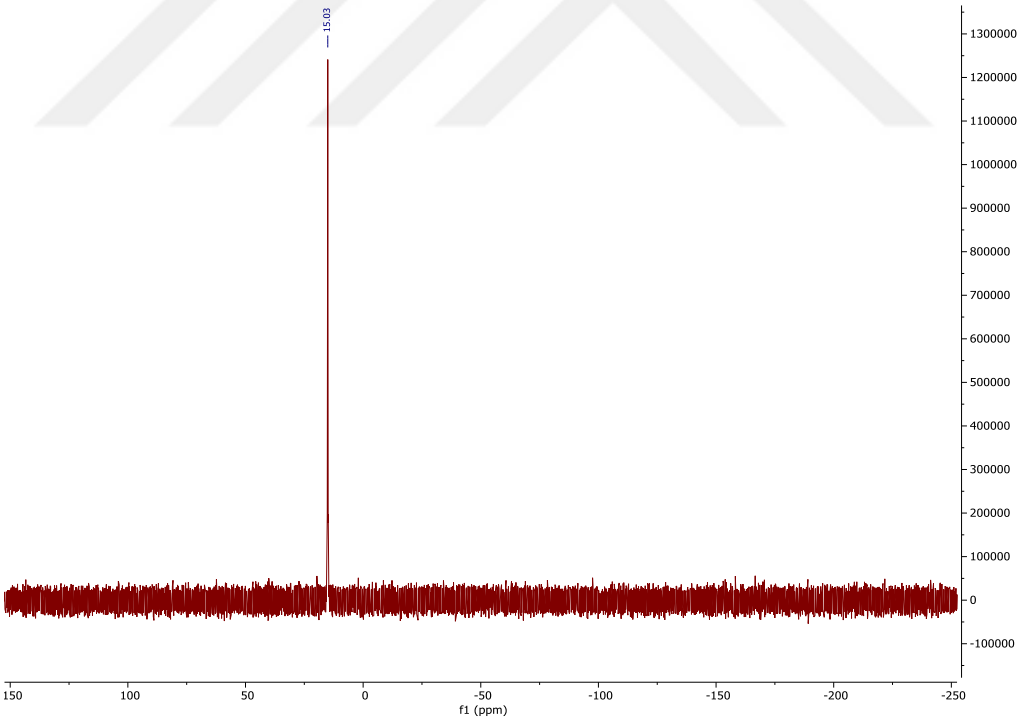
Şekil 6.56 Blok kopolimer 3a* asit formu ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu



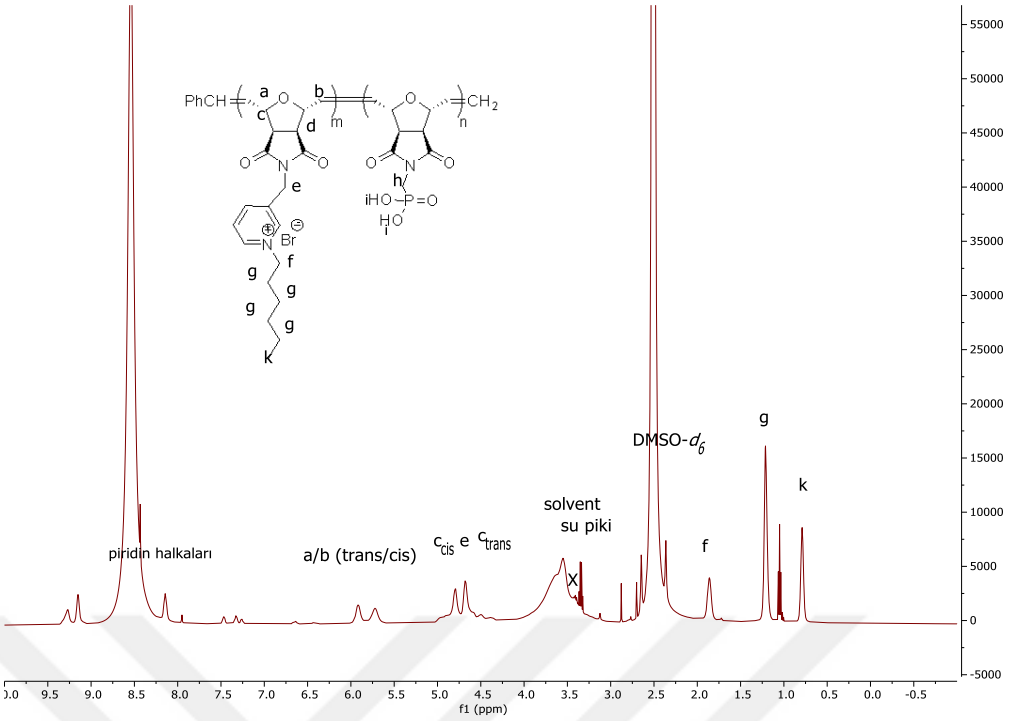
Şekil 6.57 Blok kopolimer 3a* asit formu ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu



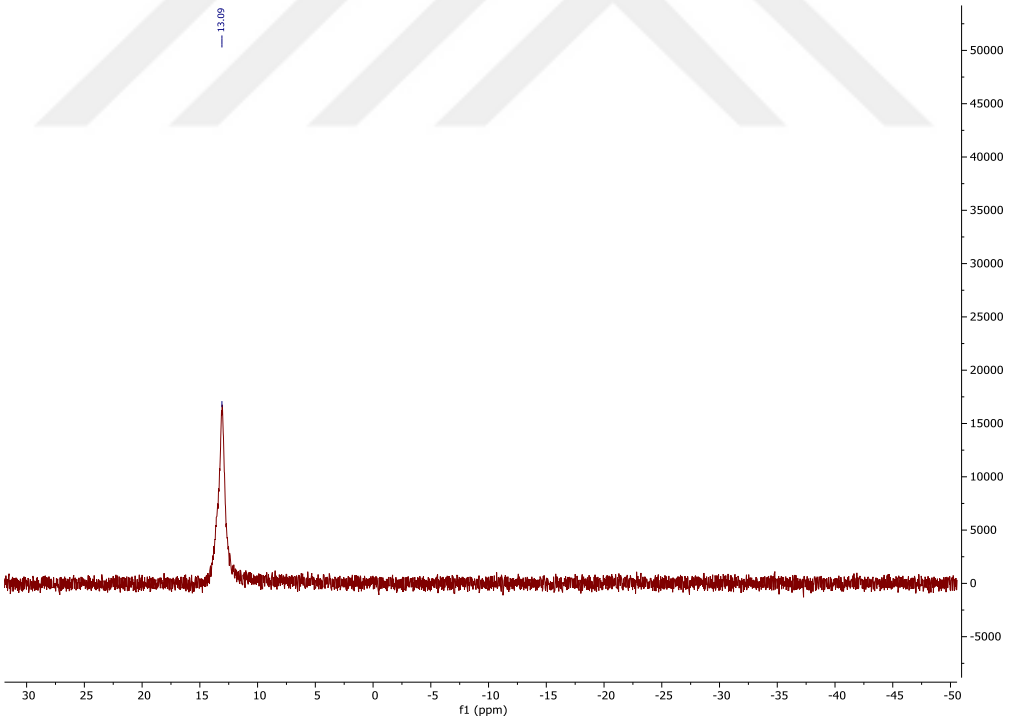
Şekil 6.58 Blok kopolimer 3b* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu



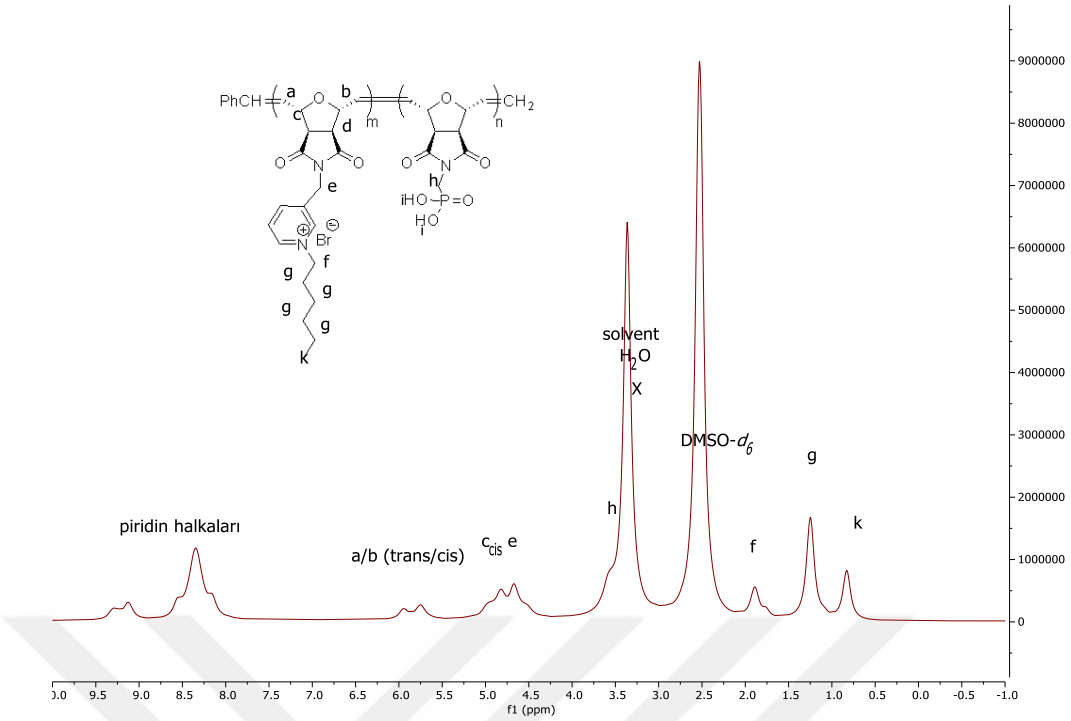
Şekil 6.59 Blok kopolimer 3b* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu



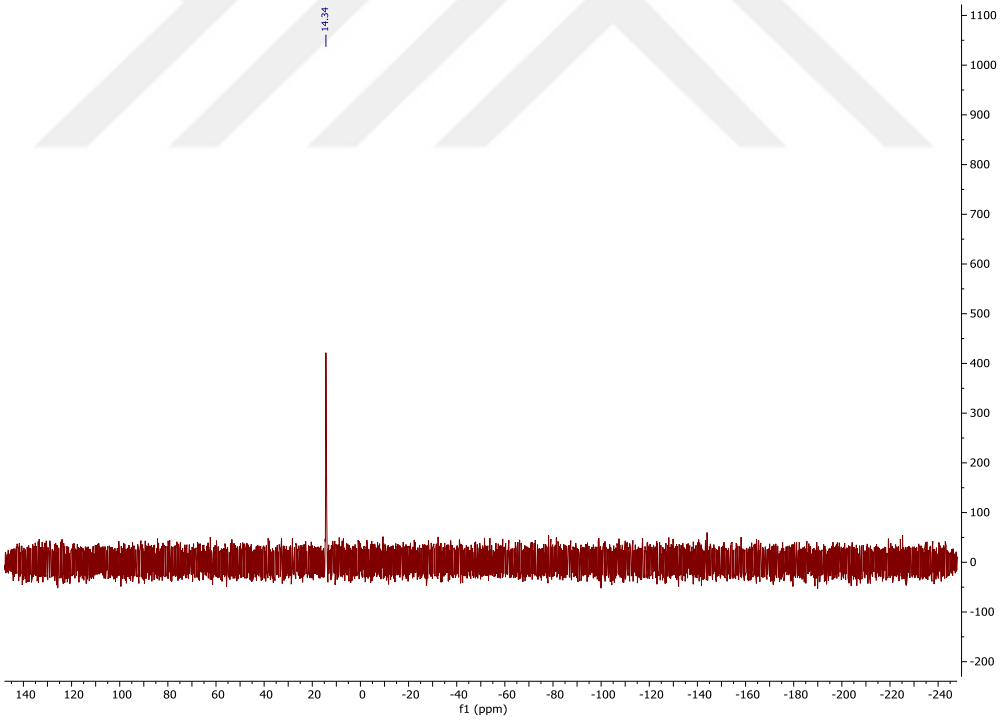
Şekil 6.60 Rastgele kopolimer 3c* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu



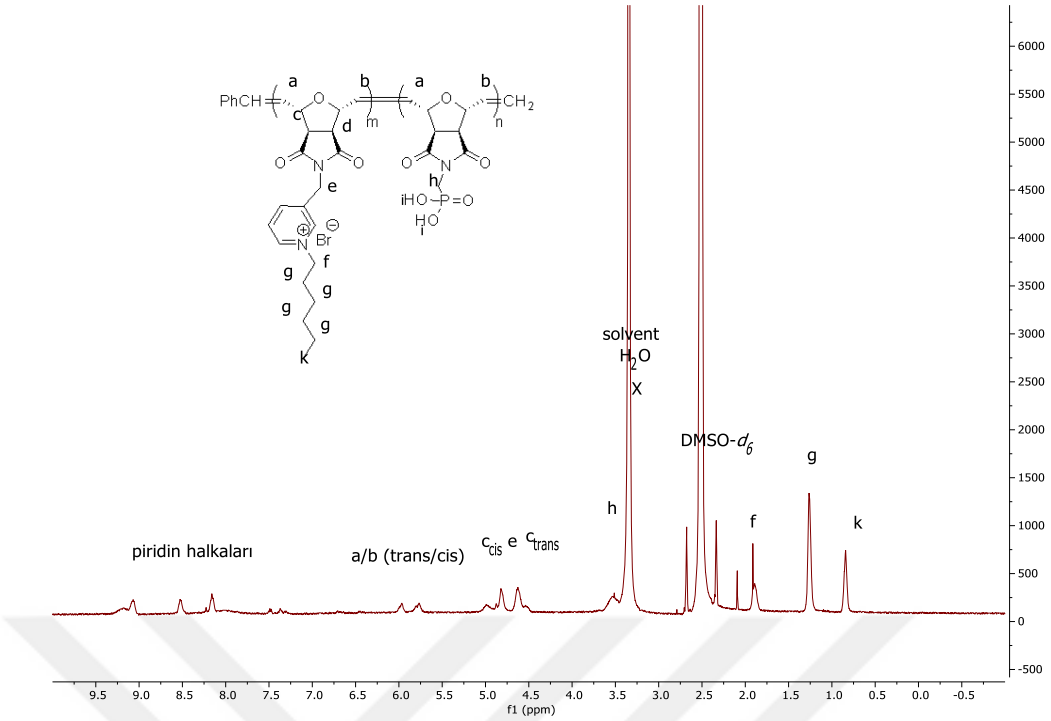
Şekil 6.61 Rastgele kopolimer 3c* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu



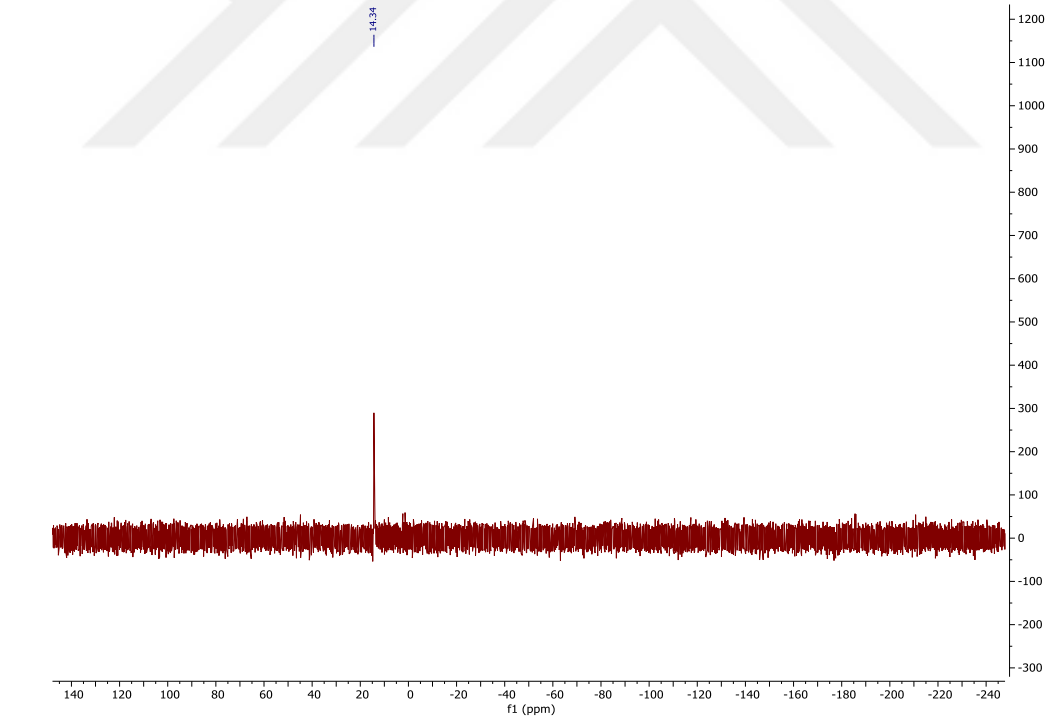
Şekil 6.62 Blok kopolimer 3d* asit formu ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu



Şekil 6.63 Blok kopolimer 3d* asit formu ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu



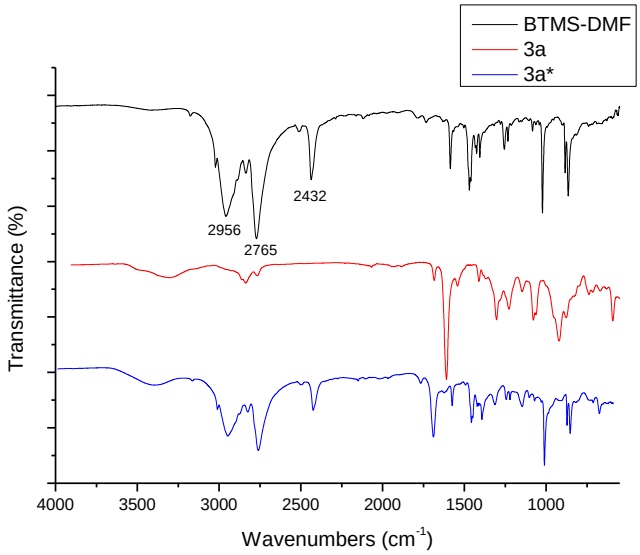
Şekil 6.64 Blok kopolimer 3e* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu



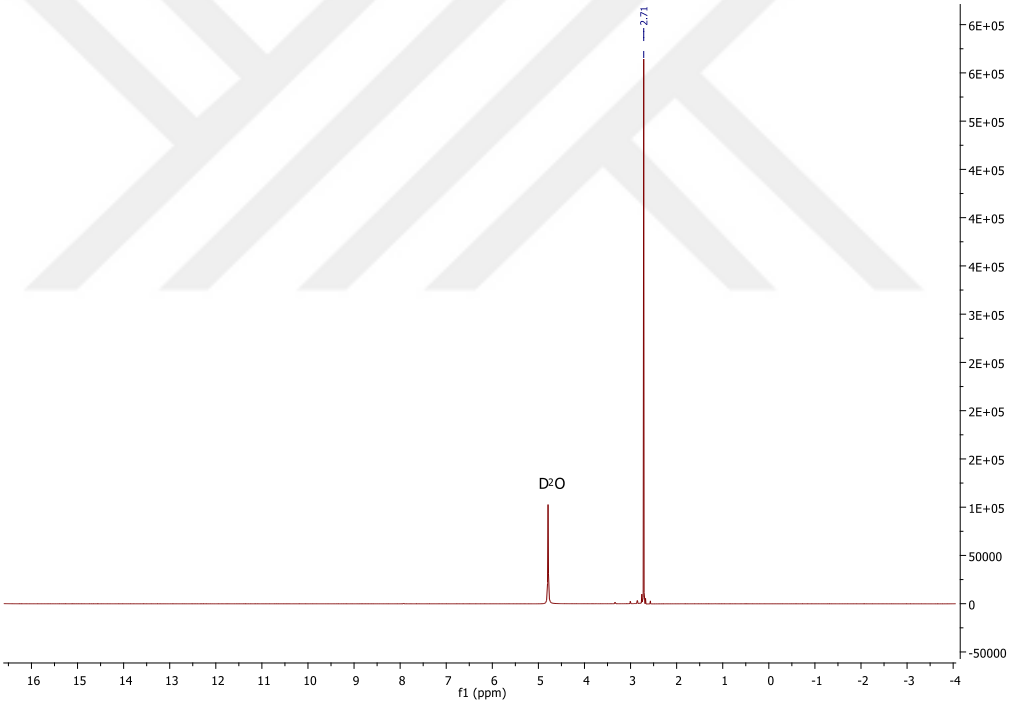
Şekil 6.65 Blok kopolimer 3e* asit formu ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu

Poly A_2 serisine ait kopolimerlerin aside dönüştürülmesi için çözücü olarak DMF kullanılmıştır. Reaksiyon sırasında bromotrimetilsilan ile DMF arasında yan reaksiyon olduğu farkedilmiştir. Bu nedenle 3a*-e* kopolimerleri reaksiyon sonrası kloroform ile yıkanarak saflaştırılmıştır.

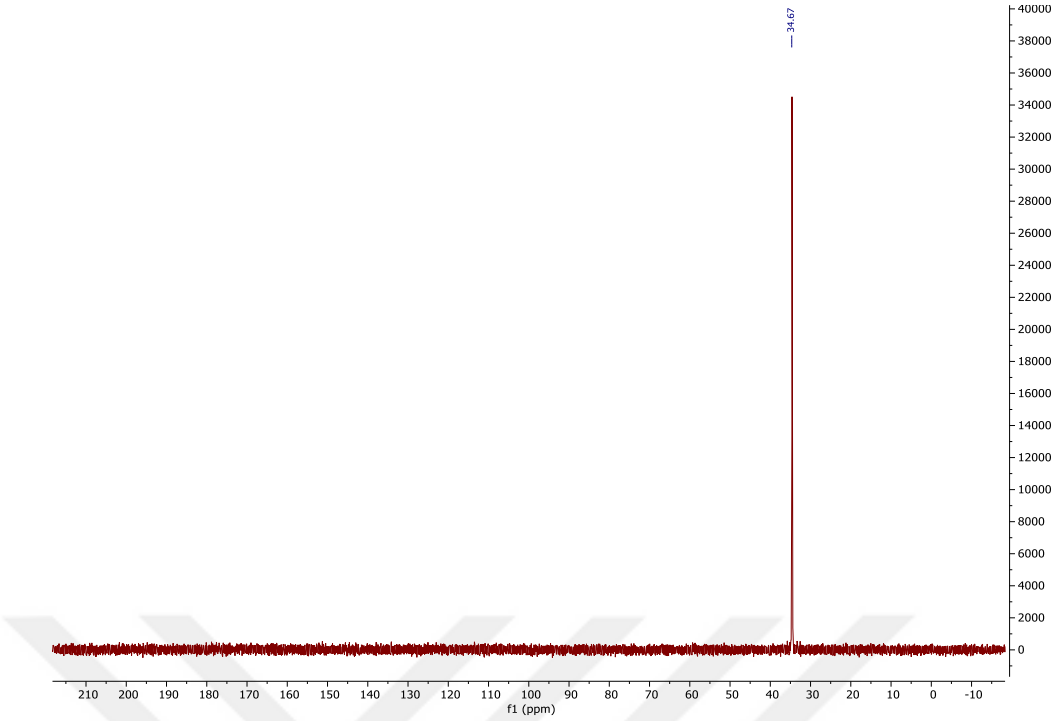
Bromotrimetilsilan ile DMF arasındaki yan reaksiyon, ortama kopolimer konmadan yapılan reaksiyon sonucu ile kanıtlanmıştır. Şekil 6.66'da yan reaksiyon ürünün, 3a ve 3a* kopolimerleri ile FTIR karşılaştırılması görülmektedir. 3a* kopolimerine yan reaksiyondan gelen kısım 2956, 2765 ve 2432 cm^{-1}'de net bir şekilde görülmektedir. Ayrıca Şekil 6.67 ve 6.68'de yan reaksiyonun ^{1}H ve ^{13}C NMR'ları verilmiştir.



Şekil 6.66 Bromotrimetilsilan-DMF (BTMS-DMF), 3a ve 3a* FTIR spektrumları



Şekil 6.67 Bromotrimetilsilan-DMF model bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu



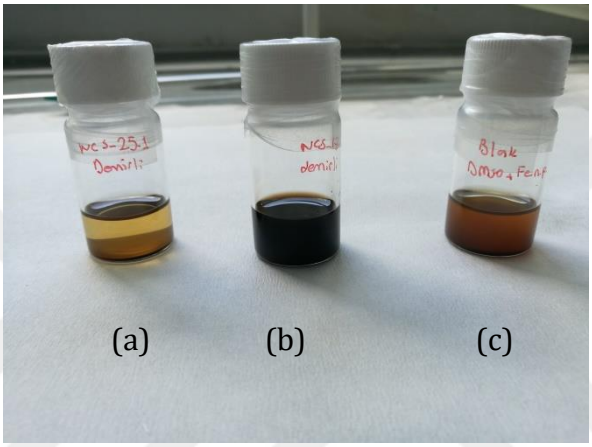
Şekil 6.68 Bromotrimetilsilan-DMF model bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu

6.2.1.4 Demir Oksit Nanopartikülü Sentezi ve Karakterizasyonu

Geçtiğimiz on yılda, paramanyetik nanopartiküllerin sentezi, manyetik depolama ortamı, biyoalgılama uygulamaları ve tıbbi uygulamalar gibi birçok teknolojik uygulamada faydalı oldukları için kapsamlı bir şekilde geliştirilmiştir [120]. Ayrıca, demir oksitlerin manyetik nanopartikülleri (Fe_3O_4 ve Fe_2O_3), düşük toksisiteleri, biyouyumlulukları, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri ve düşük fiyatları nedeniyle artık tıpta, ilaç dağıtım sistemlerinde, süperparamanyetizmada ve antimikrobiyal kaplamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [120-122]. Son zamanlarda biyolojik olarak konjuge manyetik nanopartiküllerin farklı analitik yöntemlerle entegrasyonu, bakteri, protein ve kanser hücresi tespiti, saflaştırması ve kantitatif analiz için yeni yollar açmıştır. Varshney ve Li, et örneklerinde *E. coli*'nin saptanması için manyetik nanopartikül-antikor konjugatlarına dayalı bir biyosensör geliştirdi [123]. Biyolojik ortamda genellikle doğal olarak oluşan manyetik bileşenlerden yoksun olduğundan, manyetik nanopartiküller kullanılarak patojenler seçici olarak kontrol edilebilir ve mükemmel özgüllük ve düşük arka plan gürültüsü ile tespit edilebilmektedir. Demir oksit nanopartiküllerinin biyosidal kopolimerlere dahil edilmesinin sensör verimliliğini

artırabileceğini düşündük. Bu içerikte Fe_3O_4 nanopartikülleri birlikte çökeltme yöntemi ile sentezledik. ICP-OES sonucuna göre kopolimerlerin % 0.15 ± 0.01 oranında demir oksit nanopartükülü içerdiği analiz edilmiştir.

