

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAKTERİLERİN YÜZEYDE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ
RAMAN SPEKTRUMLARINI ETKİLEYEN
PARAMETRELERİN İNCELENMESİ**

Kimyager Mehmet KAHRAMAN

**FBE Biyomühendislik Bölümü'nde
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Tez Danışmanları : Yrd.Doç.Dr. Zeynep Akdeste (YTÜ)
Doç.Dr. Mustafa Çulha (YÜ)**

İSTANBUL, 2007

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAKTERİLERİN YÜZEYDE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ
RAMAN SPEKTRUMLARINI ETKİLEYEN
PARAMETRELERİN İNCELENMESİ**

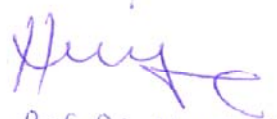
Kimyager Mehmet KAHRAMAN

FBE Biyomühendislik Bölümü'nde
Hazırlanan

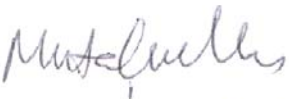
YÜKSEK LİSANS TEZİ



Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE



Prof. Dr. Hüseyin KUZU



Doç. Dr. Mustafa ÇULHA

Tez Danışmanları : Yrd.Doç.Dr. Zeynep Akdeste (YTÜ)
Doç.Dr. Mustafa Çulha (YÜ)



Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN



Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV

İSTANBUL, 2007

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	iv
KISALTMA LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÇİZELGE LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 TEORİK BİLGİ	4
2.1 Raman Spektroskopi	4
2.1.1 Raman Spektroskopisinin Teorisi	4
2.1.1.1 Raman Spektrumlarının Uyarılması	5
2.1.1.2 Raman ve Rayleigh Saçılımının Mekanizması	6
2.1.1.3 Raman ve IR Karşılaştırma	7
2.1.2 Raman Cihazı	9
2.1.2.1 Işın Kaynakları	10
2.1.2.2 Numune Işınlama Sistemi	11
2.1.2.3 Raman Spektrometreleri	12
2.1.3 Raman Spektroskopinin Uygulama Alanları	14
2.1.3.1 Raman Spektroskopinin İnorganik Uygulamaları	14
2.1.3.2 Raman Spektroskopinin Organik Uygulamaları	15
2.1.3.3 Raman Spektroskopinin Biyolojik Uygulamaları	15
2.1.3.4 Kantitatif Uygulamaları	15
2.1.4 Raman Spektroskopinin Diğer Çeşitleri	16
2.1.4.1 Rezonans Raman Spektroskopi	16
2.1.4.2 Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopi	18
2.1.4.3 Doğrusal Olmayan Raman Spektroskopi	19
2.2 Nanoparçacıklar	19
2.2.1 Nanoparçacıkların Hazırlanma Yöntemleri	19
2.2.1.1 Lazer Kazıma Yöntemi	19
2.2.1.2 Ultrason ile İndirgeme Yöntemi	20
2.2.1.3 Gama Işınları ile İndirgeme Yöntemi	20
2.2.1.4 UV Işını ile İndirgeme Yöntemi	20
2.2.1.5 İnorganik Ajanlarla İndirgeme Yöntemi	21
2.2.1.6 Organik Ajanlarla İndirgeme Yöntemi	21
2.2.2 Nanoparçacıkların Karakterizasyonunda Kullanılan Teknikler	21
2.3 Mikroorganizmalar	21
2.3.1 Bakterilerin Yapısı ve Özellikleri	22
2.3.2 Bakterilerin Hücre Duvar Yapıları	23
2.3.2.1 Gram Pozitif Bakterilerin Hücre Duvar Yapısı	24
2.3.2.2 Gram Negatif Bakterilerin Hücre Duvar Yapısı	24

3	MATERYALLER VE METOTLAR	26
3.1	Materyaller.....	26
3.1.1	Kullanılan Kimyasallar	26
3.1.2	Kullanılan Alet ve Cihazlar	26
3.2	Metotlar	26
3.2.1	Gümüş Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Karakterize Edilmesi	26
3.2.1.1	Sitrat Yöntemi ile Gümüş Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Karakterize Edilmesi	26
3.2.1.2	Borhidrür Yöntemi ile Gümüş Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Karakterize Edilmesi	28
3.2.2	Sitrat Yöntemi ile Hazırlanan Gümüş Nanoparçacıkların Deriştirilmesi	30
3.2.3	Sitrat Yöntemi ile Hazırlanan Gümüş Nanoparçacıkların pH'larının Ayarlanması.....	30
3.2.4	Farklı Büyüklükteki Altın Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Karakterize Edilmesi	31
3.2.5	Bakterin Büyütülmesi, Toplanması ve Yıkılması	33
3.2.5.1	Bakterilerin Büyütülmesi.....	33
3.2.5.2	Bakterilerin Toplanması ve Yıkılması	33
3.2.6	Raman Spektroskopisi.....	33
3.2.7	SPSS Software	33
3.2.8	Taramalı Elektron Mikroskopu	34
4	SONUÇLAR VE YORUMLAR	35
4.1	Bakteri Konsantrasyonu	35
4.2	Nanoparçacıkların Yüzey Yükleri	36
4.3	Kolloit Süspansiyonlarının pH'ları.....	38
4.4	Nanoparçacıkların Konsantrasyonu.....	41
4.5	Lazer Dalga Boyu	49
4.6	Nanoparçacıkların Cinsi ve Büyüklükleri	51
	KAYNAKLAR.....	55
	ÖZGEÇMİŞ.....	60

SİMGE LİSTESİ

$\Delta\upsilon$	Dalga Sayısı Kayması
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
cm^{-1}	Dalga Sayısı
kV	Kilovolt
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mW	Miliwatt
nm	Nanometre
υ	Dalga Sayısı
W	Watt

KISALTMA LİSTESİ

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Güçlendirilmiş Parça Uzunluğu Polimorfizim)
AFM	Atomic Force Microscopy (Atomik Kuvvet Mikroskopi)
CARS	Doğrusal Olmayan Anti-Stokes Raman Spektroskopi
Dk.	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
FAME	Fatty Acid Methyl Ester (Yağ Asit Metil Ester)
IR	İnfrared
MIDI	Microbial Identification System (Mikrobiyal Tanı Sistemi)
PCR	Polymer Chain Reaction (Polimer Zincir Reaksiyonu)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Sınırlandırılmış Parça Uzunluğu Polimorfizim)
SEM	Scanning Electron Microscopy (Taramalı Elektron Mikroskopi)
TEM	Transmission Electron Microscopy (Geçirgen Elektron Mikroskopi)
UV	Ultraviyole
YZRS	Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopi

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 488 nm lazer ile uyarılan CCl_4 'ün Raman spektrumu.....	5
Şekil 2.2 Rayleigh ve Raman saçılımının esası.....	6
Şekil 2.3 Raman ve infrared spektrumlarının karşılaştırılması	7
Şekil 2.4 Karbondioksitin Raman ve infrared aktivitelerinin karşılaştırılması.....	9
Şekil 2.5 Antrasen'in spektrumu A: Klasik cihaz, 514.5 uyarımı, B: FT cihazı, 1064 nm lazer ile uyarımı.....	11
Şekil 2.6 İki numune uyarım sistemleri.....	12
Şekil 2.7 Bir FT-Raman spektrometrenin optik diyagramı	13
Şekil 2.8 Bir yük-eşleşmiş düzeneği (CCD) bulunan çok kanallı dispersif Raman spektrometre. BP, girişim bant-geçirimli filtre, BR, Rayleigh bant-reddeden filtre	14
Şekil 2.9 (a) Rezonans Raman saçılımı (b) floresans emisyonları için enerji diyagramları	17
Şekil 2.10 Bakterilerin üç temel şekilleri, A) koklar, B) spiral şekilli çomaklar, C) düzgün çomaklar.....	22
Şekil 2.11 Bakteri hücresinin genel yapısı	23
Şekil 2.12 Peptidoglikanın (murein) genel yapısı	23
Şekil 2.13 Gram pozitif bakterilerin genel hücre duvar yapısı.....	24
Şekil 2.14 Gram negatif ve pozitif hücre duvar yapılarının karşılaştırılması.....	25
Şekil 3.1 Sitrat yöntemi ile hazırlanan gümüş nanoparçacıkların taramalı elektron mikroskop görüntüsü.....	27
Şekil 3.2 Sitrat yöntemi ile hazırlanan gümüş nanoparçacıkların UV/görünür bölge absorpsiyon spektrumu	28
Şekil 3.3 Farklı indirgen konsantrasyonlarda sentezlenen gümüş nanoparçacıkların UV/görünür bölge absorpsiyon spektrumları.....	29
Şekil 3.4 Crieghton yöntemine göre sentezlenen gümüş nanoparçacıkların UV/görünür bölge absorpsiyon spektrumu	29
Şekil 3.5 Sitrat ile indirgenen nanoparçacıkların pH'a bağlı UV/görünür bölge absorpsiyon spektrumları.....	30
Şekil 3.6 Farklı büyüklüklerdeki altın nanoparçacıkların UV/görünür bölge absorpsiyon spektrumları	31
Şekil 3.7 Farklı büyüklüklerdeki altın nanoparçacıkların renk değişimi.....	32
Şekil 3.8 Farklı büyüklüklerdeki altın nanoparçacıkların bazı büyüklüklerinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri	32
Şekil 4.1 Gram pozitif <i>Clavibacter michignensis</i> 'in farklı konsantrasyonlardaki Raman spektrumları.....	35
Şekil 4.3 Gram negatif <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın farklı konsantrasyonlardaki Raman spektrumları	36
Şekil 4.3 <i>Bacillus megaterium</i> 'un farklı yüzey yüküne sahip gümüş nanoparçacıklarla alınan Raman spektrumları.....	37
Şekil 4.4 <i>Escherichia coli</i> 'nin farklı yüzey yüküne sahip gümüş nanoparçacıklarla alınan Raman spektrumları.....	38
Şekil 4.5 <i>Bacillus megaterium</i> 'un pH'a bağlı Raman spektrumları.....	40
Şekil 4.6 <i>Escherichia coli</i> 'nin pH'a bağlı Raman spektrumları.....	40
Şekil 4.7 <i>Escherichia coli</i> 'nin farklı konsantrasyonlarda nanoparçacık içeren ışık mikroskop görüntüleri.....	41
Şekil 4.8 <i>Escherichia coli</i> 'nin 2X gümüş nanoparçacıkla karıştırılan taramalı elektron mikroskop görüntüsü.....	42

Şekil 4.9 <i>Escherichia coli</i> 'nin 4X gümüş nanoparçacıkla karıştırılan taramalı elektron mikroskop görüntüsü	42
Şekil 4.10 <i>Escherichia coli</i> 'nin 8X gümüş nanoparçacıkla karıştırılan taramalı elektron mikroskop görüntüsü ve nivelman ortometrik yükseklikleri farkı	43
Şekil 4.11 <i>Bacillus megaterium</i> 'un 1X gümüş nanoparçacıkla alınan Raman spektrumları ...	44
Şekil 4.12 <i>Bacillus megaterium</i> 'un 2X gümüş nanoparçacıkla alınan Raman spektrumları ...	44
Şekil 4.13 <i>Bacillus megaterium</i> 'un 4X gümüş nanoparçacıkla alınan Raman spektrumları ...	45
Şekil 4.14 <i>Bacillus megaterium</i> 'un 8X gümüş nanoparçacıkla alınan Raman spektrumları ...	45
Şekil 4.15 <i>Escherichia coli</i> 'nin 1X gümüş nanoparçacıkla alınan Raman spektrumları	46
Şekil 4.16 <i>Escherichia coli</i> 'nin 2X gümüş nanoparçacıkla alınan Raman spektrumları	46
Şekil 4.17 <i>Escherichia coli</i> 'nin 4X gümüş nanoparçacıkla alınan Raman spektrumları	47
Şekil 4.18 <i>Escherichia coli</i> 'nin 8X gümüş nanoparçacıkla alınan Raman spektrumları.....	47
Şekil 4.19 <i>Bacillus megaterium</i> 'un konsantrasyona bağlı Raman spektrumları	48
Şekil 4.20 <i>Escherichia coli</i> 'nin konsantrasyona bağlı Raman spektrumları	48
Şekil 4.21 <i>Escherichia coli</i> 'nin 514 nm dalga boylu lazer ile alınan Raman spektrumu.....	50
Şekil 4.22 <i>Escherichia coli</i> 'nin 830 nm dalga boylu lazer ile alınan Raman spektrumu.....	50
Şekil 4.23 <i>Bacillus megaterium</i> 'un farklı büyüklüklerdeki altın nanoparçacıklar ile alınan Raman spektrumları.....	52
Şekil 4.24 <i>Bacillus megaterium</i> 'un 25 nm altın nanoparçacıkla karıştırılan taramalı elektron mikroskop görüntüsü	52
Şekil 4.25 <i>Bacillus megaterium</i> 'un 72 nm altın nanoparçacıkla karıştırılan taramalı elektron mikroskop görüntüsü	53
Şekil 4.26 <i>Bacillus megaterium</i> 'un 147 nm altın nanoparçacıkla karıştırılan taramalı elektron mikroskop görüntüsü	53
Şekil 4.27 <i>Bacillus megaterium</i> 'un aynı büyüklükteki altın ve gümüş nanoparçacıklarla alınan Raman spektrumları.....	54

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Raman ve IR karşılaştırılması	9
Çizelge 2.2 Raman spektroskopide yaygın olarak kullanılan bazı lazer kaynakları	10
Çizelge 2.3 Nanoparçacıkların karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan teknikler	21
Çizelge 2.4 Mikroorganizmaların sınıflandırılması	22
Çizelge 2.5 Gram pozitif ve negatif bakteri hücrelerinin karşılaştırılması.....	25
Çizelge 4.1 Alınan 10 spektrumun ortalamaya yakınlığını gösteren tablo	43

ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgilerinden ve yardımlarından faydalandığım, sayın danışmanım Yrd.Doç.Dr. Zeynep Akdeste'ye ,

Tez çalışmam esnasında bana yol gösteren ve kıymetli fikirlerini benden esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Mustafa Çulha'ya ve bütün deneysel çalışmaların yürütüldüğü Yeditepe Üniversitesine sağlamış olduğu olanaklardan ve mali destekten dolayı, Yeditepe Üniversitesi Mütevelli Heyetine,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca çok değerli yorumlarını esirgemeyen ve tez çalışmam sırasında büyük kolaylık gösteren Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Bölüm Başkanı sayın Prof. Dr. Mehmet Mustafaev'e,

Değerli bilgi ve yorumları ile her zaman yanımda olan sayın hocam Prof. Dr. Fikrettin Şahin'e,

Tez dönemim boyunca deneylerimde katkısı bulunan çalışma arkadaşım, M. Müge Yazıcı'ya,

Bilgi ve fikirleri ile desteklerini benden esirgemeyen Ö. Faruk Bayrak'a,

Öğrencilik hayatım boyunca, desteklerini benden esirgemeyen değerli aileme,

Bana bu tez yazımında destek ve motivasyon veren nişanlım Sevgi Eskikanbur'a,

Bana ve bu teze ufacıkta olsa emeği geçen herkese en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Yüzeyde zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi, mikroorganizmaların hızlı tanı ve karakterizasyonu için güçlü bir tekniktir. Ancak hazırlanan örneklerin heterojen olmasından dolayı deneysel koşulların iyi optimize edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, bakterilerin yüzeyde zenginleştirilmiş Raman spektrumlarını etkileyen parametreler araştırıldı ve deneysel koşullar optimize edildi.

İlk olarak bakteri ve nanoparçacık karışım oranlarının etkisi araştırıldı ve optimum oran bulundu. Bu oran kullanılarak, bakterilerin yüzeyde zenginleştirilmiş Raman saçılmasını etkileyecek parametreler: lazer dalga boyu, nanoparçacık içeren süspansiyonun pH'sı ve konsantrasyonu, nanoparçacıkların yüzey yükleri, cinsi ve büyüklüğü araştırıldı.

Bu çalışma, bakterilerin yüzeyde zenginleştirilmiş Raman saçılması için optimum deneysel koşullarının yanı sıra, deneysel koşulların değişmesi ile bakteri hücrelerinden moleküler bilgi alınabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler : Yüzeyde zenginleştirilmiş Raman saçılması, YZRS, Bakteri, Tanı, Nanoparçacık, Plazmonlar

ABSTRACT

Surface-enhanced Raman spectroscopy is powerful technique for fast identification and characterization of microorganisms. However, due to the heterogeneity of the prepared sample, the experimental conditions must be optimized.

In this study, parameters of influencing the Surface-enhanced Raman spectrum of bacteria are investigated and the experimental conditions are optimized.

First, ratio of bacteria to nanoparticles in the mixture is investigated and optimized. Using this ratio, the influence of the other parameters such as laser wavelength, pH and concentration of nanoparticles suspension, nanoparticles surface charge, type and size are investigated

This study not only demonstrates optimum experimental conditions for bacterial SERS but also the applicability of obtaining molecular information from bacteria cells by changing the experimental parameters.

Key words: Surface Enhanced Raman Scattering, SERS, Bacteria, Identification, Nanoparticles, Plasmons

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Patojenlerin hızlı, doğru ve hassas tanısı sadece klinik uygulamalarda değil, endüstriyel uygulamalarda da çok önemlidir. Klinik uygulamalarda, bakteri, mantar ve virüs gibi patojenlerin hızlı tanısı, hastanın hayatta kalması ile doğrudan ilgili ve hasta insanların ölüm oranını düşürebilmektedir. Patojen ve patojen olmayanların kontaminasyonların ayırt edilmesi, endüstriyel uygulamalarda kritik bir yere sahiptir. Örneğin, gıda ve ilaç endüstrisinde önemli bir yer teşkil etmektedir.

Mikroorganizmaların tanısı, en az bir gün ve genellikle de daha fazla sürmektedir (Al-Khaldi ve Mossoba, 2004). Tedaviye bir an önce başlanabilmesi için mikroorganizmaların tanısı olabildiğince hızlı olmalıdır. Mikroorganizma tanısı için fenotipik ve genotipik metotlar kullanılmaktadır. Fenotipik metotlar grubunda birçok klasik testlerin (biyokimyasal, fizyolojik, patolojik, morfolojik) yanısıra (Lelliot and Stead 1987; Swing and Civerolo, 1993), bazı moleküler tekniklerde (yağ asit analizi, protein profileme, serolojik testler) (Bouzar vd., 1994) kullanılmaktadır. Klasik teknikler çok zaman alıcı, maliyetli ve kişiye göre değişebilen sonuçlarından dolayı çok tercih edilmektedir. Fenotipik tekniklerde yağ asit analizi (FAME) kültüre alınabilen bütün mikroorganizmaların tanısında kullanım olanağı olan, ekonomik ve güvenilir bir tanı yöntemi olarak bilinir (Sasser, 1990). Bu sistem gaz kromatografisi olup mikroorganizmaların yağ asit profillerine göre tanı yapmaktadır. Mikroorganizmaların hücre duvarları her birine özgü olduğundan bu sistemle tanı yapılabilir. Ancak bu yöntem içinde hücrelerin yağ asit izolasyonları yapılması gerekmektedir. Buna ek olarak bunlar uçucu türevlerine dönüştürmek gerekmektedir. Çünkü gaz kromatografide uçucu bileşikler analiz edilebilmektedir. Bunun için yağ asitlerinin metil esterleri oluşturularak uçucu hale dönüştürülürler. Ancak bu yöntemdeki dezavantaj, prosesin uzun oluşudur. Nükleik asit (genetik) tabanlı teknikler son yıllarda yaygın olarak mikrobiyal tanıda kullanılmaktadır. Bu tekniklerden RFLP, AFLP ve PCR genomik tanıda en yaygın olarak tercih edilirler (Louws vd., 1995). Bu yöntemler için yetişmiş insanlara ihtiyaç vardır. Aynı zamanda yüksek maliyetli olması yöntemin dezavantajıdır.

Mikroorganizma tanı ve karakterizasyonu için yukarıda belirtilen yöntemlere alternatif olarak spektroskopik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemleri kütle ve titreşimsel spektroskopiler olarak ikiye ayırabiliriz. Kütle spektroskopisi mikroorganizma tanısında kullanılmıştır (Claydon vd., 1996; Goodacre vd., 1996; Haag vd., 1998). Kütle spektroskopisi yöntemi çok pahalı olduğundan fazla tercih edilmemektedir. Son yıllarda titreşimsel spektroskopisi

teknikleri mikroorganizma tanı ve karakterizasyonu için ümit vaat etmektedir (Maquelin vd., 2002b, 2003). Bunlar IR ve Raman spektroskopik yöntemleridir. Bu yöntemlerde her moleküle özgü parmak izi özelliklerinden dolayı kimyasal ve biyolojik yapılardan çok kısa sürede bilgi alınabilmektedir. Bu iki yöntemde titreşimsel spektroskopidir. Ancak temel olarak birbirinden farklıdır. IR dipol moment değişikliğine bağlı absorpsiyon spektrumu verirken, Raman polarite değişime bağlı saçılma spektrumu vermektedir. IR spektroskopisi mikroorganizma tanısı için kullanılmıştır (Naumann vd., 1991; Naumann, 2000). Ancak infrared spektroskopinin kullanılması bir takım dezavantajları birlikte getirmektedir. Bunlar, suyun spektruma girişim yapması, örnek hazırlamanın zahmetli ve uzun olması ve spektrumların karmaşık olmasıdır. Son yıllarda Raman spektroskopisi mikroorganizma tanısı için güçlü bir teknik olarak görülmektedir. IR spektroskopisine göre iki büyük avantajı vardır. Suyun spektruma az girişim yapması ve örnek hazırlamanın çok daha kolay ve hızlı olmasıdır. Bu özelliklerinden dolayı mikroorganizma tanısı için ideal bir araç olarak düşünülmektedir. Çünkü mikroorganizmalar genellikle biyolojik ortamlarda bulunduğu sulu örneklerdir ve Raman spektroskopisi ile kolayca analiz edilebilmektedir. Raman spektroskopide alınan spektrumlar her moleküle özgü parmak izi taşımaktadır. Bu özelliğinden faydalanarak kimyasal ve biyolojik moleküllerden bilgi alınabilmektedir. Ancak Raman spektroskopinin kullanımının bir kaç dezavantajı vardır. Raman saçılmasının zayıf ve floresansın spektruma girişim yapmasıdır. Floresans girişimini daha az enerjili daha uzun dalga boylu lazerler kullanılarak elimine edilmeye çalışılmıştır (Chase, 1987). Saçılmayı zenginleştirmek içinde soy nanometaller kullanılmaktadır ve bu yönteme yüzeyde zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi denilmektedir. Bu yöntemi ilk olarak Jeanmaire ve Van Duyne (1977) , Albrecht ve Creighton (1977) keşfetmişlerdir. Kullanılan soy nanometallere Raman substratı denmektedir, bu substratlar: nano yüzeyler, parçacık içeren çözeltiler ve düzenli bir yapıda olan iki ve üç boyutlu yapılar olabilmektedir (Lee ve Meisel, 1982; Tessier vd., 2000; Dustin vd., 2001; Lu vd., 2005; Hossain vd., 2007). Birçok grup tarafından mikroorganizma tanısı için Raman spektroskopinin kullanılabileceği gösterilmiştir (Manoharan vd., 1990; Maquelin vd., 2000, 2002a, 2006; Jarvis ve Goodacre, 2004c; Lopez-Diez ve Goodacre, 2004). İlk olarak Raman spektroskopisi kullanılarak mikroorganizma tanısının yapılabileceği Maquelin tarafından 2000 yılında ortaya konmuştur (Maquelin vd., 2000). Ancak normal Raman'da saçılma zayıf olduğundan uzun süre lazerin örnek üzerinde kalması gerekmektedir. İlk olarak yüzeyde zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi 1998'de mikroorganizma tanısında Efrima ve Bronk (1998) tarafından kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmada gümüş nanoparçacıklar bakteri ile birlikte indirgenerek elde edilmiştir. Goodacre ve çalışma arkadaşları (2004,2006)

nanoparçacıklarla bakterileri basit karıştırma ile tanı yapmışlardır. Birçok grup bu alanda çalışmaktadır (Efrima vd., 1998, 1999; Jarvis vd., 2004a; 2004b; 2006, Sengupta vd., 2005, 2006; Zeiri vd., 2002, 2004; Premasiri vd., 2005). Yapılan çalışmalarda kullanılan örnek hazırlama metotları birbirinden farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar spektrumların kalitesini ve tekrarlanabilirliğini etkilemektedir. Şu ana kadar deneysel parametreler henüz optimize edilmemiştir. Jarvis (2004b) tekrarlanabilirlik sorununu çözmeye çalışmış ve bunun için, Raman cihazına elektron mikroskopunu eşleştirerek bakterinin nerede olduğunu tespit etmiş ve oradan spektrum almıştır. Ancak alınan spektrumların kalitesi ve zenginliği çok zayıftır.