Şekil 6.69'da demir oksit (yüzeyi kaplanmamış) nanopartikül bağlanması sonrası polimerlerin görüntüsü gösterilmektedir. (c)'de kopolimer olmadan DMSO içinde DONP görülmektedir. (a)'da Poly A_2 serisine, (b)'de ise Poly A_1 serisine örnek gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi DMSO içinde Poly A_1 içeren DONP'lerin stabilitesi, Poly A_2'den daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

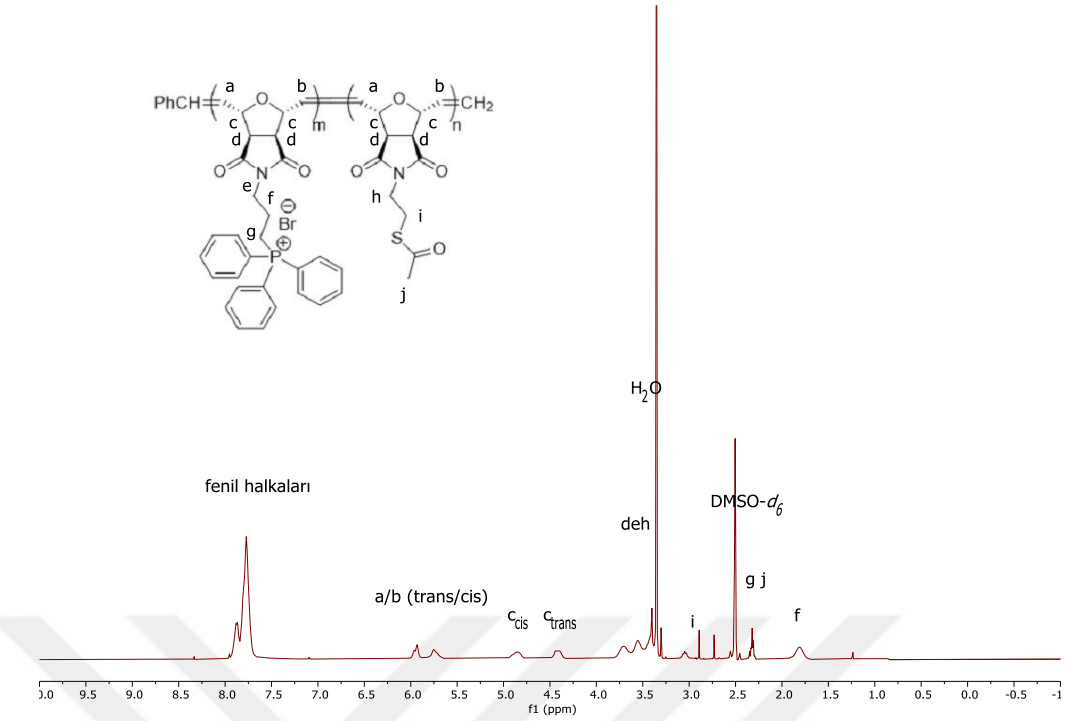


Şekil 6.69 Demir oksit (yüzeyi kaplanmamış) nanopartikül bağlanması sonrası polimerler ((a) Poly A_2 serisi (b) Poly A_1 serisi (c) polimersiz)

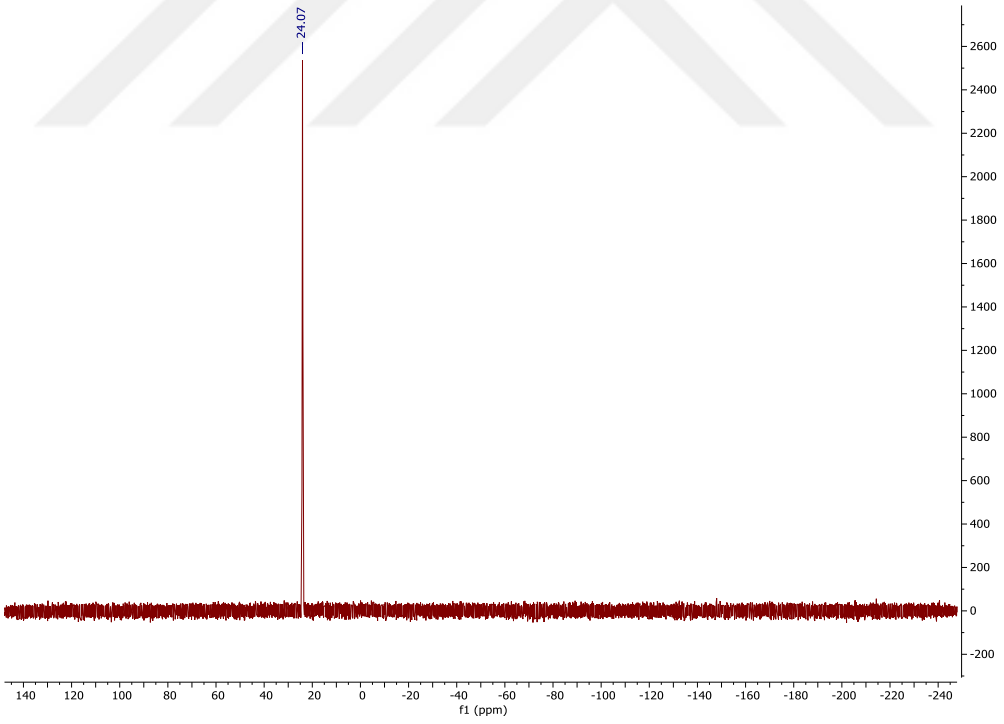
6.2.2 Poly B Serisi Sentezi ve Karakterizasyonu

Poly B_1'in (4a-e) ^1H ve ^{31}P NMR spektrumları Şekil 6.70-6.79 arasında, Poly B_2'nin (5a-e) ^1H NMR spektrumları ise Şekil 6.80-6.84 arasında gösterilmektedir. ^1H NMR'larında, 6.49 ppm'deki okzanorbornen halkasının spesifik çift bağı (-CH=CH-) polimerizasyon sonucu açıldığı için yok olduğu ve 5.5-6.0 ppm arasında a/b trans/cis'e dönüştüğü görülmüştür. NMR spektrumunda 4.5-5.0 ppm arasındaki (-O-CH-CH-) bağının c_{cis} ve c_{trans} olarak geldiği görülmüştür. Poly B_1 serisine ait spesifik fenil halkaları 7.6-7.9 ppm arasında geldiği analiz edilmiştir. Poly B_2 serisine ait spesifik piridin halkaları 8.0-9.5 ppm arasında görülmüştür. Monomer 4'e ait (-S-CH_2-) piki 3.05 ppm'de geldiği görülmüştür.

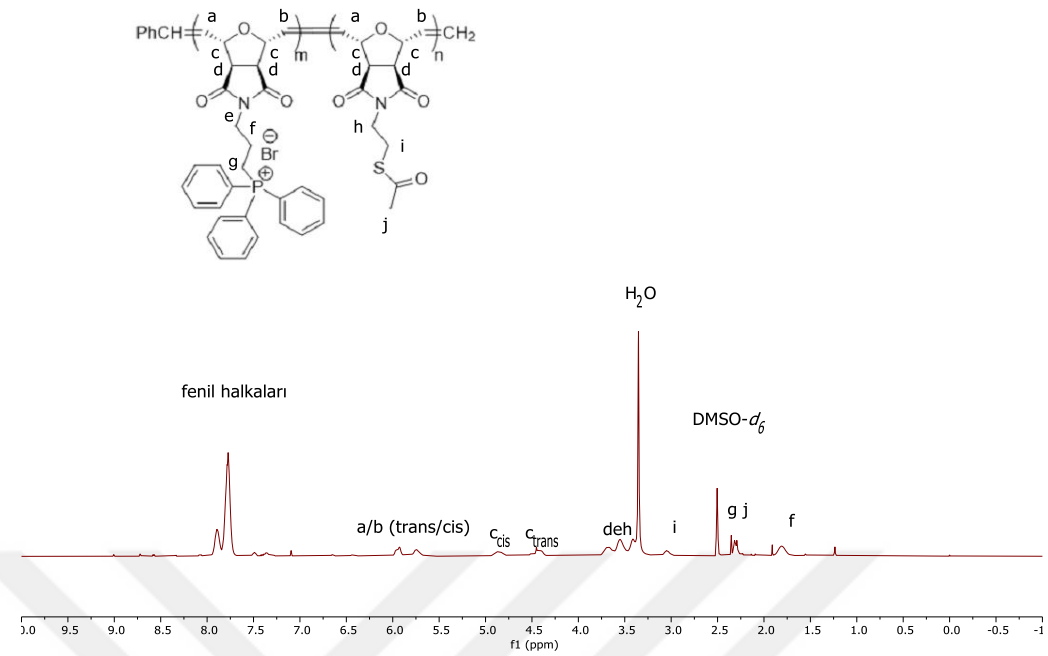
6.2.2.1 Poly B_1 Serisi Karakterizasyonu



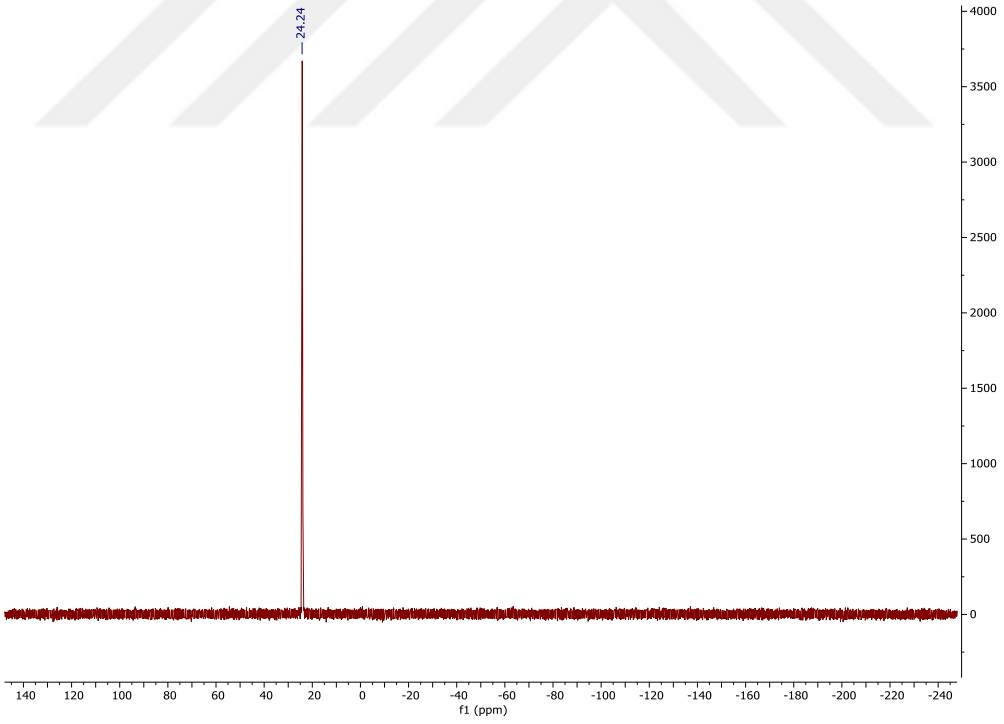
Şekil 6.70 Blok kopolimer 4a ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu



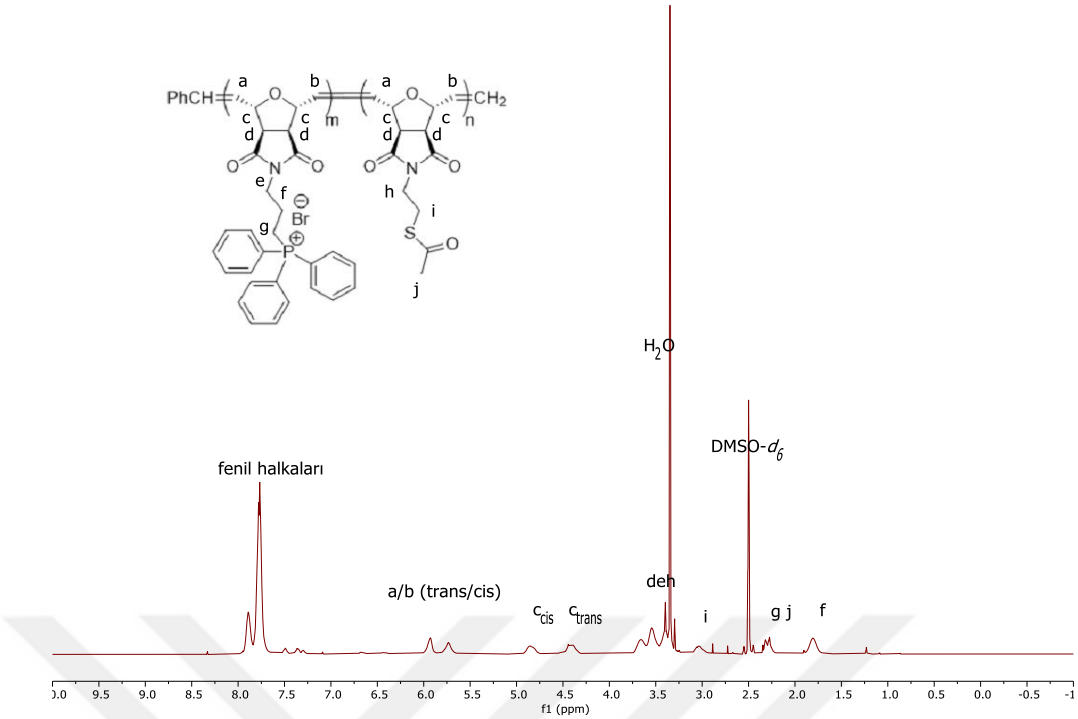
Şekil 6.71 Blok kopolimer 4a ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu



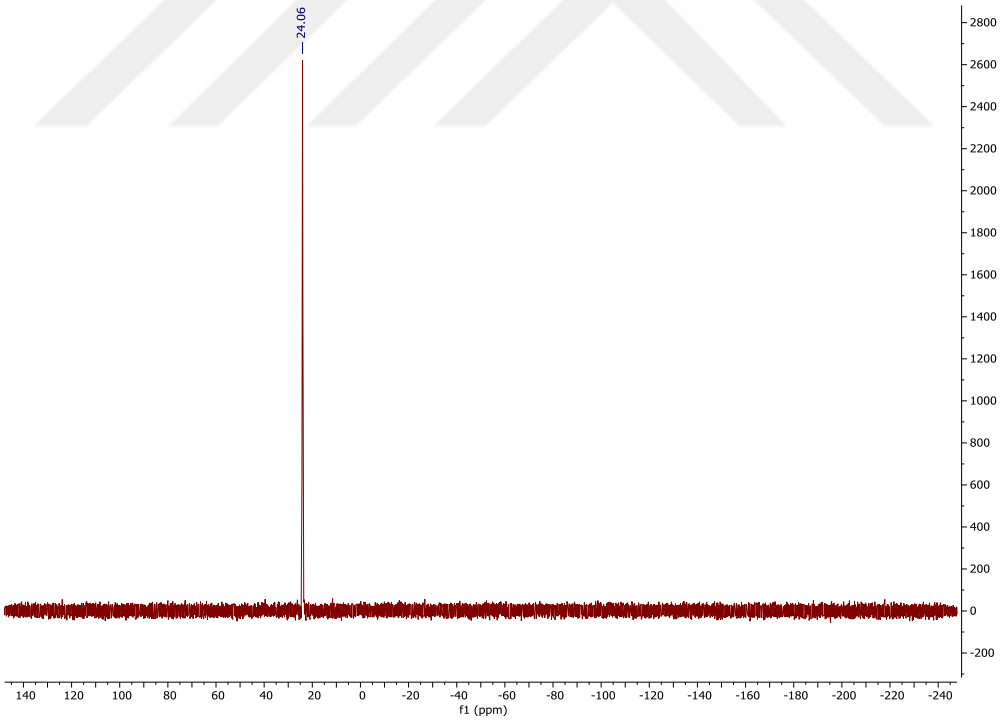
Şekil 6.72 Blok kopolimer 4b ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu



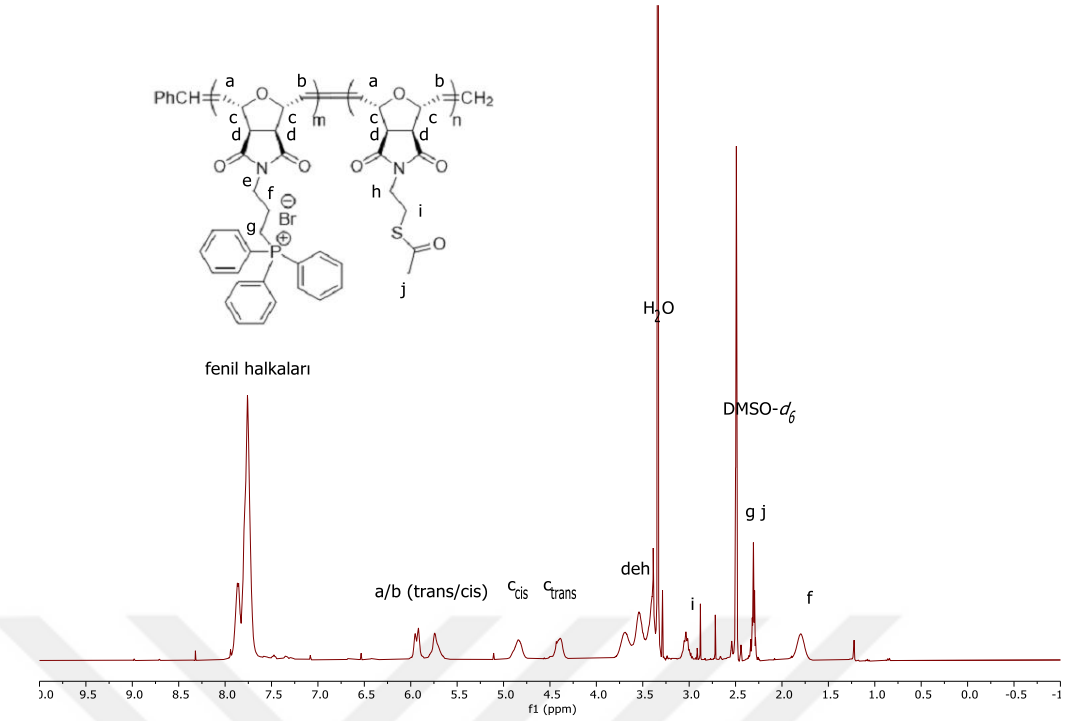
Şekil 6.73 Blok kopolimer 4b ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu



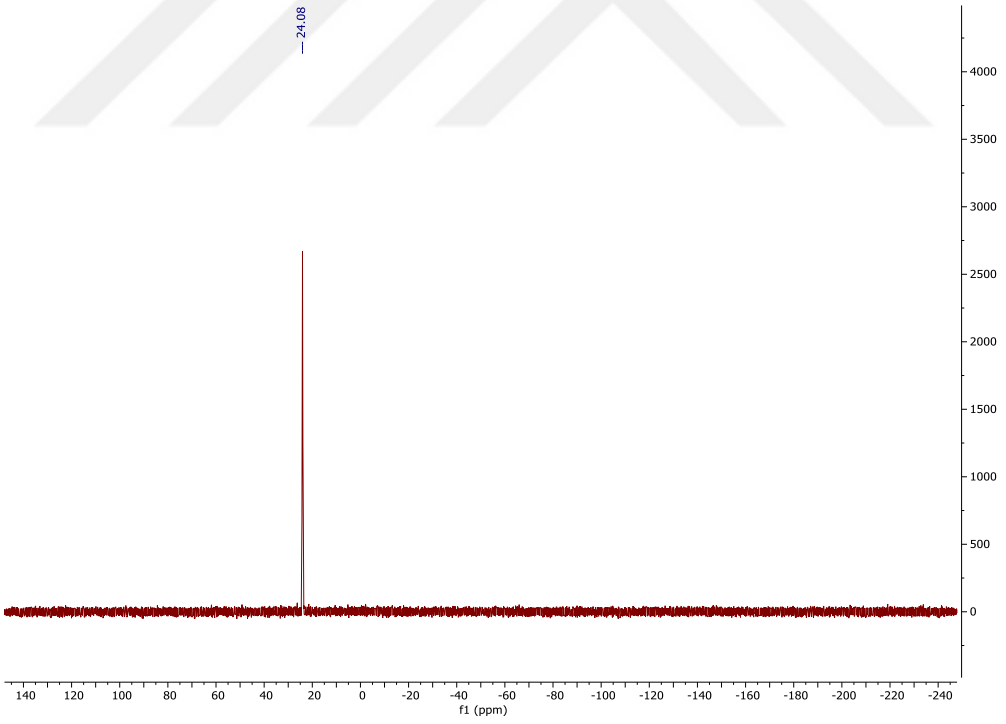
Şekil 6.74 Rastgele kopolimer 4c ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol Kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu



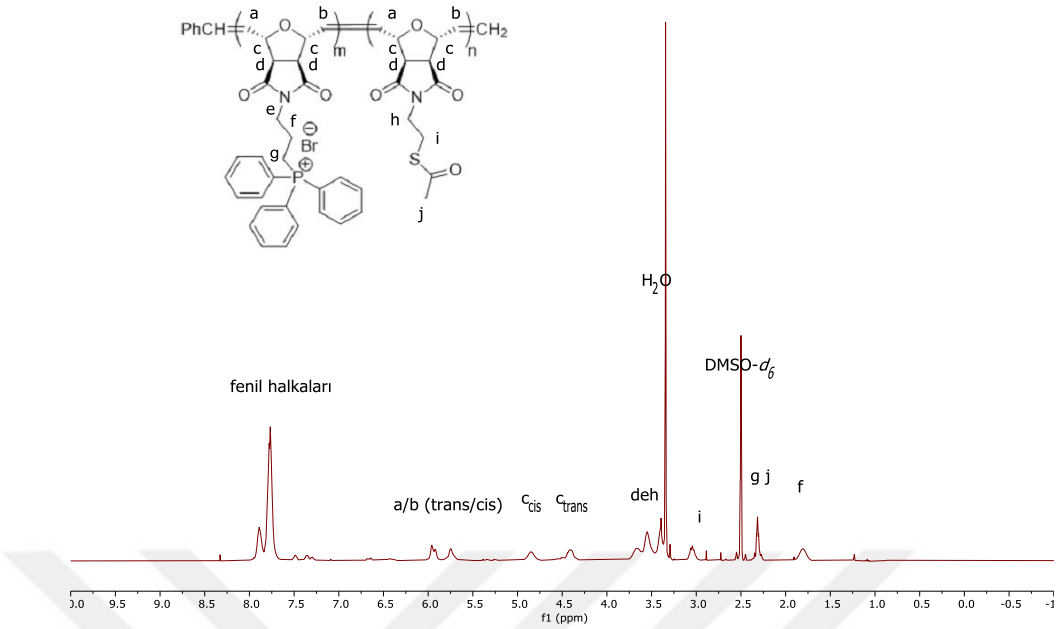
Şekil 6.75 Rastgele kopolimer 4c ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol Kütlece m:n (8:2)) ^{31}P NMR spektrumu



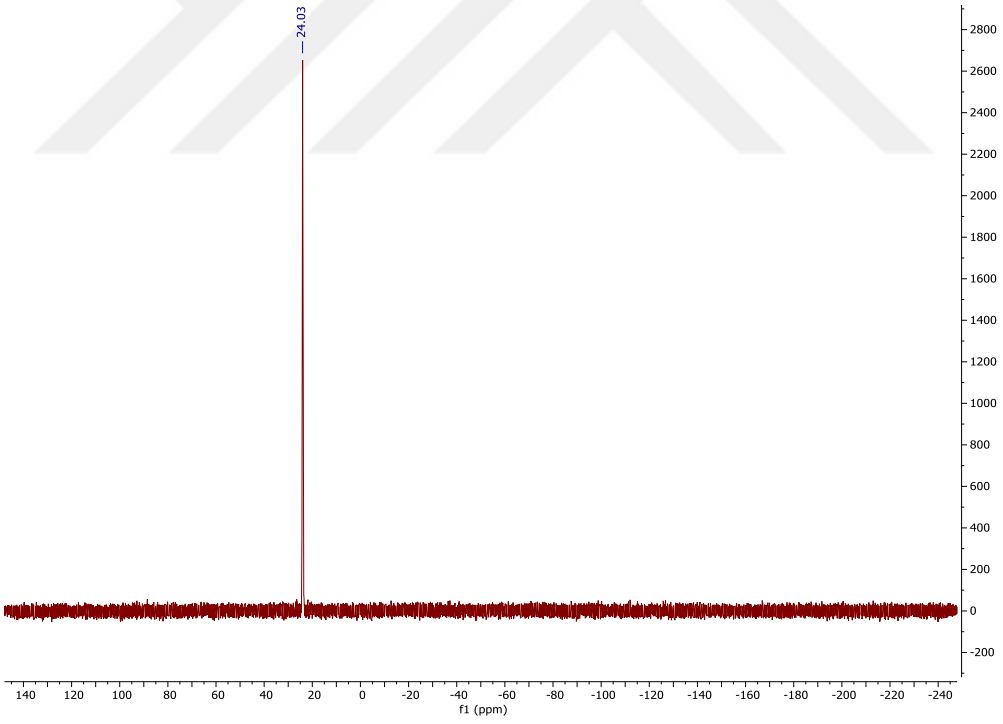
Şekil 6.76 Blok kopolimer 4d ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu



Şekil 6.77 Blok kopolimer 4d ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu

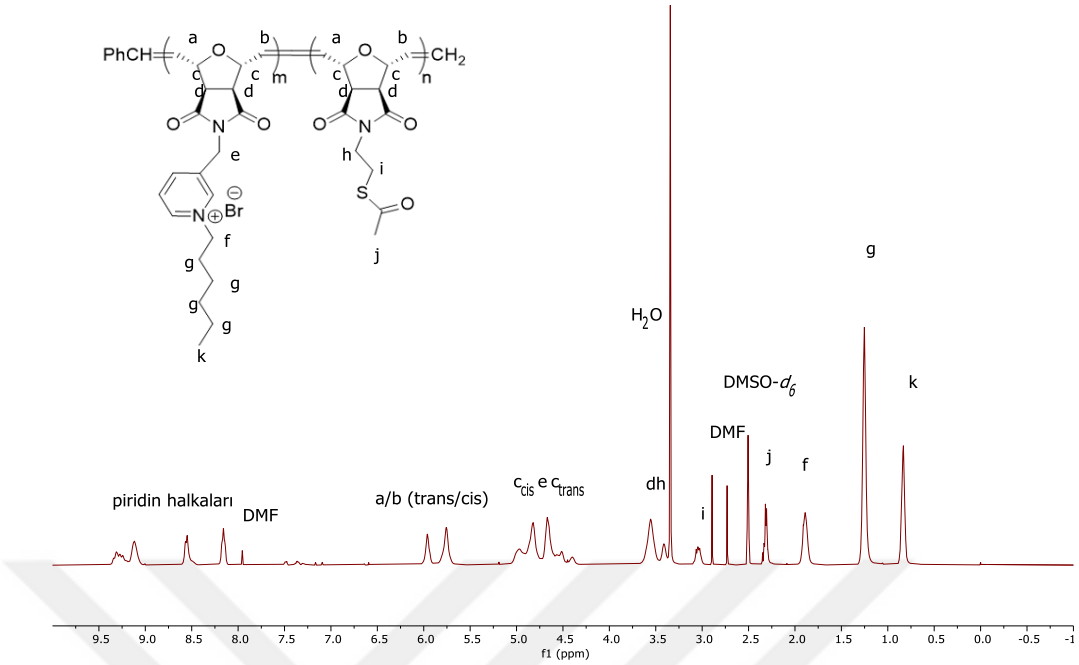


Şekil 6.78 Blok kopolimer 4e ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu

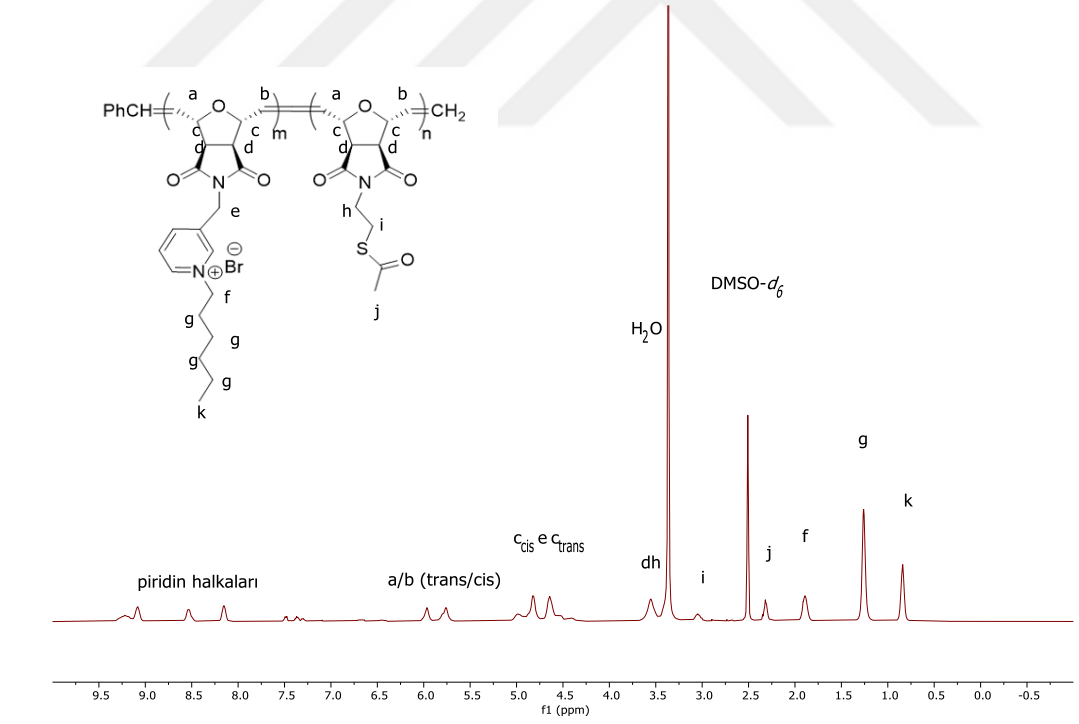


Şekil 6.79 Blok kopolimer 4e ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{31}P NMR spektrumu

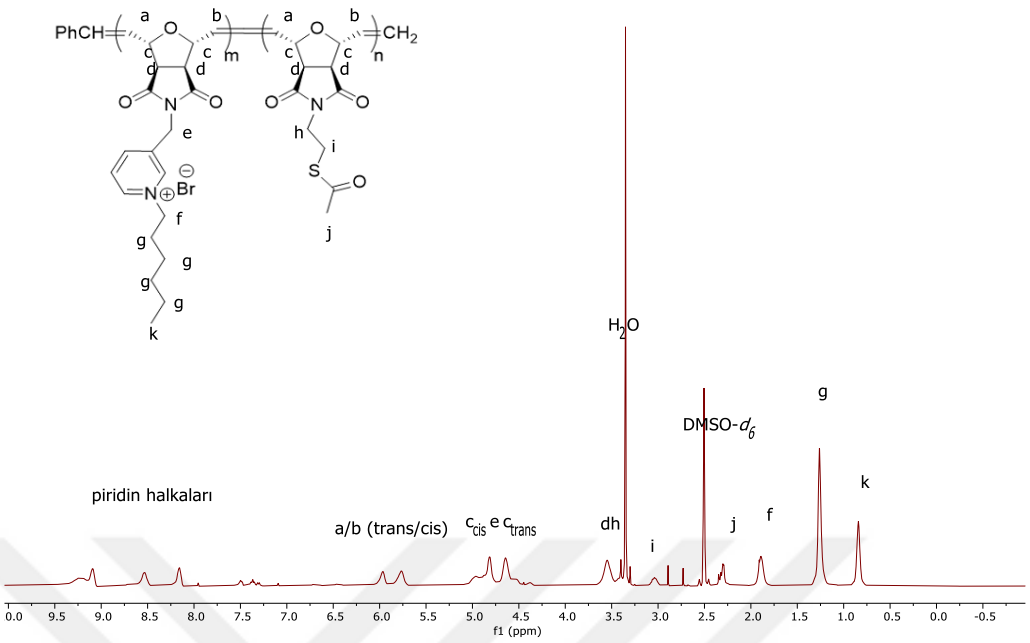
6.2.2.2 Poly B_2 Serisi Karakterizasyonu



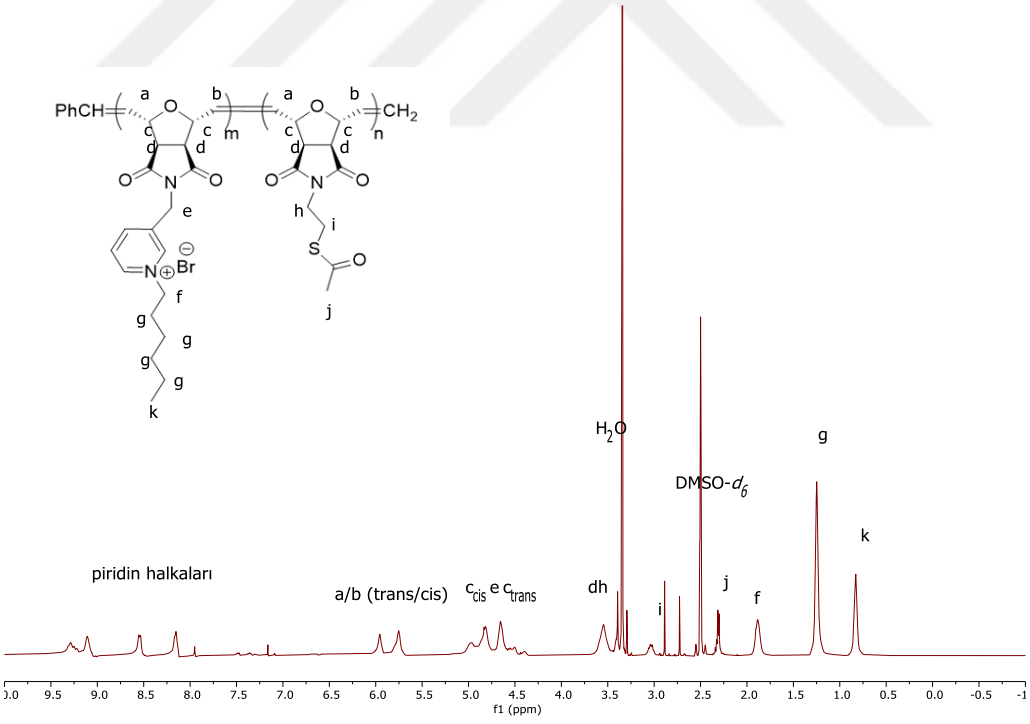
Şekil 6.80 Blok kopolimer 5a ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu



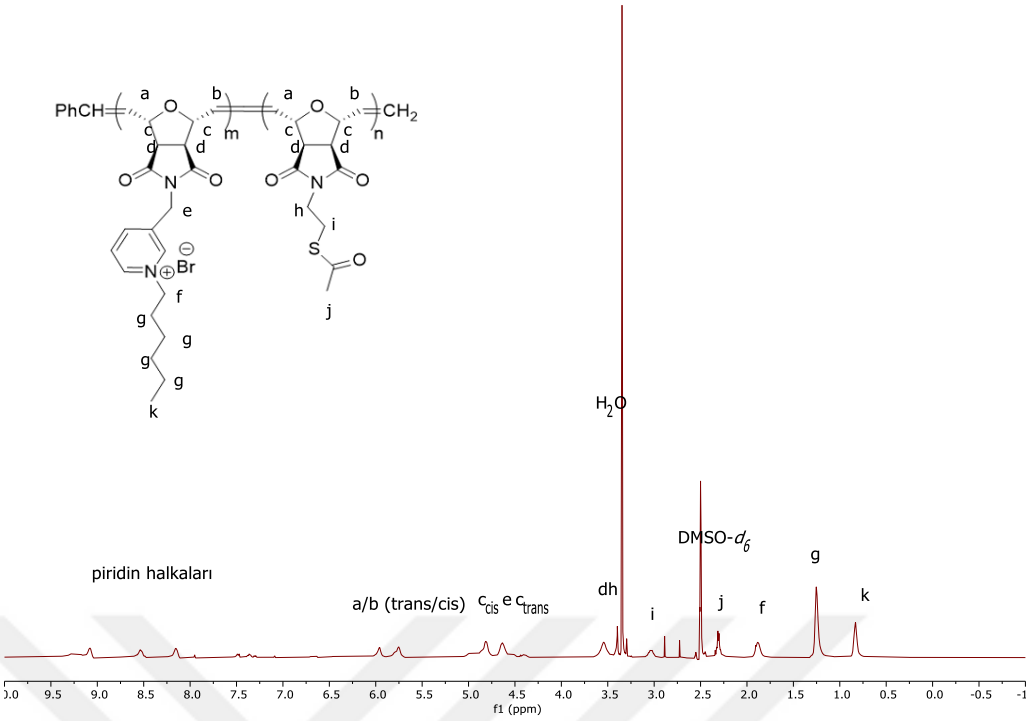
Şekil 6.81 Blok kopolimer 5b ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu



Şekil 6.82 Rastgele kopolimer 5c ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (8:2)) ^{1}H NMR spektrumu



Şekil 6.83 Blok kopolimer 5d ($M_{n,th}$ = 10.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu



Şekil 6.84 Blok kopolimer 5e ($M_{n,th}$ = 3.000 g/mol kütlece m:n (7:3)) ^{1}H NMR spektrumu

Tablo 6.2'de Poly B_1(4a-e) ve B_2 (5a-e) serisi kopolimerlerinin polimerizasyon dereceleri (teorik ve NMR hesapsal), ortalama molekül ağırlıkları (teorik, NMR hesapsal ve SEC hesapsal) ve PDI'ları verilmiştir. Hesapsal olarak polimerizasyon dereceleri ^{1}H NMR'ı ile analiz edilmiştir. Örnek hesaplama olarak 4b kopolimerinin m ve n değerlerinin bulunması verilecektir. Bu kapsamda, Monomer 1'den gelen trifenil fosfonyum tuzunun metilen grubu (-CH_2-) 1.81 ppm'de gelmektedir ve 2 tane proton içermektedir. Grubbs 3 katalizöründen gelen stirenik son grup ise 7.2-7.5 ppm arasında görülmektedir ve 5 tane proton içermektedir. Bu piklerin integrasyonlarının birbirine oranı m değeri olan 3.5 değerini vermektedir. Tiyolasetat grubu içeren Monomer 4'e ait olan alkil grup (-S-CH_2-) 3.05 ppm'de görülmektedir ve 2 tane proton içermektedir. Bu grubun integrasyonunun stirenik son grubun integrasyonuna oranı bize n değeri olan 2.9 sonucunu vermektedir. Aynı işlem diğer kopolimer serilerinin polimerizasyon derecelerini bulmak için uygulanmıştır.

Ortalama molekül ağırlık hesapları, bulunan m ve n değerleri kullanılarak yapılmıştır. Örneğin, 4b kopolimeri; teorik ortalama molekül ağırlığı 3.000 g/mol'dür. NMR ile hesaplanmış ortalama molekül ağırlığı ise (3,5 × monomer 1'in molekül ağırlığı (548 g/mol) + (2,9 ×monomer 4'ün molekül ağırlığı (267 g/mol) = 2.694 g/mol) şeklindedir.

Tablo 6.2 Poly B_1 ve B_2 serilerinin karakterizasyonları

Polimer Kodu	m[a]	n[b]	m/n[c]	m/n[d]	M_n[e] (g/mol)	M_n[f] (g/mol)	M_n[g] (g/mol)	$Đ$ [h]
(4a)	37,6	13,1	1.9	2,8	10.000	24.122	4.887	1,18
(4b)	3,5	2,9	1.9	1,2	3.000	2.694	2.187	1,21
(4c)	3,9	3,3	1.9	1,2	3.000	3.020	2.381	1,17
(4d)	27,6	20,1	1.1	1,4	10.000	20.528	4.346	1,18
(4e)	3,9	4,3	1.1	0,9	3.000	3.288	2.248	1,3
(5a)	26,9	7,5	1.9	2,5	10.000	10.136	4.620	1,31
(5b)	6,8	2,7	1.9	2,0	3.000	3.017	2.300	1,15
(5c)	8,5	2,9	1.9	2,9	3.000	4.356	2.812	1,25
(5d)	23,6	12,5	1.1	1,8	10.000	13.284	4.113	1,45
(5e)	7,3	4,6	1.1	1,5	3.000	4.305	2.186	1,21

[a]H NMR'ı ile hesaplanmış monomer 1 veya monomer 3'ün polimerizasyon derecesi

[b]H NMR'ı ile hesaplanmış monomer 4'ün polimerizasyon derecesi

[c]Kopolimerdeki monomerlerin teorik mol oranları

[d]Monomerlerin ^{1}H NMR'ı ile hesaplanmış mol oranları

[e]Kopolimerlerin teorik sayıca ortalama molekül ağırlıkları

[f]Kopolimerlerin ^{1}H NMR'ı ile hesaplanmış ortalama molekül ağırlıkları

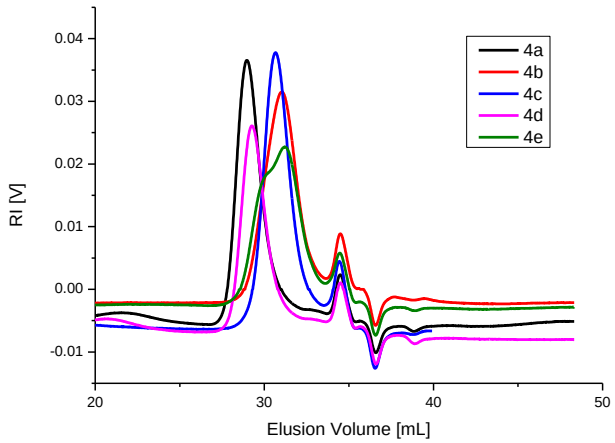
[g]Kopolimerlerin Boyut Dışlama Kromatografisi (SEC) ile ortalama molekül ağırlıkları

[h]SEC ile kopolimerlerin polidispersite indeksleri (PDI)((DMF, 3 g/L LiBr)

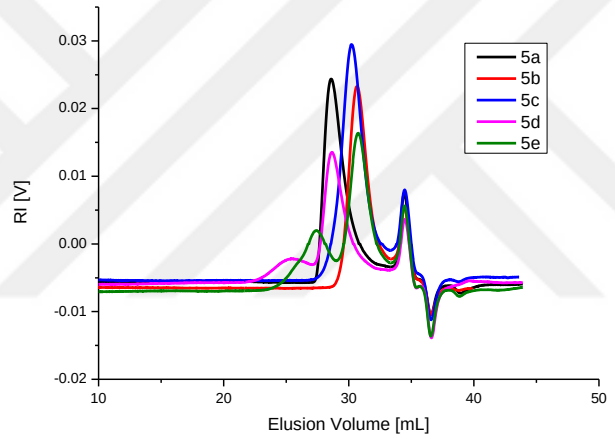
Polimer serileri 5a ve 5b için tiyolasetat esaslı monomerin polimer zincirine yüksek verimlilikte bağlanmadığı gözlendi. Büyüyen zincire sahip hekzilpiridinyum, ikinci monomerin rutenyum merkezine katılmasını engelleyen polimerizasyon koşullarında bir misel oluşumu oluşturabilir. Bu durum özellikle yüksek moleküler ağırlıklı (teorik 10.000 g/mol ortalama molekül ağırlığı) blok kopolimer serilerinin sentezinde gözlendi.

Monomer 4'ün konsantrasyonu artırıldığında (ağırlıkça oranı 7: 3'e yükseldiğinde), polimer zincirine az da olsa monomer 4'ün eklendiği gözlenmiştir. (^{1}H NMR'ında (-CH_2-S(=O)-) protonlarının pikinin 3,05 ppm'de görülmesi). Tablo 6.2'de görülen bir diğer önemli sonuç, 4a ve 4d blok kopolimerinde son grup analizine göre ortalama molekül ağırlıklarda önemli sapmanın gözlenmesidir. Bunun sebebinin, yüksek moleküler ağırlıklı polimer elde edilmesiyle sonuçlanan çapraz metatez lehine olması olduğu düşünülmektedir.

SEC sonuçlarına göre kopolimerlerin ortalama molekül ağırlıkları aynı Poly A serisinde olduğu gibi NMR'da hesaplanan ortalama molekül ağırlığına göre düşük çıktığı görülmüştür. Poly A serileri için yapılan açıklama ile paralel sonuçlar elde edilmiştir. SEC kalibrasyonu için kullanılan doğrusal, iyonik olmayan pullulan standartları, katyonik bazlı polimerlere kıyasla farklı hidrodinamik hacimlere neden olabileceği ve bu durumun da güçlü bir sapmaya yol açabileceği düşünülmektedir [118]. PDI değerleri 1,15 ile 1,45 arasında elde edilmiştir. Poly B serilerinin GPC sonuçlarının grafiği Şekil 6.85 ve 6.86'da verilmiştir.



Şekil 6.85 Poly B_1 serisi (4a-e) kopolimerlerinin GPC grafiği



Şekil 6.86 Poly B_2 serisi (5a-e) kopolimerlerinin GPC grafiği

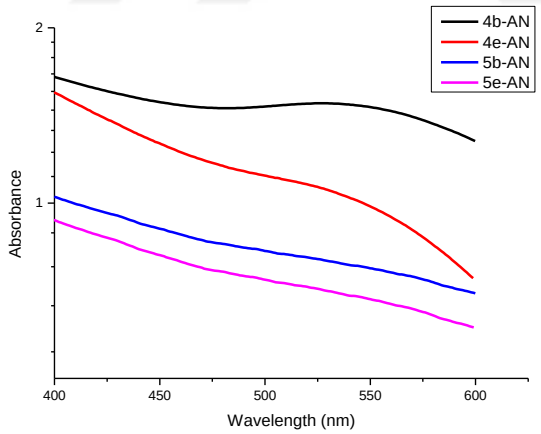
6.2.2.3 Altın Nanopartikül Sentezi ve Karakterizasyonu

Altın nanopartiklün polimer matrisine dahil edilmesinin empedans sinyalini artırabileceğini düşünülmektedir. Altın nanopartiküllerin sentezinde, kopolimerlerde bulunan tiyolasetat grupları aracılığıyla polimer kaplı altın yüzey elde etmek için daha yüksek biyosidal aktiviteye sahip kopolimer serisi 4b, 4e, 5b ve 5e kullanılmıştır. DMSO içinde bir hidrojen tetrakloroaurat (III) çözeltisi, polimer karışımına ilave edildi ve ayrıca indirgeme, sodyum borohidrit çözeltisi ilave edilerek altın nanopartikül sentezi gerçekleştirildi. Sodyum borhidrürün polimerin çifte bağına etki edip etmediğini kanıtlamak için 5.000 g/mol molekül

ağırlıklı tiyolasetat homopolimeri sentezlenmiştir. Bu polimerin altın nanopartikül uygulaması yapıldıktan sonra ^{1}H NMR'ı çekilmiştir. ^{1}H NMR'ında polimerin çifte bağının piki görüldüğü için sodyum borhidrürün polimerin çifte bağına etki etmediği ispat edilmiştir.

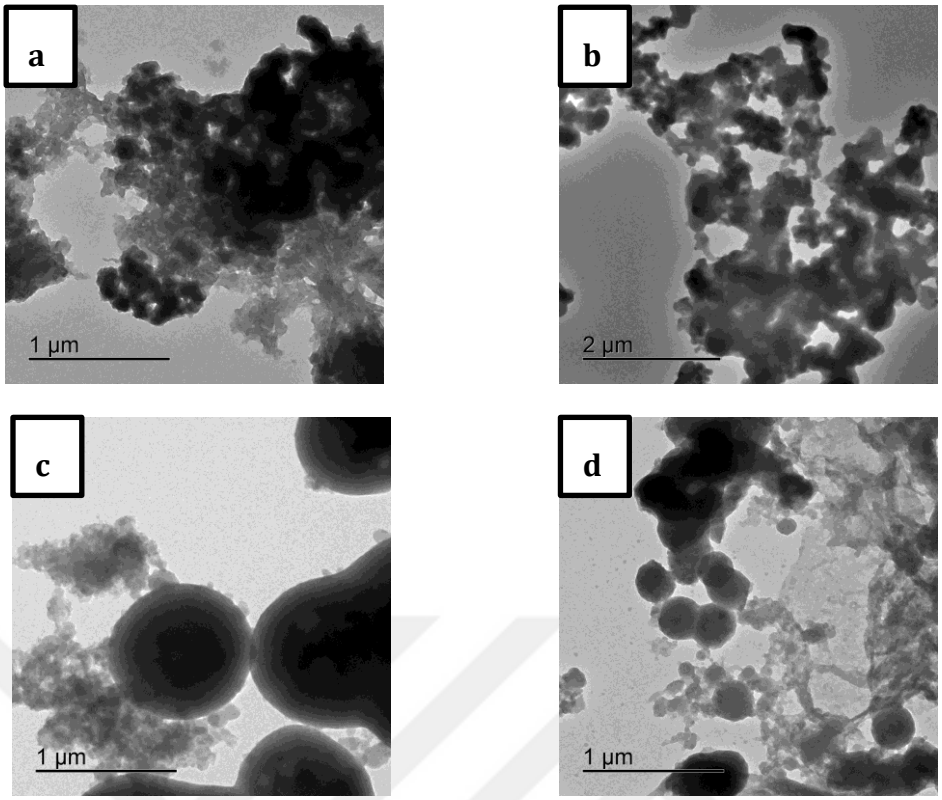
Saflaştırmadan sonra altın nanopartikül taşıyan kopolimerler, 4b-AN, 4e-AN, 5b-AN ve 5e-AN, UV-Vis spektroskopisi ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile analiz edildi.

UV-Vis spektroskopisi, altın nanopartikül boyutu, konsantrasyonu ve agregasyon seviyesinin kısa sürede tahmin edilmesini sağlayan çok pratik bir tekniktir [124]. Tüm UV–Vis spektrumları 400 ile 600 nm arasında kaydedildi. (Şekil 6.87) Karakteristik olarak, orbiküler agrege olmamış altın nanopartiküllerin UV-Vis spektrumu, SPR (yüzey plazmon rezonansı) nedeniyle yaklaşık 520 nm'lik bir bant, artı d-bandı elektronlarının bantlar arası geçişleri nedeniyle daha kısa dalga boylarında bir absorpsiyon kenarından oluşur [125]. Ne yazık ki, 520 nm'ye yakın absorbansın 5b-AN ve 5e-AN için spesifik altın absorbans alanı olduğunu net bir şekilde görülememiştir.



Şekil 6.87 Altın napopartikül bağlı kopolimerlerin UV-VIS absorpsiyon spektrumları

Altın nanopartiküllerin ayrıca TEM analizi görüntüleri elde edildi. (Şekil 6.88) Polimer kaplı altın nanopartiküller TEM ızgarasında kümelenme eğilimindeydi ve bu nedenle ortalama partikül boyutu gözlenemedi.



Şekil 6.88 Altın nanopartikül bağlı kopolimerlerin TEM görüntüleri (a) 4b-AN, (b) 4e-AN, (c) 5b-AN (d) 5e-AN

6.3 Elektrot Yüzeyi Kaplanması

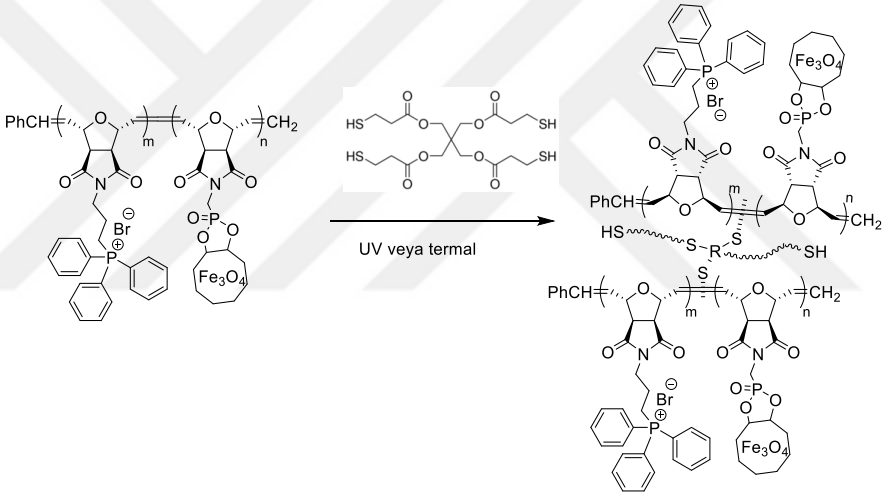
Elektrot yüzeyine kopolimerlerin kaplanması döndürerek kaplama ve damlatarak kaplama teknikleri ile denenmiştir. Ancak damlatarak tekniği ile elektrot yüzeyinin daha verimli kaplandığı görülmüştür.

6.3.1 Poly A Serisinin Elektrot Yüzeyine Kaplanması

Analizde kullanılacak elektrot yüzeyleri 30 dakika boyunca izopropanol içinde sonikatör kullanılarak temizlendi ve daha sonra argon gazı altında kurutuldu. DMSO içindeki 10 µL kopolimer çözeltileri (konsantrasyon 8 mg/mL) elektrot yüzeyine damlatıldı ve çözücü uzaklaşıp ince film elde etmek için 70 °C'de 2 saat kurutuldu.