Bu çalışmada farklı iki yöntemle farklı yüzey yüküne sahip gümüş nanoparçacıkları ve farklı büyüklüklerde altın nanoparçacık sentezi yapıldı (Lee ve Meisel, 1982; Creighton vd., 1979) ve sentezlenen nanoparçacıklar UV/görünür bölge spektrofotometre ve taramalı elektron mikroskopu ile karakterize edildi. Sitrat yöntemi ile hazırlanan gümüş nanoparçacıklarla bakteri örnekleri ile farklı oranda karıştırıldı ve optimum nanoparçacık ve bakteri oranı araştırıldı. Gümüş nanoparçacıklar kullanılarak hazırlanan örnekler, 830 nm ve 514 nm lazerler kullanılarak spektrumlara etkisi incelendi. Sitrat yöntemi ile hazırlanan gümüş nanoparçacıkların pH'ları değiştirilerek ve farklı yüzey yüklerine sahip gümüş nanoparçacıklar kullanılarak bakteri spektrumuna etkisi incelendi ve tekrarlanabilirliği artırmak için gümüş nanoparçacıklar değiştirildi ve nanoparçacık konsantrasyonunun tekrarlanabilirliğe etkisi araştırıldı. Farklı büyüklüklerde hazırlanan altın nanoparçacıkların, bakterilerin yüzeyde zenginleştirilmiş Raman saçılmasına etkisi araştırıldı. Model bakteri olarak, gram negatif olan *Escherichia coli* ATCC 35218 , *Pseudomonas aeruginosa* (B9) gram pozitif olan *Bacillus megaterium* (B6), *Clavibacter michignensis* (B5) kullanıldı.

Bu çalışmada amaç, yüzeyde zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi ile bakteri tanısı için optimum deneysel koşulların belirlenmesi, tekrarlanabilirliğin daha basit yöntemlerle artırılması ve biyolojik bir molekül olan bakteri ile nanoparçacıkların etkileşiminin incelenmesidir.

2. TEORİK BİLGİ

2.1 Raman Spektroskopisi

Işın geçirgen ortamdan geçerken, ortamdaki türler, ışın demetinin bir kısmını çeşitli yönlerde doğru saçarlar. 1928’de, Hintli Fizikçi C.V.Raman, belirli moleküllerce saçılan ışının ufak bir kesrinin görünür alandaki dalga boyunun gelen ışığınkinden farklı olduğunu ve buna ilaveten dalga boyundaki kaymaların, saçılmadan sorumlu moleküllerin kimyasal yapısına bağlı olduğunu buldu. Bu buluşundan dolayı 1931 Nobel Fizik Ödülü’nü aldı (Ferraro ve Nakamoto, 1994).

Şu anda iyice anlaşılmış olan Raman saçılmasının teorisi, söz konusu olgunun, infrared absorpsiyonu ile ilişkili kuvantlaşmış titreşimsel değişmelerle aynı türden değişmelerden kaynaklandığını göstermektedir. Böylece gelen ve saçılan ışık dalga boyları arasındaki fark, orta infrared bölgesindeki dalga boyuna denk gelmektedir. Gerçektende verilen bir tür ışın için Raman saçılım spektrumu ile infrared absorpsiyon spektrumu çoğu kez birbirine benzemektedir. Ancak infrared-aktif ve Raman-aktif fonksiyonel grup türleri arasında, bu teknikleri, birbirinin rakibi olmaktansa tamamlayıcısı olacak ölçüde farklar vardır. Bazı problemler için infrared yöntemi daha üstün araç iken, bazı durumlarda Raman spektrumu daha iyi sonuç verir.

Raman spektrumlarının infrarede göre önemli bir üstünlüğü, suyun girişim yapmamasından kaynaklanır; sulu çözeltilerden Raman spektrumları elde edilebilir. Buna ek olarak, infrared spektroskopide kullanılan sodyum klorür ve diğer atmosferik bakımdan kararsız pencere malzemeleri yerine cam ve kuvars hücreler kullanılabilir. Bu avantajlarına rağmen, Raman spektroskopisi, 1960’larda lazerlerin geliştirilmesine kadar kimyacılar tarafından yapısal çalışmalar için çok fazla kullanılmamıştır. Raman spektroskopinin kullanımının iki dezavantajı vardır. Birincisi, saçılmanın zayıf olması, ikincisi ise numunede bulunan safsızlıklardan gelen floresans girişimidir. Günümüzde yakın infrared lazer kaynaklarının kullanımı ile floresans girişim büyük ölçüde giderilmiştir (Chase, 1987).

2.1.1 Raman Spektroskopinin Teorisi

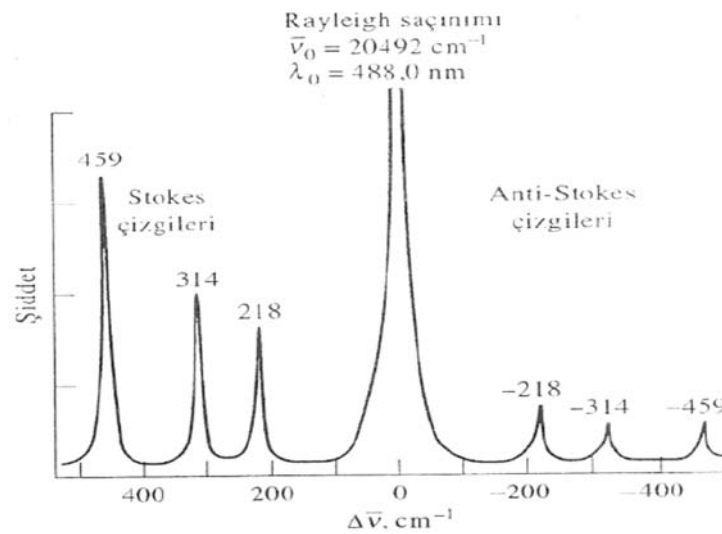
Raman spektrumları, bir numuneyi görünür alan veya yakın-infrared monokromatik ışıktan oluşan güçlü bir lazer kaynağıyla uyarılması ile elde edilebilir. Işınlama süresince saçılan ışının spektrumu uygun bir spektrometre ile belirli bir açıdan (genellikle 90 derece) ölçülür.

Raman çizgilerinin şiddetleri çok zayıftır; bu yüzden saçılmanın ölçümü infrared spektrumlarından daha güçtür.

2.1.1.1 Raman Spektrumlarının Uyarılması

Şekil 2.1, bir karbon tetraklorür numunesinin 488 nm (20492 cm^{-1}) dalga boylu argon iyonu lazer kullanılarak elde edilen Raman spektrumunun bir kısmını göstermektedir. Saçılan ışın üç çeşittir: Stokes saçılımı, anti-stokes saçılımı ve Rayleigh saçılımı. Rayleigh saçılımının dalga boyu, uyarıcı kaynağın dalga boyu ile aynı olup bu saçılım diğer iki tipten çok daha şiddetlidir.

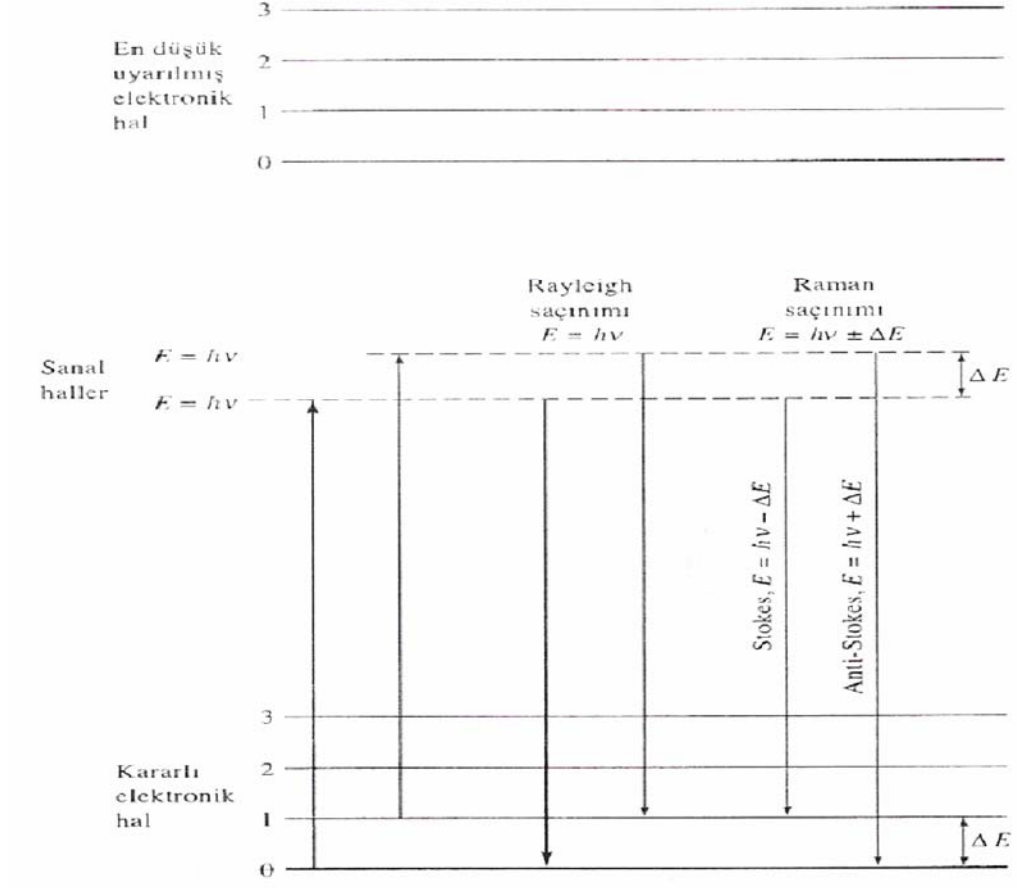
Raman spektrumlarında genellikle Şekil 2.1’de görüldüğü gibi yatay eksen, dalga kayması $\Delta\bar{\nu}$ olup, gözlenen ışının ve kaynağın dalga sayıları (cm^{-1}) arasındaki fark olarak tanımlanır. Rayleigh pikinin her iki yanında üç adet Raman pikinin bulunması ve iki taraftaki kayma düzenlerinin özdeş olması dikkat çekicidir. Bir diğer deyişle stokes çizgileri Rayleigh pikinden $218, 314$ ve 459 cm^{-1} daha küçük dalga boyunda çıkarlar. Halbuki anti-stokes pikleri kaynağın dalga sayısından $218, 314, 459 \text{ cm}^{-1}$ daha büyük dalga sayılarında görülür. Genel olarak anti-stokes çizgileri bunlara gelen stokes çizgilerinden çok daha az şiddetlidir. Bu nedenle sadece stokes kısmı kullanılır. Floresans yapan moleküller için, stokes değil, anti-stokes kaymaları kullanılması daha yararlıdır. Çünkü daha az enerjili olurlar ve floresans girişimi engellenebilmektedir. Raman saçılmalarının şiddetini uyarıcı dalga boyundan bağımsızdır. Şekil 2.1’de verilen özdeş kayma düzenleri, uyarmanın kripton iyon lazeri ile (488), helyum/neon lazeri ile (632.8) veya Nd:YAG lazer ile (1064) yapıldığına bakılmaksızın karbon tetraklorür için gözlenir (Kılıç vd., 1998).



Şekil 2.1 488 nm lazer ile uyarılan CCl₄’ün Raman spektrumu (Strommen ve Nakamoto, 1981).

2.1.1.2 Raman ve Rayleigh Saçılımının Mekanizması

Raman spektroskopide, spektral uyarma normal olarak, analitin herhangi bir absorpsiyon pikinden yeterince uzakta bir dalga boyuna sahip bir ışın ile yapılır.



Şekil 2.2. Rayleigh ve Raman saçılımının esası

Şekil 2.2'deki enerji-seviye diyagramı, Raman ve Rayleigh saçılımları göstermektedir. Soldaki koyu ok, kaynaktan gelen bir fotonla etkileştiğinde moleküldeki enerji değişimini göstermektedir. Enerjideki artış, foton ($h\nu$) eşittir. Kaynaktan gelen ışının frekansına bağlı olarak molekülün enerjisi, temel hal ile diyagramın üst tarafında gösterilen birinci elektronik uyarılmış hal arasında sanal haller diye bilinen sonsuz sayıdaki değerlerden herhangi birini alabilir. Soldan ikinci ve daha ince ok, fotonla karşılaşan molekülün, elektronik temel halin birinci titreşim seviyesinde bulunması durumunda ortaya çıkabilecek değişimi göstermektedir. Oda sıcaklığında bu halde moleküllerin bulunma ihtimali pek yoktur. Böylece bu işlemin gerçekleşme olasılığı çok düşüktür.

Ortadaki ikinci ok Rayleigh saçılımını oluşturan değişimleri gösterir. Buradaki daha olası değişim daha kalın okla temsil edilir. Rayleigh saçılımında enerji kaybı olmadığına dikkat

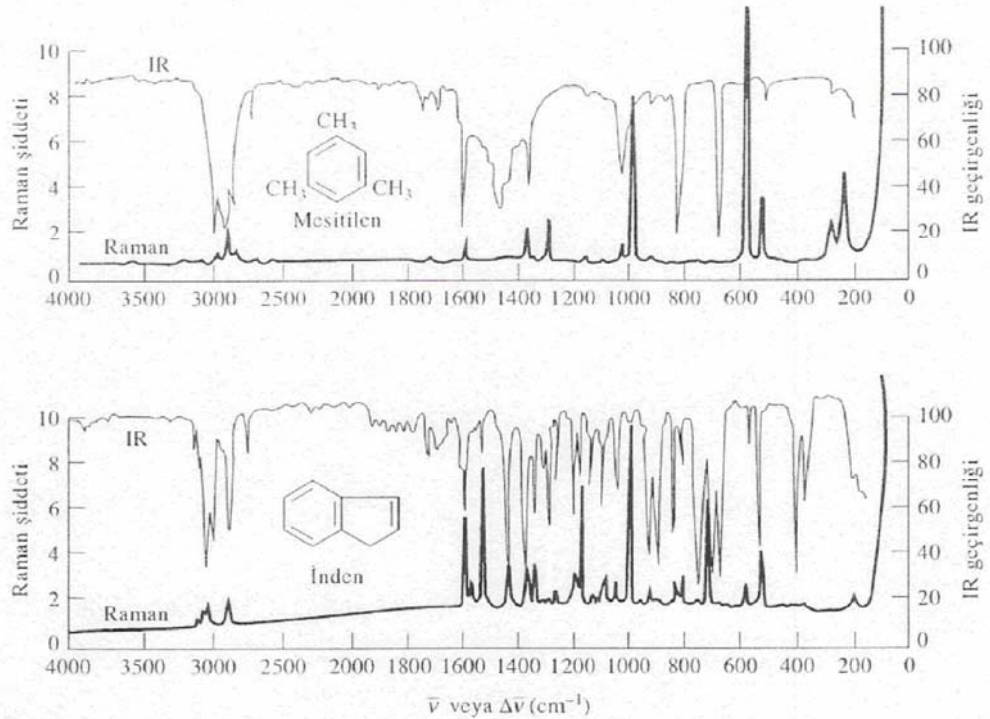
edilmelidir. Bunun sonucunda foton ve molekül arasındaki çarpışmaların “esnek” olduğu söylenir.

Son olarak stokes ve anti-stokes saçılımı oluşturan enerji değişimleri sağ tarafta verilmektedir. Bu ikisi, Rayleigh ışınından temel halin birinci titreşim düzeyinin enerjisi olan $\pm\Delta E$ 'ye karşılık gelen frekanslar kadar farklıdır. Bağ infrared aktifse, bağın absorpsiyon enerjisinin de ΔE kadar olacağına dikkat ediniz. Yani Raman frekans kayması ve infrared absorpsiyon pik frekansı özdeşdir.

Dikkate değer başka bir husus bu iki üst enerji halinin bağlı bolluklarının, Stokes emisyonunun anti-Stokes emisyonuna göre daha çok tercih edilecek biçimde bulunmasıdır. Ayrıca Rayleigh saçılımı Raman'a göre oldukça yüksek bir gerçekleşme olasılığına sahiptir. Çünkü en olası olay, temel haldeki moleüllere enerji aktarımı ve bu moleüllerin temel hale geri dönüşleriyle yeniden enerji emisyonudur. Son olarak anti-Stokes/Stokes şiddet oranının sıcaklıkla artacağına dikkat edilmelidir, çünkü moleüllerin daha büyük bir kesri bu koşullar altında birinci titreşim uyarılmış halde bulunur (Kılıç vd., 1998).

2.1.1.3 Raman ve IR Karşılaştırma

Belirli bağ için bir Raman deneyinde gözlenen enerji kaymaları, ilişkili titreşim modları hem infrared absorpsiyonuna, hem de Raman saçılmasına karşı aktif olmak koşuluyla, bağın infrared absorpsiyon bantlarının enerjisiyle özdeş olmasına dikkat ediniz.

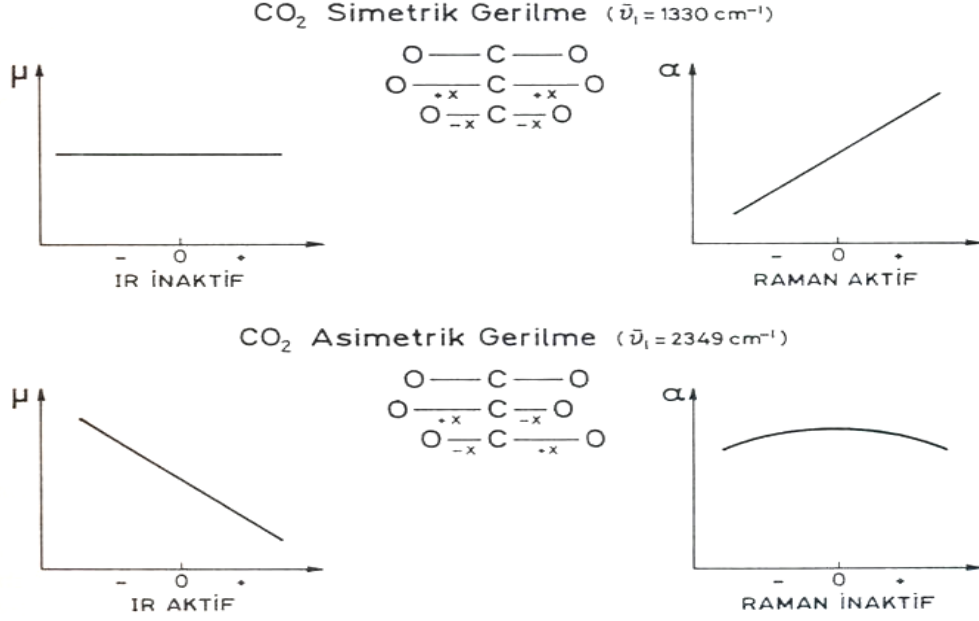


Şekil 2.3 Raman ve infrared spektrumlarının karşılaştırılması

Şekil 2.3, bu iki tip spektrumun benzerliğini ortaya koymaktadır. İki bileşik için özdeş ν ve $\Delta\nu$ değerlerine sahip çeşitli piklerin var olduğu görülmektedir. Ancak bazı karşı gelen piklerin birbirine göre çoğu kez oldukça farklıdır; ayrıca bir spektrumda ortaya çıkan bazı pikler diğerinde görülmemektedir.

Bir Raman spektrumuyla infrared arasındaki farklılıklar, temel mekanizmaları aynı titreşim modlarına dayalı olduğu halde, mekanik olarak farklı işlemlerden kaynaklandıkları göz önüne alındığında hiç de şaşırtıcı değildir. İnfrared absorpsiyonu, molekülün bir titreşim modunun dipol momentle bir değişime veya bununla ilişkili bir yük dağılımına sahip olmasını gerektirir. Ancak ondan sonra aynı frekanstaki ışın, molekülle etkileşime girebilir ve onu uyarılmış bir titreşim haline yükseltir. Bunun aksine saçılım, bir moleküldeki bağın etrafındaki elektronların dağılmasındaki anlık bozulması ve sonra, bağın normal haline geri dönüşü sırasında ışının yeniden emisyonu ile ilişkilidir. Elektron dağılımı bozulmuş olan molekül, geçici olarak polarizlenmiştir; yani durulma ve yeniden emisyonla kaybolan bir anlık indüklenmiş dipol oluşturur. Mekanizmadaki bu temel farklılıktan ötürü, verilen bir titreşim modunun Raman aktivitesi onun infrared aktivitesinden önemli ölçüde farklı olabilir. Örneğin azot, hidrojen veya klor gibi homonükleer bir molekülün gerek denge konumunda, gerekse gerilme titreşimi iki çekirdek arasındaki uzaklıkta bir değişime yol açtığında dipol moment değişimi yoktur. Bu yüzden titreşim frekansında absorpsiyon gerçekleşemez ve IR aktif değildir. Diğer taraftan bu tür bir molekülde iki atom arasında bağın polarizlenebildiği, periyodik olarak gerilme titreşimleri ile eşfazlı olarak değişir ve maksimum değerine en büyük ayırmda, minimum değerine ise, en fazla yaklaşımda olur. Buna bağlı olarak titreşim modundakine karşılık gelen frekansta bir Raman kayması ortaya çıkar. Dolayısıyla Raman aktiftir.

Karbondioksit molekülü için eşleşmiş titreşim modlarının infrared ve Raman aktivitelerini kıyaslamak oldukça ilginçtir. Simetrik modda iki oksijen atomu, merkezdeki karbon atomundan uzaklaştığında veya yaklaştığında dipol momentte değişiklik olmaz; yani bu mod infrared bakımından aktif değildir. Ancak polarizlenebilirlik, titreşimle eşfazlı bir değişim gösterir, çünkü bağlar uzadıkça bunların elektron dağılımı kolaylaşır ve kısaldıkça güçleşir. Raman aktivitesi bu modla ilgilidir. Buna karşıt olarak, karbondioksitin dipol momentli anti-simetrik titreşim modu ile eşfazlı olarak dalgalanma gösterir. Şu halde infrared absorpsiyon piki bu moddan kaynaklanır. Buna karşılık bağlardan birinin polarizlenebilirliği bağ uzadıkça artar ve diğerinin polarizlenebilirliği azalır; öyle ki polarizlenebilirlikte net bir değişim olmaz. Böylece antisimetrik gerilme titreşimi Raman aktif değildir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Karbondioksitin Raman ve infrared aktivitelerinin karşılaştırılması

Genellikle Raman ve infrared spektrumlarının bazı kısımları, her biri bir moleküldeki farklı bir dizi titreşim modu ile ilişkili olarak birbirinin tamamlayıcısıdır (Kılıç vd., 1998). IR ve Raman spektroskopisinin karşılaştırılması Çizelge 2.1’de genel olarak kısaca görülmektedir.

IR	RAMAN
Absorpsiyon esasına dayanır.	Saçılma esasına dayanır.
Dipol moment değişimi gereklidir.	Polarite değişimi gereklidir.
Sulu örnekler analiz edilemez.	Sulu örnekler analiz edilebilir.
Floresanstan etkilenmez.	Floresanstan etkilenebilir.
Cam ve kuvars kullanılamaz.	Cam ve kuvars kullanılabilir.
Sadece KBr ve NaCl hücreleri kullanılır.	

Çizelge 2.1 Raman ve IR karşılaştırılması

2.1.2 Raman Cihazı

Modern Raman spektroskopide kullanılan cihazlar üç ana bileşenden oluşur; bir lazer kaynağı, bir numune aydınlatma sistemi ve uygun bir spektrometre. Ancak bu bileşenlerin performans özellikleri, moleküler spektrometrelerden çok daha önemlidir ve çok daha iyi olmalıdır, çünkü Raman saçılım sinyali çok zayıftır.

2.1.2.1 Işın Kaynakları

Modern Raman spektrometrede kullanılan ışın kaynakları genellikle lazerlerdir. Çünkü makul bir sinyal/gürültü oranıyla ölçülebilir yeterlilikte bir şiddete sahip Raman saçılımı oluşturmak için yüksek şiddetli ışın kaynağı gerekir. Raman spektroskopide yaygın olarak kullanılan 5 lazer Çizelge 2.2’de verilmektedir.

KAYNAK TİPİ	DALGA BOYU (nm)
Argon iyonu	488.0 veya 514.5
Kripton iyonu	530.9 veya 647.3
Helyum/Neon	632.8
Diyod lazeri	782 veya 830
Nd/YAG	1064

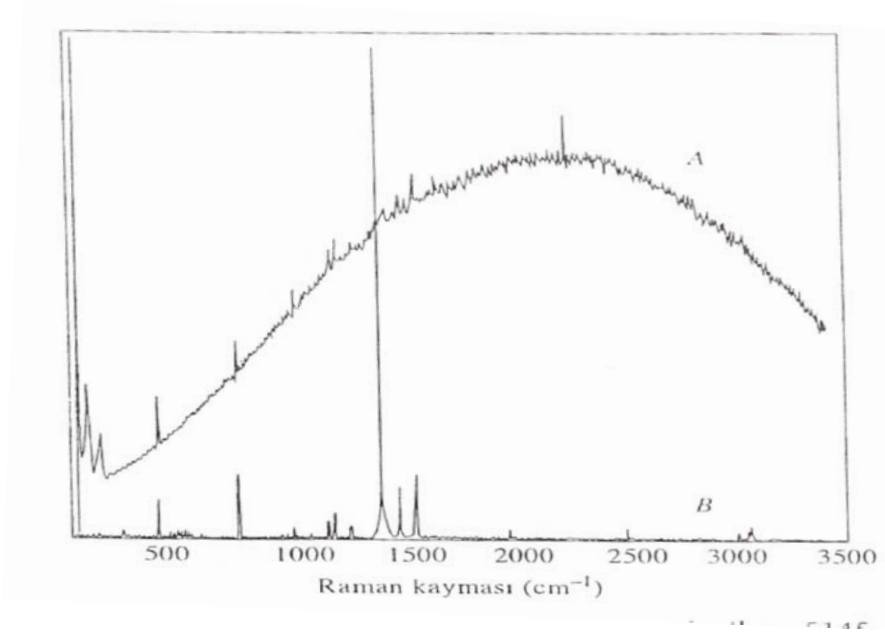
Çizelge 2.2 Raman spektroskopide yaygın olarak kullanılan bazı lazer kaynakları

Raman saçılım şiddeti frekansın dördüncü kuvveti ile orantılı olduğundan, spektrumun düşük dalga bölgesinde yayınım yapan argon ve kripton iyon kaynakları diğer kaynaklara göre daha avantajlıdır. Örneğin 488 nm’deki argon çizgisi, aynı giriş gücündeki helyum/neon kaynakları ile uyarılan Raman çizgilerinden neredeyse üç kat daha şiddetli çizgiler verirler.

Çizelgedeki yakın-infrared ışınları, uyarıcı olarak giderek daha fazla kullanım bulmaktadır. Çünkü yakın-infrared kaynaklarının, daha kısa dalga boylu lazerlere göre iki önemli üstünlüğü vardır. Birincisi, numunenin foto parçalanmasına yol açmaksızın çok yüksek güçlerde (50 W’a kadar) çalıştırılabilmesidir. İkincisi, çoğu molekülde yeterli sayıda floresans oluşturucu uyarılmış elektronik enerji hallerini doldurmaya yetecek kadar enerjili olmamalıdır. Bunun sonucu olarak bu lazerlerle floresans, çok düşük şiddetlidir veya hiç olmaz. 1064 nm’deki Nd/YAG çizgisi floresansın giderilmesinde özellikle etkilidir. Diyod serili lazerlerin 782 ve 830 nm’lerdeki iki çizgisi de çoğu durumda floresansı önemli ölçüde düşürmektedirler.

Şekil 2.5, 1064 nm’deki Nd/YAG kaynağının zemin floresansını tamamen giderdiği bir örneği göstermektedir. Üstteki spektrum uyarma için argon iyon lazerinden gelen 514.5 nm çizgisini kullanan klasik dispersif Raman cihazıyla elde edilmiştir. Numune antrasendir ve kaydedilen sinyalin büyük kısmı bu bileşiğin floresansından gelmektedir. Alttaki spektrum ise aynı numunenin, 1064 nm’de ışın yayan bir Nd/YAG lazeriyle donatılmış bir Fourier dönüşümlü spektrometre ile alınan spektrumudur. Burada floresans zemin sinyalinin tamamen

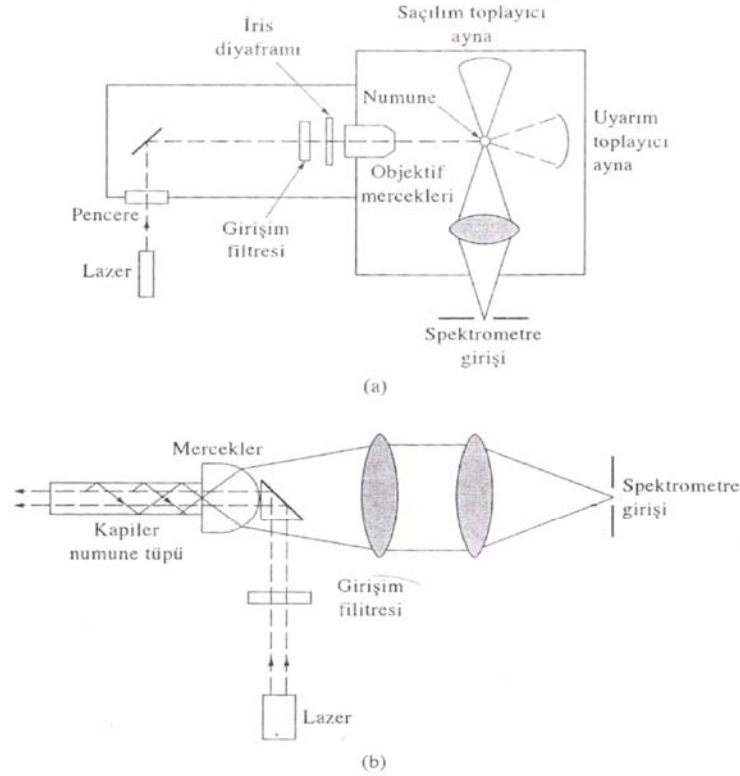
yok olmuştur (Chase, 1987). Yani floresan girişimini engellemek için uzun dalga boylu lazerler kullanmak daha avantajlıdır.



Şekil 2.5 Antrasen'in spektrumu A: Klasik cihaz, 514.5 uyarımı, B: FT cihazı, 1064 nm lazer ile uyarımı (Chase, 1987).

2.1.2.2 Numune Işınlama Sistemi

Raman spektroskopik ölçümlerinde, numunenin hazırlanması infrared spektroskopiden daha basittir, çünkü pencereler, mercekler ve diğer optik bileşenler için daha kırılğan ve atmosferik olarak daha az dayanıklı kristal halojen yerine cam kullanılabilir. Buna ek olarak lazer kaynağı, numunenin küçük bir alanına kolaylıkla odaklanabilir ve yayınlanan ışın bir slit üzerine verimli olarak odaklanabilir. Bunun sonucunda çok ufak numuneler bile incelenebilir. Şekil 2.6, sıvı numuneler için kullanılan pek çok sistemden ikisini göstermektedir. Bunlardan her biri, bir lazer kaynağından gelen tek bir çizgiyi geçiren ve diğer çizgileri geçirmeyen dar bir bant-geçirimli bir girişim filtresine sahiptir. Şekil 2.6b'deki tüpün boyutları, Raman ışınlarının tüpün duvarlarda yansımalarının ayrıntılı bir şekilde gösterilmesi için büyütülmüştür. Aslında tutucu, yaklaşık 5 cm uzunluğunda 1mm dış çaplı bir cam kapilerdir.



Şekil 2.6 İki numune uyarım sistemleri

Raman spektroskopinin infrarede göre numune hazırlamada temel üstünlüğü, suyun zayıf bir Raman saçındırıcısı, fakat kuvvetli infrared ışını absorplayıcısı olma özelliğinden gelir. Böylece sulu çözeltiler, infrared ile değil Raman spektroskopisiyle incelenebilir. Bu üstünlük, biyolojik ve inorganik sistemler için ve su kirliliği sorunlarına ilişkin çalışmalarda özellikle çok önemlidir.

Katı numunelerin Raman spektrumları, çoğu kez ufak bir oyuğu ince toz edilmiş numune doldurularak alınır. Polimerler genellikle numune doğrudan incelenebilirler. Gaz numuneler için Raman spektrumu almak için, ışın yolu uzatılmış gaz hücrelerinin kullanımıdır. İki ucuna aynalar yerleştirilmiş silindirik bir cam tüp numune gazı ile doldurulur. Uyarıcı lazer demeti aynalardan birindeki ufak bir penceren geçirilir ve bunun ardından gaz numuneden defalarca geçer. Numune tüpüne ve uyarıcı lazer demetine dik olarak oluşan Raman saçılımı bundan sonra büyük mercek aracılığı ile spektrometrenin giriş siliti üzerine odaklanır (Kılıç vd.,1998).

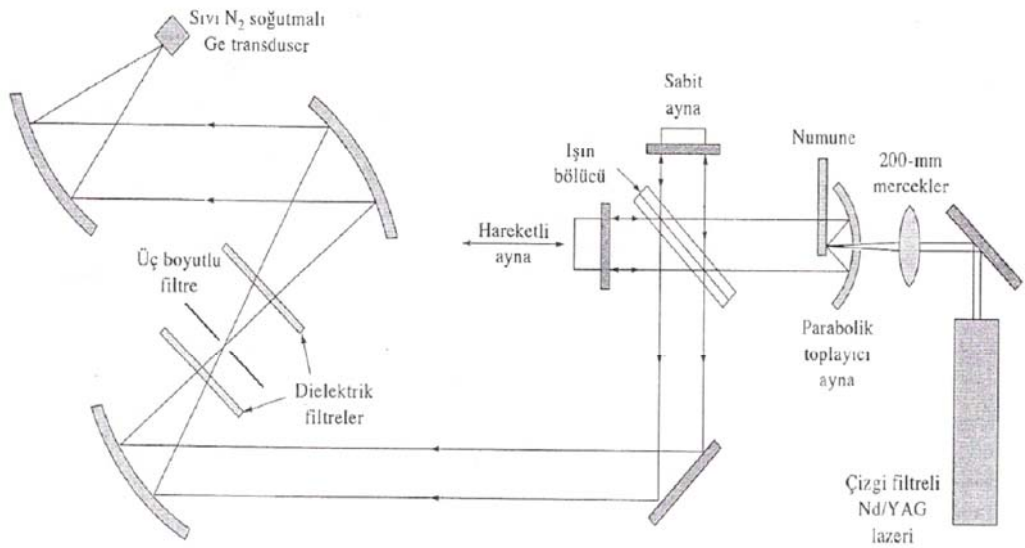
2.1.2.3 Raman Spektrometreleri

1980'li yılların başına kadar Raman spektrometreleri klasik ultraviyole/görünür bölge dispersif cihazlarla aynı tür bileşenleri kullanmakta ve bunlara tasarım yönünden benzemektedirler.

Bunların çoğunda transdusere ulaşan yalancı ışını en alt düzeye indirmek için çift optik ağı sistemler kullanıldı. Fotoçoğaltıcılar transduser olarak kullanıldılar. Ancak şu anda çoğu Raman spektrometre ya germanyum transduseri ile donatılmış Fourier dönüşümlü cihazlar olarak ya da yük eşleşmiş düzeneklere dayalı çok kanallı cihazlar olarak pazarlanmaktadır. Fotoçoğaltıcı tüplerin aksine bu transduserler, ciddi floresansa yol açmaksızın çoğu bileşiğin Raman uyarımını sağlayan ve diyod lazerleri ile 782 nm’de üretilen ışığa karşı duyarlıdır. Ne yazık ki, yük eşleşmiş düzenekler bir Nd/YAG lazerinden gelen 1064 nm ışınına duyarlı değildir.

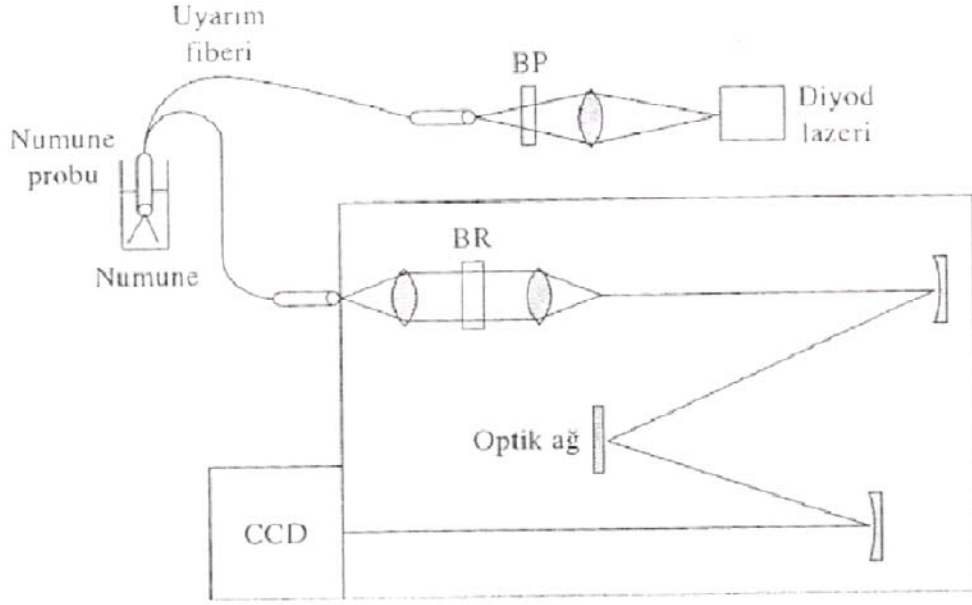
Günümüzde floresans gösteren numunelerde Raman ölçümleri için hangi tür cihazın daha iyi olduğu konusunda tam bir netlik yoktur. Fourier dönüşümlü cihazlar mı yoksa yük-eşleşmiş dedektörlere dayanan dispersif cihazlar mı daha iyi sonuç verir? Bu noktada bu cihaz türlerinin hangisinin gelecekte daha yaygınlıkta kullanılacağı açık değildir.

Şekil 2.7, Fourier-dönüşümlü Raman ölçümleri için bir cihazın şemasıdır. İnterferometre, infrared cihazlarda kullanılanlarla aynı tiptendir. Transduser ise sıvı azotla soğutmalı germanyum fotoiletkenidir. Rayleigh çizgisinin şiddeti, Raman çizgisine ait olandan bir kaç mertebe daha yüksek olduğundan, cihazda, transdusere kaynağından daha uzun dalga boylu ışınının erişmesini sınırlandırmak için genellikle notch filtreleri denen holografik girişim filtreleri veya bir monokromatör kullanılır. Bazı Fourier dönüşümlü cihazlarda sadece lazer kaynağının dalga boyunu gidermek üzere tasarlanmış filtreler kullanılır (Chase, 1987).



Şekil 2.7 Bir FT-Raman spektrometrenin optik diyagramı (Chase, 1987).

Şekil 2.8, bir yük eşleşmiş dedektörü olan tipik bir Raman dispersif spektrometrenin şemasıdır. Kaynak 783 nm’de ışın veren bir diyod lazeri ve filtre sistemidir. Bu demet bir mercek aracılığıyla uyarım fiberinin ucuna odaklanır ve 19 toplayıcı fiberle çevrili uyarım fiberinden oluşan bir fiber proba iletilir. Bu fiber prob ise, Raman saçılımını bir monokromatörün slitine taşır ki burada filtreden geçerken Rayleigh saçılmış ışını yok edilir. Her mm’inde 600 yiv içeren bir kırınım optik ağı ışını disperse eder ve onu 258’e 1152 pikselden oluşan bir yük eşleşmiş cihazın üzerine yansıtır. Son okumadan önce 258 düşey pikselden her biri toplanır (Newman vd., 1992).



Şekil 2.8 Bir yük-eşleşmiş düzeneği (CCD) bulunan çok kanallı dispersif Raman spektrometre. BP, girişim bant-geçirimli filtre, BR, Rayleigh bant-reddeden filtre (Newman vd., 1992).

2.1.3 Raman Spektroskopinin Uygulama Alanları

Raman spektroskopisi inorganik, organik ve biyolojik sistemlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde kullanılmaktadır (Grasselli ve Bulkin, 1991).

2.1.3.1 Raman Spektroskopinin İnorganik Uygulamaları

İnorganik sistemlerin incelenmesinde spektroskopinin kullanımı açısından Raman tekniği çoğu kez infrarede göre üstündür. Çünkü sulu çözeltiler kullanılabilir. Buna ek olarak metal-ligand bağlarının titreşim enerjileri genellikle infraredin deneysel olarak güç olan $100-700\text{ cm}^{-1}$ aralığında yer alır. Ancak bu titreşimler Raman aktiftir ve $\Delta\nu$ değerleri bu aralıkta yer alan pikler, kolaylıkla gözlenir. Raman çalışmaları koordinasyon bileşiklerinin bileşim, yapı ve

kararlılığına ilişkin bilgilerin elde edilmesinde yararlı kaynaklardır. Örneğin çok sayıda halojenli ve halojenimsi kompleksler Raman spektrumu oluştururlar ve bu şekilde incelenebilirler. Metal-oksijen bağları da Raman aktiftir. Böylelikle metal-oksijen bağı içeren kompleksler incelenmiştir. Gelecekte Raman spektroskopinin, inorganik sitemlerin kurumsal kanıtlanması ve yapısal çalışmaları için daha yaygın kullanım bulacağı düşünülmektedir (Nakamoto, 1996).

2.1.3.2 Raman Spektroskopinin Organik Uygulamaları

Raman spektrumları, fonksiyonel grup belirtilmesinde yararlı bölgeler ile belirli bileşiklerin tanınmasına olanak veren parmak izi bölgelerine sahip olmaları bakımından infrared spektrumlarına benzerler. Daimay ve çalışma arkadaşları (1971) Raman fonksiyonel grup frekanslarının kapsamlı bir incelemesini yayınlamışlardır.

Raman spektrumları belirli tipte organik bileşikler için infrared spektrumundan daha fazla bilgi verirler. Örneğin, olefinlerin çifte bağ gerilme titreşimi zayıf ve bazen belirlenemeyen infrared absorpsiyonuna yol açar. Diğer yandan Raman bandı (infrared bandı gibi yaklaşık 1600 cm^{-1} 'de ortaya çıkan) şiddetli olup, konumu süstituentlerin doğasına olduğu kadar geometrisine de duyarlıdır. Raman çalışmaları, infrared çalışmalarıyla ortaya konulamayan olefinik fonksiyonel gruplar hakkında yararlı bilgiler vermeye adaydır. Bu ifade sikloparafın türevleri için de geçerlidir. Bu bileşikler $700\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ aralığında karakteristik bir Raman pikine sahiptir. Bu pik, çekirdeklerin halka merkezine göre içeriye ve dışarı simetrik hareket ettikleri bir nefes alma titreşimine atfedilmiştir. Pikin konumu siklopropan için 1190 cm^{-1} 'den siklooktan için 700 cm^{-1} 'e kadar sürekli bir azalma gösterir; Raman spektroskopi bu şekilde parafinlerin halka boyutunu tahmin etmede mükemmel bir teşhis aracı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu titreşime ilişkin infrared piki zayıftır veya yoktur.

2.1.3.3 Raman Spektroskopinin Biyolojik Uygulamaları

Raman spektroskopi, biyolojik sistemlerin incelenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Carey, 1982, Tu, 1982). Bu tekniğin avantajları, az miktarda numune gerektirmesi, suyun girişiminin çok az olması, ayrıntılı spektrum elde edilmesi ve konformasyonel yapıya ve çevreye çok duyarlı olmasıdır.

2.1.3.4 Kantitatif Uygulamaları

Raman spektrumlarında, infrared spektrumlarından daha az çakışmış pik bulunur. Bunun sonucu olarak karışımlarda pik çakışması daha az olasıdır ve kantitatif ölçümler daha kolaydır. Buna ek olarak, Raman numune düzenekleri nemden etkilenmez ve numunelerde

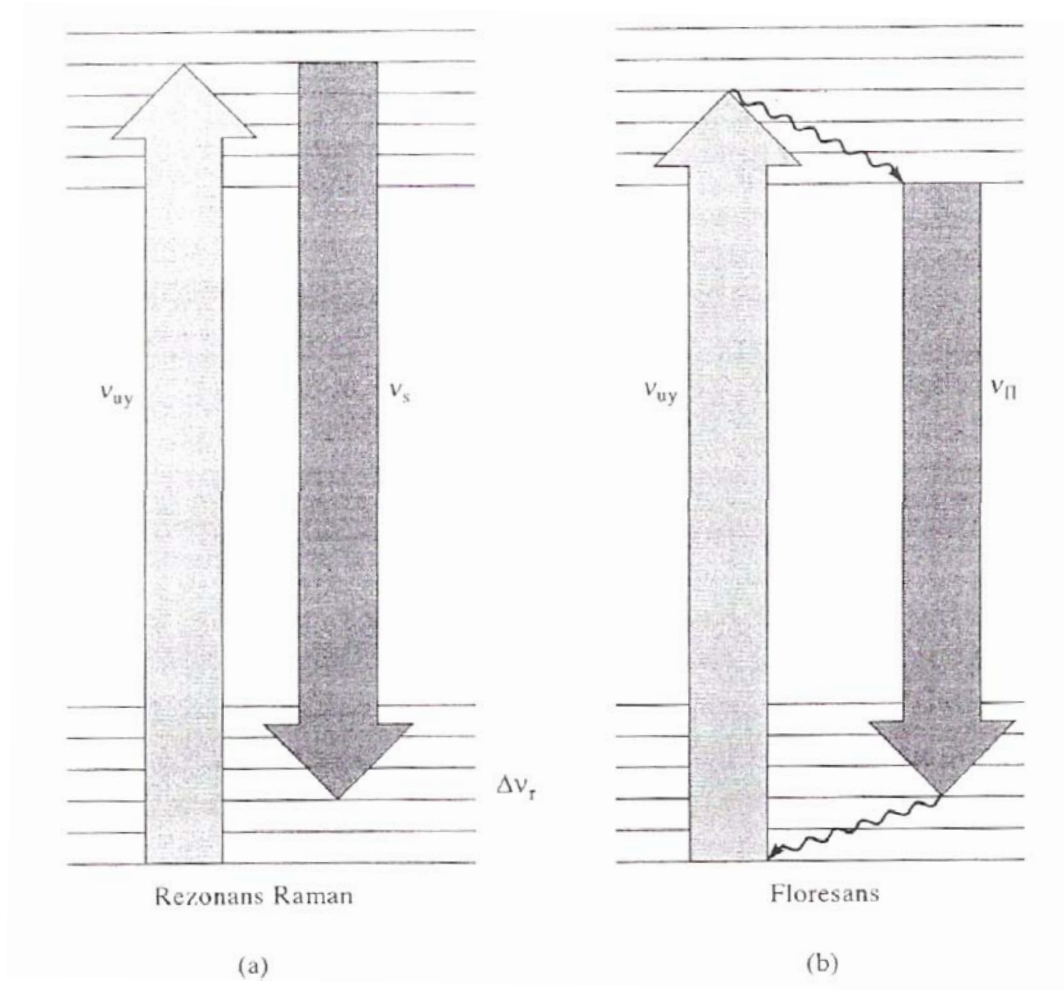
var olabilen az miktardaki su girişim yapmaz. Bu avantajlara rağmen Raman spektroskopisi, kantitatif analizde yaygın olarak yer almamıştır. Bu kullanım eksikliği büyük ölçüde Raman spektrometrelerinin absorpsiyon cihazlarına göre yüksek maliyetinden kaynaklanmıştır. Uygun düşük maliyetli lazer diyodlar piyasaya sürüldükçe bu engelin gittikçe önemini kaybedeceği düşünülebilir. Lazer demetleri yüksek kesinlikle odaklanabildiğinden, kantitatif analizleri çok az numunelere uygulamak mümkün olmaktadır. Bu iş için lazer mikro probalar denen cihazlar kullanılır. Lazer mikro probalar tek bakteri hücrelerinde, duman ve uçucu külün her bir taneciği içindeki bileşenlerde ve minerallerin mikroskopik yapısında türlerin tayininde kullanılmıştır (Kılıç vd., 1998)

2.1.4 Raman Spektroskopinin Diğer Çeşitleri

Ayarlanabilen lazerlerin geliştirilmesi ile çeşitli Raman spektroskopik yöntemler 1970'lerin başlarında geliştirildi. Bu tekniklerin bazılarının uygulamalarına ilişkin kısa bir bilgi aşağıda verilmiştir.

2.1.4.1 Rezonans Raman Spektroskopisi

Rezonans Raman saçılımı, Raman çizgi şiddetlerinin, bir analitin elektronik absorpsiyon pikine oldukça yaklaşan dalga boyları ile uyarılması sonucu büyük ölçüde güçlendiği bir olguya işaret eder. Bu koşul altında çoğu simetrik titreşime ilişkin Raman piklerinin şiddetleri 10^2 ile 10^6 kat kadar kuvvetlenir. Bunun sonucunda rezonans Raman spektrumları 10^{-8} M'a kadar düşürülebilen analit derişimlerinde elde edilmiştir. Bu duyarlılık düzeyi, çoğunlukla 0.1 M'dan daha yukarı derişimlerle sınırlı normal Raman çalışmalarıyla çelişkilidir. Rezonans kuvvetlendirmesi, kromofor ile ilgili Raman bantları ile kısıtlanmış olduğundan rezonans Raman spektrumları genellikle sadece birkaç çizgiden oluşur. Bundan da ötesi, rezonans Raman spektrumları oldukça seçimli olarak elde edilebilir. Çünkü uyarma, spesifik absorpsiyon bantlarına hedeflenebilir. Şekil 2.9a, rezonans Raman saçılımından sorumlu enerji değişimlerini göstermektedir. Bu şekil, normal Raman saçılımı için geçerli olan enerji diyagramından (Şekil 2.2), elektronun uyarılmış bir elektronik hale sıçraması ve bunun ardından elektronik kararlı halin bir titreşim seviyesine süratle durulması bakımından farklıdır. Şekilde gösterildiği gibi rezonans Raman saçılımı, kararlı hale durulma işleminden önce uyarılmış elektronik halin en düşük titreşim düzeyine ön durulmasının gerçekleşmeyişi bakımından floresanstan (Şekil2.9b) ayrılır.



Şekil 2.9 (a) Rezonans Raman saçılımı (b) floresans emisyonları için enerji diyagramları
(Morris ve Wallan, 1979).