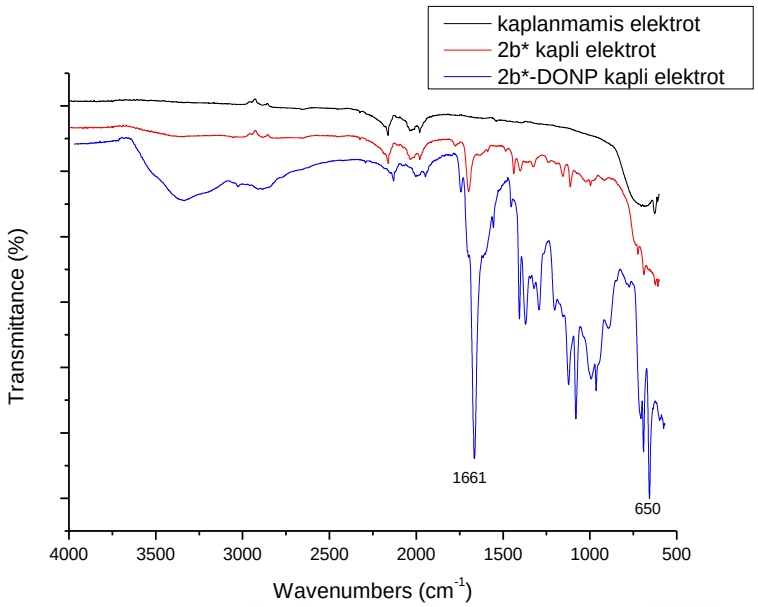
Demir nanopartikül esaslı polimerlerin elektrot yüzeyine daha iyi bağlanması için çapraz bağlayıcı pentaeritritol tetrakis (3-merkaptopropiyonat) eklenerek thiol-ene kimyası uygulanmıştır. Tiyol grupları altın ile kovalent şekilde bağlandığı bilinmektedir.[126] Bu nedenle tiyol-en kimyası kullanılarak polimerlerdeki alken

yapısından tiyol grup bağlanması, bileşikteki açıkta kalan tiyol kısım ise altın elektrota kovolent bağlanması amaçlanmıştır. Kopolimerler, DMSO içinde çözüldükten sonra içine bir kaç damla pentaeritritol tetrakis (3-merkaptopropiyonat) eklenmiştir. Elektrotlar bu çözelti ile daldırma yöntemi ile kaplanmış ve elektrotlar UV küvet içine konarak UV'ye maruz bırakılmıştır. Pentaeritritol tetrakis (3-merkaptopropiyonat), hem polimere hem de ölçüm yapılacak elektrota kovalent bir şekilde bağlandığı düşünülmüştür. Fakat empedans ölçüm sırasında maalesef ki elektrot yüzeyinden polimer filminin attığı görülmüştür. Şekil 6.89'da tiyol-en reaksiyonu sentez şeması gösterilmektedir. Bu kapsamda reaksiyon şartlarının optimize edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak, bu aşamada pentaeritritol tetrakis (3-merkaptopropiyonat) kullanılmadan film kaplama yapılmış ve empedans ölçümleri gerçekleştirilmiştir.



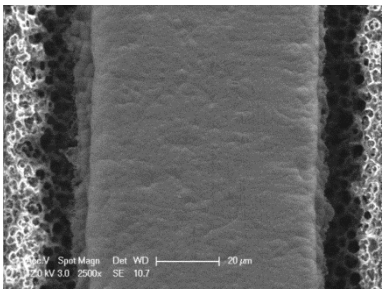
Şekil 6.89 2b*-DONP'nin altın elektrot yüzeyine bağlanması için tiyol-en reaksiyonu

Şekil 6.90'da polimer kaplı elektrotlarda 1661 cm^{-1}'de amit gerilmesi ve 1430-1450 cm^{-1}'de $-P^{+}(Fenil)_3$ karakteristik bandı görülmektedir.

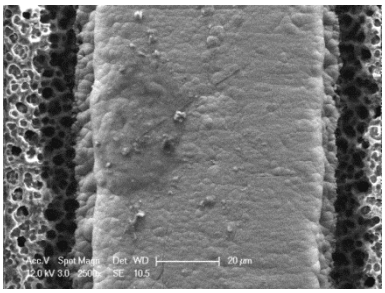


Şekil 6.90 Kaplanmamış, 2b* ile kaplanmış ve 2b*-DONP ile kaplanmış elektrot yüzeylerinin FTIR spektrumları

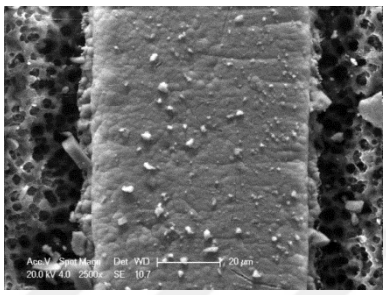
Şekil 6.91'de (a) polimer kaplı olmayan elektrot yüzeyinin, (b) 2b* kopolimeri ile kaplanmış ve (c) 2b*-DONP ile kaplanmış elektrot yüzeyinin SEM görüntüleri görülmektedir. Polimer kaplı olmayan elektrot yüzeyi pürüzsüz görünür iken 2b* kopolimeri kaplı elektrot yüzeyinin pürüzlü olduğu, ayrıca üniform kaplamanın olmadığı görülmüştür (b). Şekil 6.91 (c)'de gösterilen SEM görünüsünde ise demir oksit nanopartiküllerinin kümelenme eğiliminde (agrege) olduğu görülmektedir. Elektrot yüzeyinin analiz edilen hacminin temel bileşimini belirlemek için SEM-EDS analizi de yapıldı. Kontrol kaplamasız elektrot ve polimer kaplı elektrot karşılaştırıldığında, karbon, nitrojen ve brom içerikleri, kaplamadan sonra sırasıyla% 5,78'den % 17,17'ye, % 0'dan % 1,3'e ve % 0'dan % 1,62'ye yükseldi. Böylece, yüzey analizlerinin sonuçları, polimerin altın elektrot yüzeyine başarıyla kaplandığını kanıtladı.



(a)



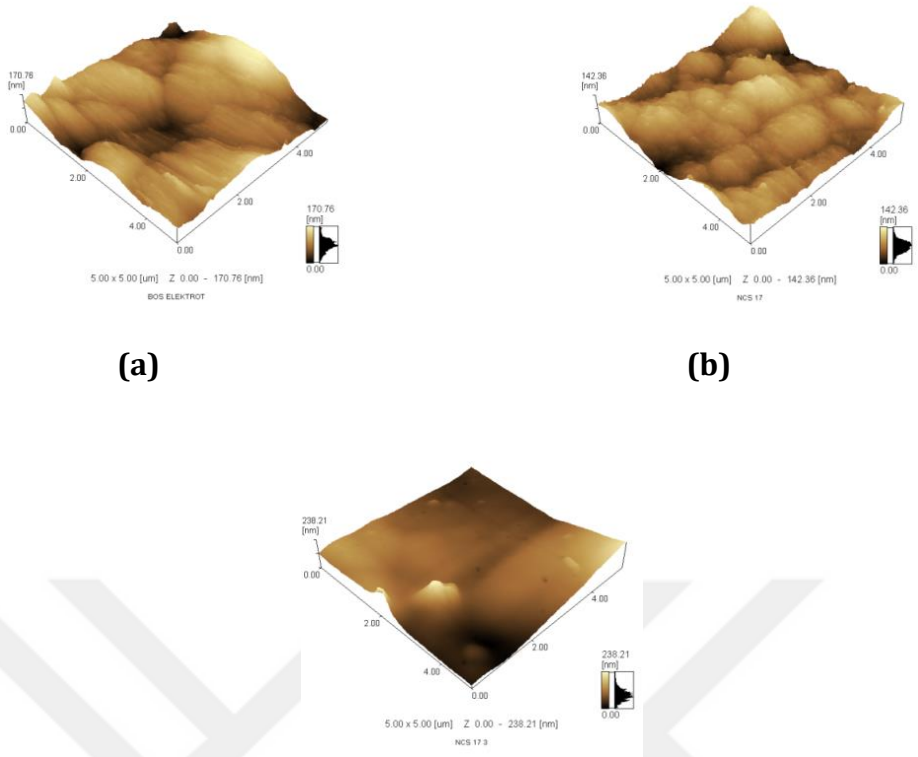
(b)



(c)

Şekil 6.91 (a) Kaplanmamış elektrot (b)2b* kaplı elektrot (c) 2b*-DONP kaplı elektrot yüzeylerinin sem görüntüleri

Şekil 6.92'de AFM ile elde edilen (a) polimer kaplı olmayan elektrot yüzeyinin, (b) 2b* kopolimeri ile kaplanmış ve (c) 2b*-DONP ile kaplanmış elektrot yüzeyinin 3D topografi görüntüsünü gösterilmiştir. Polimerin elektrot yüzeyine eklenmesi, kontrol elektrotuna göre nm ölçeğinde bazı muntazam olmayan dağılım ve farklı pürüzlülük aralıkları göstermesine neden olmuştur.



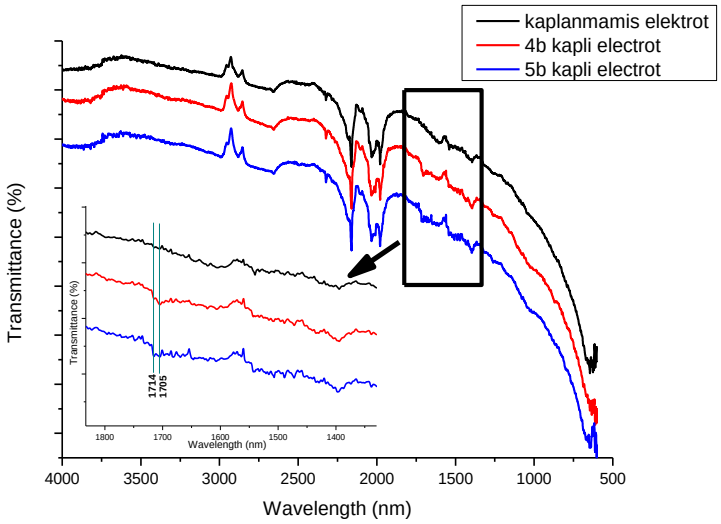
(a) **(b)**

(c)

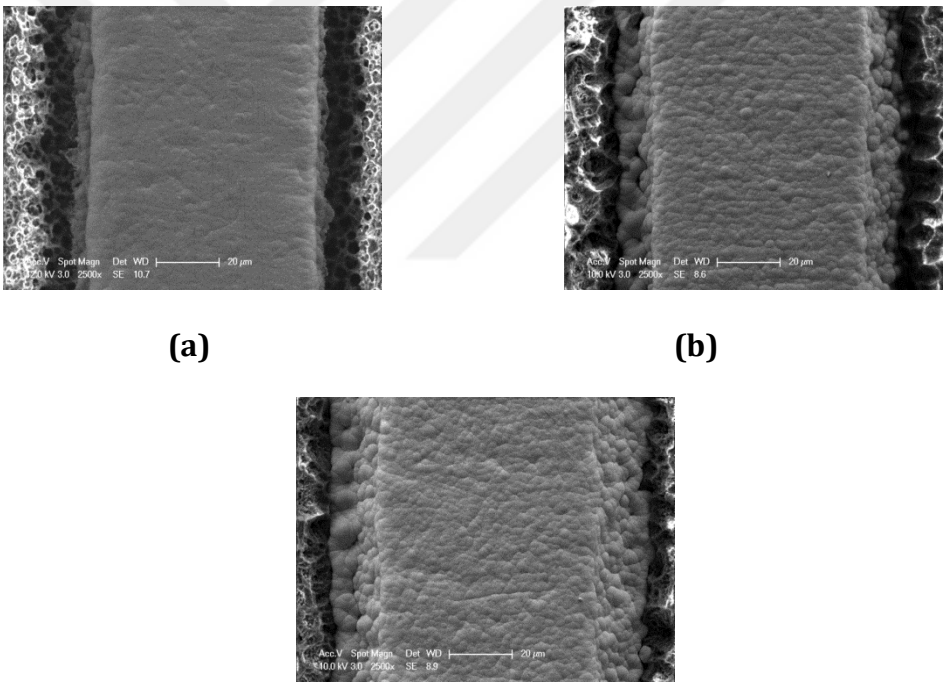
Şekil 6.92 (a) Kaplanmamış elektrot (b)2b* kaplı elektrot (c) 2b*-DONP kaplı elektrot yüzeylerinin AFM görüntüleri

6.3.2 Poly B Serisinin Elektrot Yüzeyine Kaplanması

Altın elektrot yüzeyine tiyolasetat grubuna sahip katyonik polielektrolitlerin adsorpsiyonu, yüzey modifikasyonu için bir yöntem türüdür. Altın yüzeyinde adsorpsiyon için tahrik edilen kuvvet, mikroiyonlar yoluyla entropidir ve ayrıca bir baz kullanmadan doğrudan tiyolasetat grubundan oluşturulabilir [127]. Şekil 6.93'te kaplanmamış, 4b ile kaplanmış ve 5b ile kaplanmış elektrot yüzeylerinin FTIR spektrumları gösterilmektedir. Sırasıyla 1714 ve 1705 cm^{-1}'de tiyolasetat ve amid gerilmeleri görülmektedir.



Şekil 6.93 Kaplanmamış, 4b ile kaplanmış ve 5b ile kaplanmış elektrot yüzeylerinin FTIR spektrumları



(a) **(b)**

(c)

Şekil 6.94 (a) Kaplanmamış elektrot (b)4b kaplı elektrot (c) 5b kaplı elektrot yüzeylerinin SEM görüntüleri

Şekil 6.94'te (a) kaplanmamış elektrot, (b) 4b kaplı elektrot ve (c) 5b kaplı elektrot yüzeylerinin SEM görüntüleri gösterilmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde, elektrot yüzeyindeki küresel tabaka bize altın elektrot yüzeyinin 4b veya 5b ile

kaplandığını, kaplamasız altın elektrot yüzeyinin ise pürüzsüz olduğunu göstermektedir.

6.4 Katı Yüzeyde Antibakteriyel Etkinlik

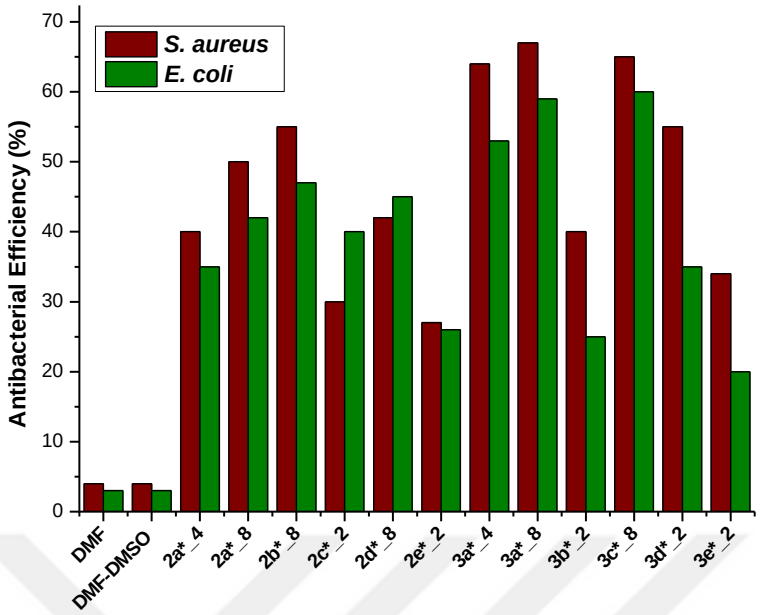
Cam yüzeyde kopolimerlerin biyosidal aktiviteleri ölçüldü. İlk olarak 2,5 × 2,5 cm cam mikroskop lamlarının yüzeyi Piranha solüsyonu kullanılarak temizlendi. Polimer çözeltileri, slaytlar üzerine döküldü ve 30 saniye süreyle 2.000 rpm'de döndürerek kaplama ile kaplandı. Slaytlar, kalan çözücüyü buharlaştırmak için 2 saat boyunca 70 °C'de vakum altında kurutuldu. Yüzeyler daha sonra iki önemli patojeni öldürmedeki etkinlik açısından test edildi: Gram-negatif bakteri *E. coli* (ATCC numarası: 25922) ve Gram-pozitif bakteri *S. aureus* (ATCC numarası: 25923). Yüzeyin biyosidal aktivitesi, 10 µL bakteri çözeltisinin cam yüzey üzerine dağıtılmasıyla test edildi. Kurutulduktan sonra, kaplanmış cam slaytlar, canlı bakteri hücrelerini belirlemek için büyüme altında inkübe edildi.

6.4.1 Poly A Serisi Antibakteriyel Etkinlik

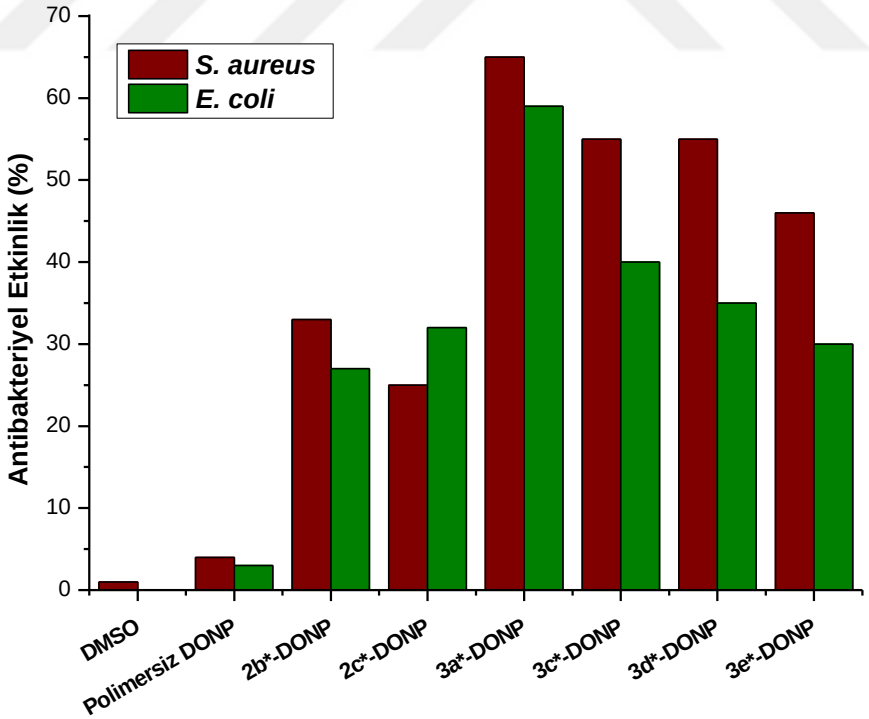
Tablo 6.3'te antibakteriyel etkinlik testi için Poly A serisi çözünürlük ve konsantrasyon tablosu verilmiştir. Kopolimerler fosfonik asit içerdikleri için çözünürlüklerinde zorluklar görülmüştür. Şekil 6.95'te Poly A serisi kopolimerlerinin (2a-e ve 3a-e) katı yüzeyde % antibakteriyel etkinliklerinin grafiği gösterilmiştir. Burada en etkin olarak Poly A_1 serisinde 2b, Poly A_2 serisinde ise 3a kopolimeri göstermiştir. 2b* kopolimeri için *S. aureus*'a etkinlik %55 iken; *E. coli*'ye karşı %47 olarak tespit edilmiştir. 3a* kopolimeri için *S. aureus*'a etkinlik %67 iken; *E. coli*'ye karşı %59 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca kopolimerlerin konsantrasyonu arttırıldıkça % antibakteriyel etkinliklerinin de arttığı görülmüştür. (Bakınız Şekil 6.95, 2a_4 ve 2a_8. 4 ve 8 kopolimerlerin mg/mL cinsinden konsantrasyonlarını göstermektedir.) Şekil 6.96'da ise demir oksit (yüzeyi kaplanmamış, bare) nanopartikül bağlanmış bazı Poly A serisi kopolimerlerin % antibakteriyel etkinlikleri gösterilmiştir. Şekil 6.95'teki grafik ile karşılaştırıldığında kopolimerlere demir oksit nanopartikülü bağlandığında % antibakteri etkinliklerinde düşüş gözlenmiştir.

Tablo 6.3 Poly A_1 ve A_2 serilerinin çözünürlükleri

	Çözünürlük			
Kopolimer Kodu	DMF	DMSO	Amonyak(%30)	Konsantrasyon (mg/mL)
2a*	X			8
2b*	X			8
2c*	X			8
2d*	X	X	X	2
2e*	X	X	X	2
3a*	X			8
3b*	X	X	X	2
3c*	X	X	X	2
3d*	X	X	X	2
3e*	X			8



Şekil 6.95 Fosfonik aside dönüştürülmüş Poly A serisi kopolimerlerin % antibakteriyel etkinlikleri



Şekil 6.96 Demir oksit (yüzeyi kaplanmamış) nanopartikül bağlanmış Poly A serisi kopolimerlerin % antibakteriyel etkinlikleri

Tablo 6.4'te Poly A serisi kopolimerlerinin *S. aureus* ve *E. Coli* ile maruz bırakıldıktan sonraki petri görüntüleri gösterilmiştir. 2b*'ın *S. aureus*'a *E. coli*'ye göre daha aktif olduğu, demir oksit nanopartikülü bağlanınca aktivitesi azaldığı (2b*-DONP) görülmüştür.

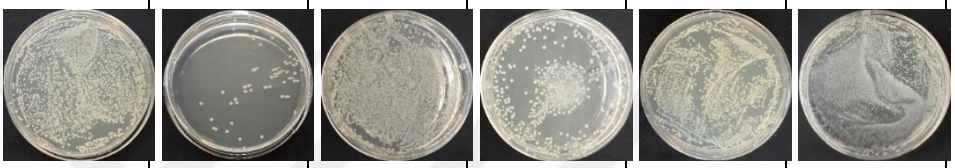
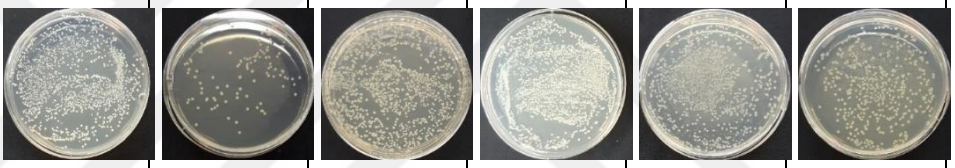
İlk sonuçlar, 2a*–e* serisinin 3a*–e* serisinden daha aktif olduğunu gösterdi (Tablo 6.4 görüntüleri). Bu sonuçların birkaç nedeni olabilir. 3a*–e* serisindeki kopolimerler, hekzil zincirlerinin güçlü hidrofobik etkileşimi nedeniyle birbirine yapışma eğilimindedir ve muhtemelen yüzeyde polimer kümeleşmeleri oluşturur. Bu nedenle, bu tür kümeler, polimerin bakteriyel membran ile elektrostatik etkileşimin üstesinden gelmek için bakteriyel membran ile verimli bir şekilde etkileşime giremediği anlamına gelir.

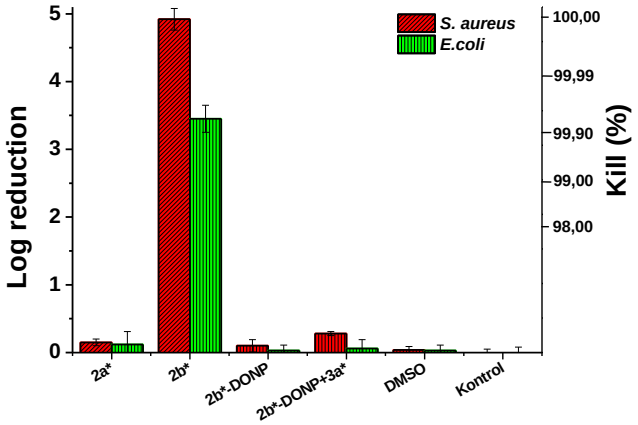
Şekil 6.97'de, Tablo 6.4'te gösterilen petri görüntülerine sahip kopolimerlerin *S. aureus* ve *E. coli'ye* karşı log azalma ve % öldürme sonuçları verilmiştir. En yüksek antibakteriyel aktivite, *S. aureus* için 4,92 log azalma ve % 100,00 öldürme aktivitesi ve *E. coli* için 3, 45 log azalma ve % 99,96 öldürme aktivitesi ile kopolimer 2b* için her iki organizmaya karşı tespit edilmiştir. 2b*-DONP+3a* numunesi, *S. aureus* bakterilerine karşı 0,28 log azalma ile % 39,10 öldürme gösterdi, ancak *E. coli*'ye karşı aktif değildi.

2b*'ı, 2a* ile karşılaştırdığımızda, 2b*'ın düşük moleküler ağırlıklı bir polimer olduğu gözlenmektedir. Bu nedenle, 2b* polimer matris içinde daha yüksek bir serbest hareket edebilir ve daha az polimer zincir dolaşıklığa sahiptir. Dolayısıyla, polimer 2b*'ın fizyolojik koşullar altında daha yüksek bir entropiye sahip olduğu varsayılır. Yüzeyde daha fazla özgürlük, yüzey üzerinde hareket etmesi termodinamik olarak daha zor olan daha yüksek moleküler ağırlıklı bir polimere göre bakteri membranına daha kolay nüfuz etmesini veya etkileşime girmesini sağlar. Biyosidal aktivite ve substrat yüzeyindeki serbestlik dereceleriyle ilişki Lienkamp ve meslektaşları tarafından da rapor edilmiştir [128]. Demir nanopartiküllerin dahil edilmesi, polimer yapıların kümeleşmesine ve aktivitede daha fazla düşüşe neden oldu. Bunun sebebi olarak polimerin yüzeydeki morfolojisi demir nanopartikül eklenince değiştiği ve hirofobik/hidrofilik özelliğinin de aggregasyon sonunda değiştiği öngörülmektedir. Polimer kaplı

yüzeylerin *S. aureus*'a karşı *E. coli*'ye göre daha yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür ve bu durum literatürde bildirilen sonuçlarla uyumludur [117]. Bu durum, *E. coli* ve *S. aureus*'un farklı hücre duvarı yapılarından kaynaklanmaktadır.