Bu iki olgunun zaman ölçekleri de oldukça farklı olup floresans emisyonunun 10^{-6} ile 10^{-8} s arasındaki süresine karşılık, Raman durulması 10^{-14} s'den daha kısa sürede gerçekleşmektedir. Bir rezonans Raman deneyinde çizgi şiddetleri, uyarma dalga boyu elektronik absorpsiyon pikinin dalga boyuna yaklaştıkça hızla artar. Böylece geniş bir absorpsiyon maksimumu aralığında en fazla sinyal kuvvetlendirmesini sağlamak için ayarlanabilir bir lazer gereklidir. Şiddetli lazer ışını ile numune ayrışması ciddi bir problem haline gelebilir, çünkü elektronik absorpsiyon pikleri sıklıkla ultraviyole bölgesinde ortaya çıkar. Özel olarak şiddetli absorpsiyon numunede yerel ısınmaya yol açar ki, bu da analitin parçalanmasına sebep olur. Bu sorunun üstesinden gelmek için lazer ışını odaklanırken numuneyi sirküle ettirmek bilinen bir çaredir. Bu sirkülasyon iki şekilde yapılır: numune çözeltisi içine yerleştirilmiş bir kapilerden çözelti ya da sıvıyı pompalamak veya numuneyi içeren silindirik hücreyi lazer demeti içinde döndürmek. Böylece herhangi bir anda numunenin yalnızca küçük bir kesri

ışınlanmış olur ve ısıtma ile numune parçalanması en az düzeye indirilir. Rezonans Raman spektroskopinin belki de en önemli uygulaması, fizyolojik bakımdan önemli koşullar altında biyolojik moleküllerin incelenmesidir; yani bu çalışma, suyun varlığında ve düşükten ortaya değişen derişim düzeylerinde yapılır. Örnek olarak bu teknik, hemeglobin ve sitokrom-c moleküllerindeki demir atomlarının yükseltgenme basamağını ve spinini tayin etmede kullanılmış. Bu moleküllerde rezonans Raman bantları sadece tetrapirel kromoforunun titreşim modlarından kaynaklanır. Protein ile diğer bantlardan hiç biri kuvvetlendirilmez ve sonuç olarak normalde kullanılan derişimlerde bu bantlar girişim yapmaz. Rezonans Raman spektroskopiyeye önemli bir sınırlama, analitin kendisinden veya numunede var olan diğer türlerden gelen floresans girişimidir (Morris ve Wallan, 1979; Strommen ve Nakamoto, 1977; Asher, 1993).

2.1.4.2 Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (YZRS)

Yüzeyde zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi, koloidal nanometal tanecikleri (genelde gümüş, altın ve bakır) yüzeyinde veya bu metallerin nanoparçacıklarının pürüzlendirilmiş yüzeylerinde adsorplanmış numunelerin, Raman spektrumlarını elde etmeye ilişkindir. Tam olarak anlaşılamayan nedenlerle adsorplanmış molekülün Raman saçılımları çoğu kez 10^3 ile 10^6 kat kadar kuvvetlendirilir.

Yüzeyde zenginleştirilmiş spektroskopisi için çeşitli numune hazırlama teknikleri kullanılır. Bu tekniklerden birinde koloidal gümüş veya altın nanoparçacıkları, numunenin (genellikle sulu) seyreltik bir çözeltisi ile karıştırılır. Daha sonra çözelti bir yandan lazer ışını ile uyarılmakta olan dar bir cam tüp içinden geçirilir. Diğer bir yöntemde koloidal nanometal taneciklerinin ince bir filmi, cam bir yüzey üzerinde biriktirilir ve numune çözeltisinin 1-2 damlası film üzerine damlatılır. Raman spektrumu alınır (Garrell, 1989).

Yüzeyde zenginleştirme iki sebepten dolayı kaynaklanmaktadır. Bu sebeplerden birincisi Elektromanyetik zenginleştirme (Moskovits, 1985) ikincisi ise kimyasal zenginleştirmedir (Otto vd., 1992). Elektromanyetik zenginleştirmeye sebep olan, nanoparçacıkların kendi etrafında oluşturdukları yüzey plazmonlarıdır. Bu yüzey plazmonları nanoparçacıkların cinslerine ve büyüklüklerine göre değişmektedirler. Buna bağlı olarak zenginleştirmede de farklılıklar gösterirler (Barnes vd., 2003; Kreibig ve Vollmer, 1996; Liz-Marzan, 2006; Raether, 1988). Kimyasal zenginleştirmeye sebep olan ise metal ile moleküller arasındaki yük transferidir. Bu zenginleştirme elektromanyetik zenginleştirmeden daha düşüktür. Zenginleştirmenin olabilmesi için molekülün nanoparçacıklara 0.2 nm uzaklığında olması gerekmektedir (Smith ve Dent, 2005).

2.1.4.3 Doğrusal Olmayan Raman Spektroskopisi

Çoğu lazerler, önemli miktarlarda doğrusal olmayan ışın oluşturmaya yetecek kadar şiddetlidir. 1970'ler ve 1980'ler boyunca ikinci derece ve daha yüksek alan şiddetleri ile indüklenen polarizasyona dayalı pek çok Raman tekniği geliştirilmiştir. Bu teknikler, doğrusal olmayan Raman yöntemleri olarak adlandırılır. Bu yöntemler arasında sitimüle edilmiş Raman saçılımı, hiper Raman etkisi, sitimüle edilmiş Raman kazanımı, ters Raman spektroskopisi, uyumlu anti-stokes Raman spektroskopisi ve uyumlu Stokes Raman spektroskopisi sayılabilir. Bu yöntemler arasında en yaygın kullanılanı koherent anti-Stokes Raman spektroskopisi veya CARS tekniğidir (Harvey, 1978)). Doğrusal olmayan teknikler, klasik Raman spektroskopinin, başlıca düşük verim, görünür ve yakın-ultraviyole bölgelerle sınırlılık ve floresanstan gelen girişime duyarlılık gibi zayıflıkları yenmek için kullanılmıştır. Doğrusal olmayan yöntemlerin temel bir dezavantajı ise, bunların analite özgü olma eğilimleri ve bir dizi farklı türe uygulayabilmek için sıklıkla birkaç farklı lazerlere ihtiyaç duymalarıdır. Bu güne dek doğrusal olmayan yöntemlerin hiç biri, uzman olmayanlar arasında yaygın kullanım bulmamıştır (Harvey, 1981).

2.2 Nanoparçacıklar

Nanoparçacıklar son yıllarda bilim ve teknoloji alanında kullanılmaya başlanmıştır. Çünkü nanomaddeler moleküler hallerinden farklı olarak bir takım özellikler kazanmaktadırlar. Nano boyutta maddelerin magnetik, elektronik ve optik özellikleri değişmektedir. Bu özelliklerini, nanoparçacıkların şekli, büyüklüğü ve sentezlendiği maddeye göre çok farklılıklar göstermektedir. Bu ekstra özelliklerinden dolayı nanoparçacıklar yeni kimyasal ve biyolojik sensörlerde, elektro optik cihazlarda, elektronikte, yüksek kapasiteli data saklayıcılarda ve yüzeyde zenginleştirilmiş Raman spektroskopide kullanılmaktadır.

2.2.1 Nanoparçacıkların Hazırlanma Yöntemleri

2.2.1.1 Lazer Kazıma Yöntemi

Lazer kazıma yöntemi, makroskopik materyalleri kullanılarak nanoparçacık hazırlama yönteminde yeni ve ümit vaat eden fiziksel bir yöntemdir. Bu metodun avantajı uygulamanın kolay olmasıdır. Bu yöntemle elde edilecek metallerin makroskopik boyutları kullanılmaktadır ve lazer ile yüzeyden nanoboyutta parçacıkları elde edilmektedir. Bu yöntem pek fazla kullanılmamaktadır. Çünkü parçacık boyutunun dağılımının kontrolü çok zordur. Bu yöntemle ilgili hala çalışmalar devam etmektedir. Bu metotla 30-40 nm'nin üstü büyüklüklerde nanoparçacıklar elde edilebilmektedir. Nanoparçacıkların büyüklüğü

kullanılan lazerin dalga boyuna, şiddetine ve örnek üzerindeki kalma süresine bağlı olarak değişmektedir (Jeon ve Yeh, 1998).

2.2.1.2 Ultrason ile İndirgeme Yöntemi

Ultrasonun, suyu hidrojen ve hidroksil radikallerine parçalama kabiliyeti vardır. Nanoparçacıklar hazırlanırken, oluşan hidroksil ile tepkimeye girerek organik radikalleri oluşturacak maddeler eklenir. Oluşan bu radikaller indirgen olarak davranırlar ve metal tuzlarını sulu ortamda indirgeyerek nanoparçacıklar oluştururlar. Bu yöntem kullanılarak 13 ± 3 nm boyutunda gümüş nanoparçacıkları hazırlanmıştır (Nagata vd., 1992).

2.2.1.3 Gama ışınları ile indirgeme yöntemi

Bu yöntem silver nanoparçacıkları hazırlarken direk olarak gümüş tuzlarının sulu ortamda ışınlama ile parçalanarak elde edilebilir. Nanoparçacıkları bu metotla hazırlamanın avantajı, reaksiyon ortamında nanoparçacığın yüzeyine adsorplandığında özelliklerini değiştirecek fazla kimyasalların bulunmamasıdır. Bu yöntemle 7 nm gümüş nanoparçacıkları elde edilmiştir (Gutierrez ve Henglein, 1993).

2.2.1.4 UV Işını ile İndirgeme Yöntemi

Bu yöntemde ışın ile katalizleme yöntemidir. Bu yöntemin amacı basit ve ucuz olmasıdır. Bu yöntemde cıva boşalım lambaları UV ışın kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde metal tuzlarının çözeltilerinin içine UV ışını ile tepkimeye girerek radikaller oluşturacak organik maddeler eklenir. Oluşan bu radikaller indirgen olarak davranarak metal tuzlarını indirgeyerek nanoparçacıklar oluştururlar. Bu yöntemde UV ışını ile etkileşime girerek aktif hale gelebilen organik madde olarak aseton (Henglein, 1998), aseteofenon (Sato vd., 1999), benzofenon (Kapoor, 1998) kullanılabilir. Örneğin, metal tuzları içeren aseton, 2-propanol ve polimerik stabilizör içeren bir karışım UV ışını ile etkileştirildiğinde, aseton UV ışını ile uyarılır. Uyarılmış hal 2-propanol ile tepkimeye girerek güçlü indirgen olan keto radikallerini oluştururlar ve bu radikaller metal tuzunu indirgeyerek nanoparçacık oluştururlar. Bu yöntemle stabilizör olarak polietilenimin kullanılarak 7 nm gümüş nanoparçacık elde edilmiştir (Henglein, 1998).

2.2.1.5 İnorganik Ajanlarla İndirgeme Yöntemi

En yaygın olarak kullanılan method, metal tuzlarının NaBH_4 ile kimyasal olarak indirgeme yöntemidir. Bu yöntem Creighton yöntemi olarak bilinir. Soğutulmuş metal tuzları indirgen maddeye eklenerek elde edilir (Creighton vd., 1979).

2.2.1.6 Organik Ajanlarla İndirgeme Yöntemi

En yaygın olarak kullanılan method sodyum sitrat ile indirgeme yöntemidir. Bu yöntemde metal tuzları kaynayınca kadar ısıtılır ve sodyum sitrat eklenir. Altın nanoparçacık hazırlarken 15 dk., gümüş nanoparçacık hazırlarken 1 saat kaynatmaya devam edilir.

Örneğin, sitrat yöntemi ile gümüş nanoparçacıklar hazırlarken 90 mg gümüş nitrat (AgNO_3) tartılır ve kaynayınca kadar ısıtılır ve üzerine 10ml %1'lik sodyum sitrat çözeltisi eklenerek bir saat kaynatılır. Bu yöntem Lee-Meisel yöntemi olarak bilinir. Bu yöntemle oluşan nanoparçacıklar 40-60 nm aralığındadır (Lee ve Meisel, 1982).

Kimyasal indirgeme yöntemlerinde parçacık büyüklüklerini; karıştırma hızı, sıcaklık, indirgen ve metal tuzlarının konsantrasyonu, kullanılan malzemelerin temizliği ve reaksiyon zamanı etkilemektedir.

2.2.2 Nanoparçacıkların Karakterizasyonunda Kullanılan Teknikler

Hazırlanan nanoparçacıkların karakterizasyonu için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

Çizelge 2.3'de nanoparçacıkların büyüklükleri, şekilleri, büyüklük dağılımları ve bileşimleri hakkında bilgi almak için kullanılan teknikler görülmektedir.

TEKNİK	ALINAN BİLGİ
TEM/SEM	Büyüklük/Şekil/Büyüklük Dağılımı
UV/Görünür	Büyüklük/Büyüklük Dağılımı
AFM	Büyüklük/Şekil/Büyüklük Dağılımı
X-Ray	Bileşim
Zetasizer	Büyüklük/Büyüklük Dağılımı

Çizelge 2.3 Nanoparçacıkların karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan teknikler

2.3 Mikroorganizmalar

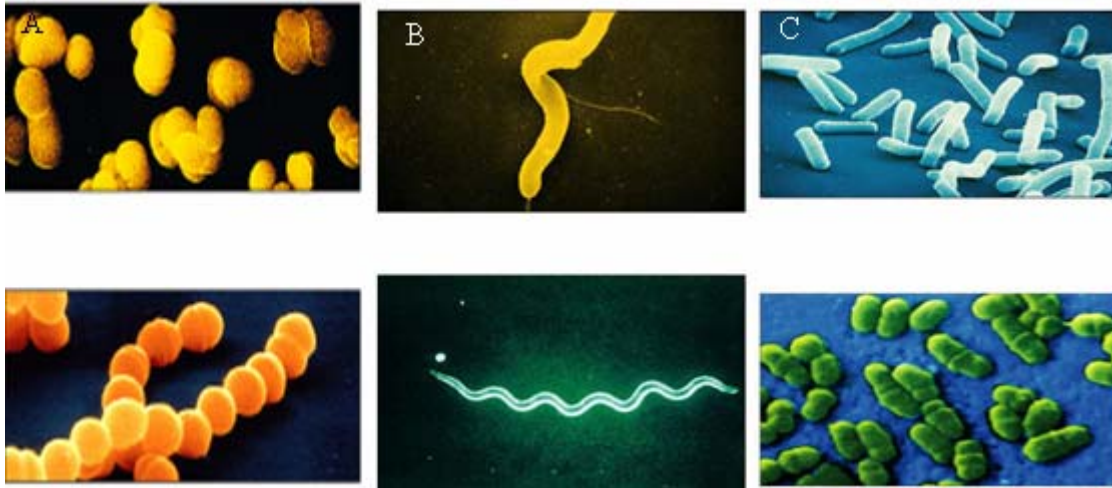
Mikroorganizmalar hücre yapılarına göre ökaryotlar ve prokaryotlar olarak 2'ye ayrılırlar. Bu iki ana grupta kendi içinde gruplara ayrılmaktadır. Çizelge 2.4'de bu gruplar görülmektedir (Bilgehan, 1999).

Ökaryotlar	Prokaryotlar
Algler	Arkebakteriler
Protozoonlar	Siyanobakteriler
Mantarlar	Bakteriler
Küfler	-Spiroketler
Mayalar	-Öbakteriler
	-Klamidiyalar
	-Mikoplazmalar

Çizelge 2.4 Mikroorganizmaların sınıflandırılması

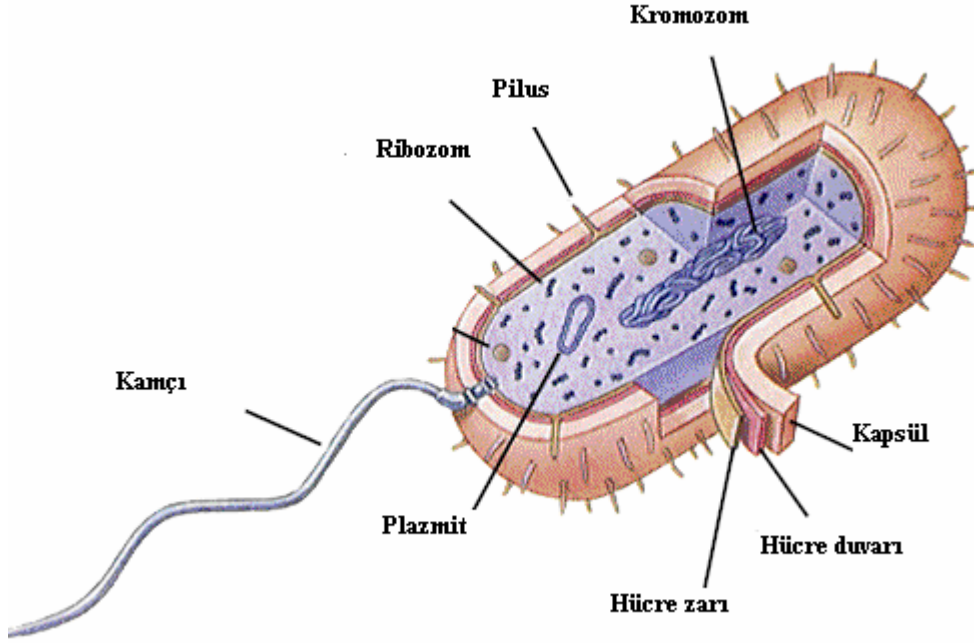
2.3.1 Bakterilerin Yapısı ve Özellikleri

Bakteri hücrelerinin büyüklüğü 0,3-5 μm 'dir. Üç temel şekil bulunur; Koklar, düzgün çomaklar, ve spiral şekilli çomaklar (şekil 2.10).



Şekil 2.10 Bakterilerin üç temel şekilleri, A) koklar, B) spiral şekilli çomaklar, C) düzgün çomaklar (Tortora vd., 2004)

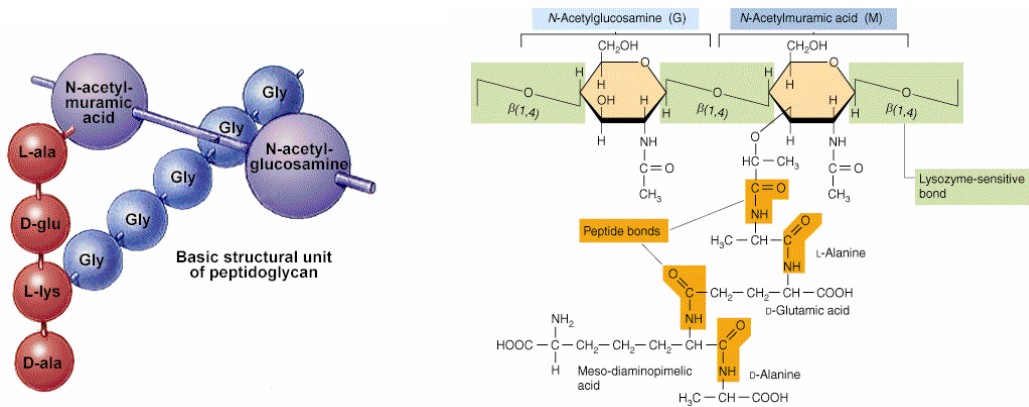
Çekirdek, bir zarla çevrili olmayan, çok ince, uzun ve sirküler bir DNA molekülünden ibarettir (kromozom). Bunun yanı sıra, hücre içerisinde sayıları birden fazla olan ekstra kromozomal nükleik asitler (DNA) plazmitlerdir. Sitoplazma, sitoplazma zarı ile çevrilidir. Sitoplazma zarında, permeazlar, murein sentezi enzimleri, salgısal proteinler ve sinyal proteinleri yer alır. Sitoplazma zarının dışında ise en önemli yapı olarak koruyuculuk işlevine sahip mureinden ibaret kompleks yapıli hücre duvarı bulunur. Birçok bakteriyi fagositozdan koruyucu işleve sahip polisakkarit yapısında kapsül vardır. Kamçılar aktif hareket organelleri olarak iş görürler. Şekil 2.11'de bir bakteri hücresinin genel yapısı görülmektedir.



Şekil 2.11 Bakteri hücresinin genel yapısı (Tortora vd., 2004))

2.3.2 Bakterilerin Hücre Duvar Yapıları

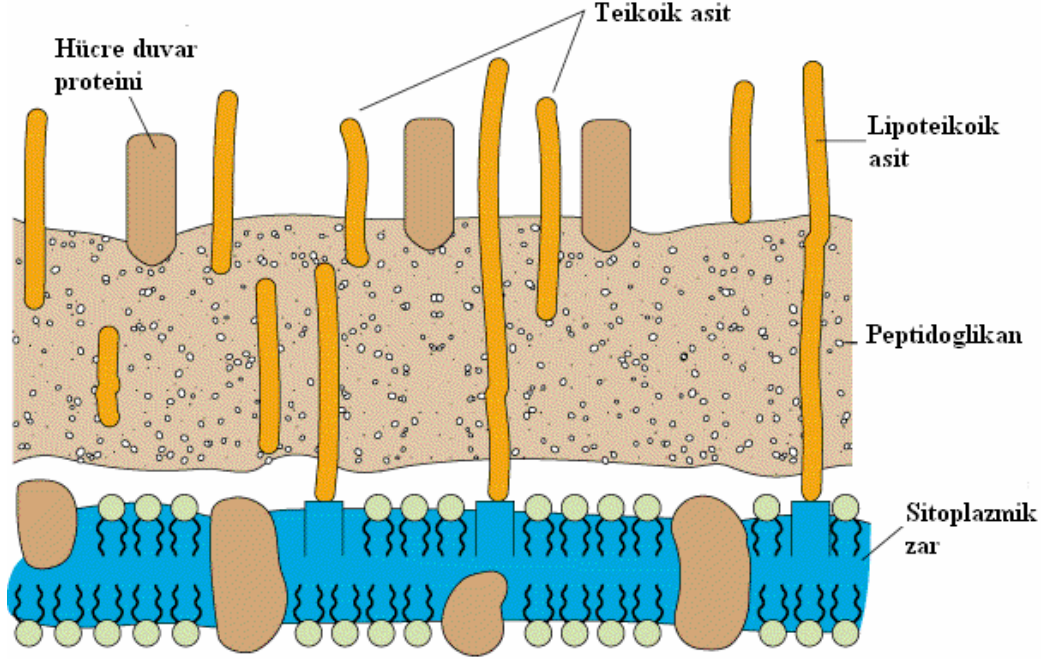
Karmaşık yapılu hücre duvarının görevi; protoplastı dış etkilerden korumak, iç ve dış ortamın ozmotik basınç farkını dengelemek, hücreye karakteristik şeklini vermek ve hücrenin dış çevreyle iletişimini sağlamaktır. Hücre duvarının en önemli yapıtaşı, tüm hücreyi çevreleyen, ağımsı bir polimer olan mureindir. Murein, N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asit birimlerinin dönüşümlü olarak ardarda gelmesiyle oluşan polisakkarit zincirinden oluşur (Küçüker vd., 2002). Şekil 2.12’de murein (peptidoglikan) yapısı görülmektedir.



Şekil 2.12 Peptidoglikanın (murein) genel yapısı (Tortora vd., 2004).

2.3.2.1 Gram Pozitif Bakterilerin Hücre Duvar Yapısı

Murein ağı 40 kat tabakadan oluşabilir ve kuru ağırlığının % 30'unu oluşturur (20-80 nm). Zar teikoikasitleri sitoplazma zarında yer alırken, hücre duvarı teikoikasitleri mureinle kovalent bağ oluştururlar. Yapıları rijittir (Küçüker vd., 2002). Şekil 2.13'de Gram pozitif bakterilerin genel hücre duvar yapılarını göstermektedir.

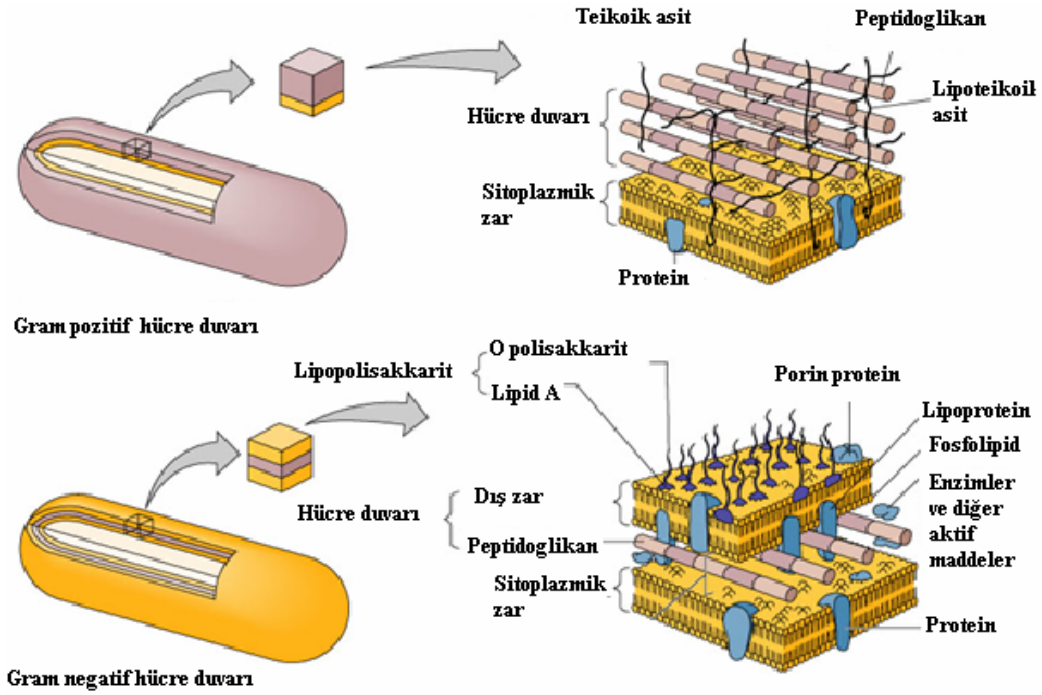


Şekil 2.13 Gram pozitif bakterilerin genel hücre duvar yapısı (Tortora vd., 2004)

2.3.2.2 Gram Negatif Bakterilerin Hücre Duvar Yapısı

Peptidoglikan sadece 2-10 nm kalınlığa sahiptir ve hücre kuru ağırlığının sadece %10'unu oluşturur. Hücre duvarının en önemli yapısal elemanı, içinde sayısız protein ve tıbbi açıdan önemli lipopolisakkariti içeren dış zardır. Yapıları dış zardan dolayı gram pozitif göre daha az rijittir (Küçüker vd., 2002).

Gram negatif ve gram pozitif hücre duvar yapılarının karşılaştırılması, Şekil 2.14'de görülmektedir.



Şekil 2.14 Gram negatif ve pozitif hücre duvar karşılaştırılması (Tortora vd., 2004)

Kısaca gram negatif ve pozitif bakterilerin genel özelliklerinin karşılaştırılması çizelge 2.5’de verilmektedir.

Özellik	Gram Pozitif	Gram Negatif
Hücre duvarının kalınlığı	20-80 nm	2-10 nm
Hücre duvar sayısı	1	2
Peptidoglikan içeriği	>%50	%10-20
Hücre duvarında teikoik asit	+	-
Lipid ve lipoprotein içeriği	%0-3	%58
Protein içereği	%0	%9
Lipopolisakkarit	0	%13
Penisilin duyarlılığı	Duyarlı	Az duyarlı
Lizozim duyarlılığı	Duyarlı	Çok az duyarlı

Çizelge 2.5 Gram pozitif ve negatif bakteri hücrelerinin karşılaştırılması (<http://textbookofbacteriology.net>).

3. MATERYALLER VE METOTLAR

3.1 Materyaller

3.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Trisodyum sitrat($C_6H_5Na_3O_7$)

Gümüş nitrat ($AgNO_3$)

Hidroklorik asit (HCl)

Sodyum hidroksit (NaOH)

Hidrojen tetrakloro avrat trihidrat ($HAuCl_4.3H_2O$)

Sodyum borhidrür ($NaBH_4$)

Nutrient agar

3.1.2 Kullanılan Aletler ve Cihazlar

UV/Görünür bölge spektrofotometre (Thermo/Multiskan)

Raman spektroskopisi sistemi (Renishaw inVia Raman mikroskop)

Taramalı elektron mikroskobu (Carl Zeiss Evo 40)

Steril kabin (Heal Force, Class II)

Santrifüj (BECKMAN)

Manyetik karıştırıcı (Heidolph)

Otoklav (HIRAMAYA)

Hassas terazi (OHUS)

İnkubatör (Memmert)

pH metre (METTLER TOLEDO)

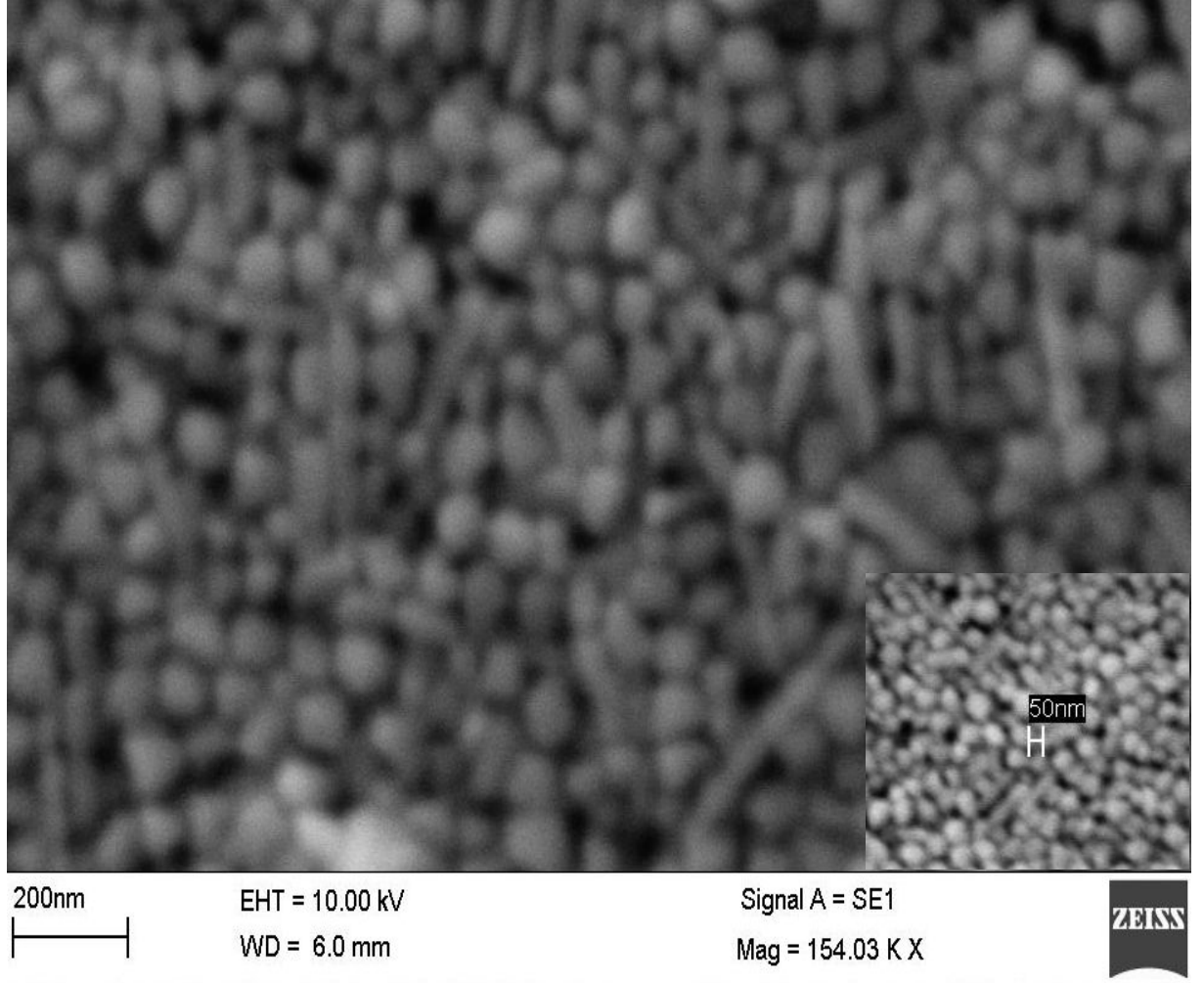
3.2 Metotlar

3.2.1 Gümüş Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Karakterize Edilmesi

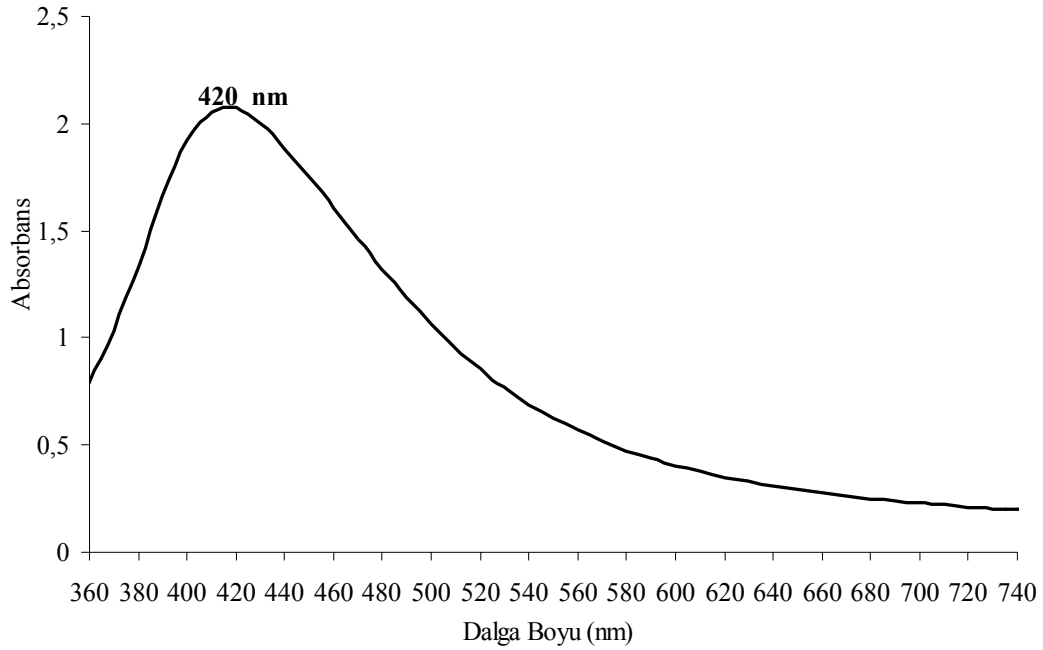
3.2.1.1 Sitrat Yöntemi ile Gümüş Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Karakterize Edilmesi

Gümüş nanoparçacıklar, Lee ve Meisel yöntemine göre sentezlendi (Lee ve Meisel, 1982). Bu senteze göre, 90 mg $AgNO_3$ tartıldı ve 500 ml saf su içerisinde çözüldü. Hazırlanan çözelti kaynayınca kadar ısıtıldı, ve üzerine 10 ml %1'lik trisodyumsitrat çözeltisi eklendi. Çözelti yaklaşık 250 ml kalana kadar kaynatıldı. Oluşan çözelti yeşilimsi renk aldı. Hazırlanan bu

Çözelti tez içinde 1X olarak nitelendirildi. Hazırlanan nanoparçacıkları karakterize etmek için UV/görünür bölge spektrofotometre ve taramalı elektron mikroskobu kullanıldı. Bu yöntemle hazırlanan nanoparçacıkların 420 nm dalga boyunda absorpsiyon yaptığı ve ortalama boyutlarının 40-60 nm aralığında olduğu bilinmektedir. Şekil 3.1'deki taramalı elektron mikroskop görüntüsünde hazırlanan nanoparçacıkların ortalama büyüklükleri 40-60 nm aralığında olduğu görülmektedir. Şekil 3.2'de ise nanoparçacıkların 420 nm dalga boyunda absorpsiyon grafiği görülmektedir. Bu yöntem sitrat yöntemi olarakta bilinmektedir.



Şekil 3.1 Sitrat yöntemi ile hazırlanan gümüş nanoparçacıkların taramalı elektron mikroskop görüntüsü



Şekil 3.2 Sitrat yöntemi ile hazırlanan gümüş nanoparçacıkların UV/görünür bölge absorpsiyon spektrumu

3.2.1.2 Borhidrür Yöntemi ile Gümüş Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Karakterize Edilmesi

Gümüş nanoparçacıklar, Creighton yöntemine göre sentezlendi (Creighton vd., 1979). Bu yöntemde indirgen olarak sodyum borhidrür kullanıldı. Bu yöntemde gümüş nanoparçacıklar hazırlanırken gümüş nitratin ve indirgen olarak kullanılan sodyum borhidrür miktarları değiştirildi ve en uygun oranlar bulundu. Bunun için 3 deneme yapıldı ve hangi denemenin en iyi sentez olduğu belirlendi ve o hazırlanan nanoparçacıklar deneyde kullanıldı. Bunu tespit etmek için nanoparçacık karakterizasyonu için kullanılan UV/görünür bölge spektrofotometresi kullanıldı ve sentezlenen en iyi nanoparçacık tespit edildi.

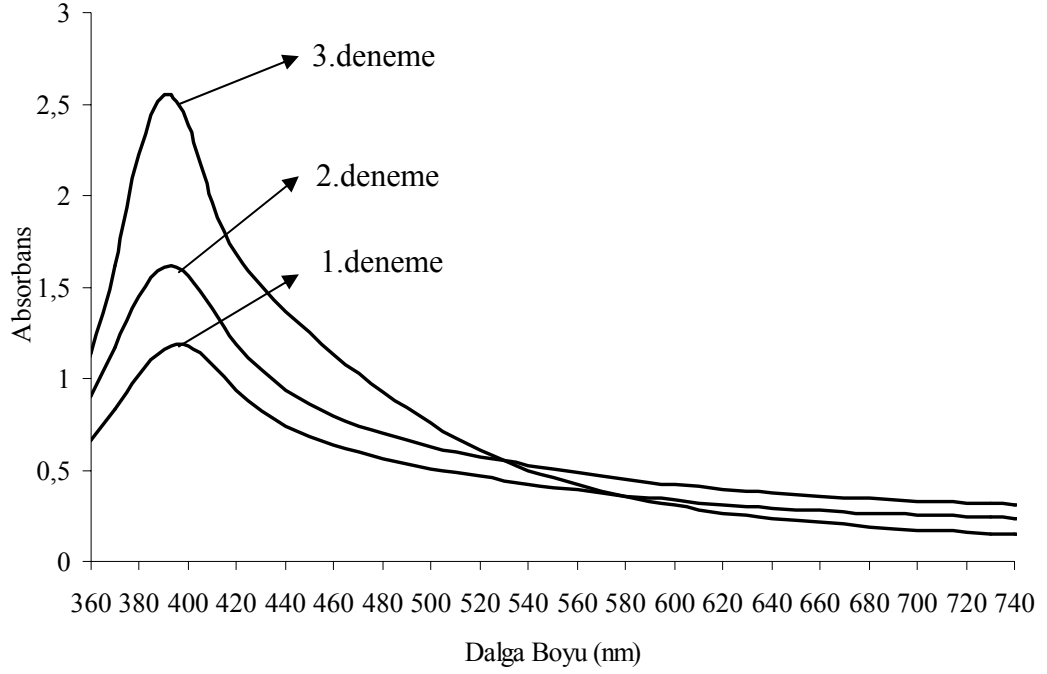
1.deneme: 6 mM, 50 ml AgNO_3 ve 1.2 mM, 150 ml NaBH_4 çözeltileri hazırlandı ve hazırlanan çözeltiler buz banyosunda 30 dakika bekletildi. 50 ml AgNO_3 çözeltisi büret yardımı ile yavaş yavaş NaBH_4 'e eklendi .

2.deneme: 6 mM 50 ml AgNO_3 ve 2.4 mM 150 ml NaBH_4 çözeltileri hazırlandı ve hazırlanan çözeltiler buz banyosunda 30 dakika bekletildi. 50ml AgNO_3 çözeltisi büret yardımı ile yavaş yavaş NaBH_4 'e eklendi.

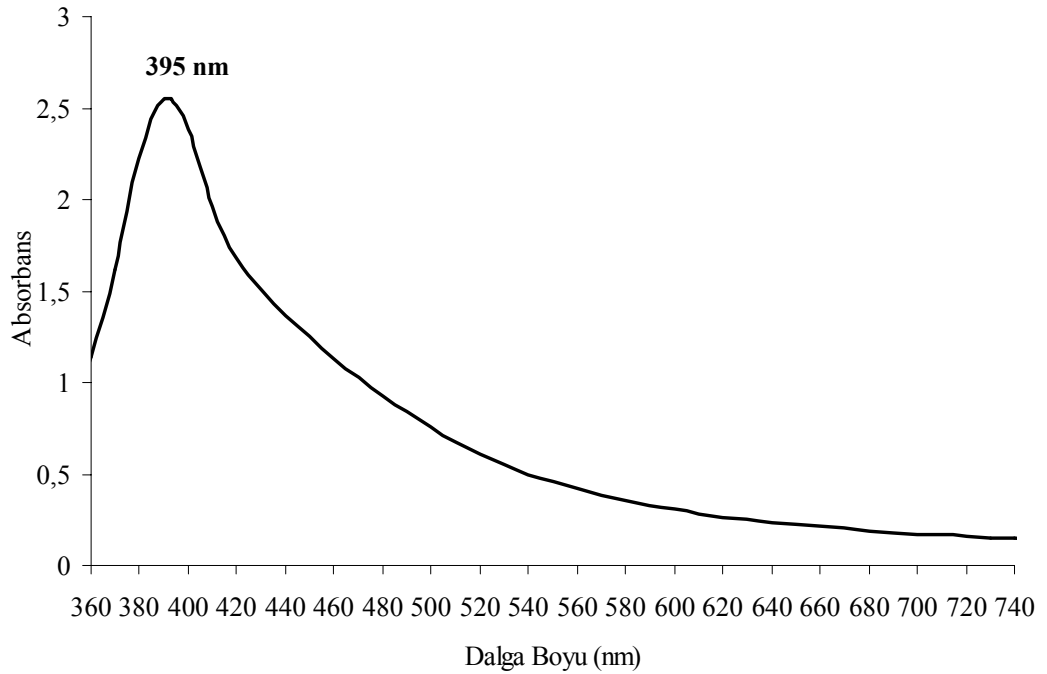
3.deneme: 6 mM 50 ml AgNO_3 ve 4.8 mM 150 ml NaBH_4 çözeltileri hazırlandı ve hazırlanan çözeltiler buz banyosunda 30 dakika bekletildi. 50ml AgNO_3 çözeltisi büret yardımı ile yavaş yavaş NaBH_4 'e eklendi. Oluşan tüm çözeltiler sarı renkte idi.

Hazırlanan çözeltilerin karakterizasyonu için UV/görünür bölge spektrofotometresi kullanıldı. 395 nm dalga boyunda absorpsiyon yaptığı tespit edildi. Şekil 3.3 ve 3.4'de görüldüğü gibi en

iyi sentezlene nanoparçacık 3.denemede elde edilen parçacıklardır. Çünkü oluşturdıkları yüzey plazmonların şiddeti en yüksektir. Bu da bize o koşullarda hazırlanan parçacıkların en iyi yöntem olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.3 Farklı indirgen konsantrasyonlarda sentezlenen gümüş nanoparçacıkların UV/görünür bölge absorpsiyon spektrumları



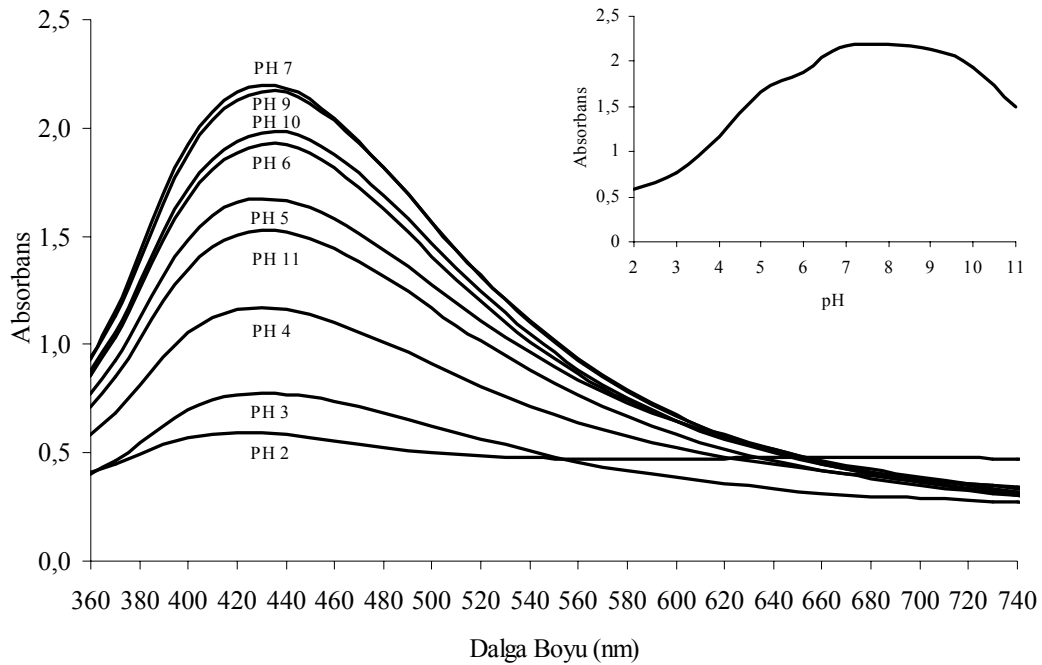
Şekil 3.4 Crieghton yöntemine göre sentezlenen gümüş nanoparçacıkların UV/görünür bölge absorpsiyon spektrum

3.2.2 Sitrat Yöntemi ile Hazırlanan Gümüş Nanoparçacıkların Deriştirilmesi

Hazırlanan 1X olarak nitelendirilen gümüş nanoparçacık içeren çözeltiden 10 ml falkon tüpe konuldu ve 20 dk. 5500 rpm de santrifüj edildi ve üzerinden 5 ml alınarak 2X çözelti elde edildi. 20 ml 1X çözelti alınarak santrifüj edildi ve üzerinden 15 ml alınarak 4X, 30 ml den 25 ml alınarak 6X, 40 ml 35 ml alınarak 8X çözeltiler elde edildi. Böylelikle 5 ml 2X, 4X, 6X, 8X çözeltiler elde edildi. Sonuç olarak farklı konsantrasyonlarda gümüş nanoparçacıklar içeren kolloitler elde edildi.

3.2.3 Sitrat Yöntemi ile Hazırlanan Gümüş Nanoparçacıkların pH'larının Ayarlanması

Normal olarak sentezlenen nanoparçacıkların pH'sı indirgen olarak kullanılan trisodyum sitrattan dolayı baziktir. Hazırlanan çözeltinin pH = 9 dur. pH 2-11 arasında 1 M HCl ve NaOH eklenerek ayarlandı. Hazırlanan çözeltilerin UV/görünür bölge absorpsiyonlarına bakıldı. Çünkü UV/görünür bölge spektrofotometresinde absorpsiyon vermesi nanoparçacıkların etrafında oluşturdukları yüzey plazmonlarından dolayıdır. pH'a bağlı olarak bu plazmonlar değişmektedir (Alvarez-Puebla vd., 2005) ve Şekil 3.5'de pH ya bağlı nanoparçacıkların absorpsiyon grafiği görülmektedir.

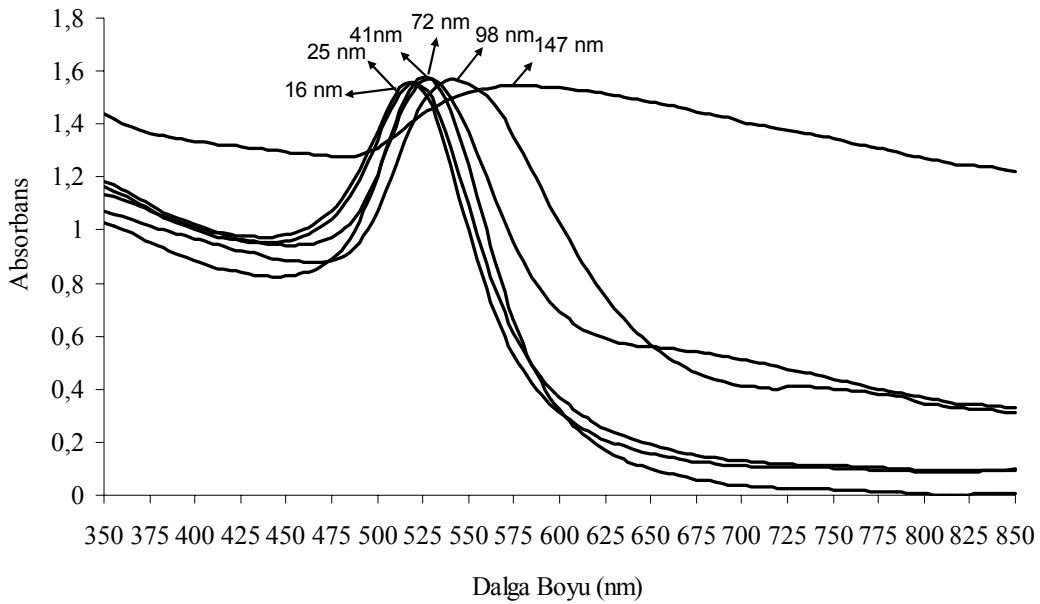


Şekil 3.5 Sitrat ile indirgenen nanoparçacıkların pH'a bağlı UV/görünür bölge absorpsiyon spektrumları

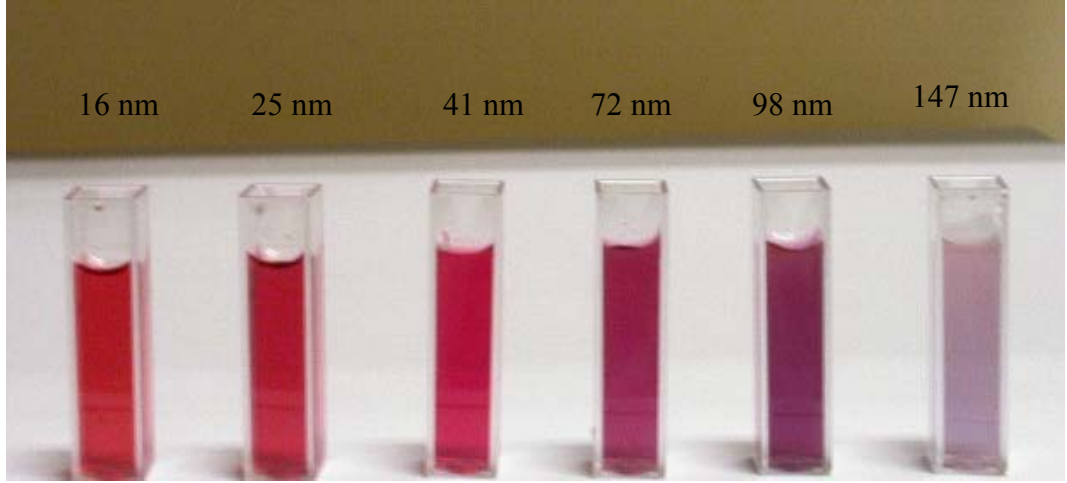
3.2.4 Farklı Büyüklüklerde Altın Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Karakterize Edilmesi

Sitrat yöntemi ile 16 nm, 25 nm, 41 nm, 72 nm, 98 nm ve 147 nm büyüklüklerinde altın nanoparçacıklar sentezlendi. 300 ml %0.01 lik $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ve % 1 lik 5 ml trisodyum sitrat çözeltisi hazırlandı. 16nm altın nanoparçacık hazırlamak için 50 ml %0.01'lik altın çözeltisi kaynayıcaya kadar ısıtıldı ve üzerine 1 ml %1 lik sodyum sitrat çözeltisi ilave edildi ve 15 dakika kaynatıldı. Renk sarıdan kırmızıya döndü. Diğer büyüklükteki altın nanoparçacıkları hazırlamak için parçacık büyüklüğünü artırmak için indirgen konsantrasyonu azaltıldı, böylelikle daha büyük boyutta altın nanoparçacıkları elde edildi (Handley, 1989).