Tablo 6.4 Poly A serisi kopolimerlerinin *S. aureus* ve *E. Coli* ile maruz bırakıldıktan sonraki petri görüntüleri

Mikroorganizma	Test Örnekleri					
	2a*	2b*	2b*-DONP	2b*-IONP +3a*	DMSO Kaplı Cam	Kontrol (Boş Cam)
S. aureus						
E. coli						

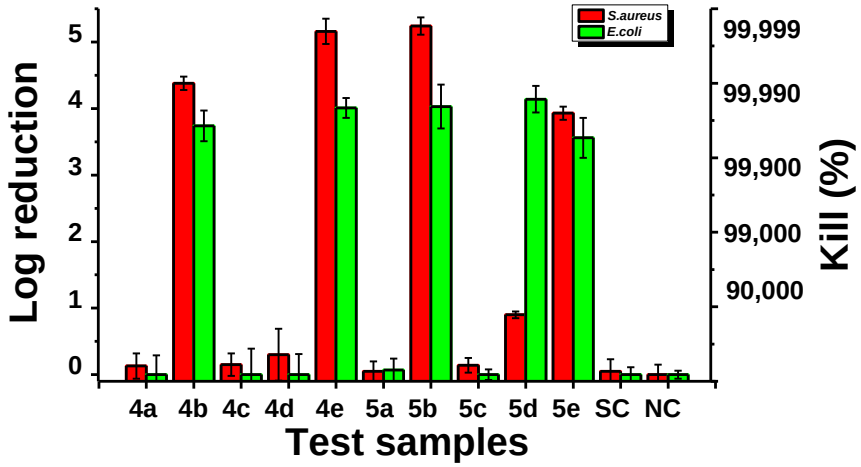


Şekil 6.97 *S. aureus* ve *E. coli'ye* karşı Poly A serisi kopolimerlerin log azalma ve % öldürme sonuçları

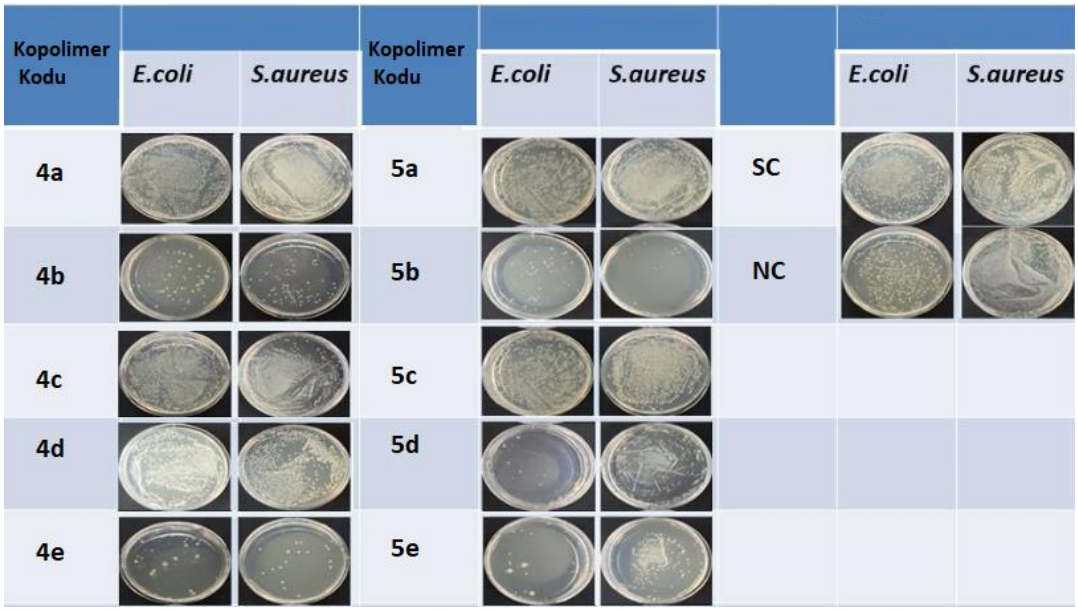
6.4.2 Poly B Serisi Antibakteriyel Etkinlik

Şekil 6.98'de, polimer kaplı cam yüzeyde *S. aureus* ve *E. coli* için log azalma ve % öldürme sonuçlarını gösterilmiştir. 5a–e serisinin, 4a–e serisinden daha aktif

olduğunu görülmektedir. (Şekil 6.99'daki hayatta kalan bakterilerin petri görüntülerine bakın). 3.000 g/mol moleküler ağırlığa sahip 4e ve 4b'li blok kopolimer serileri 5e ve 5b, diğer kopolimerlerden *E.coli* ve *S. aureus*'a karşı daha yüksek aktivite göstermiştir. (Bakınız Şekil 6.98) Bu sonuçların birkaç nedeni olabilir. Düşük aktivite kazanan kopolimerler, fenil halkalarının güçlü hidrofobik ve π-π etkileşimi nedeniyle birbirine yapışmaya meyillidir ve muhtemelen yüzeyde polimer kümeleri oluşturur. Bu nedenle, bu tür kümeler, polimerin bakteriyel membran ile elektrostatik etkileşimin üstesinden gelmek için bakteriyel membran ile verimli bir şekilde etkileşime giremediği anlamına gelmektedir. Şekil 6.98'de görüldüğü gibi; en yüksek antibakteriyel aktivite, *S. aureus* için 5,24 log azalma ve % 99,999 öldürme aktivitesi ve *E. coli* için 4,03 log azalma ve % 99,989 öldürme aktivitesi ile kopolimer 5b'ye ait olduğu tespit edilmiştir. *S. aureus*'a karşı kopolimer 4b için log azalması 4,38 ve öldürme aktivitesi % 99996 iken, *E.coli* için log azaltma ve öldürme aktivitesi sırasıyla 3,74 ve %99,98 bulundu. İlginç bir şekilde, polimer 5d'nin *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesi düşükken (0,9 log azalma), *E. coli*'ye karşı oldukça yüksekti (4,14 log azalma). İkinci en yüksek antibakteriyel aktivite, *S. aureus* için % 99,999 öldürme aktivitesi 5,16 log azalma ve *E. coli* için 4,01 log azalma % 99,99 öldürme aktivitesi ile kopolimer 4e için tespit edildi.

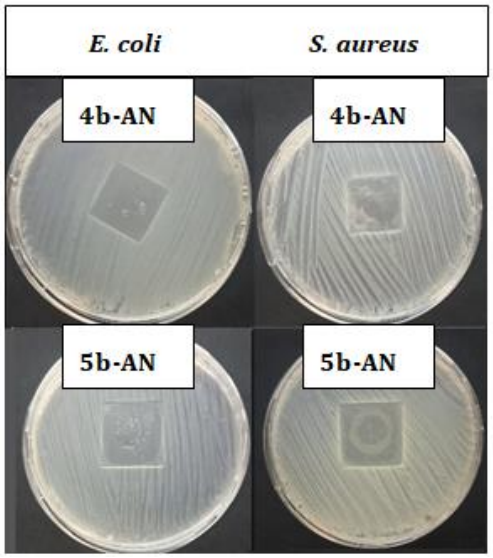


Şekil 6.98 *S. aureus* ve *E. coli'ye* karşı Poly B serisi kopolimerlerin log azalma ve % öldürme sonuçları



Şekil 6.99 Poly B serisi kopolimerlerinin *S. aureus* ve *E. Coli* ile maruz bırakıldıktan sonraki petri görüntüleri (SC: Solvent kontrol, NC: Kaplamasız cam kontrol)

Yüksek antibakteriyel özellik gösteren 4a, 4e, 5a ve 5b kopolimerlerine altın nanopartikül bağlanmıştır. Fakat kopolimerlere altın nanopartikül bağlandıktan sonra kopolimerler antibakteriyel aktivitelerini yitirmişlerdir. Bunun sebebi polimerin yüzey morfolojisinin değiştiği ve aggregasyon sonrası bakteri çeperi ile yeterli bir hidrofobik/hidrofilik etkileşmenin olmadığı görülmektedir. Ayrıca, disk difüzyon testi sonucu zon görülmemiştir. (Şekil 6.100)

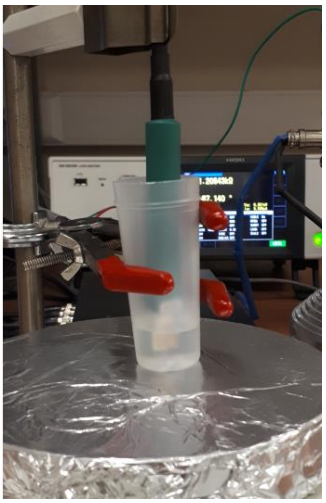


Şekil 6.100 4b-AN ve 5b-AN kopolimerlerinin disk difüzyon testi sonuçları

6.5 Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi

Sensör elemanı, iç içe geçmiş elektrot dizisi (IDEA) olarak bilinen iki düzlemsel birbirine bağlı elektrotlu bir empedimetrik dönüştürücüdür [129, 130]. IDEA, iç içe geçmiş, birbirine bağlı bir elektrot oluşturan bir dizi paralel düzlemsel elektrottan oluşur. Polimer kaplı elektrot yüzeyine bakterilerin yapışması, ara yüzey elektron transfer sürecini etkiler ve yüzeydeki elektron transferini azaltır, bu da bakteri miktarına bağlı olarak kapasitans artışı ile sonuçlanır [66]. Negatif yüklü bakteri türleri, katyonik polimer kaplı elektrot yüzeyine yapışarak elektriksel empedansta değişikliklere neden olabilir. Faradik empedans ölçümlerinde bakteri hücresinin bağlanması ve bakteri zarının zaman ölçeğinde dakikalar ile onlarca dakika arasında bozulması yük direncini ve iletkenliği etkileyebilir.

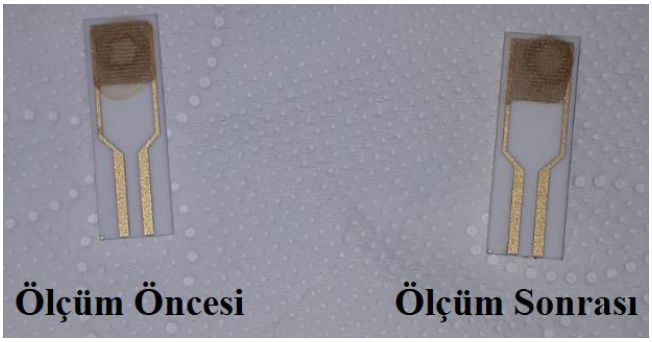
Şekil 6.101'de elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile bakteri miktarı tayini analizinin görüntüsü verilmiştir. Şekil 6.102'de ise empedans ölçümü sırasında kullanılan antibakteriyel polimer kaplı IDEA elektrotların ölçüm öncesi ve sonrasındaki fotoğrafı verilmiştir. Fotoğrafta görüldüğü gibi analiz sonrası elektrot yüzeyinde antibakteriyel polimer filmi sabit kalmıştır. (DONP bağlı olan polimerlerde ölçüm sonrası elektrot yüzeyinde polimer filminin çözüldüğü görülmüştür.)



Şekil 6.101 Elektrotların empedans ölçümleri

Biyosidal katyonik polimerler (2b*, 2b*-DONP, 2b*-DONP+3a*, 4b ve 5b) ile kaplanmış altın elektrotlar, fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ve bakteri

solüsyonunda empedans ölçümleri için uygulandı. Amaç, *E. coli* ve *S. aureus*'un sulardaki hassas tespiti için empedans analizinde antibakteriyel polimerlerin kullanılmasının fizibilitesini araştırmaktı.



Şekil 6.102 Ölçüm öncesi ve ölçüm sonrası elektrot yüzeyleri

Bakteri tespitinin hassasiyeti ve seçiciliği, sensörün pratik kullanımı için önemli bir parametredir. PBS ve farklı konsantrasyonlardaki bakteri çözeltilerine karşı empedans ölçümleri, 10 Hz ile 1 kHz arasında ölçülmüştür. (Şekil 6.103-104, Şekil 6.108-111, Şekil 6.113-114, Şekil 118-119) Optimum analiz frekansı olarak 100 Hz seçilmiştir ve bütün empedans ölçümleri 100 Hz'de alınmıştır.

6.5.1 Poly A Serisi Empedans Sonuçları

Biyosidal katyonik polimerler (2b*, 2b*-DONP ve 2b*-DONP+3a*) ile kaplanmış altın elektrotlar, PBS ve bakteri solüsyonunda empedans ölçümleri için uygulandı. 2b* ile kaplanmış elektrot numunesi için 10 Hz ile 1 kHz arasındaki empedans frekans aralığını analiz edilmiştir. (Şekil 6.103 ve Şekil 6.104) Farklı konsantrasyonlarda hedef hücrelerin tespiti için optimum frekans aralığı 100 Hz olarak bulunmuştur. İlk olarak, elektrot başlangıçta PBS içine daldırılmış ve 400 saniye empedans okumasına tabi tutulmuştur. Daha sonra 10^1, 10^3 ve 10^5 cfu/mL *S. aureus* çözeltileri yüzey kaplı elektrot ile inkübe edildi ve empedans 1200 saniye empedans değerleri ölçüldü. Empedans sonuçları, *S. aureus* örneklerinin enjeksiyonundan önce ve sonra sürekli olarak incelenmiştir. Şekil 6.105, 2b* polimer sensörünün farklı konsantrasyonlarda (10^1, 10^3 ve 10^5 cfu/mL) *S. aureus* ile inkübasyonundan sonra gerçekleştirilen zamana karşı empedans ölçümlerin sonuçlarını göstermektedir. Empedans sinyalinin polimer kaplanmamış elektrota kıyasla (PBS) *S. aureus* konsantrasyonunun artmasıyla logaritmik olarak

artmadığını göstermektedir. (Şekil 6.107) 10^1 cfu/mL konsantrasyonunda empedans sinyalinde 81 Ω artış, 10^3 cfu/mL konsantrasyonunda 66 Ω, 10^5 cfu/mL konsantrasyonunda ise 70 Ω artış görülmüştür.

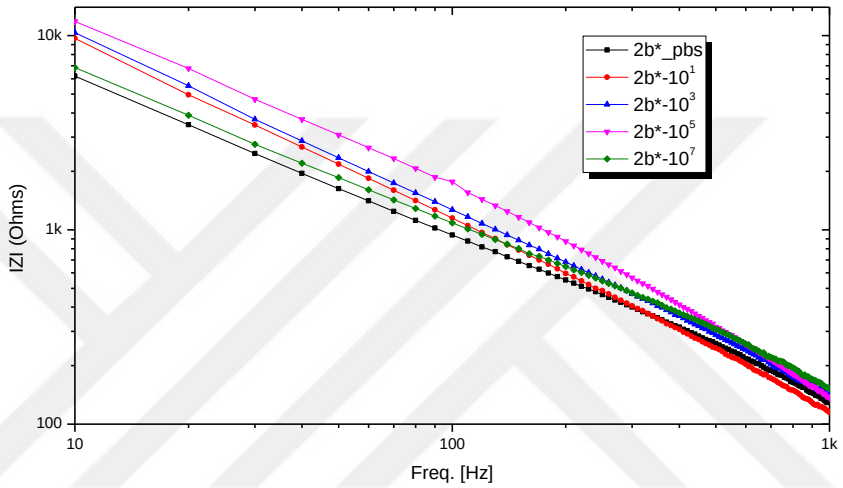
2b* kaplı elektrotların *E. coli* için zamana karşı empedans ölçümleri 10^3, 10^5 ve 10^7 cfu/mL konsatrasyonlarında yapılmıştır. (Şekil 6.106) Grafikte görüldüğü gibi empedans değişimi sadece 10^7 cfu/mL konsantrasyonundaki *E. coli'*de görülmüştür ve bu empedans değerindeki artış 78 Ω olarak tespit edilmiştir. (Şekil 6.107) Düşük konsantrasyonlarda *E. coli*'ye karşı sinyal alamama sebebi şu şekilde açıklanmıştır. Düşük konsantrasyondaki *E. coli*, tüm frekans değerlerinde farklı bir mekanizma sergiler ve empedans değeri, bakteri içermeyen tampon gibi boş numuneninkinden daha düşüktür. Elektrot yüzeyindeki bağlanma kinetiğinin doğru sinyali elde etmek için çok önemli olduğunu düşündük. *E. coli*'nin dış zarı için elde edilen dielektrik özellikleri, 2×10^{-6} S/m gibi çok düşük bir iletkenliğe sahip olduğunu göstermektedir [131]. *E. coli*'nin elektrot yüzeyine bağlanması daha yavaş olduğundan, serbest *E. coli* hücreleri çözeltinin iletkenliğini arttırır ve bu da boştan (PBS, bakterisiz) daha düşük bir empedans sinyali ile sonuçlanır. Bunun aksine, *S. aureus*'a 10^1 ve 10^3 konsantrasyonda bir yanıt gözlemledik. Bu, *S. aureus*'un zaman içinde elektrot yüzeyinde daha iyi biyofilm oluşturma ve adezyon özelliklerine bağlanabilir.

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi ölçümleri yapıldıktan sonra elektrotların SEM analizi yapıdı. Şekil 6.112'de, kopolimer 2b* kaplı 10^5 cfu/mL konsantrasyonundaki *S. aureus ve E. coli* ölçümleri sonrasındaki elektrot yüzeylerinin SEM görüntüleri görülmektedir. *S. aureus ve E. coli*'nin elektrot üzerinde birikmesinden sonra yüzeyde artan bir deformasyona neden olduğunu görülmüştür. Bakterilerin ölümü nedeniyle organellerin yüzeye yayıldığı ve yüzey pürüzlülüğünün arttığı görülmüştür.

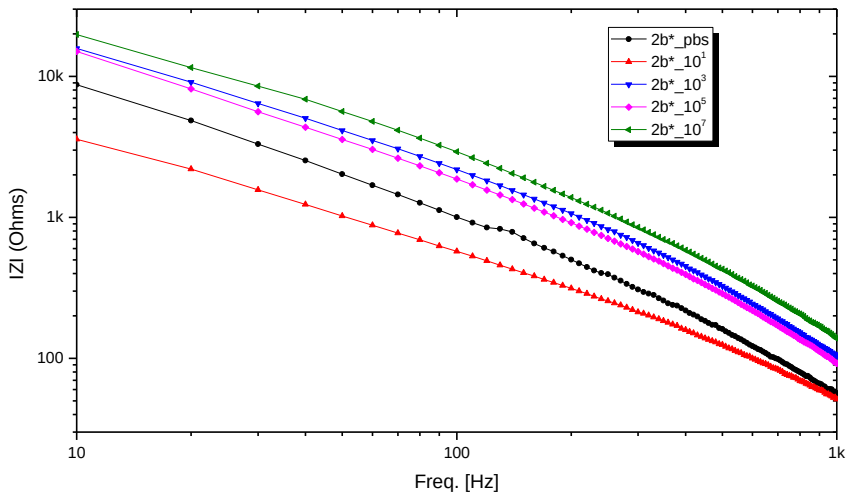
Polimer-demir nanopartikül (2b*-DONP ve 2b*-DONP+3a*) kaplı sensörler için empedans ölçümleri Şekil 6.108–6.111 arasında gösterilmiştir. Tercihen, 2b*-DONP+3a* kaplı sensör, 2b*-DONP kaplı olandan daha yüksek bir empedans sinyali verdi. Hekzil piridinyum işlevselliğinin varlığının sensör yüzeyinin biyosidal aktivitesini artırdığını ve daha iyi bir sinyalle sonuçlandığını düşündük. Ayrıca, tek

tip bir sinyalin elde edilmesini engelleyen demir nanopartiküllerin varlığı nedeniyle sinyalin yüksek potansiyel (> 0,1 mV) altında dalgalandığı da not edilmelidir.

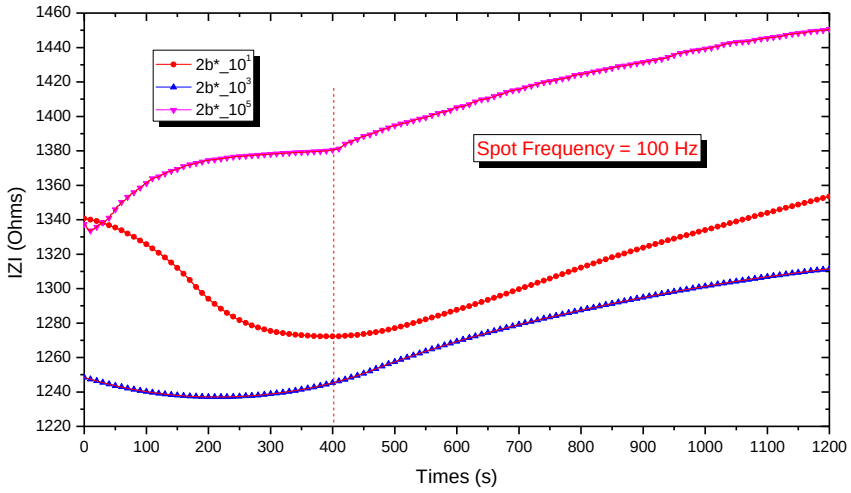
2b*-DONP ve 2b*-DONP+3a* polimer filmlerinin ölçüm sırasında elektrot yüzeyinden attığı tespit edildiği için maalesef zamana karşı empedans ölçümleri yapılamamıştır. Polimer filmin yüzeydeki kararlılığını artırmak için çapraz bağlı ajan (pentaeritritol tetrakis, yukarıda bahsedilmiştir) kullanılmasına ragmen yüzeye kuvvetli bağlanma kapsamında bir iyileşme olmamıştır.



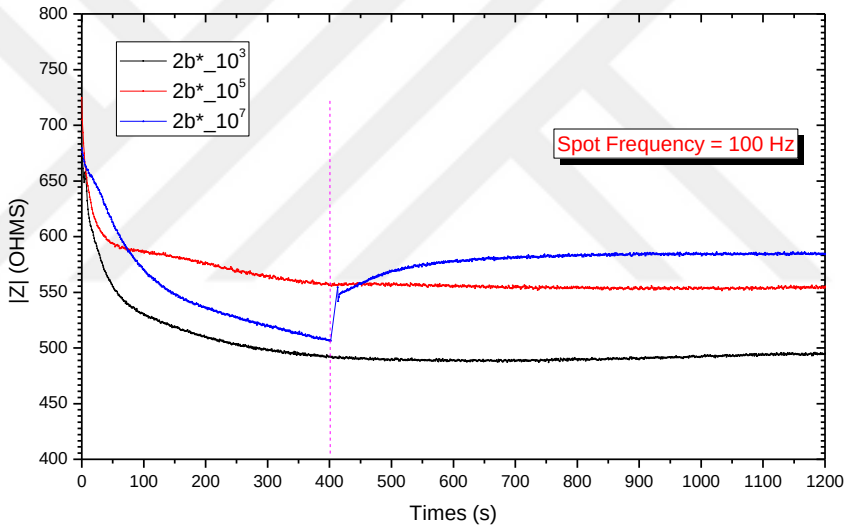
Şekil 6.103 2b* Kopolimerinin *S. aureus*'a karşı empedans-frekans grafiği



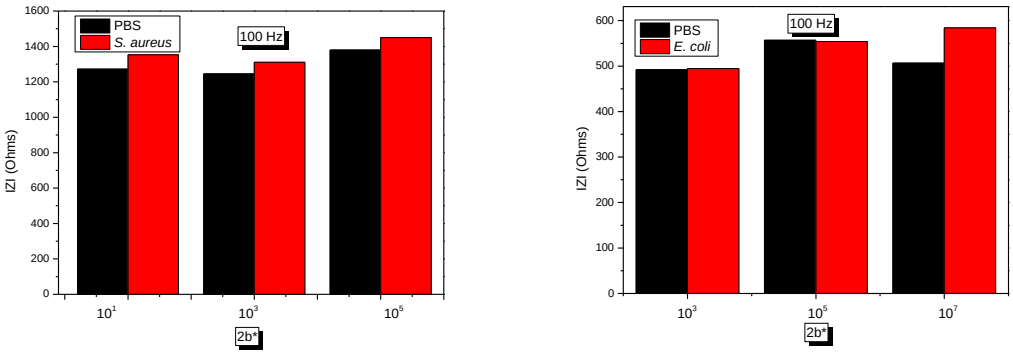
Şekil 6.104 2b* Kopolimerinin *E. coli*'ye karşı empedans-frekans grafiği



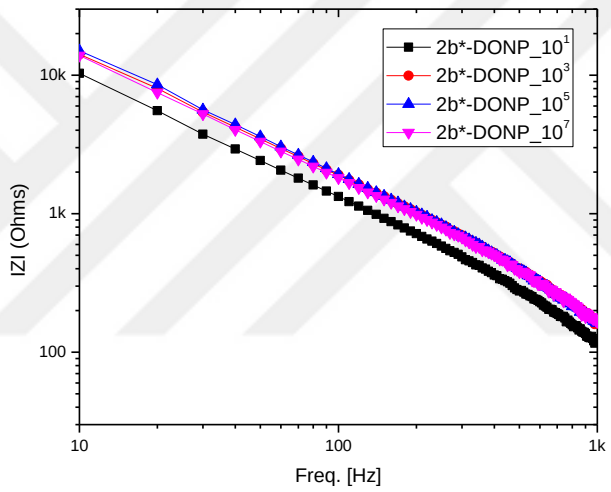
Şekil 6.105 2b* Kaplı elektrodun çeşitli konsantrasyonlardaki *S. aureus*'a karşı empedans-zaman grafiği



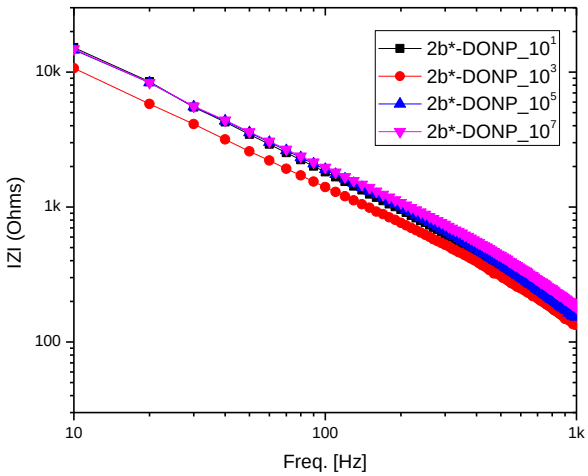
Şekil 6.106 2b* Kaplı elektrodun çeşitli konsantrasyonlardaki *E. coli*'ye karşı empedans-zaman grafiği



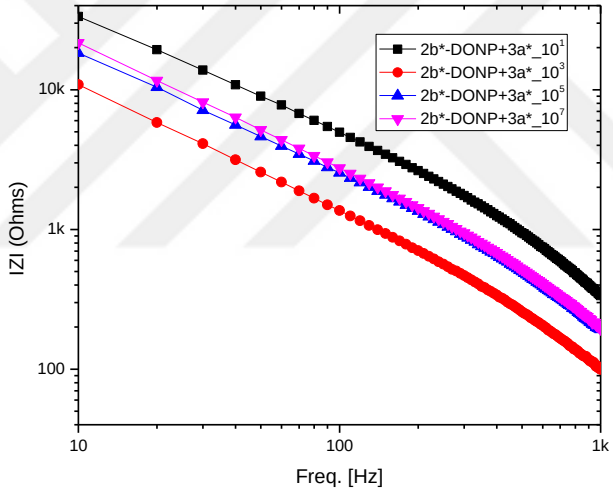
Şekil 6.107 Antibakteriyel polimer 2b* sensörünün sabit frekansta (100 Hz) çeşitli *S. aureus* ve *E. coli* konsantrasyonlarında gerçek zamanlı empedimetrik yanıtı