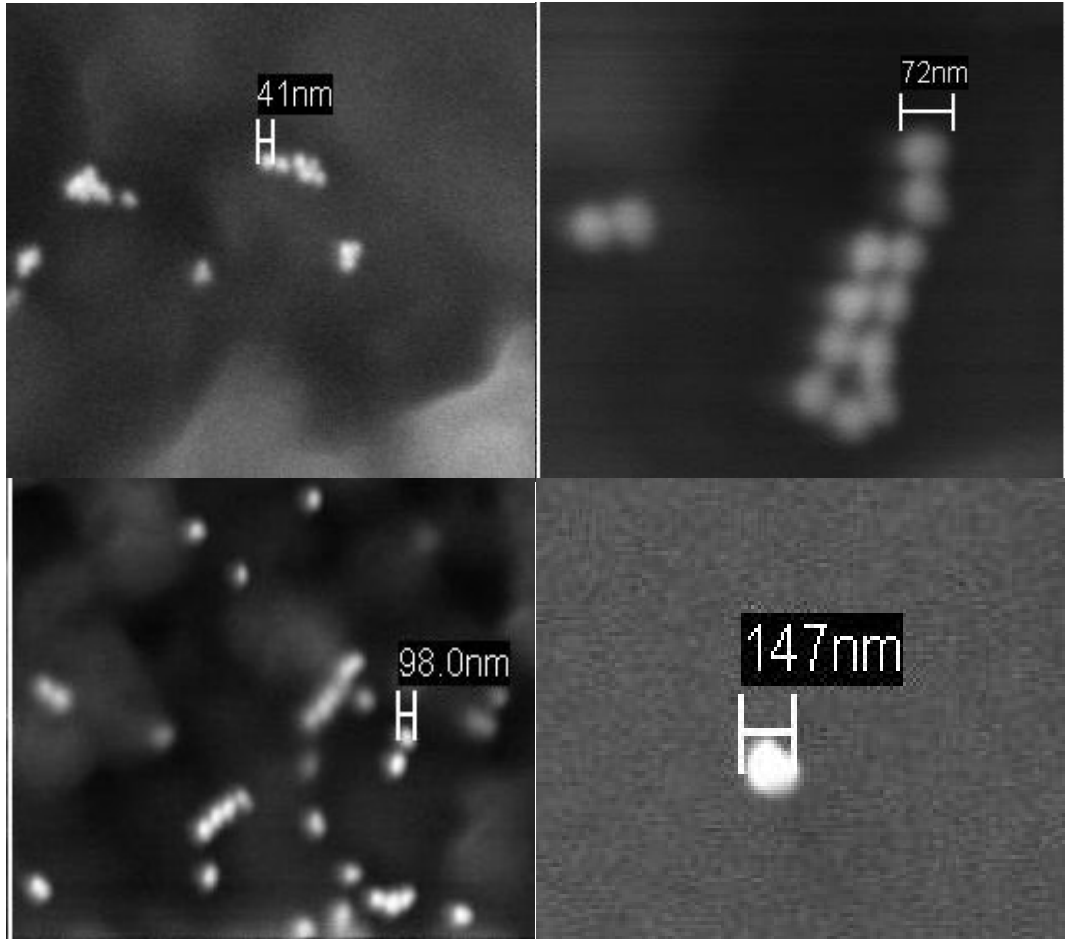
25 nm nanoparçacık için 0.75 ml, 42 nm için 0.5 ml, 72 nm için 0.30 ml, 98 nm için 0.21 ml ve 147 nm için 0.160 ml %1'lik trisodyum sitrat çözeltisi kaynamakta olan 50 ml %0.01 lik altın çözeltisine ilave edildi ve 15 dakika kaynatıldı. Hazırlanan nanoparçacıklar UV/görünür bölge spektrofotometresi ve taramalı elektron mikroskobu ile karakterize edildi. Şekil 3.6'da hazırlanan nanoparçacıkların UV/görünür bölge absorpsiyon spektrumları, Şekil 3.7'de renkleri ve Şekil 3.8'de taramalı elektron mikroskop görüntüleri görülmektedir.



Şekil 3.6 Farklı büyüklüklerdeki altın nanoparçacıkların UV/görünür bölge absorpsiyon spektrumları



Şekil 3.7 Farklı büyüklüklerdeki altın nanoparçacıkların renk değişimi



Şekil 3.8 Farklı büyüklüklerdeki altın nanoparçacıkların bazı büyüklüklerinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri

3.2.5 Bakterilerin Büyütülmesi, Toplanması ve Yıkması

3.2.5.1 Bakterilerin Büyütülmesi

Deneylerde kullanılan tüm bakteriler Yeditepe Üniversitesi, Mimarlık ve Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik bölümü mikroorganizma stoklarından temin edildi. Kullanılan tüm bakteriler (MIDI) Microbial Identification System ve Biolog ile karakterize edildi. Bütün deneylerde model bakteri olarak iki gram negatif ve iki de gram pozitif bakteri kullanıldı. Gram negatif olarak; *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* (B9) gram pozitif olarak ise *B. megaterium* (B6), *C. michignensis* (B5) kullanıldı. Bakteriler hazırlanan – 80 stoklardan (%15 gliserol,%4 nutrient broth) 20 ml nutrient agar(katı besiyer) ile hazırlanan petri kaplarında 37 °C’de 24 saat kültür edildi.

3.2.5.2 Bakterilerin Toplanması ve Yıkması

Kültür edilen bakteriler 10 µL’lik plastik steril öze ile bir öze dolusu toplandı ve içerisinde 1 ml saf su bulunan ependorflara aktarıldı ve homojen yapmak için vorteks yapıldı. Daha sonra 7500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan sulu kısım atılıp tekrar üzerine 1 ml su ilave edildi. Tekrar santrifüjlendi ve prosedür üç kez tekrarlandı. Böylelikle toplama esnasında besiyerinden gelebilecek safsızlıklar elimine edildi. Sonuç olarak sadece saf bakteri elde edildi.

3.2.6 Raman Spektroskopisi

Öncelikle sitrat yöntemi ile hazırlanan nanoparçacıklarla bakteri konsantrasyonu deneyler sonucunda en iyi oranın; 5 µL bakteri 100 mikrolitre nanoparçacık çözeltisi olduğu bulundu. Diğer yapılan tüm deneylerde 5 µL yıkanmış bakteri ile 100 µL nanoparçacık çözeltisi karıştırıldı. Homojen yapmak için vorteks edildi. CaF₂ üzerine 5 µL damlatıldı ve yaklaşık 15-30 dakika kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra Raman cihazında bulunan Lieca 50X objektif ile örnek üzerine odaklandı ve farklı bölgelerden 10 spektrum alındı. Analizler sırasında Raman cihazında bulunan 830 nm ve 514 nm lazerler kullanıldı .Lazerin dalga boyuna bağlı olarak lazerin gücü 0.3-30 mW ve örnek üzerindeki lazerin kalma süresi 10-120 saniye idi.

3.2.7 SPSS Software

SPSS software programı spektrumların birbirlerine ve ortalama spektruma olan ilişkisini göstermek için kullanıldı. Bunu için metot olarak en çok kullanılan Pearson Correlation kullanıldı. Datalar software atılmadan önce normalize edildiler. Bunun için spektrumların y eksenindeki datalar kendi arasında toplam 100 olacak şekilde normalize edildiler ve software

programında analiz edildiler. Analiz sonucunu yorumlarken 10 spektrumun ortalaması matrikste 1 olarak görünmekte diğer on spektrum ise 1 den küçük değerler almaktadır. 0.990 büyük olan datalar ortalama ile aynı anlamına gelmektedir.

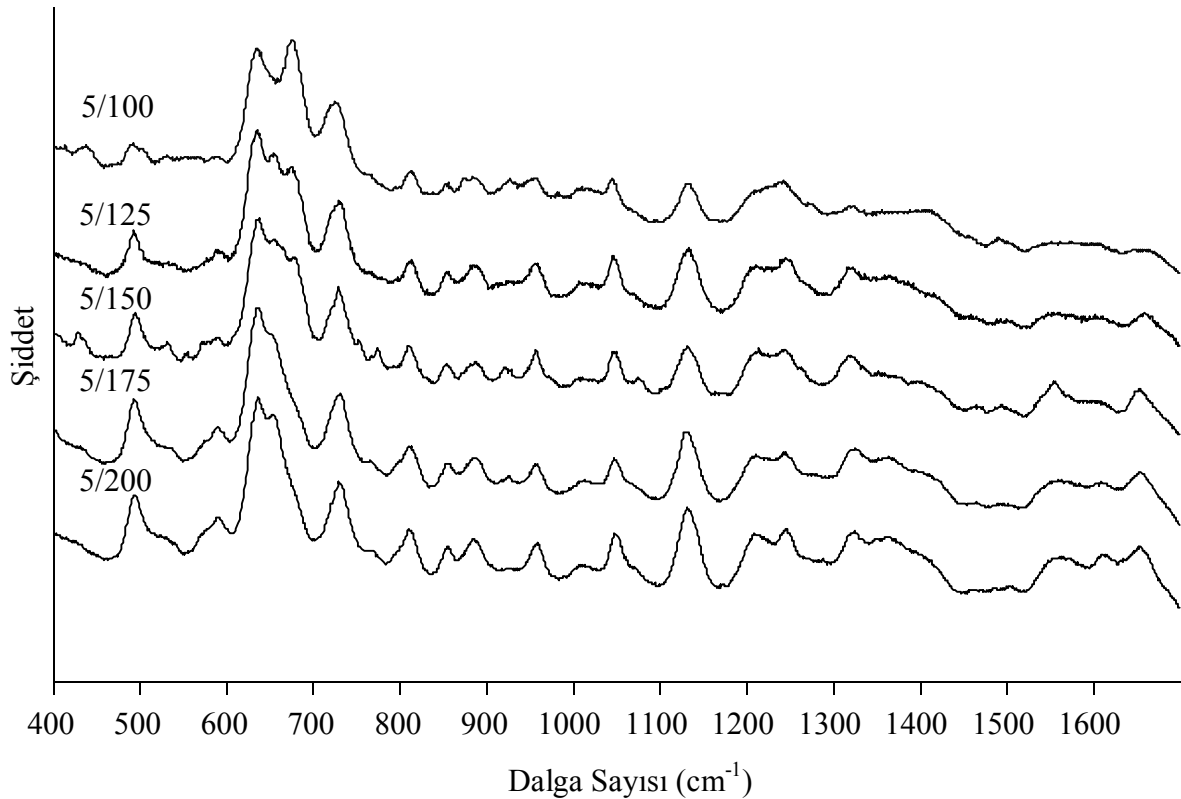
3.2.8 Taramalı Elektron Mikroskopu

Alınan tüm görüntüler Carl Zeiss Evo 40 marka taramalı elektron mikroskopu ile alındı. Hazırlanan örneklerden 5 μL karbon disk üzerine damlatıldı, kurutuldu ve yüksek vakum altında $\text{EHT} = 10 \text{ kV}$ 'da görüntülendi. 5 μL damlatılmasını nedeni ise Raman'da spektrum alırken CaF_2 üzerine 5 μL örnek damlatılmasıdır. Böylelikle elektron mikroskopundaki görüntü Ramandaki kameradaki görüntü ile aynı olacaktır

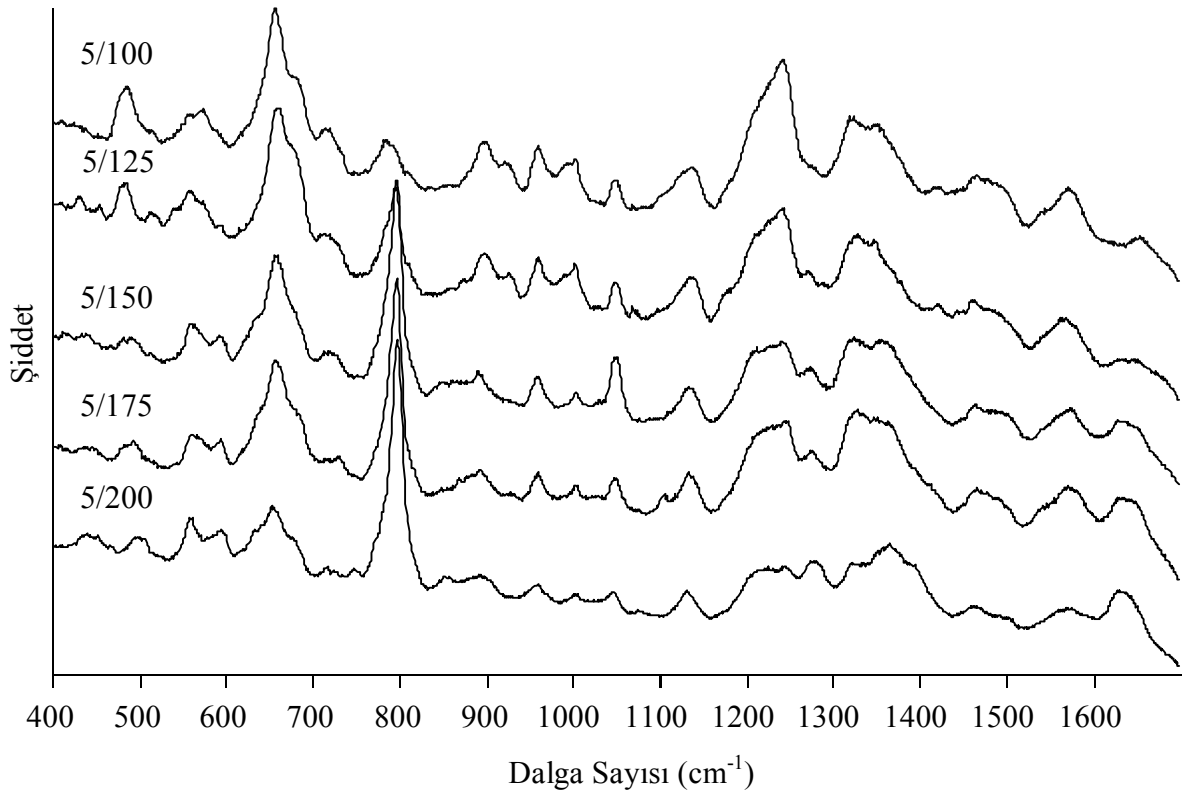
4. SONUÇLAR VE YORUMLAR

4.1 Bakteri Konsantrasyonu

Yüzeyde zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi için moleküllerin nanoparçacıklara yakın olması gerekmektedir (Smith ve Dent, 2005). Bundan dolayı bakteri ve nanoparçacık oranları bakteri spektrumu için önemlidir. Hangi oranın en iyi olduğunu tespit etmek için 15 farklı bakteri ile çalışıldı ve bakteri konsantrasyonlarını belirlerken bakteri miktarı sabit tutulup kolloit miktarı artırıldı. Yapılan deneylerde 5 farklı konsantrasyon denendi. Bunlar; 5 μ L bakteri üzerine 100, 125, 150, 175, 200 μ L sitrat yöntemi ile hazırlanan 1X nanoparçacık çözeltisi ilave edildi. Hazırlanan karışımların Raman spektrumları alındığında bu bakterilerin bazılarında bakteri konsantrasyonu ile fazla bir değişiklik olmadı. Bazılarında ise spektrumları önemli farklılık gösterdiği tespit edildi. Şekil 4.1-2’de görüldüğü gibi en iyi bakteri konsantrasyonunun 5 μ L bakteri ile 100 μ L nanoparçacık çözeltisi karışımı olduğu tespit edildi.



Şekil 4.1 Gram pozitif *Clavibacter michignensis*'in farklı konsantrasyonlardaki Raman spektrumları



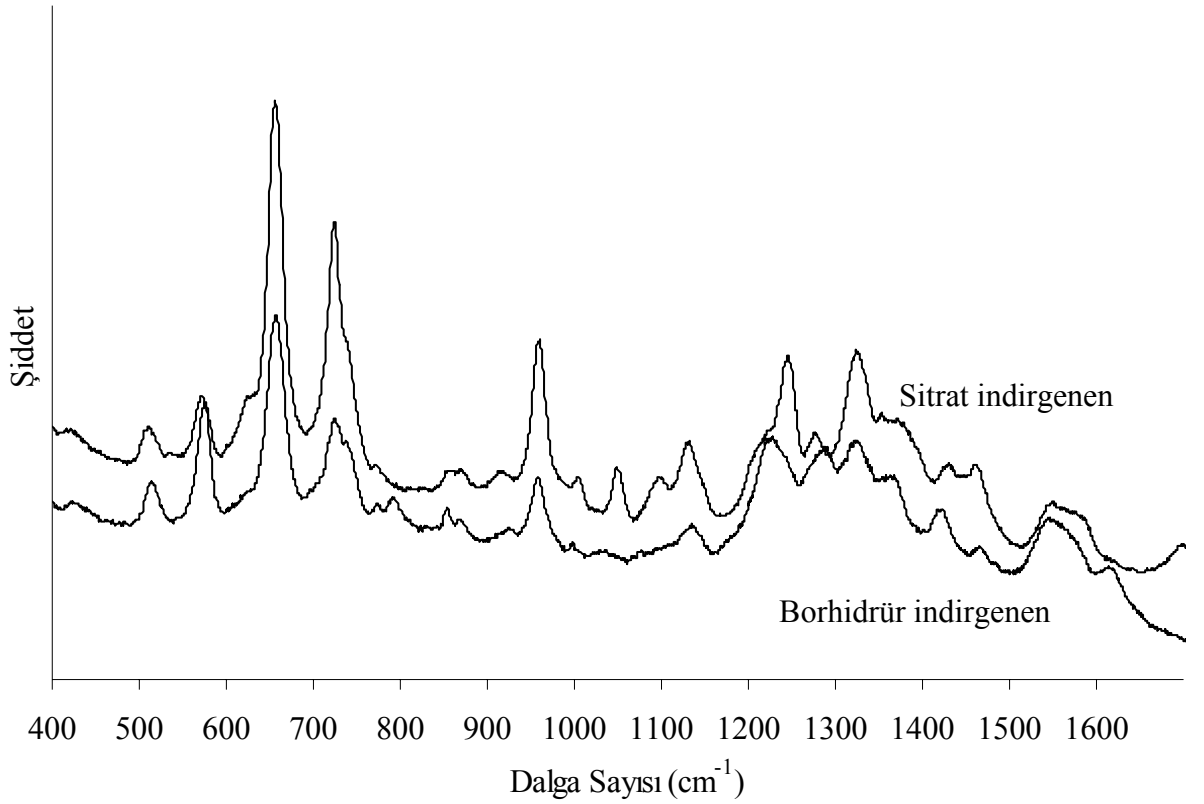
Şekil 4.2 Gram negatif *Pseudomonas aeruginosa*'nın farklı konsantrasyonlardaki Raman spektrumları

Bundan sonraki tüm çalışmalarda analiz için 5 μ L bakteri, 100 μ L nanoparçacık karışım oranları kullanıldı.

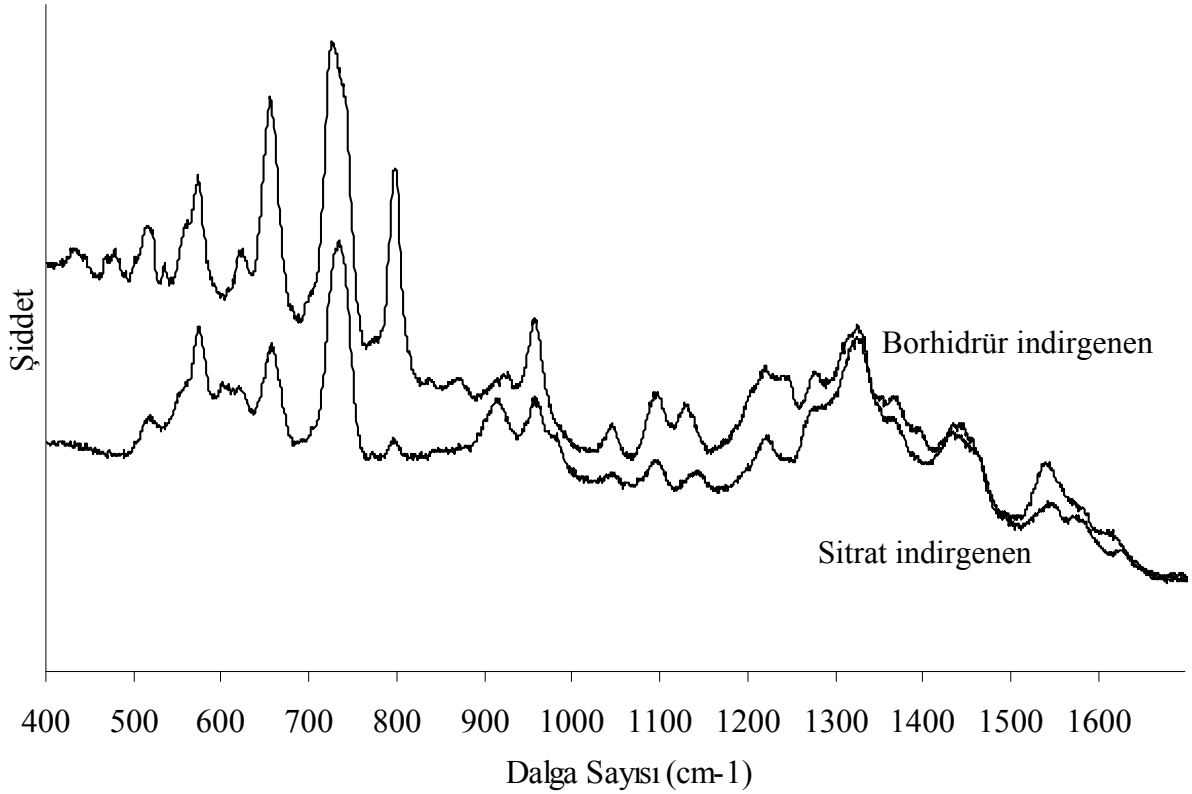
4.2 Nanoparçacıkların Yüzey Yükleri

Nanoparçacıkların hazırlama yöntemlerinden biride kimyasal indirgeme yöntemidir. Sentezlenen nanoparçacıkların yükleri indirgen olarak kullanılan maddeye göre farklılık göstermektedir. Literatürde negatif (Lee ve Meisel, 1982) , az negatif (Creighton vd., 1979) veya pozitif (Li vd., 1999) yüzey yüküne sahip nanoparçacıklar sentezlenmiştir. Sitrat indirgenmesinden elde edilen nanoparçacıkların yüzey yükü sitrattan dolayı negatif olduğu bilinmektedir. Sodyum borhidrür ile indirgenen nanoparçacıkların yüzey yükünün negatif ama sitrat ile indirgenenden daha az negatif olduğu literatürde bilinmektedir (Li vd., 2001) Bakterilerin YZRS'ında nanoparçacık yükünün etkisini araştırmak ve bakteri hücre duvarı ile nanoparçacık etkileşimini anlamak için sitrat ve borhidrür yöntemi ile yüzey yükleri aynı ancak, yoğunlukları farklı iki farklı nanoparçacık sentezlendi. Nanoparçacıkların yüzey yükleri bakterideki fonksiyonel gruplar ile etkileşimde önemli rol oynamaktadır. Sentezlenen nanoparçacıkların pH değeri 9 civarındadır. Buna bağlı olarak bakteri duvarında bulunan iyonlaşabilen grupların pozitif yada negatif olmasına bağlı olarak spektrum farklılık göstermektedir. Gram negatif ve gram pozitif bakterilerin hücre duvarları birbirinden çok

farklıdır. Gram negatif bakteriler ince peptidoglikan tabakası ve lipopolisakkarit, protein, fosfolipitlerden oluşan dış membrandan oluşmaktadır. Gram pozitif bakteriler ise kalın bir peptidoglikan tabakasından oluşmaktadır. Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin farklı yüzey yüküne sahip nanoparçacıklarla spektrumları alındığında hücre duvarlarının farklı olmasından dolayı farklı etkileşimler olacağı düşünüldü. Nanoparçacıkların pH'sı bazik olduğundan dolayı hücre duvarındaki tüm karboksil grupları ve bazı amino grupları protonları vermiştir. Buna bağlı olarak her iki bakteri duvarında negatif yüklü olduğu düşünüldü ve buna bağlı olarak beklenen daha az negatif yüke sahip nanoparçacıklarında daha iyi ve detaylı spektrum alınması beklendi ancak, bakteriler ile nanoparçacıkların yüzey yüklerine bağlı olarak spektrumlarına şekil 4.3,4'e bakıldığında; gram negatif bakterilerin hücre duvarının esnek olmasından dolayı yüzey yüklerine bağlı olarak spektrumları çok farklılık gösterirken, gram pozitif bakterilerde fazla bir değişiklik gözlenmedi. Beklenenin tersine daha fazla negatif yüzey yüküne sahip nanoparçacıklar ile muamale edilen bakteriler gram pozitif olan bakteride daha detaylı ve iyi spektrum alınırken gram negatif bakteride tam tersi gözlemlendi.