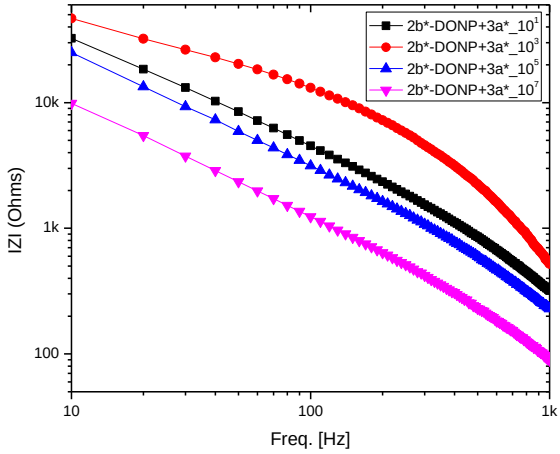
Şekil 6.108 2b*-DONP kopolimerinin *S. aureus*'a karşı empedans-frekans grafiği



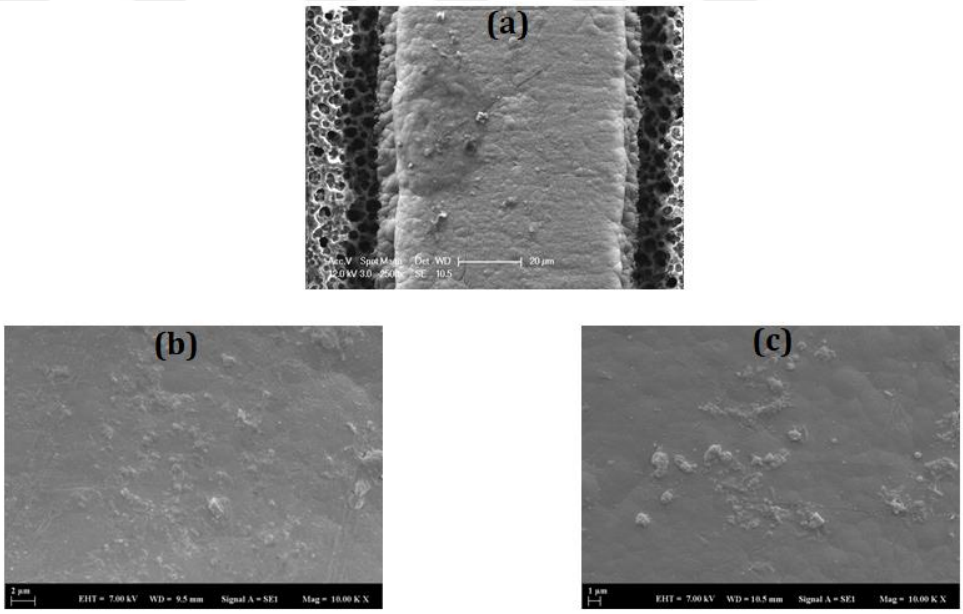
Şekil 6.109 2b*-DONP kopolimerinin *E. coli*'ye karşı empedans-frekans grafiği



Şekil 6.110 2b*-DONP+3a* kopolimerinin *S. aureus*'a karşı empedans-frekans grafiği



Şekil 6.111 2b*-DONP+3a* kopolimerinin *E. coli*'ye karşı empedans-frekans grafiği



Şekil 6.112 (a) 2b* kaplı elektrot yüzeyi (b) *S. aureus* ile kontamine edildikten sonra (c) *E. coli* ile kontamine edildikten sonraki 2b* kaplı elektrotların SEM görüntüleri

6.5.2 Poly B Serisi Empedans Sonuçları

Sırasıyla 4b ve 5b ile kaplanmış elektrot numunesi için 10 Hz ile 1 kHz arasındaki frekans değişimi ile empedans analizi yapılmıştır. Kopolimer 4b için Şekil 6.113 ve Şekil 6.114, 5b için Şekil 6.118 ve Şekil 6.119'da empedans-frekans grafikleri verilmiştir. 4b ve 5b kopolimer kaplı sensörlerin duyarlılığı, farklı bakteri (*E. coli*

ve *S. aureus*) konsantrasyonlarının (10^3, 10^5 ve 10^7 cfu/mL) varlığında araştırıldı. Her deneyde, boş bir numune (bakteri içermeyen PBS ortamı) ayrıca karşılaştırmalar için empedans okumalarına tabi tutuldu. Frekans değişimine göre empedans sonuçları daha düşük frekansta (100 Hz) maksimum değişiklikleri gösterdiğinden ve en iyi değişim 100 Hz'de görüldüğü için bu frekansta çalışılarak farklı bakteri ve konsantrasyonlarda zamana karşı empedans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Antibakteriyel 4b veya 5b kopolimeri ile kaplı altın elektrotlar 600 saniye boyunca PBS çözeltisinde bekletilerek ölçüm alınmıştır. 600 saniye sonrasında analiz ortamına farklı konsantrasyonlarda (10^3, 10^5 ve 10^7 cfu/mL) *E. coli* ve *S. aureus* eklenmiştir. Toplam analiz süresi her bir elektrot için 2400 saniyedir.

4b ve 5b kopolimerlerinin zamana karşı empedans değişimi grafikleri Şekil 6.115-94 ve Şekil 6.120-121'de verilmiştir. Empedans sonuçları, *S. aureus* veya *E. coli* örneklerinin enjeksiyonundan öncesi ve sonrası olarak incelenmiştir. Kopolimer 4b'yi incelediğimizde, *S. aureus* için 10^7 cfu/mL konsantrasyonunda sadece 291 Ω artış gözlemledik, *E. coli* için aynı konsantrasyonda 452 Ω artış vardı (sırasıyla Şekil 6.115 ve Şekil 6.116).

S. aureus için empedans sinyalleri, kopolimer 5b için sırasıyla 10^7 cfu/mL konsantrasyonunda 672 Ω artış ve 10^5 cfu/mL konsantrasyonunda 348 Ω artış gözlendi (Şekil 6.120). *E. coli* için empedans sinyallleri ise, 10^7 cfu/mL konsantrasyonunda 598 Ω artış ve 10^5 cfu/mL konsantrasyonunda ise 279 Ω artış olarak belirlendi (Şekil 6.121). Ayrıca, empedans sinyal sonuçlarının test edilen her iki bakteri türünün konsantrasyonu ile orantılı olduğunu gözlemledik. Empedans cevabındaki farklılığa, adezyon için polimerin eşik konsantrasyonu ve ilgili elektriksel özelliklerine yansıyabilen bakteriyel membranın bozulmasının bir sonucu olarak bağlanma kinetiği gibi birkaç faktör sebep olabilir. Hekzil piridinyum işlevselliğinin varlığının sensör yüzeyinin biyosidal aktivitesini artırdığını ve daha iyi bir sinyalle sonuçlandığını gördük.

Şekil 6.117'de antibakteriyel polimer 4b sensörünün, Şekil 6.122'de antibakteriyel 5b sesörünün sabit frekansta (100 Hz) çeşitli *S. aureus* ve *E. coli* konsantrasyonlarında empedans ölçüm sonuçlarının PBS ortamında ve bakteri

çözeltisi eklendikten sonraki karşılaştırılması verilmiştir. Şekil 6.122'de verilen sonuçlara göre 4b kaplı elektrotların empedans sinyalinin boşa kıyasla (PBS ortamı) *S. aureus* konsantrasyonunun artmasıyla logaritmik olarak arttığını göstermektedir. Empedans değişimlerinin, seri seyreltilmiş bakteri hücresinin konsantrasyonundaki artış ile doğru orantılı ve sinyallerin $10^7 > 10^5 > 10^3$ cfu/mL olduğu kaydedilmiştir. *S. aureus* için 4b antibakteriyel kopolimeri kaplı elektrot cihazının tespit sınırının mL başına 10^7 bakteri olduğu bulunmuştur ve bu, bakteriyel büyümeyi kontrol etmek için klinik olarak anlamlı olanın (mL başına 10^3 bakteri) altındadır [132]. Benzer şekilde, empedans değişimlerindeki büyüklüğün değişimi *E. coli* için de bakteri konsantrasyonu artışı ile orantılı ve $10^7 > 10^5 > 10^3$ cfu/mL şeklinde bulunmuştur. 10^3 cfu/mL *E. coli* konsantrasyonu ile PBS ortamını karşılaştırdığımızda, benzer sonuç vermis olup bir değişim görülmemiştir. *S. aureus*'ta ise aynı konsatrasyonda empedans artışı görülmüştür. Bu durum, *S. aureus*'un zaman içinde elektrot yüzeyine daha iyi yapışma özelliklerine bağlanabilir. Şekil 6.122'deki 5b antibakteriyel kopolimeri ile kaplı elektrodun empedans ölçüm sonuçlarındaki değişimin kopolimer 4b kaplı elektrot sonuçları ile benzer sonuç gösterdiği görülmüştür. Aynı şekilde bakteri konsatrasyonu arttıkça empedans değişim büyüklüğünün de doğru orantı ile arttığı ve daha düşük konsatrasyonlarda *S. aureus*'a karşı daha iyi sonuç verdiği görülmüştür.

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi ölçümleri yapıldıktan sonra elektrotların SEM analizi yapıdı. Şekil 6.125'te, kopolimer 5b kaplı 10^5 cfu/mL konsantrasyonundaki *S. aureus ve E. coli* ölçümleri sonrasındaki elektrot yüzeylerinin SEM görüntüleri görülmektedir. *S. aureus*'un elektrot üzerinde birikmesinden sonra yüzeyde artan bir deformasyona neden olduğunu görülmüştür. Bakterilerin ölümü nedeniyle organellerin yüzeye yayıldığı ve yüzey pürüzlülüğünün arttığı ve küçük tepeciklerin oluştuğu görülmüştür. Bu değişim *E. coli*'de net bir şekilde görülmemiştir.

E. coli ve *S. aureus* arasındaki yapısal farklılıklar, empedans sinyallerinde bir farkın gözlemlenmesine neden olmuştur. Gram-negatif bakterilerin (*E. coli*) ve Gram-pozitif bakterilerin (*S. aureus*) zar bileşimlerinin farklı olduğu bilinmektedir. *E. coli*

sitoplazması, bir fosfolipid iç zar, bir peptidoglikan duvarı ve bir anyonik dış lipid zarı ile çevrilidir. Buna karşılık, *S. aureus*'un sitoplazması, bir lipit membranı ve bir peptidoglikan tabakası ile çevrilidir. Bu nedenle, farklı membran ve sitoplazma yapılarıyla *S. aureus* ve *E. coli*'nin elektriksel özellikleri, farklı iletkenlik özelliklerinden dolayı farklıdır [11, 131]. Gram-pozitif bakteriler genellikle Gram-negatif bakterilerden daha yüksek bir K^+ içeriğine sahiptir, bu da *S. aureus*'un *E. coli*'den daha yüksek iç iletkenliğini açıklar [131]. Elektrolitik etkiler düşük frekanslarda (<1 kHz) önemli hale gelse de, polimer sensör üzerindeki adezyon kinetiği ve ölü bakterilerden anyonik fosfolipitlerin oluşumu da empedans sinyalinde önemli bir rol oynayabilir.

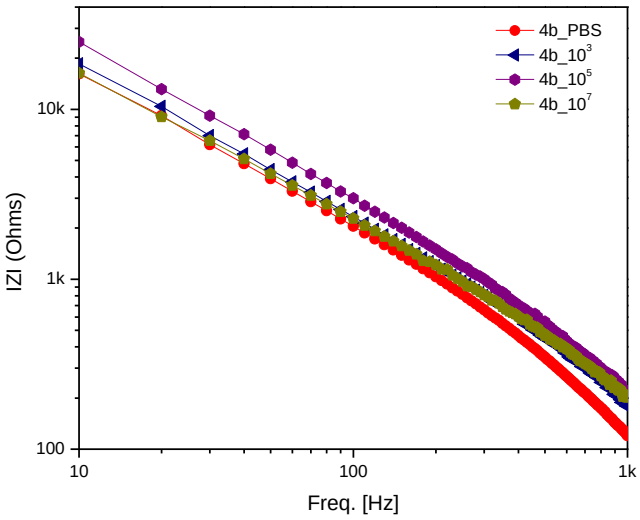
E. coli ve *S. aureus* için farklı empedimetrik yanıtlar, yüzeylerindeki farklı bağlanma reseptörlerine de kaynaklı olabilir. Örneğin, hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilerdeki man-PTSs reseptörleri, antibakteriyel peptitlere ve bakteriyofajlara bağlanır [133, 134]. Reseptörlerin lokal konsantrasyonları ve ekspresyon seviyelerindeki sapmalar, bakterisidal elektrot yüzeyinde farklı bağlanma hassasiyetlerine neden olur ve empedans sensörü yanıtlarında değişikliklere yol açar [13]. Yapışmış bakteri hücreleri, polimer sensör ile spesifik olmayan bir şekilde etkileşime girdiği ve dirençte bir artışa yol açan güçlü empedans değişikliklerine neden oluyor gibi görünmektedir. Polimer kaplı sensörün hassasiyeti, tampon konsantrasyonu veya ortam sıcaklığı veya bakteri konsantrasyonu gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. İletkenliği daha iyi kontrol etmek için deney, seyreltilmiş PBS çözeltisi ile gerçekleştirilebilir, ancak koşulları optimize etmek ve empedans sinyallerindeki farklılıkların nedenlerini araştırmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

6.5.2.1 Polimer Kaplı Elektrotların Süt ve Atık Suda Bakteri Tespiti Uygulaması

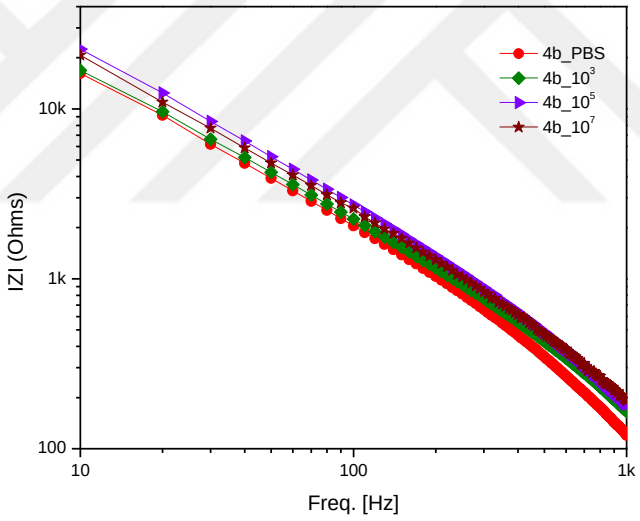
Polimer 5b kaplı sensör dizisinin gerçek hayattaki uygulamalarda uygulanabilirliğini kanıtlamak için kontamine süt örneklerinde bakteri tespiti için kullanıldı. Bu amaçla 7 mL süt örneğine 70 µL *S. aureus* veya *E. coli* solüsyonu yerleştirildi ve ardından bu solüsyonlara elektrot yerleştirildi. Ayrı bir deneyde elektrodu önce süt solüsyonunda 600 saniye inkübe ettik, daha sonra bu solüsyona

70 µL *S. aureus* solüsyonu ekledik. Bakterilerle kontamine olmuş süt numunesine karşı 5b kaplı elektrodun Empedans-Zaman grafiği, elektrodun yüksek empedans tepkisi vermediğini gösterdi. (Şekil 6.123) Sütü PBS ile karşılaştırdığımızda süt, içerdiği yağlar, şekerler, enzimler ve proteinler nedeniyle çok yüksek moleküler yoğunluğa sahiptir. Bu bileşenler maalesef elektrot yüzeyine bakterilerden önce yapışabilir ve yanlış pozitif veya negatif sonuçlara yol açabilir. Aynı sonuç, proteinlerin, enzimlerin, yağların, sütün bileşenlerinin birbirine bağlı elektrotların empedans tepkisini etkilediği ve dirençte bir artışa yol açtığı daha önce gösterilmiştir [13, 128-130]. Bununla birlikte, PBS ile seri seyreltme, uygun empedans sinyalini artırabileceği düşünülmektedir.

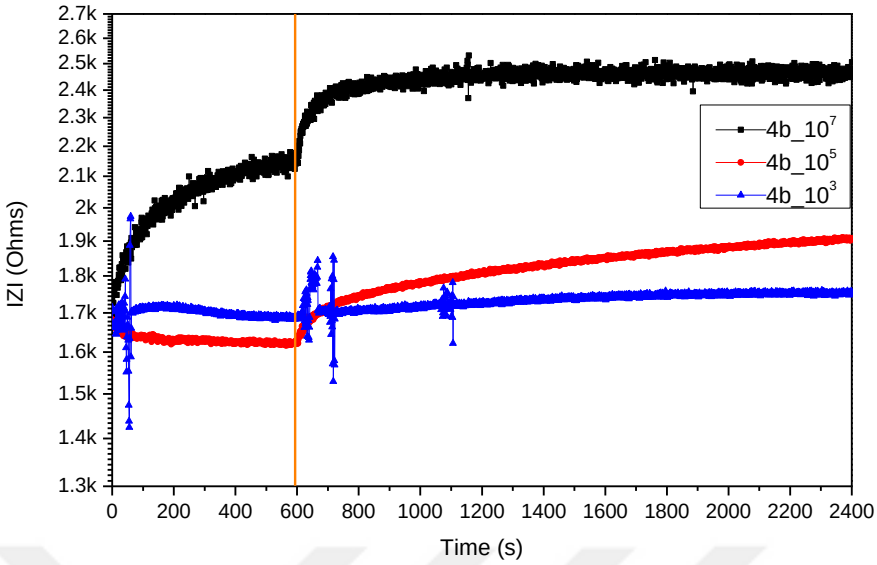
Ayrıca, büyükbaş sığır çiftliğinden alınan atık su numunesi ile 5b kopolimeri kaplı elektrodun 10^7 cfu/mL konsantrasyonundaki *S. aureus* ile empedans ölçümü yapılmıştır. (Şekil 6.124) Sensör, 600 saniye atık su numunesi içinde bekletildikten sonra ortam konsantrasyonu 10^7 cfu/mL olacak şekilde *S. aureus* eklenmiştir. Ortama bakteri eklenmesinden sonra empedans değerindeki değişim bakteri eklenmeden önceki empedans sinyali ile aynı doğrusallıkta olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebinin, ortama bakteri solüsyonu koyulmadan önce atık sudaki bakterilerin elektrot yüzeyine bağlandığı (600 saniye içinde yüksek oranda empedans değişimi olmuştur.) ve elektrot yüzeyindeki polimerin doygunluğa ulaşmış olmasıdır. Bu nedenle empedans sinyalinde artış görülmediği düşünülmektedir.



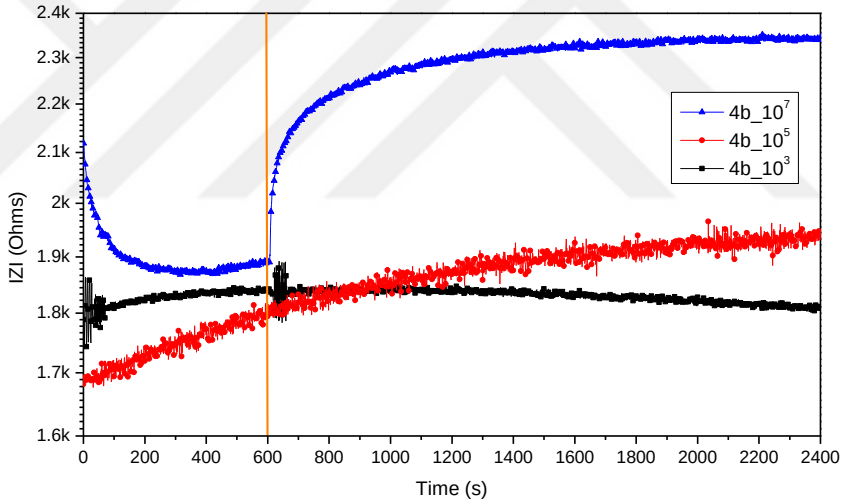
Şekil 6.113 4b kopolimerinin *S. aureus*'a karşı empedans-frekans grafiği



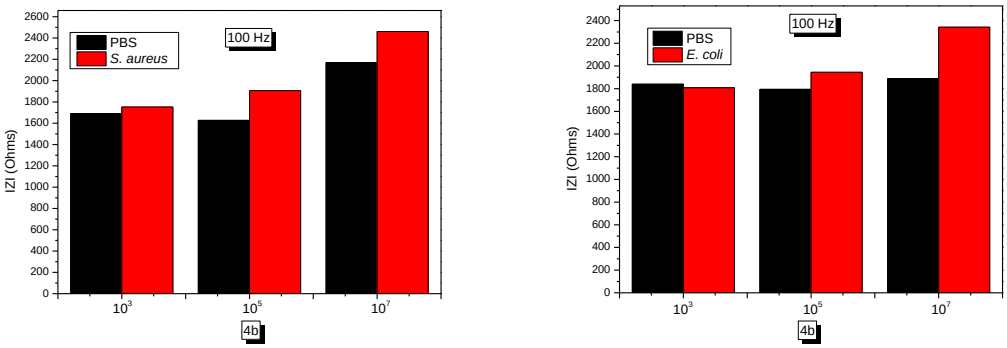
Şekil 6.114 4b kopolimerinin *E. coli*'ye karşı empedans-frekans grafiği



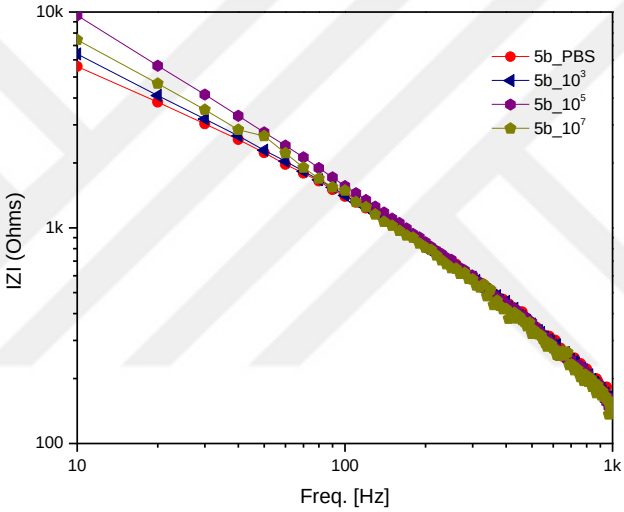
Şekil 6.115 4b Kaplı elektrodun çeşitli konsantrasyonlardaki *S. aureus*'a karşı empedans-zaman grafiği



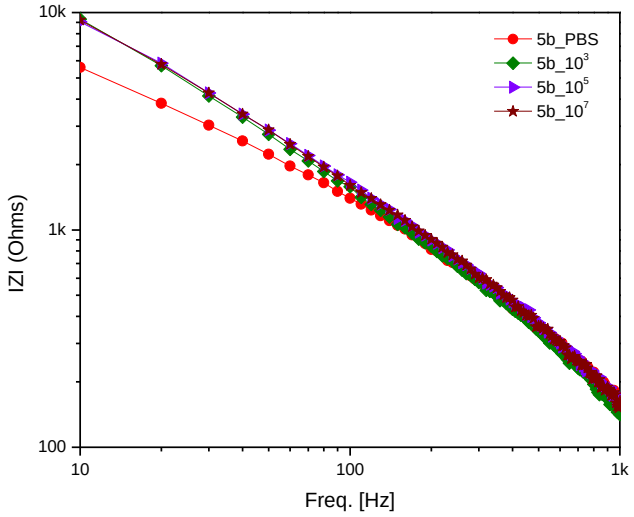
Şekil 6.116 4b Kaplı elektrodun çeşitli konsantrasyonlardaki *E. coli*'ye karşı empedans-zaman grafiği



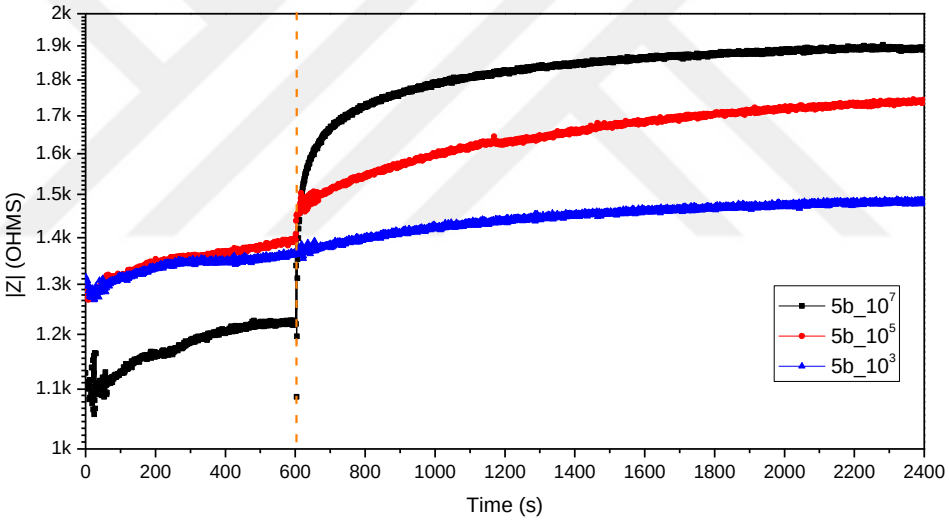
Şekil 6.117 Antibakteriyel polimer 4b sensörünün sabit frekansta (100 Hz) çeşitli *S. aureus* ve *E. coli* konsantrasyonlarında gerçek zamanlı empedimetrik yanıtı



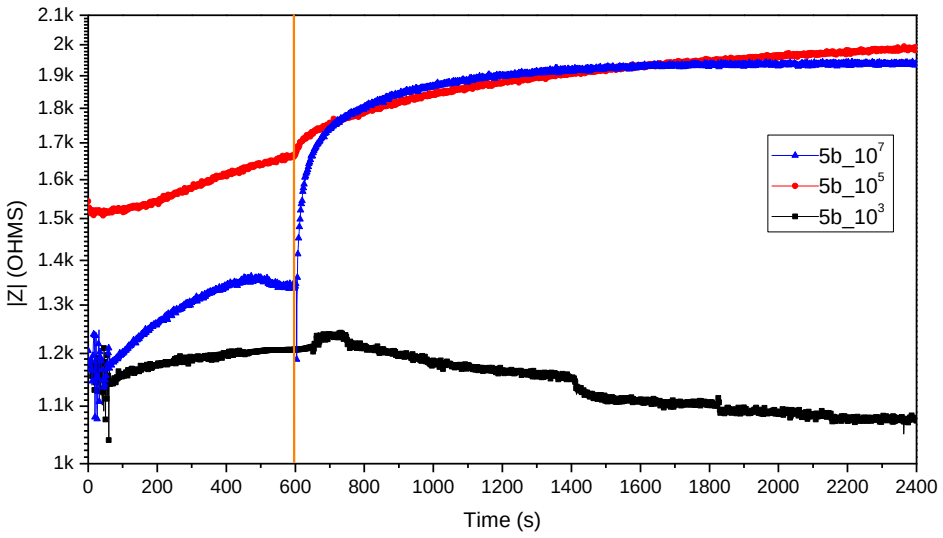
Şekil 6.118 5b kopolimerinin *S. aureus*'a karşı empedans-frekans grafiği



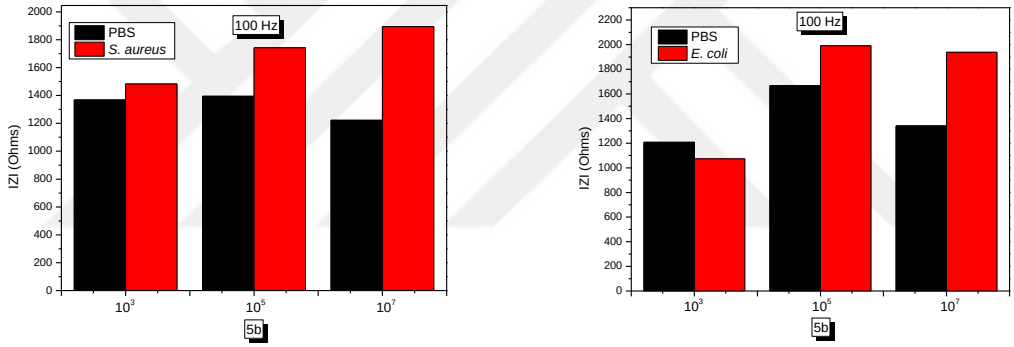
Şekil 6.119 5b kopolimerinin *E. coli*'ye karşı empedans-frekans grafiği



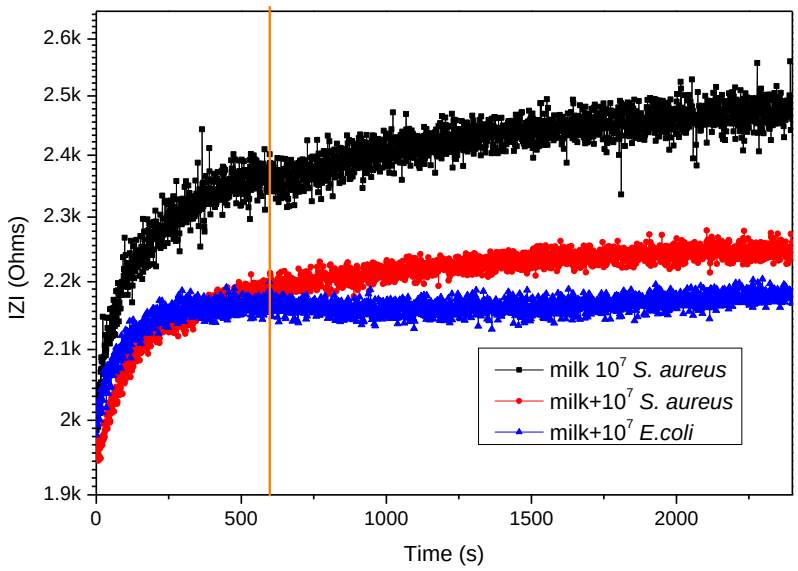
Şekil 6.120 5b Kaplı elektrodun çeşitli konsantrasyonlardaki *S. aureus*'a karşı empedans-zaman grafiği



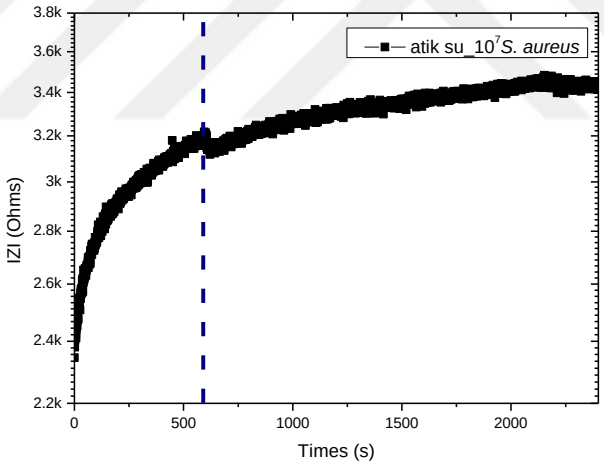
Şekil 6.121 5b Kaplı elektrodun çeşitli konsantrasyonlardaki *E. coli*'ye karşı empedans-zaman grafiği



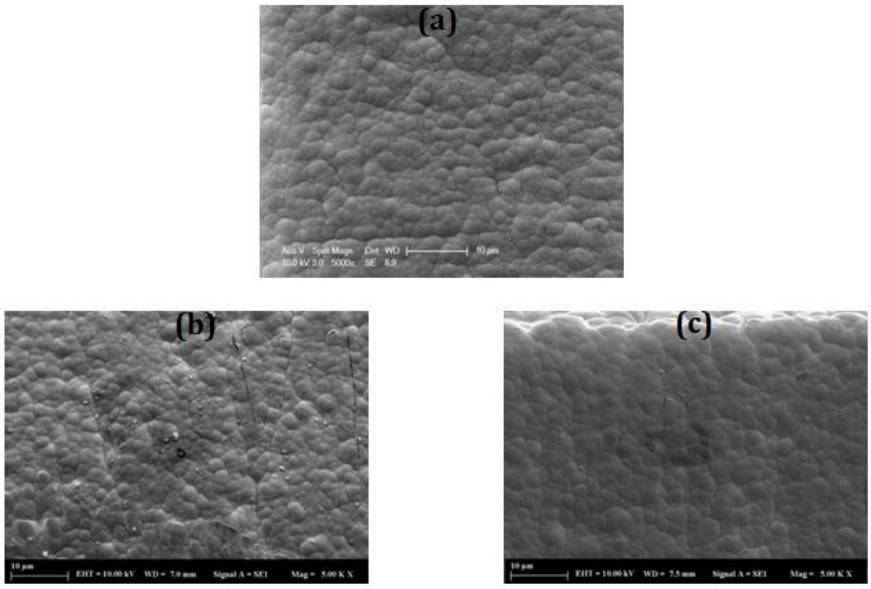
Şekil 6.122 Antibakteriyel polimer 5b sensörünün sabit frekansta (100 Hz) çeşitli *S. aureus* ve *E. coli* konsantrasyonlarında gerçek zamanlı empedimetrik yanıtı



Şekil 6.123 5b kopolimeri kaplı elektrodun bakteri kontamine süt örneğinin empedans-zaman grafiği (___):10^7 cfu/mL *S. aureus* 600. saniye eklendi (___):10^7 cfu/mL *S. aureus* kontamine süt örneği ölçümü (___):10^7 cfu/mL *E.coli* kontamine süt örneği ölçümü



Şekil 6.124 5b kopolimeri kaplı elektrodun atık suyun *S. aureus* ile kontaminasyonunun empedans-zaman grafiği



Şekil 6.125 (a) 5b kaplı elektrot yüzeyi (b*) S. aureus* ile kontamine edildikten sonra (c) *E. coli* ile kontamine edildikten sonraki 5b kaplı elektrotların SEM görüntüleri

6.6 Döngülü Voltametri Ölçümleri

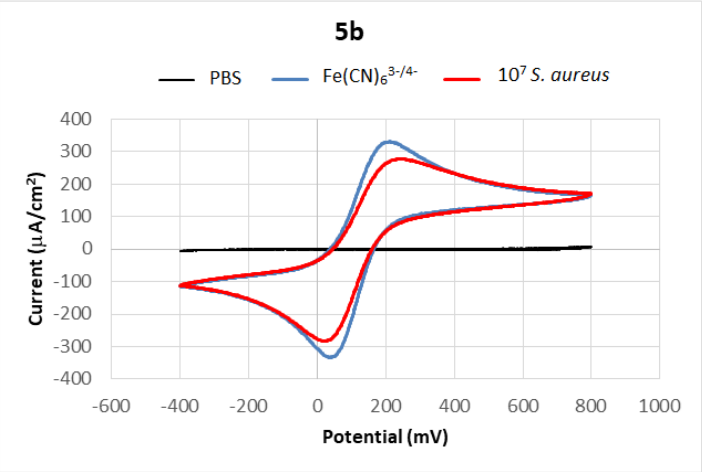
Döngüsel voltametri (CV) yöntemi, sensör yüzeyi ile solüsyondaki türler arasındaki elektron transfer özelliğini incelemede yararlı bir yöntemdir [64, 135]. Bu çalışmada, elektrot yüzeyine kaplanmış polimer film üzerindeki bakteriyel adsorpsiyonu incelemek için prob olarak $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks çifti seçilmiştir. Bakteri adsorbsiyonuyla redoks probunun elektrot yüzeyine penetrasyonu ve elektrodun yük transfer etkinliği azalacağından, $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks çiftine ait indirgenme/yükseltgenme pik şiddetinde azalma ve pik potansiyelleri arasında artış beklenmektedir. CV çalışmasında, IDEA, Pt tel ve kalomel (3 M KCl) elektrotları sırasıyla çalışan, yardımcı ve referans elektrot olarak kullanıldı. 0,01 M $K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi PBS içinde hazırlandı. 100 mV/s tarama hızında -400-(+800) mV aralığında döngüsel voltametri 5b polimer ile kaplanmış IDEA elektrotları ile kaydedildi. Daha sonra aynı koşulda kurulan CV deneyine sırasıyla 10^5 ve 10^7 cfu/mL olmak üzere iki farklı konsantrasyonda *S. aureus* ve *E. coli* solüsyonu ilave edildikten 15 dakika sonra kayıt altına alındı.

Bütün CV ölçümlerinde bakteri çözeltisi yerleştirildikten sonra pik şiddetinin azaldığı ve pik potansiyelleri arasındaki farkın arttığı görülmüştür. Pik

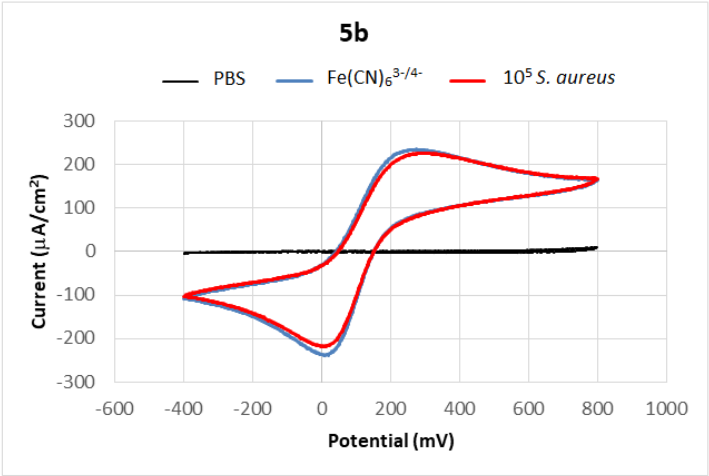
şiddetindeki azalışın en fazla 10^7 cfu/mL konsantrasyonundaki *E. coli* ve *S. aureus*'ta olduğu görülmüştür. (Şekil 6.126 ve Şekil 6.128) 5b kaplı elektrotta yaklaşık 200 mV ve 60 mV'de oksidasyon ve indirgeme piklerinin şiddeti, *E.coli* adsorpsiyonu ile azalır. (Şekil 6.128) Aynı eğilim, *E. coli*'den biraz daha düşük yanıtla *S. aureus* için de gözlenmektedir (Şekil 6.126). *E. coli*'nin polimer kaplı elektrotların yüzeyine daha verimli adsorbe edildiğini ve akımı azaltmak için bir yalıtım tabakası oluşturabileceğini düşünülmüştür.

10^5 cfu/mL bakteri çözeltisine karşı polimer kaplı elektrodun CV'leri de yapıldı. (Şekil 6.127 ve Şekil 6.129) Bununla birlikte, bakteri çözeltisinin yerleştirilmesinden sonra akımda küçük bir değişiklik gözlendi. Bu sonuç, yukarıda tartışılan empedans spektrumu ile paraleldir ve bakterilerin tespit limitinin 10^7 cfu/mL olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar yüzeyde bakteri adsorbsiyonun olduğuna ve bunun sonucu olarak redoks probunun elektroda penetrasyonunun ve yük transfer etkinliğinin azaldığına işaret etmektedir.

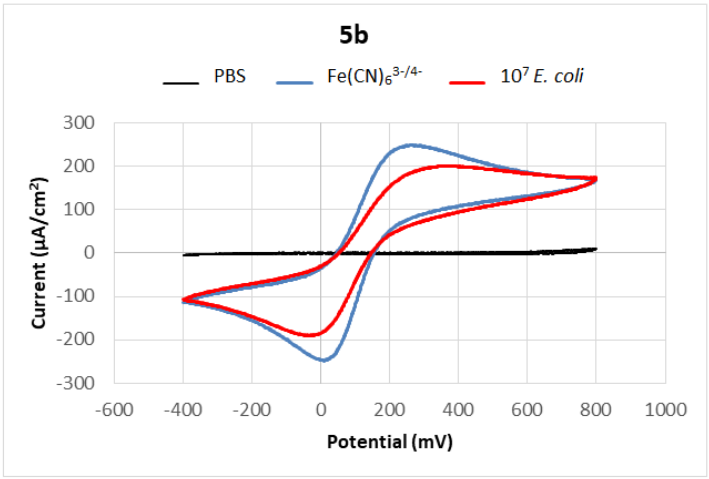
Ayrıca 5b kaplı elektrotun 10^5 cfu/mL konsantrasyonundaki *E. coli* ölçümünden sonra aynı elektrodun 10^7 cfu/mL *E. coli* içinde ölçümü yapılmıştır. Bu şekilde elektrotların tekrarlanabilirliği test edilmiştir. (Şekil 6.130)



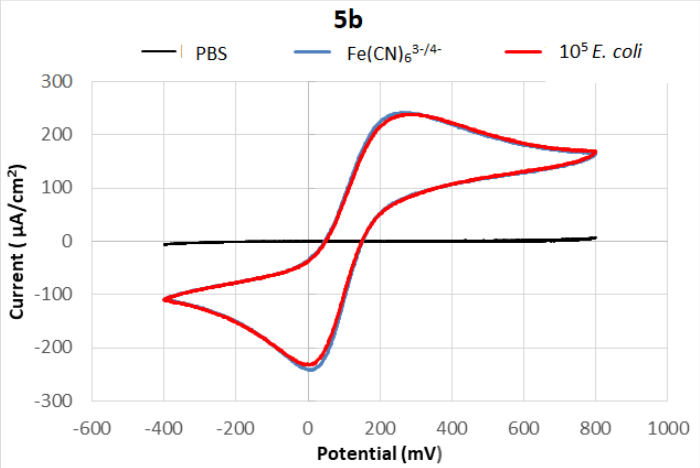
Şekil 6.126 (___): PBS tampon, 0,01 M $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks prob bakteri eklemeden önce (____) ve (___)10^7 cfu/mL *S. aureus* ile bekletildikten sonrası CV sonuçları



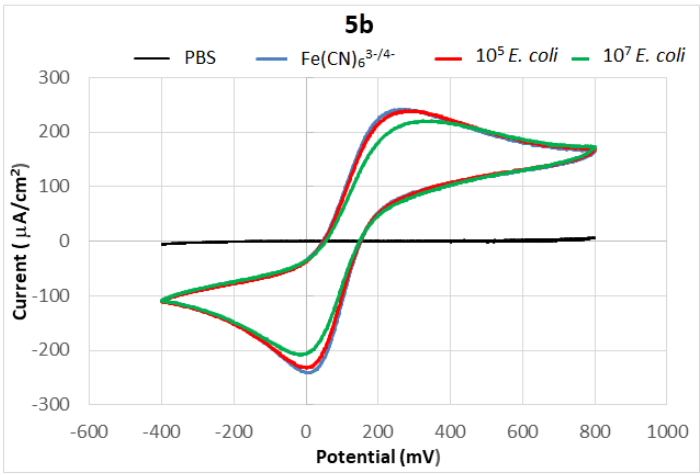
Şekil 6.127 (___): PBS tampon, 0,01 M $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks prob bakteri eklemeden önce (___) ve (___)10^5 cfu/mL *S. aureus* ile bekletildikten sonrası CV sonuçları



Şekil 6.128 (___): PBS tampon, 0,01 M $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks prob bakteri eklemeden önce (___) ve (___)10^7 cfu/mL *E. coli* ile bekletildikten sonrası CV sonuçları



Şekil 6.129 (___): PBS tampon, 0,01 M $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks prob bakteri eklemeden önce (____) ve (___)10^5 cfu/mL *E. coli* ile bekletildikten sonrası CV sonuçları



Şekil 6.130 (___): PBS tampon, 0,01 M $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks prob bakteri eklemeden önce (____) ve (___)10^7 cfu/mL *E. coli* ile ve (___)10^5 cfu/mL *E. coli* ile bekletildikten sonrası CV sonuçları

7
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ROMP'dan türetilen antibakteriyel katyonik polimerler kullanılarak gerçek zamanlı, etiketsiz (label-free) saptamaya dayalı olarak geliştirilmiş bir impedimetrik biyosensör platformu kullanarak *S. aureus* ve *E. coli'*nin saptanması için yeni bir yöntem sunulmuştur. Çalışmanın ilk bölümünde, farklı katyonik blok ve rastgele kopolimerler sentezlenmiş ve bunların biyosidal aktiviteleri bir cam yüzey üzerinde analiz edilmiştir. Bu kapsamda 2 farklı polimer serisi (Poly A ve Poly B) sentezlenmiştir. Poly A serisi trifenil fosfonyum veya hekzil piridinyum ve fosfonik asit esaslıdır. Poly B serisi ise trifenil fosfonyum veya hekzil piridinyum ve thiol asetat esaslıdır. Poly A serisinde, trifenil fosfonyum-fosfonik asit grubu içeren polimer 2b*, *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı en yüksek aktiviteyi sırasıyla % 55 ve % 47 öldürerek gösterdi. Poly B serisinde, trifenil fosfonyum-tiyolasetat (4b) ve hekzil piridinyum-tiyolasetat (5b) grubu içeren kopolimerler ise sırasıyla *S. aureus*'a % 99,996 ve % 99,999; *E.coli*'ye karşı ise % 99,98 ve % 99,989 antibakteriyel etkinlik gösterdi. Poly A ve Poly B serisinin empedans sinyal özelliğini artırmak için demir nanopartikül ve altın nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiş ve polimerler ile kaplanmıştır. Bu kapsamda Poly A serisi fosfonik asit içermesi sebebi ile demir nanopartikül ile kaplanmış, Poly B serisi ise tiyol asetat grubu olması sebebi ile altın nanopartikül ile kaplanmıştır. Polimerlere altın nanopartikül bağlanmasından sonra antibakteriyel etkinliğin kaybolduğu görüldü. Demir oksit nanopartikülü bağlanması sonunda ise antibakteriyel etkinliklerinde az bir düşüş olduğu görüldü.

Poly A serisinden (2b*) ve Poly B serisinden (4b ve 5b) en aktif bulunan polimerler 2b* 4b ve 5b elektrot yüzeyine kaplanmış ve sensör özellikleri incelenmiştir. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi ve döngüsel voltametri metotları ile bakteri sensörü çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada polimer kaplı elektrotların PBS örneklerinde *E. coli* ve *S. aureus*'u nasıl tespit edebildiğini gösterilmiştir. Farklı bakteri konsantrasyonu, farklı bakteri türlerinin sinyale etkisi incelenmiştir.

Bununla birlikte, yeterli hassasiyetle daha iyi bir saptama sınırı (LOD) elde etmek için sinyal/gürültü oranının arttırılması gerektiği tespit edilmiştir.

Poly A serisinden 2b* polimeri ile yapılan elektrokimyasal empedans spektroskopisi çalışmasında empedans değerinin *S. aureus* konsantrasyonunun artmasıyla logaritmik olarak artmadığı görülmüştür. 10^1 cfu/mL konsantrasyonunda empedans sinyalinde 81 Ω artış, 10^3 cfu/mL konsantrasyonunda 66 Ω, 10^5 cfu/mL konsantrasyonunda ise 70 Ω artış görülmüştür. 2b* kaplı elektrotların *E. coli* için zamana karşı empedans ölçümlerinde ise sadece 10^7 cfu/mL konsatrasyonunda empedans artışı görülmüştür ve bu değer 78 Ω olarak tespit edilmiştir.

Poly B serisinden çalışılan 4b ve 5b kopolimerinin her ikisinin de empedans değerlerinin analiz sonucunda her iki bakteri türüne göre ortamdaki bakteri konsatrasyonuna bağlı olarak logaritmik arttığı görülmüştür. Biyosensör, 5b için 10^7 cfu/mL saptama sınırı (LOD) ile Gram-pozitif (*S. aureus*) ve Gram-negatif (*E. coli*) bakteri konsantrasyonlarını tespit edebilmiştir. Kopolimer 4b'yi incelediğimizde, *S. aureus* için 10^7 cfu/mL konsantrasyonunda sadece 291 Ω artış görülmüştür, *E. coli* için ise aynı konsantrasyonda 452 Ω artış gözlendi. *S. aureus* için empedans sinyalleri, kopolimer 5b için sırasıyla 10^7 cfu/mL konsantrasyonunda 672 Ω artış ve 10^5 cfu/mL konsantrasyonunda 348 Ω artış gözlendi. *E. coli* için empedans sinyallleri ise, 10^7 cfu/mL konsantrasyonunda 598 Ω artış ve 10^5 cfu/mL konsantrasyonunda ise 279 Ω artış olarak belirlendi. Hekzil piridinyum işlevselliğinin varlığının sensör yüzeyinin biyosidal aktivitesini artırdığını ve daha iyi bir sinyalle sonuçlandığı görüldü.

Poly A ve Poly B serilerinin içinden empedans ölçümlerine göre en iyi sonuç veren kopolimer 5b kaplı elektrotlar için 10^7 ve 10^5 cfu/mL konsatrasyonunda *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı CV ölçümleri yapılmıştır. Empedans ölçümlerine paralel sonuç olarak LOD olarak 10^7 cfu/mL bulunmuştur.

Ayrıca 5b kopolimeri kaplı elektrotların süt ve atık su numunelerinde bakteri analizi çalışması yapılmış fakat başarılı bir sonuç elde edilememiştir.

Bu sonuçlar, polimer kaplı elektrotun duyarlılığını artırmak için optimize edilmesi gerektiğini göstermektedir. Farklı katyonik veya karbonhidrat işlevsellikleri ve hidrofobik özelliği daha yüksek moleküler ağırlıklı polimerler, elektrot performansını arttırabilir. Çalışma kapsamında literatüre ilk defa doğal peptit türevlerinin takliti olan sentetik polimerlerin bakteri sensörü olarak kullanılması sunulmuştur. Polimerlerin daha kolay sentezlenmesi ve fizyolojik ortamlarda daha kararlı olması sebebi ile bakteri sensöür uygulamasında önemli bir avantajının olacağı öngörülmektedir.

KAYNAKÇA

[1] X. Liu, M. Marrakchi, D. Xu, H. Dong, and S. Andreescu, "Biosensors based on modularly designed synthetic peptides for recognition, detection and live/dead differentiation of pathogenic bacteria," *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 80, pp. 9-16, 2016.

[2] D. Kwon, J. Joo, J. Lee, K.-H. Park, and S. Jeon, "Magnetophoretic chromatography for the detection of pathogenic bacteria with the naked eye," *Analytical chemistry,* vol. 85, pp. 7594-7598, 2013.

[3] M.-M. Sadat Ebrahimi, Y. Voss, and H. Schönherr, "Rapid detection of Escherichia coli via enzymatically triggered reactions in self-reporting chitosan hydrogels," *ACS applied materials & interfaces,* vol. 7, pp. 20190-20199, 2015.

[4] J. L. de Miranda, M. D. Oliveira, I. S. Oliveira, I. A. Frias, O. L. Franco, and C. A. Andrade, "A simple nanostructured biosensor based on clavanin A antimicrobial peptide for gram-negative bacteria detection," *Biochemical Engineering Journal,* vol. 124, pp. 108-114, 2017.

[5] M. Roy, M. Bhatt, V. Maurya, S. Arya, R. Gaind, and H. Chellani, "Changing trend in bacterial etiology and antibiotic resistance in sepsis of intramural neonates at a tertiary care hospital," *Journal of postgraduate medicine,* vol. 63, p. 162, 2017.

[6] P. B. Lillehoj, C. W. Kaplan, J. He, W. Shi, and C.-M. Ho, "Rapid, electrical impedance detection of bacterial pathogens using immobilized antimicrobial peptides," *Journal of laboratory automation,* vol. 19, pp. 42-49, 2014.

[7] C. f. D. C. a. Preventation. (10 May 2019). *Salmonella*. Available: https://www.cdc.gov/salmonella/index.html

[8] (11 May 2019). *Salmonella Litigation Sources Water*. Available: https://salmonellalitigation.com/salmonella-sources/water-1

[9] A. Kulinkina, E. Shinee, B. R. G. Herrador, K. Nygard, and O. Schmoll, "The situation of water-related infectious diseases in the pan-European region," 2016.

[10] P. C. Ray, S. A. Khan, A. K. Singh, D. Senapati, and Z. Fan, "Nanomaterials for targeted detection and photothermal killing of bacteria," *Chemical Society Reviews,* vol. 41, pp. 3193-3209, 2012.

[11] C. H. Clausen, M. Dimaki, C. V. Bertelsen, G. E. Skands, R. Rodriguez-Trujillo, J. D. Thomsen*, et al.*, "Bacteria detection and differentiation using impedance flow cytometry," *Sensors,* vol. 18, p. 3496, 2018.

[12] J. Ji, J. A. Schanzle, and M. B. Tabacco, "Real-time detection of bacterial contamination in dynamic aqueous environments using optical sensors," *Analytical chemistry,* vol. 76, pp. 1411-1418, 2004.

[13] H. Etayash, K. Jiang, T. Thundat, and K. Kaur, "Impedimetric detection of pathogenic gram-positive bacteria using an antimicrobial peptide from class IIa bacteriocins," *Analytical chemistry,* vol. 86, pp. 1693-1700, 2014.

[14] J. Osek and P. Gallien, "Molecular analysis of Escherichia coli O157 strains isolated from cattle and pigs by the use of PCR and pulsed-field gel electrophoresis methods," *VETERINARNI MEDICINA-PRAHA-,* vol. 47, pp. 149-158, 2002.

[15] P. Daly, T. Collier, and S. Doyle, "PCR-ELISA detection of Escherichia coli in milk," *Letters in Applied Microbiology,* vol. 34, pp. 222-226, 2002.

[16] D. Ivanov, "BioMEMS Sensor Systems for Bacterial Infection Detection," *BioDrugs,* vol. 20, pp. 351-356, 2006.

[17] S. M. Radke and E. C. Alocilja, "A high density microelectrode array biosensor for detection of E. coli O157: H7," *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 20, pp. 1662-1667, 2005.

[18] O. R. Miranda, X. Li, L. Garcia-Gonzalez, Z.-J. Zhu, B. Yan, U. H. Bunz*, et al.*, "Colorimetric bacteria sensing using a supramolecular enzyme–nanoparticle biosensor," *Journal of the American Chemical Society,* vol. 133, pp. 9650-9653, 2011.

[19] M. S. Mannoor, S. Zhang, A. J. Link, and M. C. McAlpine, "Electrical detection of pathogenic bacteria via immobilized antimicrobial peptides," *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 107, pp. 19207-19212, 2010.