Şekil 4.3 *Bacillus megaterium*'un farklı yüzey yüküne sahip gümüş nanoparçacıklarla alınan Raman spektrumları



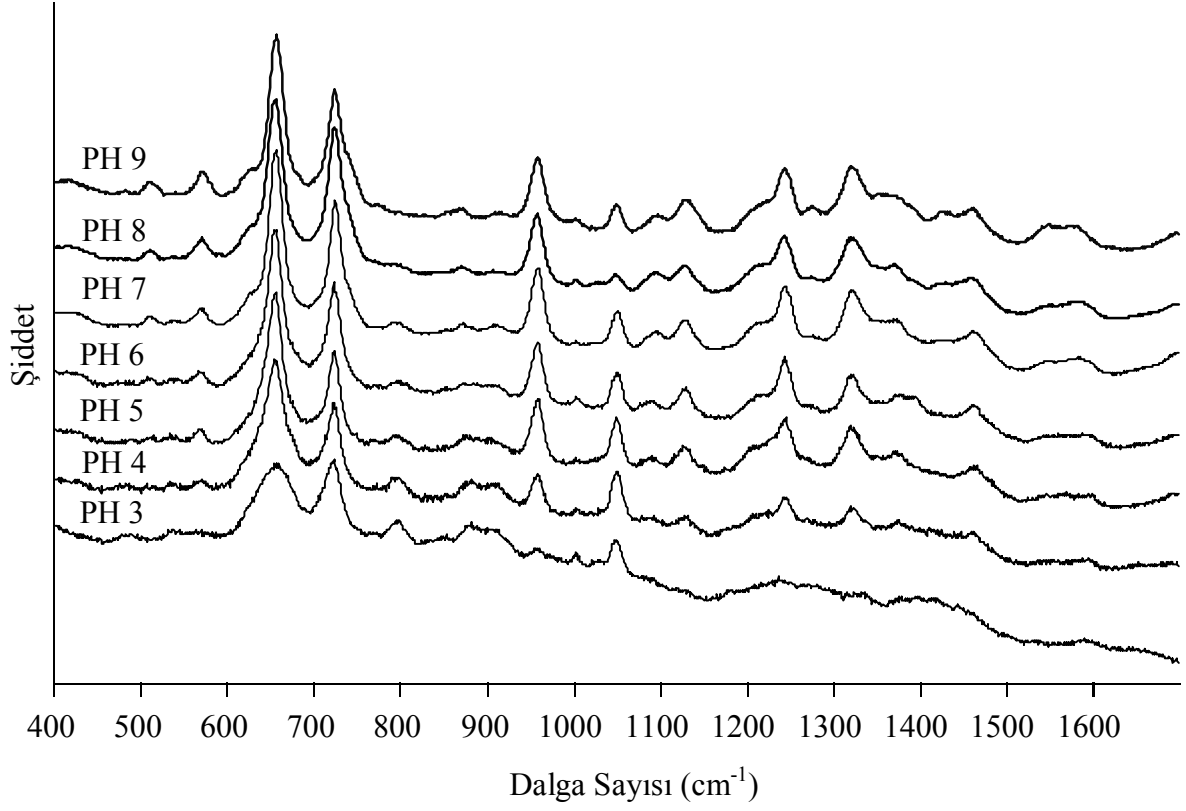
Şekil 4.4 *Escherichia coli*'nin farklı yüzey yüküne sahip gümüş nanoparçacıklarla alınan Raman spektrumları

4.3 Kolloit süspansiyonlarının pH'ları

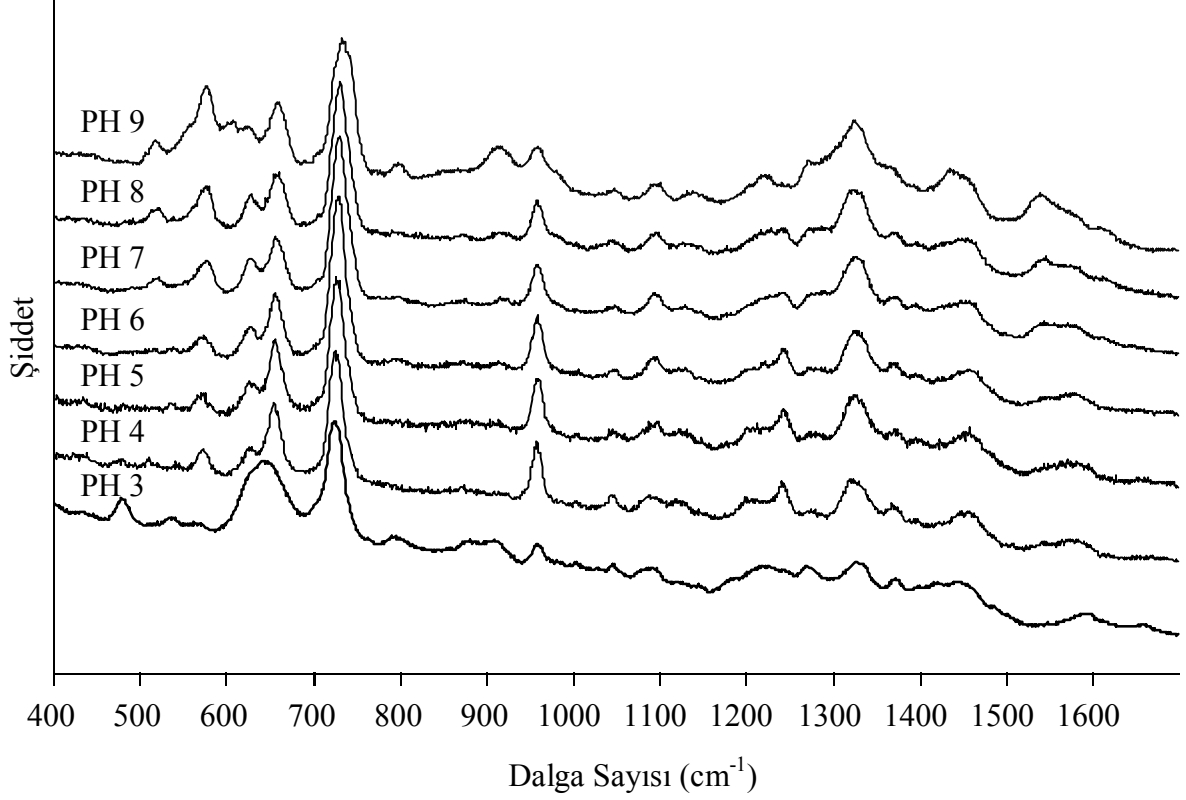
Sitrat yöntemi ile sentezlenen ve nanoparçacıkları içeren kolloit süspansiyonunun pH'sı 9 civarında olmaktadır. Nano parçacıkların etrafında oluşturdıkları yüzey plazmonları pH'a bağlı olarak değiştiği bilinmektedir (Alvarez-Puebla vd., 2005). Bu yüzey plazmonları yüzeyde zenginleştirilmiş Raman spektroskopisinde önemli rol oynamaktadır (elektromanyetik zenginleştirme) (Moskovits, 1985). Plazmonların pH'a bağlı nasıl değiştiğini ve bakterilerin o pH'da nanoparçacıklarla etkileşimini ve spektrumlardaki değişikliği anlamak için nanoparçacık içeren kolloit HCl ve NaOH kullanılarak pH 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 hazırlandı. Nanoparçacıkların yüzey plazmonlarının pH'a bağlı nasıl değiştiğini anlamak için UV/görünür bölge spektrofotometesi kullanıldı. Nanoparçacıklar sentez yöntemine bağlı olarak farklı dalga boylarında absorpsiyon vermektedirler. Bu deneyde sitrat indirgeme yöntemi ile hazırlanan çözeltinin maksimum absorpsiyon dalga boyu 420 nm dir. Şekil 3.5'e bakıldığında çok düşük pH'larda yüzey plazmonları yok denecek kadar azdır. Bunun sebebi olarak sitrat yöntemi ile hazırlanan çözeltiler negatif yüzey yüküne sahiptir. Proton eklendiğinde parçacık etrafındaki elektriksel çift tabaka değişmektedir. Eklenen proton miktarı fazla olduğunda negatif yük azalmakta ve kluster olarak çökelmektedir. Bu nedenle yüzey plazmonları sönmekte ve etkisini kaybetmektedir. Nötr pH ve bazik pH'larda yüzey plazmonlarının verdiği absorpsiyon şiddeti düşük pH'lardakine göre çok iyidir. Bunun nedenini ise yüzeydeki

elektriksel çift tabakadaki yüzey yüklerinin miktarı ile orantılı olduğu söylenebilir. Nanoparçacıkların pH'a bağlı olarak UV/görünür bölge spektrofotometresinde hangi pH'ların saçılmayı zenginleştireceği saptandı. Ancak bilindiği gibi sinyali zenginleştirmek için molekülün nanoparçacıklara yakın olmalıdır. Bundan dolayı pH'a bağlı olarak fonksiyonel grup içeren moleküllerin negatif veya pozitif olması, saçılmayı ne kadar etkileyeceği önemlidir. Literatürde yapılan çalışmalarda fonksiyonel grup içeren amino asitlerle yapılan çalışmalarda pH'a bağlı olarak amino asitlerin spektrumlarının farklılık gösterdiği saptanmıştır (Zhao vd., 2004). Buna bağlı olarak izoelektrik noktasından yüksek pH'larda amino asit negatif yüklü olduğundan Raman saçılması iyi değildir. Pozitif yüklü amino asit daha fazla negatif yüklü nanoparçacıkla iyonik etkileşime girdiğinden Raman saçılması daha zengindir. Küçük moleküllerde pH'a bağlı olarak nanoparçacıkların etkileşimi ve etkisi çok rahat anlaşılabilir ancak bakteri gibi bir kompleks moleküle etkisi nasıldır? Çünkü, bakteri duvarında birden fazla molekül ve pH'a bağlı olarak iyonlaşabilen ve yükü farklı olan moleküllere sahiptir. Zaten düşük pH'larda plazmonları etkisi kaybettiği için Raman saçılmasında zenginleşme beklenmemektedir. Ancak diğer pH'larda yüzey plazmonları etkisi hemen hemen aynı olduğu için burada Raman saçılmasında en önemli olan molekülün o pH'daki taşıdığı yük, buna bağlı olarak nanoparçacıklarla iyonik etkileşimidir. Bu deneyde sadece nanoparçacıkların pH'ları ayarlandı. Bakteri eklendikten sonra pH'lar ölçülmedi çünkü 100 µL çözeltiye 5 µL bakteri ilave edildi. Bundan dolayı pH'nın çok az değiştiği tesbit edildi (0.1-0.3). Şekil 4.5, 4.6'da *E. coli*'nin ve *B. megaterium*'un pH'a bağlı spektrumları görülmektedir. Spektrumlara bakıldığında pH 3 ve 4 gibi düşük pH'larda yüzey plazmonlarının şiddeti düşük olduğundan saçılmada fazla bir zenginleştirme gözlenmedi.

Gram pozitif bir bakteri olan *B. megaterium*'dan düşük pH'larda çok az spektrum alınırken, gram negatif olan *E. coli*'den spektrum alınmasının sebebini hücre duvar yapılarının farkından olduğu söylenebilir. Her iki pH'da da yüzey plazmonları etkisi aynıdır, ancak o pH'da hücre duvar farkından duvardaki iyonlaşabilen fonksiyonel gruplar farklıdır. pH arttıkça hem plazmonların etkisi artmakta hemde pH'a bağlı hücre duvarındaki yükler değişmektedir. Buna bağlı olarak en iyi Raman saçılması ve bakteri spektrumu, sentezlenen pH, yani pH 9 olduğu saptandı. Bundan sonraki yapılan çalışmalarda nanoparçacıkların doğal pH'sı kullanıldı.



Şekil 4.5 *Bacillus megaterium*'un pH'a bağlı Raman spektrumları



Şekil 4.6 *Escherichia coli*'nin pH'a bağlı Raman spektrumları

4.4 Nanoparçacıkların Konsantrasyonu

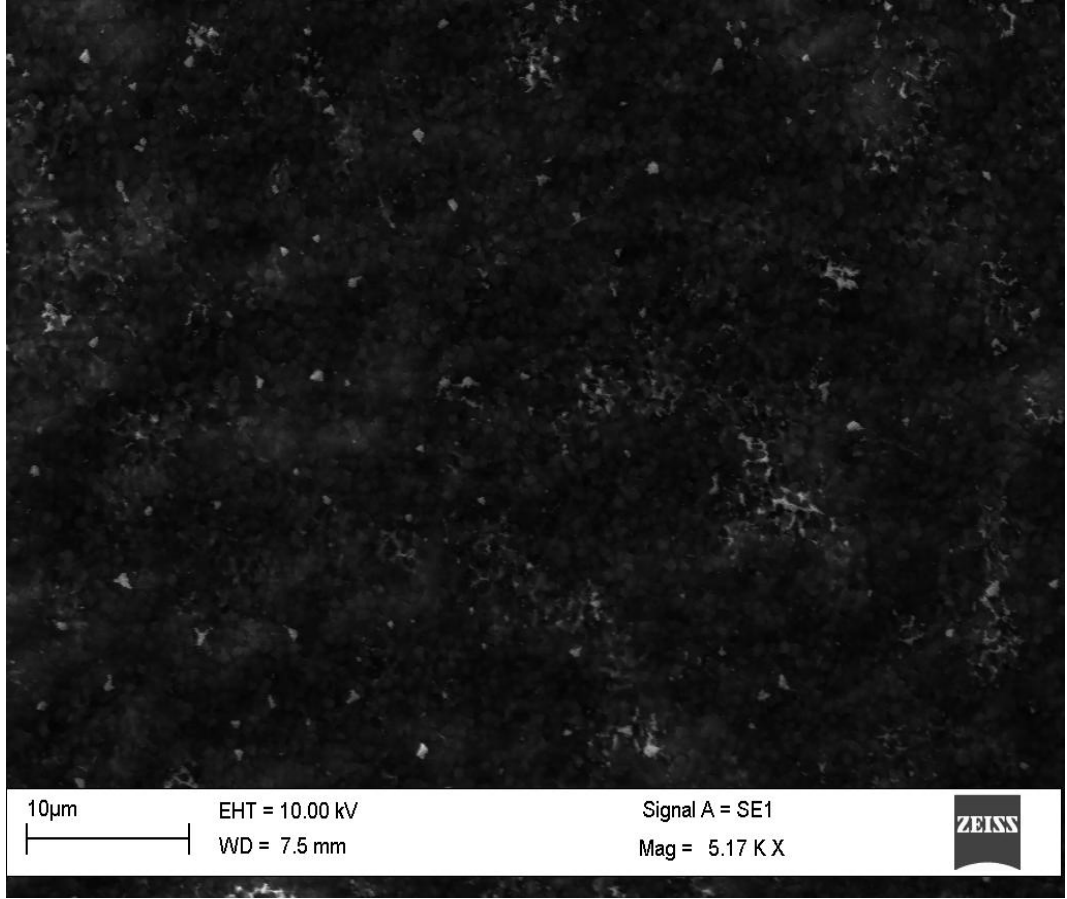
Raman spektroskopisi son yıllarda bakteri tanısında kullanılmaktadır. Literatürde bir çok yayın bulunmaktadır. Yayınlar bakıldığında genel olarak 10 spektrum alınıp onların ortaması kullanıldığı görülmektedir. Bunun nedeni bakteri ile nano kolloitleri karıştırdığınız zaman rastgele dağılmasıdır. Yani nanoparçacıklar homojen şekilde dağılmamaktadır. Yapılan bu çalışmada nanoparçacıkların konsantrasyonu artırıldı. İlk sentezlenen nanoparçacık 1X olarak nitelendirilmişti. Başlangıç konsantrasyonu değiştirilerek 2X, 4X, 6X, 8X nanoparçacık içeren çözeltiler hazırlandı ve standart protokol olan 5 µL bir gram negatif bir de gram pozitif bakteri, 100 µL nanoparçacıkları ile karıştırıldı ve spektrumları alındı. Spektrumlara bakıldığında kolloit konsantrasyonuna bağlı olarak hem spektrumda değişimler olmakta hemde tekrarlanabilirliğinde bir değişim olmaktadır

Şekil 4.7’de Raman cihazında bulunan Lieaca 50x ışık mikroskop görüntüleridir. Şekil 4.8-9-10 ise, farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış örneklerin taramalı elektron mikroskop görüntüleri görülmektedir. Konsantrasyon arttıkça ışık mikroskopunda beyaz lamba gibi yanan noktalar görülmektedir. Bunlar toplanmış gümüş nanoparçacıklarıdır. Spektrumlar alınırken bu noktaların yakınından alındı.

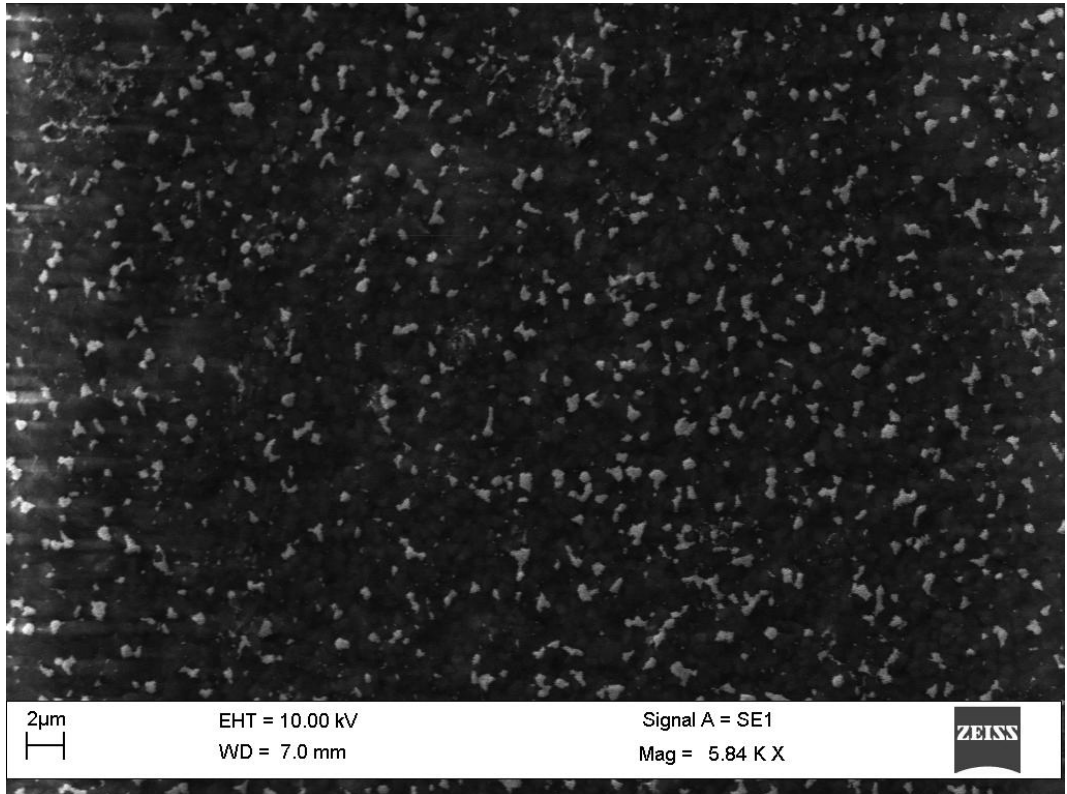
Gram negatif ve pozitif bakterilerin kolloit konsantrasyonu arttığında kolloit konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak tekrarlanabilirliğin arttığı gözlemlendi (Şekil 4.11–18). Ancak çok yüksek konsantrasyonlarda spektrumdaki piklerde azalma görülmektedir (Şekil 4.19,20). Gram negatif bakteriye bakıldığında kolloit konsantrasyonu ile birlikte spektrumda çok daha fazla değişiklik göstermektedir. Bunun nedeni, gram negatif bakterinin gram pozitif bakteriye göre daha az rijit ve daha çeşitli moleküler yapılar içermesi olarak açıklanabilir. Sonuç olarak 4X nanoparçacıklar kullanıldığında tekrarlanabilirliği ve spektrum zenginliği çok iyi spektrumlar elde edilebilir. Örnekten 10 spektrum almak yerine sadece bir spektrum alınarak analiz yapılabilir. 4X ile alınan her bir spektrum ortalama ile aynı olduğu SPSS istatistiksel software ile anlaşıldı (Çizelge 4.1). Yapılan bu çalışma aynı zamanda bir bakterinin hücre duvarının gram pozitif mi daha yakın gram negatife mi olduğu hakkında da konsantrasyonlardaki değişime bağlı olarak bilgi alınabilir.



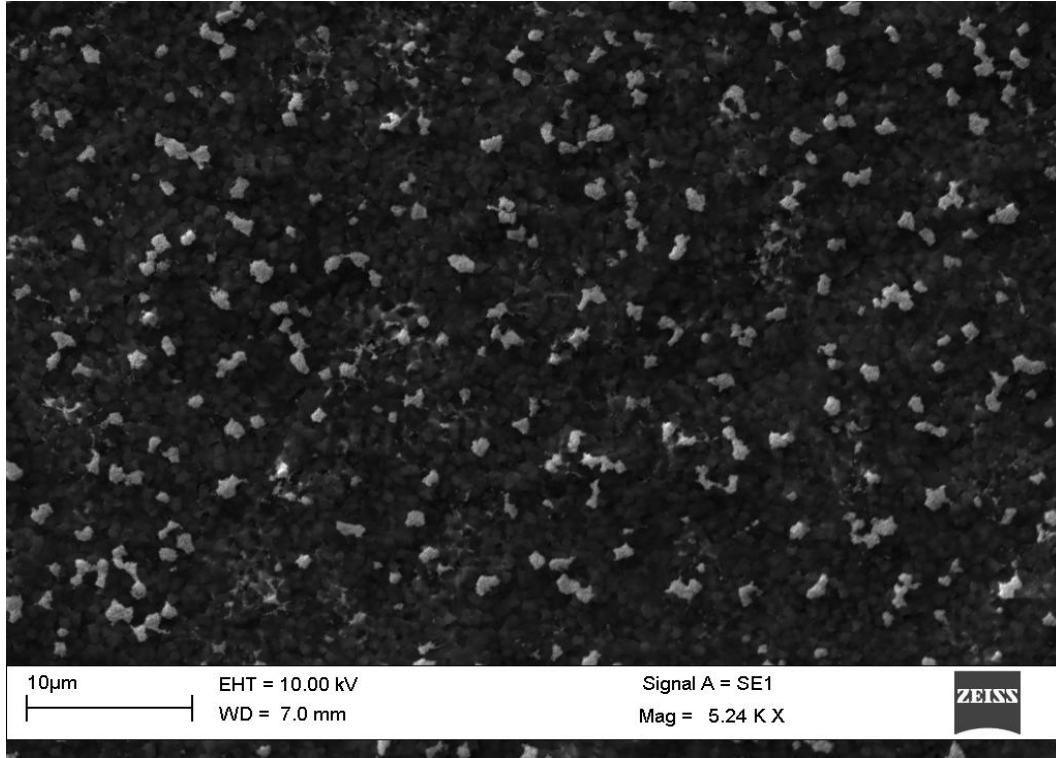
Şekil 4.7 *Escherichia coli*’nin farklı konsantrasyonlarda nanoparçacık içeren ışık mikroskop görüntüleri



Şekil 4.8 *Escherichia coli*'nin 2X gümüş nanoparçacıkla karıştırılan taramalı elektron mikroskop görüntüsü



Şekil 4.9 *Escherichia coli*'nin 4X gümüş nanoparçacıkla karıştırılan taramalı elektron mikroskop görüntüsü



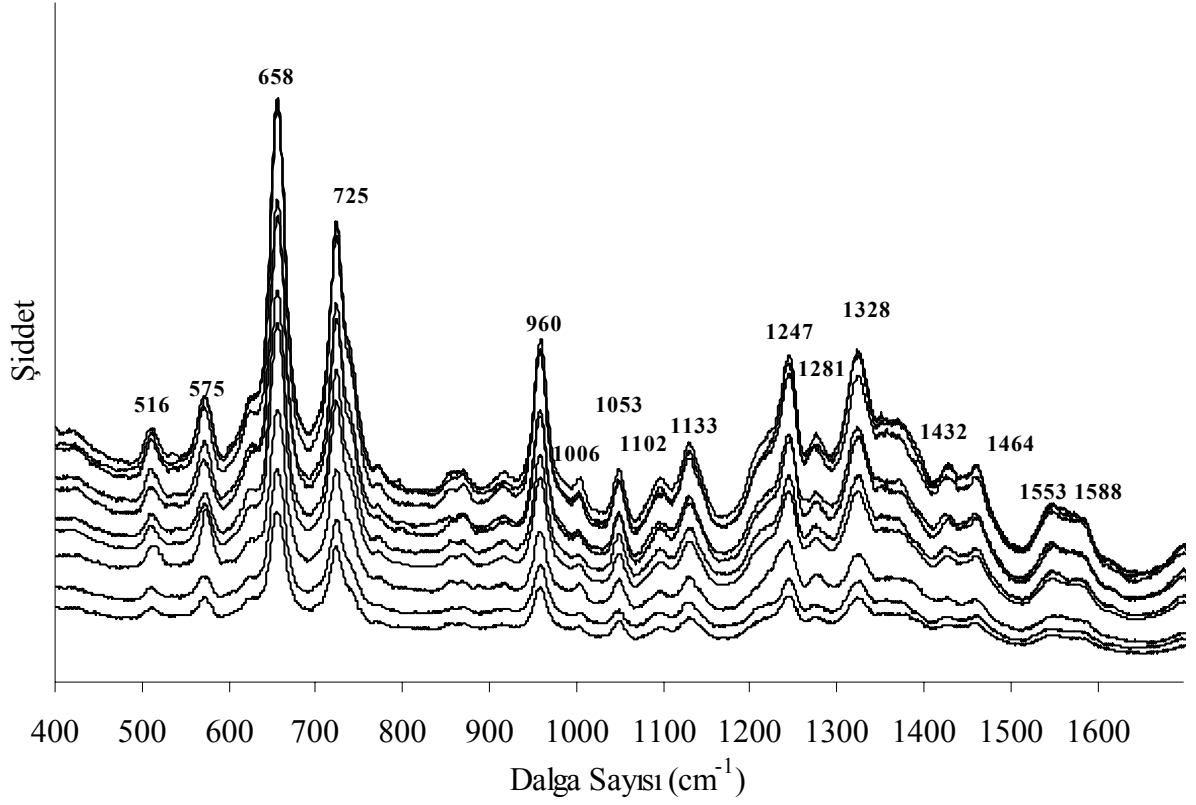
Şekil 4.10 *Escherichia coli*'nin 8X gümüş nanoparçacıkla karıştırılan taramalı elektron mikroskop görüntüsü