[20] H. Jiang, D. Jiang, J. Shao, and X. Sun, "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,* vol. 75, pp. 411-419, 2016.

[21] Y. Li, R. Afrasiabi, F. Fathi, N. Wang, C. Xiang, R. Love*, et al.*, "Impedance based detection of pathogenic E. coli O157: H7 using a ferrocene-antimicrobial peptide modified biosensor," *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 58, pp. 193-199, 2014.

[22] C. A. Andrade, J. M. Nascimento, I. S. Oliveira, C. V. de Oliveira, C. P. de Melo, O. L. Franco*, et al.*, "Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavanin A for bacterial detection," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* vol. 135, pp. 833-839, 2015.

[23] N. I. Khan and E. Song, "Lab-on-a-chip systems for aptamer-based biosensing," *Micromachines,* vol. 11, p. 220, 2020.

[24] T. Mocan, C. T. Matea, T. Pop, O. Mosteanu, A. D. Buzoianu, C. Puia*, et al.*, "Development of nanoparticle-based optical sensors for pathogenic bacterial detection," *Journal of nanobiotechnology,* vol. 15, p. 25, 2017.

[25] J. Chen, S. M. Andler, J. M. Goddard, S. R. Nugen, and V. M. Rotello, "Integrating recognition elements with nanomaterials for bacteria sensing," *Chemical Society Reviews,* vol. 46, pp. 1272-1283, 2017.

[26] M. Magro and F. Vianello, "Bare iron oxide nanoparticles: Surface tunability for biomedical, sensing and environmental applications," *Nanomaterials,* vol. 9, p. 1608, 2019.

[27] V. Urbanova, M. Magro, A. Gedanken, D. Baratella, F. Vianello, and R. Zboril, "Nanocrystalline iron oxides, composites, and related materials as a platform for electrochemical, magnetic, and chemical biosensors," *Chemistry of Materials,* vol. 26, pp. 6653-6673, 2014.

[28] W. Wu, Z. Wu, T. Yu, C. Jiang, and W.-S. Kim, "Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications," *Science and technology of advanced materials,* 2015.

[29] D. Bhattacharya, S. P. Chakraborty, A. Pramanik, A. Baksi, S. Roy, T. K. Maiti*, et al.*, "Detection of total count of Staphylococcus aureus using anti-toxin antibody labelled gold magnetite nanocomposites: a novel tool for capture, detection and bacterial separation," *Journal of Materials Chemistry,* vol. 21, pp. 17273-17282, 2011.

[30] S. Brosel-Oliu, N. Uria, N. Abramova, and A. Bratov, "Impedimetric sensors for bacteria detection," *Biosens. Micro Nanoscale Appl,* 2015.

[31] M. R. Yeaman and N. Y. Yount, "Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance," *Pharmacological reviews,* vol. 55, pp. 27-55, 2003.

[32] H. G. Sahl, U. Pag, S. Bonness, S. Wagner, N. Antcheva, and A. Tossi, "Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity," *Journal of leukocyte biology,* vol. 77, pp. 466-475, 2005.

[33] M. Cytryńska and A. Zdybicka-Barabas, "Defense peptides: recent developments," *Biomolecular Concepts,* vol. 6, pp. 237-251, 2015.

[34] K. Jiang, H. Etayash, S. Azmi, S. Naicker, M. Hassanpourfard, P. M. Shaibani*, et al.*, "Rapid label-free detection of E. coli using antimicrobial peptide assisted impedance spectroscopy," *Analytical Methods,* vol. 7, pp. 9744-9748, 2015.

[35] Q. Li, Y. Wu, H. Lu, X. Wu, S. Chen, N. Song*, et al.*, "Construction of supramolecular nanoassembly for responsive bacterial elimination and effective bacterial detection," *ACS applied materials & interfaces,* vol. 9, pp. 10180-10189, 2017.

[36] Y. Lvov, K. Ariga, I. Ichinose, and T. Kunitake, "Molecular film assembly via layer-by-layer adsorption of oppositely charged macromolecules (linear polymer, protein and clay) and concanavalin A and glycogen," *Thin solid films,* vol. 284, pp. 797-801, 1996.

[37] A. Vidyasagar, "What are bacteria," *Live Science,* 2015.

[38] F. Bektaşlı, "Fen ve Biyoloji Öğretmen Adaylarının Arkebakteri, Bakteri ve Protista Âlemleri Hakkındaki Bilgi Düzeyleri ve Kavram Yanılgıları," Eğitim Bilimleri Enstitüsü, 2018.

[39] A. J. Kluyver and C. B. Van Niel, "Prospects for a natural system of classification of bacteria," *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene,* vol. 94, pp. 369-403, 1936.

[40] K. H. Schleifer, "Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future," *Systematic and applied microbiology,* vol. 32, pp. 533-542, 2009.

[41] J. W. Bartholomew and T. Mittwer, "The gram stain," *Bacteriological reviews,* vol. 16, p. 1, 1952.

[42] F. Lowy, "Bacterial classification, structure and function," *New York, USA: Columbia University,* pp. 1-6, 2009.

[43] I. Alkasher and W. Badi, "GRAM-POSITIVE VS GRAM-NEGATIVE," 2020.

[44] P. B. Bannigidad, "Analysis of Flagellar Movements of Bacterial Cells using Digital Image Processing Techniques," *International Journal of Advanced Research in Computer Science,* vol. 5, 2014.

[45] H. Rogers, "Bacterial cell structure," *AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, D. C.(USA). 1983.,* 1983.

[46] S. Baron, "Structure--Medical Microbiology," 1996.

[47] K. Atanasova, "Interactions between porcine respiratory coronavirus and bacterial cell wall toxins in the lungs of pigs," Ghent University, 2010.

[48] G. Tortora, B. Funke, and C. Case, "Functional anatomy of prokaryotic and eukaryotic cells," *Microbiology-An Introduction. Pearson Education,* pp. 113-118, 2004.

[49] H. Bağlan, "Bakteri ve Yapısı," *Güncel Gastroenteroloji,* vol. 7, pp. 226-232, 2003.

[50] J. Katsaras and T. Gutberlet, *Lipid bilayers: Structure and interactions*: Springer Science & Business Media, 2013.

[51] E. Altay, "ROMP(ring opening metathesis polymerization) metodu ile katyonik polinorbornen türevlerinin sentezi, karakterizasyonu ve antimikrobiyal etkinliğinİn incelenmesi," Yükseklisans Tezi, Kimya, YTÜ, 2013.

[52] G. J. Gabriel, A. Som, A. E. Madkour, T. Eren, and G. N. Tew, "Infectious disease: connecting innate immunity to biocidal polymers," *Materials Science and Engineering: R: Reports,* vol. 57, pp. 28-64, 2007.

[53] S. Ryding. (2020). *What are electrochemical biosensors?* Available: https://www.news-medical.net/life-sciences/What-are-Electrochemical-Biosensors.aspx?showform=printpdf

[54] L. C. Clark Jr and C. Lyons, "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery," *Annals of the New York Academy of sciences,* vol. 102, pp. 29-45, 1962.

[55] K. Dziąbowska, E. Czaczyk, and D. Nidzworski, "Application of electrochemical methods in biosensing technologies," *Biosensing Technologies for the Detection of Pathogens-A Prospective Way for Rapid Analysis,* 2017.

[56] F. Bettazzi, G. Marrazza, M. Minunni, I. Palchetti, and S. Scarano, "Biosensors and related bioanalytical tools," *Comprehensive Analytical Chemistry,* vol. 77, pp. 1-33, 2017.

[57] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, and E. Reimhult, "Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures," *Sensors,* vol. 8, pp. 1400-1458, 2008.

[58] C. Karunakaran, K. Bhargava, and R. Benjamin, *Biosensors and bioelectronics*: Elsevier, 2015.

[59] R. Chand, D. Han, and Y.-S. Kim, "Voltammetric analysis on a disposable microfluidic electrochemical cell," *Bulletin of Korean Chemical Society,* vol. 34, pp. 1175-1180, 2013.

[60] J. Pacheco, M. Barroso, H. Nouws, S. Morais, and C. Delerue-Matos, "Biosensors," in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, ed: Elsevier, 2017, pp. 627-648.

[61] K. Yamanaka, M. d. C. Vestergaard, and E. Tamiya, "Printable electrochemical biosensors: a focus on screen-printed electrodes and their application," *Sensors,* vol. 16, p. 1761, 2016.

[62] A. Salek-Maghsoudi, F. Vakhshiteh, R. Torabi, S. Hassani, M. R. Ganjali, P. Norouzi*, et al.*, "Recent advances in biosensor technology in assessment of early diabetes biomarkers," *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 99, pp. 122-135, 2018.

[63] R. L. Caygill, G. E. Blair, and P. A. Millner, "A review on viral biosensors to detect human pathogens," *Analytica chimica acta,* vol. 681, pp. 8-15, 2010.

[64] N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart, and J. L. Dempsey, "A practical beginner's guide to cyclic voltammetry," *Journal of Chemical Education,* vol. 95, pp. 197-206, 2018.

[65] A. Veloso, X. Cheng, and K. Kerman, "Electrochemical biosensors for medical applications," in *Biosensors for medical applications*, ed: Elsevier, 2012, pp. 3-40.

[66] L. Yang and R. Bashir, "Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria," *Biotechnology advances,* vol. 26, pp. 135-150, 2008.

[67] V. F. Lvovich, "Fundamentals of electrochemical impedance spectroscopy," *Impedance spectroscopy. New York: Wiley,* pp. 1-21, 2012.

[68] M. E. Orazem and B. Tribollet, "Electrochemical impedance spectroscopy," *New Jersey,* 2008.

[69] T. Lakshmipriya and S. C. Gopinath, "An introduction to biosensors and biomolecules," in *Nanobiosensors for Biomolecular Targeting*, ed: Elsevier, 2019, pp. 1-21.

[70] M. S. Verma, J. L. Rogowski, L. Jones, and F. X. Gu, "Colorimetric biosensing of pathogens using gold nanoparticles," *Biotechnology advances,* vol. 33, pp. 666-680, 2015.

[71] R. Săndulescu, M. Tertis, C. Cristea, and E. Bodoki, "New materials for the construction of electrochemical biosensors," *Biosensors-Micro and Nanoscale Applications,* pp. 1-36, 2015.

[72] G. Maduraiveeran, "Bionanomaterial-based electrochemical biosensing platforms for biomedical applications," *Analytical Methods,* vol. 12, pp. 1688-1701, 2020.

[73] R. Bhadoria and H. S. Chaudhary, "Recent advances of biosensors in biomedical sciences," *International Journal of Drug Delivery,* vol. 3, p. 571, 2011.

[74] J. Wang, "Electrochemical biosensing based on noble metal nanoparticles," *Microchimica Acta,* vol. 177, pp. 245-270, 2012.

[75] U. Frenzel and O. Nuyken, "Ruthenium-based metathesis initiators: Development and use in ring-opening metathesis polymerization," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry,* vol. 40, pp. 2895-2916, 2002.

[76] K. J. Ivin and J. C. Mol, *Olefin metathesis and metathesis polymerization*: Elsevier, 1997.

[77] D. Smith, E. B. Pentzer, and S. T. Nguyen, "Bioactive and therapeutic ROMP polymers," *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews,* vol. 47, pp. 419-459, 2007.

[78] M. L. Randall and M. L. Snapper, "Selective olefin metatheses—new tools for the organic chemist: A review," *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical,* vol. 133, pp. 29-40, 1998.

[79] A. H. Müller and K. Matyjaszewski, "Controlled and living polymerizations," *From Mechanisms to Applications,* pp. 555-597, 2009.

[80] U. Frenzel, B. K. Müller, and O. Nuyken, "Metathesis Polymerization of Cycloolefins," *Handbook of Polymer Synthesis,* pp. 381-426, 2004.

[81] H. Eleuterio, "German Patent 1,072,811 (1960)," in *Chem. Abstr*, 1961, p. 16005.

[82] N. Calderon, H. Y. Chen, and K. W. Scott, "Olefin metathesis-A novel reaction for skeletal transformations of unsaturated hydrocarbons," *Tetrahedron Letters,* vol. 8, pp. 3327-3329, 1967.

[83] R. H. Grubbs, "ROMP with stable initiators," 2013.

[84] I. Choinopoulos, "Grubbs' and Schrock's Catalysts, Ring Opening Metathesis Polymerization and Molecular Brushes—Synthesis, Characterization, Properties and Applications," *Polymers,* vol. 11, p. 298, 2019.

[85] R. R. Schrock, "Multiple metal–carbon bonds for catalytic metathesis reactions (Nobel lecture)," *Angewandte Chemie International Edition,* vol. 45, pp. 3748-3759, 2006.

[86] R. H. Grubbs, "Olefin-metathesis catalysts for the preparation of molecules and materials (Nobel lecture)," *Angewandte Chemie International Edition,* vol. 45, pp. 3760-3765, 2006.

[87] Y. Chauvin, "Olefin metathesis: The early days (Nobel lecture)," *Angewandte Chemie International Edition,* vol. 45, pp. 3740-3747, 2006.

[88] C. W. Bielawski and R. H. Grubbs, "Living ring-opening metathesis polymerization," *Progress in Polymer Science,* vol. 32, pp. 1-29, 2007.

[89] J. A. van Hensbergen, R. P. Burford, and A. B. Lowe, "Post-functionalization of a ROMP polymer backbone via radical thiol-ene coupling chemistry," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry,* vol. 51, pp. 487-492, 2013.

[90] P. Jean-Louis Hérisson and Y. Chauvin, "Catalyse de transformation des oléfines par les complexes du tungstène. II. Télomérisation des oléfines cycliques en présence d'oléfines acycliques," *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics,* vol. 141, pp. 161-176, 1971.

[91] E. L. Dias, S. T. Nguyen, and R. H. Grubbs, "Well-defined ruthenium olefin metathesis catalysts: mechanism and activity," *Journal of the American Chemical Society,* vol. 119, pp. 3887-3897, 1997.

[92] D. J. Nelson, S. Manzini, C. A. Urbina-Blanco, and S. P. Nolan, "Key processes in ruthenium-catalysed olefin metathesis," *Chemical Communications,* vol. 50, pp. 10355-10375, 2014.

[93] S. Sutthasupa, M. Shiotsuki, and F. Sanda, "Recent advances in ring-opening metathesis polymerization, and application to synthesis of functional materials," *Polymer journal,* vol. 42, pp. 905-915, 2010.

[94] S. Varlas, S. B. Lawrenson, L. A. Arkinstall, R. K. O'Reilly, and J. C. Foster, "Self-Assembled Nanostructures from Amphiphilic Block Copolymers Prepared via Ring-Opening Metathesis Polymerization (ROMP)," *Progress in Polymer Science,* p. 101278, 2020.

[95] A. K. Pearce, J. C. Foster, and R. K. O'Reilly, "Recent developments in entropy-driven ring-opening metathesis polymerization: Mechanistic considerations, unique functionality, and sequence control," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry,* vol. 57, pp. 1621-1634, 2019.

[96] T. Masuda and F. Sanda, "Handbook of metathesis," *Wiley-VCH, Weinhem,* vol. 3, p. 375, 2003.

[97] A. Mariani, S. Fiori, Y. Chekanov, and J. A. Pojman, "Frontal ring-opening metathesis polymerization of dicyclopentadiene," *Macromolecules,* vol. 34, pp. 6539-6541, 2001.

[98] A. F. Kilbinger, "Developing new methods for the mono-end functionalization of living ring opening metathesis polymers," *CHIMIA International Journal for Chemistry,* vol. 66, pp. 99-103, 2012.

[99] I. Dragutan, V. Dragutan, and H. Fischer, "Synthesis of metal-containing polymers via ring opening metathesis polymerization (ROMP). Part II: Polymers containing transition metals," *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials,* vol. 18, p. 311, 2008.

[100] B. M. Novak and R. H. Grubbs, "The ring opening metathesis polymerization of 7-oxabicyclo [2.2. 1] hept-5-ene derivatives: a new acyclic polymeric ionophore," *Journal of the American Chemical Society,* vol. 110, pp. 960-961, 1988.

[101] H. Martinez, N. Ren, M. E. Matta, and M. A. Hillmyer, "Ring-opening metathesis polymerization of 8-membered cyclic olefins," *Polymer Chemistry,* vol. 5, pp. 3507-3532, 2014.

[102] H. S. Bazzi and H. F. Sleiman, "Adenine-containing block copolymers via ring-opening metathesis polymerization: synthesis and self-assembly into rod morphologies," *Macromolecules,* vol. 35, pp. 9617-9620, 2002.

[103] N. C. Süer, C. Demir, N. A. Ünübol, Ö. Yalçın, T. Kocagöz, and T. Eren, "Antimicrobial activities of phosphonium containing polynorbornenes," *RSC advances,* vol. 6, pp. 86151-86157, 2016.

[104] T. EREN and A. AŞÇI, "Synthesis and characterization of phosphonate based polynorbornene polymers derived from romp (ring opening metathesis polymerization) method and investigation their flame retardant properties," *Sigma: Journal of Engineering & Natural Sciences/Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi,* vol. 33, 2015.

[105] T. Eren and G. N. Tew, "Phosphonic acid-based amphiphilic diblock copolymers derived from ROMP," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry,* vol. 47, pp. 3949-3956, 2009.

[106] T. Eren, A. Som, J. R. Rennie, C. F. Nelson, Y. Urgina, K. Nüsslein*, et al.*, "Antibacterial and hemolytic activities of quaternary pyridinium functionalized polynorbornenes," *Macromolecular Chemistry and Physics,* vol. 209, pp. 516-524, 2008.

[107] J. A. Love, J. P. Morgan, T. M. Trnka, and R. H. Grubbs, "A practical and highly active ruthenium-based catalyst that effects the cross metathesis of acrylonitrile," *Angewandte Chemie International Edition,* vol. 41, pp. 4035-4037, 2002.

[108] F. Yazdani and M. Seddigh, "Magnetite nanoparticles synthesized by co-precipitation method: The effects of various iron anions on specifications," *Materials Chemistry and Physics,* vol. 184, pp. 318-323, 2016.

[109] A. K. Gupta and M. Gupta, "Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications," *biomaterials,* vol. 26, pp. 3995-4021, 2005.

[110] Y. Ju-Nam, W. Abdussalam-Mohammed, and J. J. Ojeda, "Highly stable noble metal nanoparticles dispersible in biocompatible solvents: synthesis of cationic phosphonium gold nanoparticles in water and DMSO," *Faraday discussions,* vol. 186, pp. 77-93, 2016.

[111] V. Sambhy, B. R. Peterson, and A. Sen, "Multifunctional silane polymers for persistent surface derivatization and their antimicrobial properties," *Langmuir,* vol. 24, pp. 7549-7558, 2008.

[112] P. Li, Y. F. Poon, W. Li, H.-Y. Zhu, S. H. Yeap, Y. Cao*, et al.*, "A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability," *Nature materials,* vol. 10, pp. 149-156, 2011.

[113] E. Jonasson, E. Matuschek, and G. Kahlmeter, "The EUCAST rapid disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood culture bottles," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* vol. 75, pp. 968-978, 2020.

[114] K. Lienkamp and G. N. Tew, "Synthetic Mimics of Antimicrobial Peptides—A Versatile Ring-Opening Metathesis Polymerization Based Platform for the Synthesis of Selective Antibacterial and Cell-Penetrating Polymers," *Chemistry–A European Journal,* vol. 15, pp. 11784-11800, 2009.

[115] Z. M. Al-Badri, A. Som, S. Lyon, C. F. Nelson, K. Nüsslein, and G. N. Tew, "Investigating the effect of increasing charge density on the hemolytic activity of synthetic antimicrobial polymers," *Biomacromolecules,* vol. 9, pp. 2805-2810, 2008.

[116] E. Altay, M. A. Yapaöz, B. Keskin, G. Yucesan, and T. Eren, "Influence of alkyl chain length on the surface activity of antibacterial polymers derived from ROMP," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* vol. 127, pp. 73-78, 2015.

[117] C. Demir, N. C. Süer, M. A. Yapaöz, N. Kebir, S. Ö. Okullu, T. Kocagöz*, et al.*, "Biocidal activity of ROMP-polymer coatings containing quaternary phosphonium groups," *Progress in Organic Coatings,* vol. 135, pp. 299-305, 2019.

[118] P. R. Judzewitsch, L. Zhao, E. H. Wong, and C. Boyer, "High-Throughput Synthesis of Antimicrobial Copolymers and Rapid Evaluation of Their Bioactivity," *Macromolecules,* vol. 52, pp. 3975-3986, 2019.

[119] K. Markiewicz, L. Seiler, I. Misztalewska, K. Winkler, S. Harrisson, A. Wilczewska*, et al.*, "Advantages of poly (vinyl phosphonic acid)-based double hydrophilic block copolymers for the stabilization of iron oxide nanoparticles," *Polymer Chemistry,* vol. 7, pp. 6391-6399, 2016.

[120] A. Kaushik, P. R. Solanki, K. Kaneto, C. Kim, S. Ahmad, and B. D. Malhotra, "Nanostructured iron oxide platform for impedimetric cholesterol detection," *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis,* vol. 22, pp. 1045-1055, 2010.

[121] K. Kluchova, R. Zboril, J. Tucek, M. Pecova, L. Zajoncova, I. Safarik*, et al.*, "Superparamagnetic maghemite nanoparticles from solid-state synthesis–Their functionalization towards peroral MRI contrast agent and magnetic

carrier for trypsin immobilization," *Biomaterials,* vol. 30, pp. 2855-2863, 2009.

[122] F. Figueredo, A. Saavedra, E. Cortón, and V. E. Diz, "Hydrophobic Forces Are Relevant to Bacteria-Nanoparticle Interactions: Pseudomonas putida Capture Efficiency by Using Arginine, Cysteine or Oxalate Wrapped Magnetic Nanoparticles," *Colloids and Interfaces,* vol. 2, p. 29, 2018.

[123] M. Varshney and Y. Li, "Interdigitated array microelectrodes based impedance biosensors for detection of bacterial cells," *Biosensors and bioelectronics,* vol. 24, pp. 2951-2960, 2009.

[124] V. Amendola and M. Meneghetti, "Size evaluation of gold nanoparticles by UV− vis spectroscopy," *The Journal of Physical Chemistry C,* vol. 113, pp. 4277-4285, 2009.

[125] U. Kreibig and M. Vollmer, *Optical properties of metal clusters* vol. 25: Springer Science & Business Media, 2013.

[126] J. L. Miranda, M. D. Oliveira, I. S. Oliveira, I. A. Frias, O. L. Franco, and C. A. Andrade, "A simple nanostructured biosensor based on clavanin A antimicrobial peptide for gram-negative bacteria detection," *Biochemical Engineering Journal,* vol. 124, pp. 108-114, 2017.

[127] Y. Kang, D.-J. Won, S. R. Kim, K. Seo, H.-S. Choi, G. Lee*, et al.*, "Self-assembled monolayer of the aromatic thioacetate on the gold surface," *Materials Science and Engineering: C,* vol. 24, pp. 43-46, 2004.

[128] E. K. Riga, M. Vöhringer, V. T. Widyaya, and K. Lienkamp, "Polymer-Based Surfaces Designed to Reduce Biofilm Formation: From Antimicrobial Polymers to Strategies for Long-Term Applications," *Macromolecular Rapid Communications,* vol. 38, p. 1700216, 2017.

[129] A. Bratov and N. Abramova, *Chemical sensors and biosensors based on impedimetric interdigitated electrode array transducers*: Smart Sensor and Sensing Technology. NY: Nova Science Publishers, 2013.

[130] S. Brosel Oliu, N. Uria, N. Abramova, and A. Bratov, "Impedimetric sensors for bacteria detection," *Biosensors-Micro and Nanoscale Applications. London: IntechOpen,* pp. 257-288, 2015.

[131] A. Sanchis, A. Brown, M. Sancho, G. Martinez, J. Sebastian, S. Munoz*, et al.*, "Dielectric characterization of bacterial cells using dielectrophoresis," *Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association,* vol. 28, pp. 393-401, 2007.

[132] Y. Li, A. Karlin, J. D. Loike, and S. C. Silverstein, "A critical concentration of neutrophils is required for effective bacterial killing in suspension," *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 99, pp. 8289-8294, 2002.

[133] D. B. Diep, M. Skaugen, Z. Salehian, H. Holo, and I. F. Nes, "Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II

bacteriocins," *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 104, pp. 2384-2389, 2007.

[134] M. Kjos, I. F. Nes, and D. B. Diep, "Class II one-peptide bacteriocins target a phylogenetically defined subgroup of mannose phosphotransferase systems on sensitive cells," *Microbiology,* vol. 155, pp. 2949-2961, 2009.

[135] P. T. Kissinger and W. R. Heineman, "Cyclic voltammetry," *Journal of Chemical Education,* vol. 60, p. 702, 1983.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Makaleler

1. N. C. Süer, M. A. Yapaöz, T. Arasoğlu, M. Gallei, T. Eren, "Developing phosphonic acid bearing polyelectrolytes for their biocidal activity on surfaces, thermal properties, nanofiber and nano particle formation", *Materials Today Communications,* vol. 27, pp. 102422, 2021.

Konferans Bildirileri

1. N. C. Süer, M. Altıkatoğlu Yapaöz, H. Cankurtaran, T. Eren, ROMP Antibakteriyel Polimerlerin Sentezi ve Bakteri Sensörü Olarak Uygulaması, (Sözlü Sunum), 31. Ulusal Kimya Kongresi, 10-13 Eylül 2019, İstanbul, Türkiye.

2. N. C. Süer, M. Altıkatoğlu Yapaöz, H. Cankurtaran, T. Eren, Synthesis of Synthetic Antibacterial Polymers and Their Applications in Bacteria Biosensor, (Poster Sunumu), 16th European Workshop on Phosphorus Chemistry (EWPC-16) , 24- 26 Nisan 2019, Bristol, İngiltere.

3. N. C. Süer, M. Altıkatoğlu Yapaöz, T. Eren, Sentetik Antibakteriyel Polimerlerin Bakteri Sensörü Olarak Uygulaması, (Poster Sunumu), 23. Biyomedikal Bilim Ve Teknoloji Sempozyumu Biomed2018-tr, 15-16 Aralık 2018, İstanbul, Türkiye.

Projeler

1. Biyosensör ve Antibakteriyel Özellik Gösteren Polimerlerin Sentezi ve Uygulaması, Yıldız Teknik Üniversitesi BAPK Proje No:FDK-2018-3455, Araştırmacı.

Ödüller

1. TÜBİTAK 2211/C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Lisansüstü Burs Programı

2. COST Action CM1302 (SIPs) 2016 Kısa Dönem Bilimsel Görev (STSM) Ödülü, The IMDEA Materials Institute, 1-30 Kasım 2016 (1 ay), Madrid, İspanya.

3. COST Action CA15114 (AmiCI) ITC Conference Grant, 16th European Workshop on Phosphorus Chemistry (EWPC-16) , 24-26 Nisan 2019, Bristol, İngiltere.