Correlations

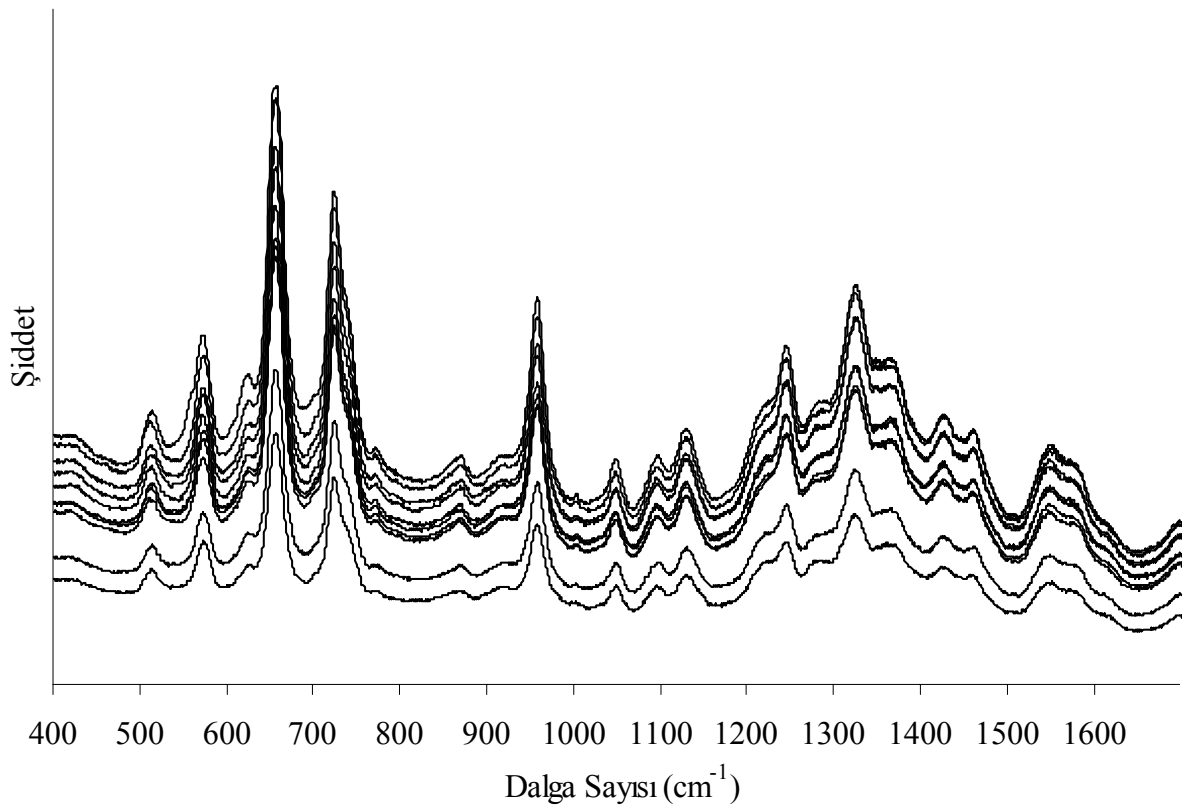
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	ORTALAMA
A	Pearson Correlation	1	,994(**)	,991(**)	,992(**)	,990(**)	,994(**)	,994(**)	,995(**)	,994(**)	,993(**)	,997(**)
	Sig. (2-tailed)	.	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
	N	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483
B	Pearson Correlation	,994(**)	1	,998(**)	,996(**)	,984(**)	,994(**)	,991(**)	,997(**)	,989(**)	,995(**)	,996(**)
	Sig. (2-tailed)	,000	.	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
	N	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483
C	Pearson Correlation	,991(**)	,998(**)	1	,997(**)	,984(**)	,994(**)	,988(**)	,997(**)	,989(**)	,996(**)	,996(**)
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	.	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
	N	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483
D	Pearson Correlation	,992(**)	,996(**)	,997(**)	1	,988(**)	,996(**)	,990(**)	,997(**)	,993(**)	,996(**)	,997(**)
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	.	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
	N	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483
E	Pearson Correlation	,990(**)	,984(**)	,984(**)	,988(**)	1	,993(**)	,991(**)	,990(**)	,993(**)	,989(**)	,994(**)
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	.	,000	,000	,000	,000	,000	,000
	N	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483
F	Pearson Correlation	,994(**)	,994(**)	,994(**)	,996(**)	,993(**)	1	,994(**)	,998(**)	,996(**)	,995(**)	,999(**)
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	.	,000	,000	,000	,000	,000
	N	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483
G	Pearson Correlation	,994(**)	,991(**)	,988(**)	,990(**)	,991(**)	,994(**)	1	,993(**)	,990(**)	,988(**)	,995(**)
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,000	.	,000	,000	,000	,000
	N	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483
H	Pearson Correlation	,992(**)	,997(**)	,997(**)	,997(**)	,990(**)	,998(**)	,993(**)	1	,995(**)	,997(**)	,999(**)
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	.	,000	,000	,000
	N	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483
I	Pearson Correlation	,994(**)	,989(**)	,989(**)	,993(**)	,993(**)	,996(**)	,990(**)	,995(**)	1	,995(**)	,997(**)
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	.	,000	,000
	N	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483
J	Pearson Correlation	,993(**)	,995(**)	,996(**)	,996(**)	,989(**)	,995(**)	,988(**)	,997(**)	,995(**)	1	,997(**)
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	.	,000
	N	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483
ORTALAMA	Pearson Correlation	,997(**)	,996(**)	,996(**)	,997(**)	,994(**)	,999(**)	,995(**)	,999(**)	,997(**)	,997(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	.
	N	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483	1483

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

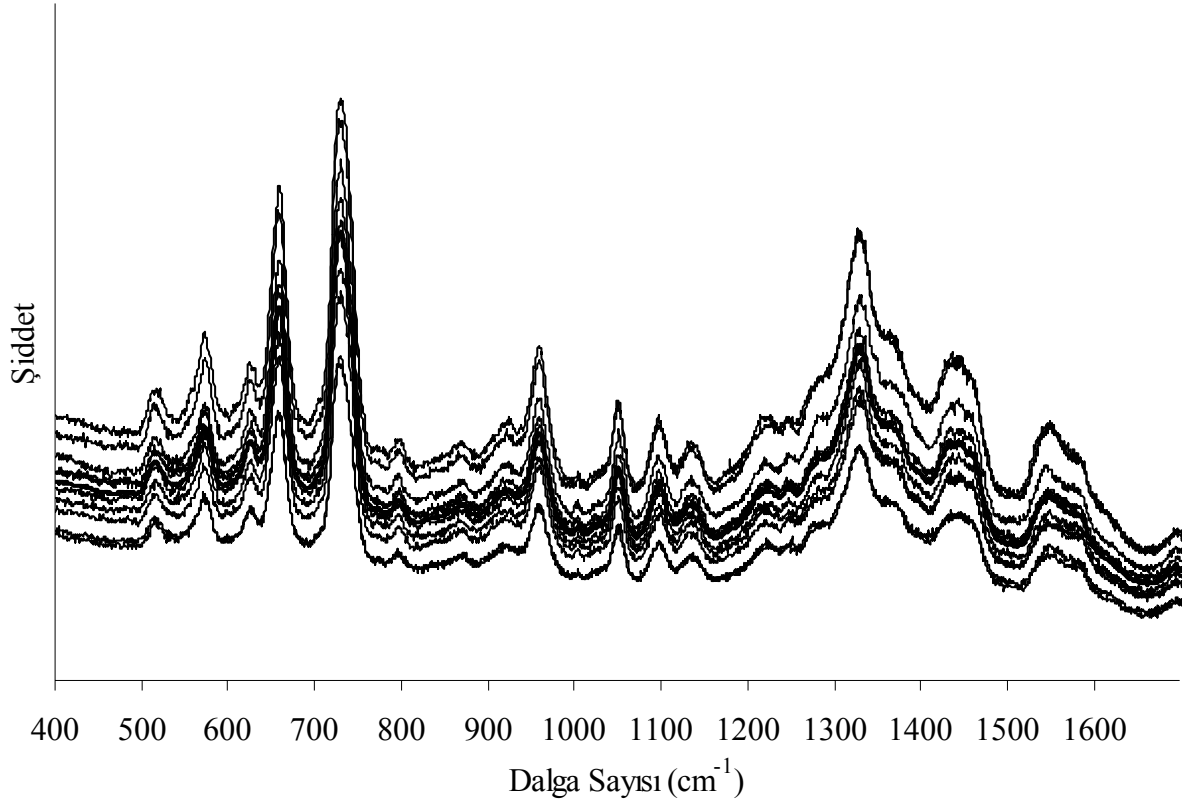
Çizelge 4.1 Alınan 10 spektrumun ortalamaya yakınlığını gösteren tablo



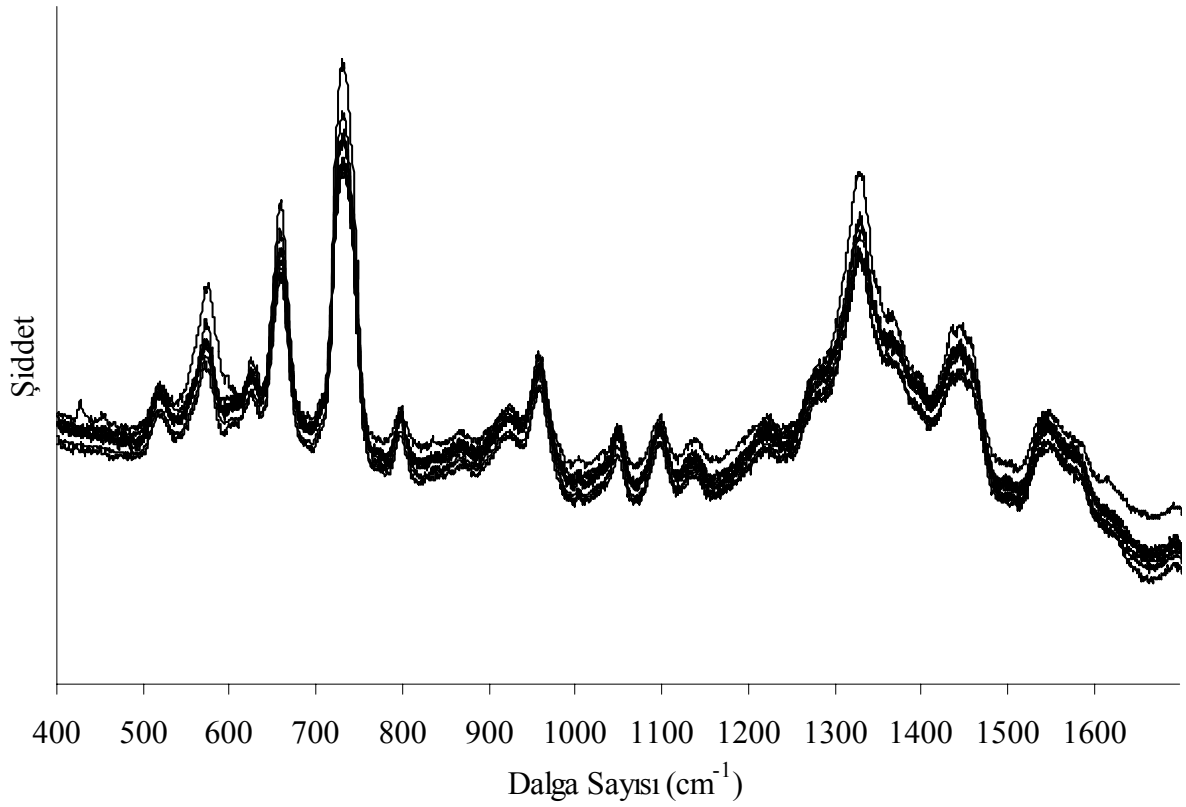
Şekil 4.11 *Bacillus megaterium*'un 1X gümüş nanoparçacıkla alınan Raman spektrumları



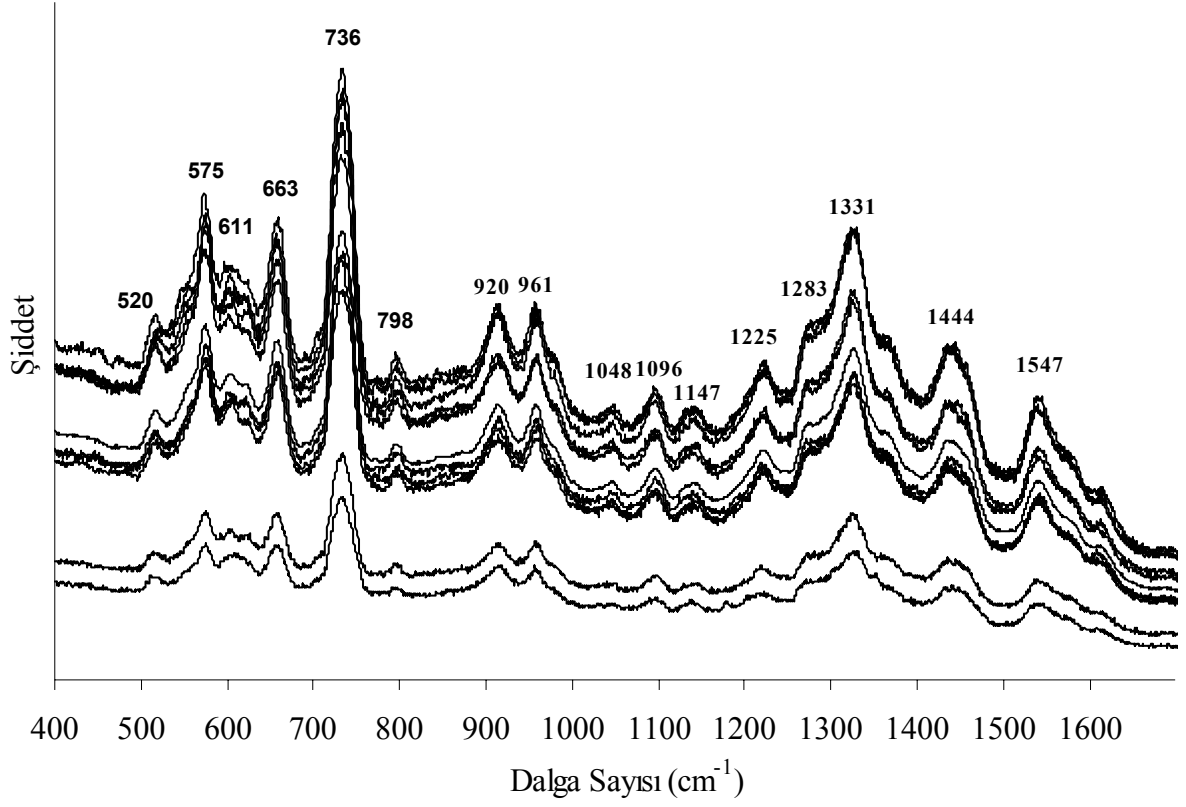
Şekil 4.12 *Bacillus megaterium*'un 2X gümüş nanoparçacıkla alınan Raman spektrumları



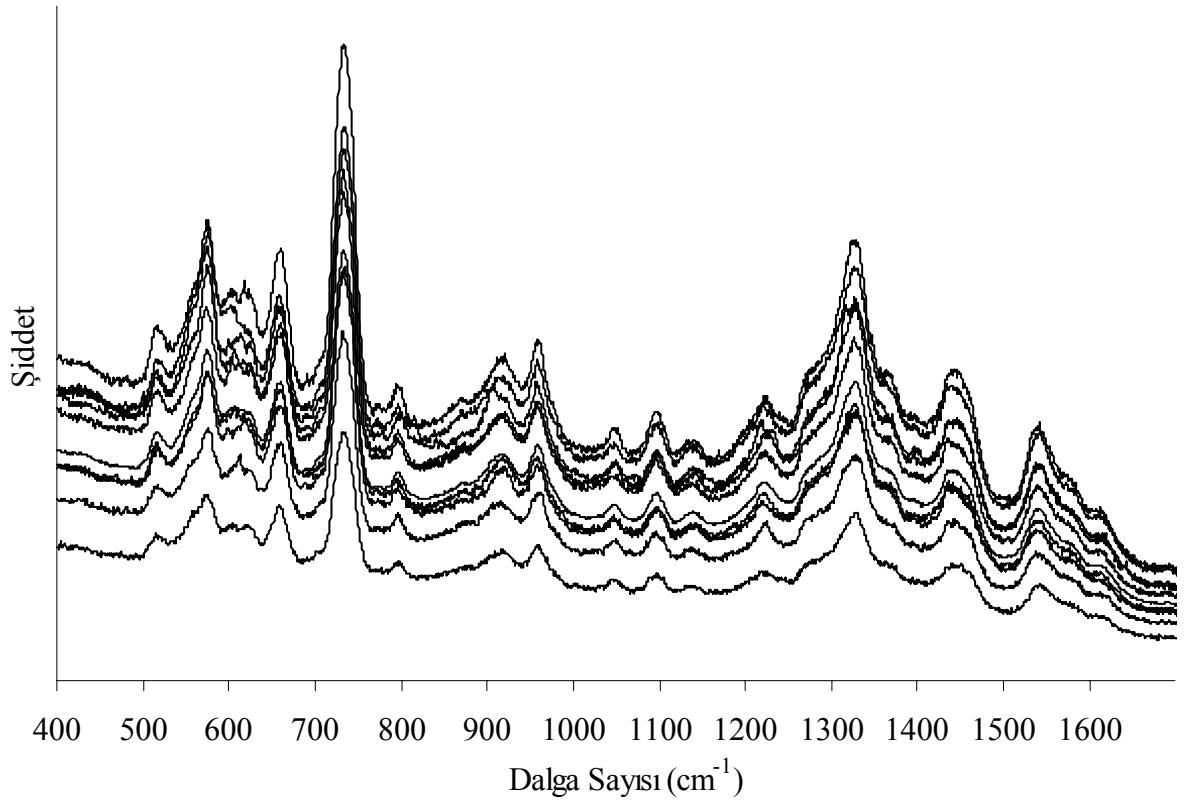
Şekil 4.13 *Bacillus megaterium*'un 4X gümüş nanoparçacıkla alınan Raman spektrumları



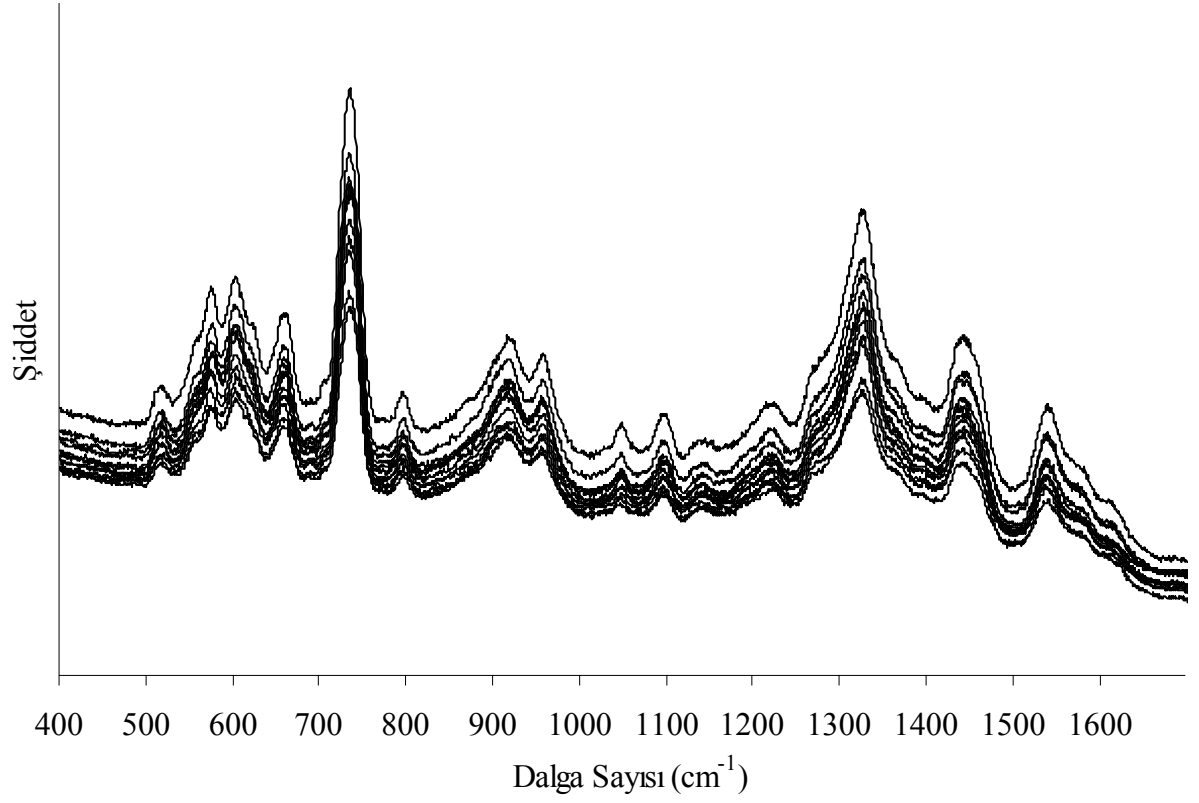
Şekil 4.14 *Bacillus megaterium*'un 8X gümüş nanoparçacıkla alınan Raman spektrumları



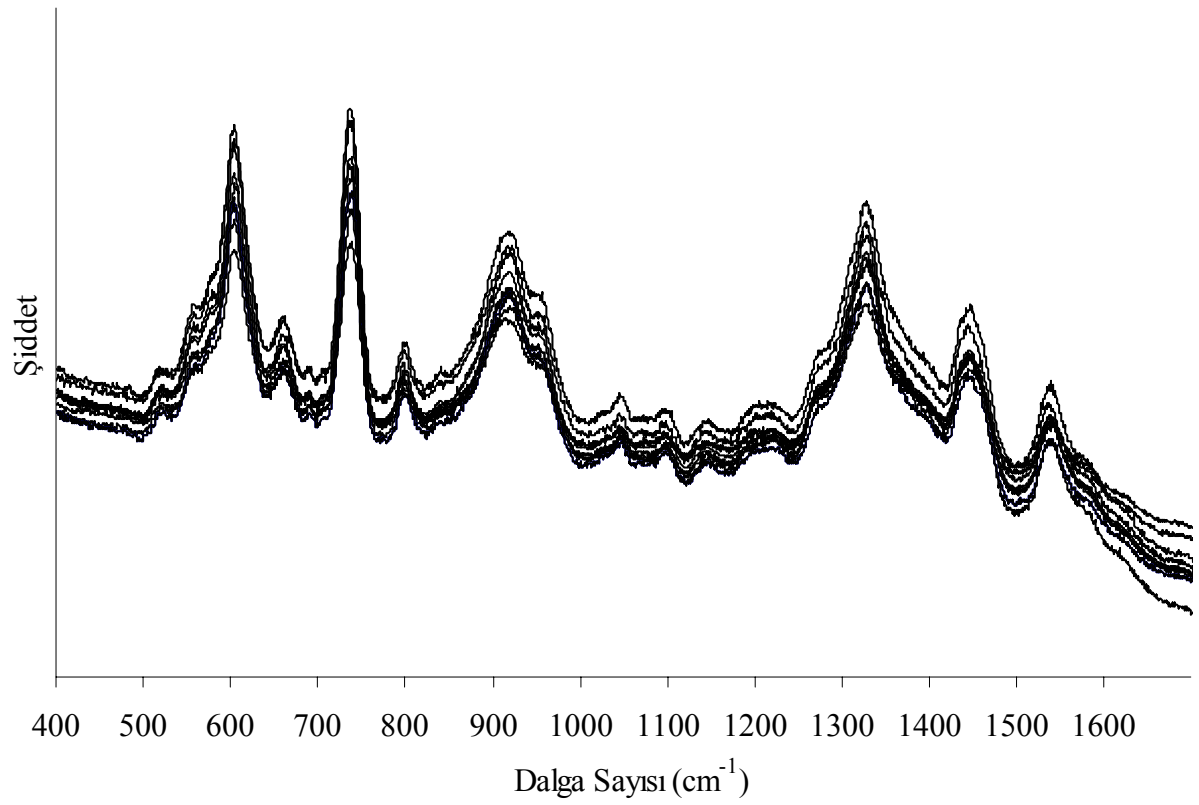
Şekil 4.15 *Escherichia coli*'nin 1X gümüş nanoparçacıkla alınan Raman spektrumları



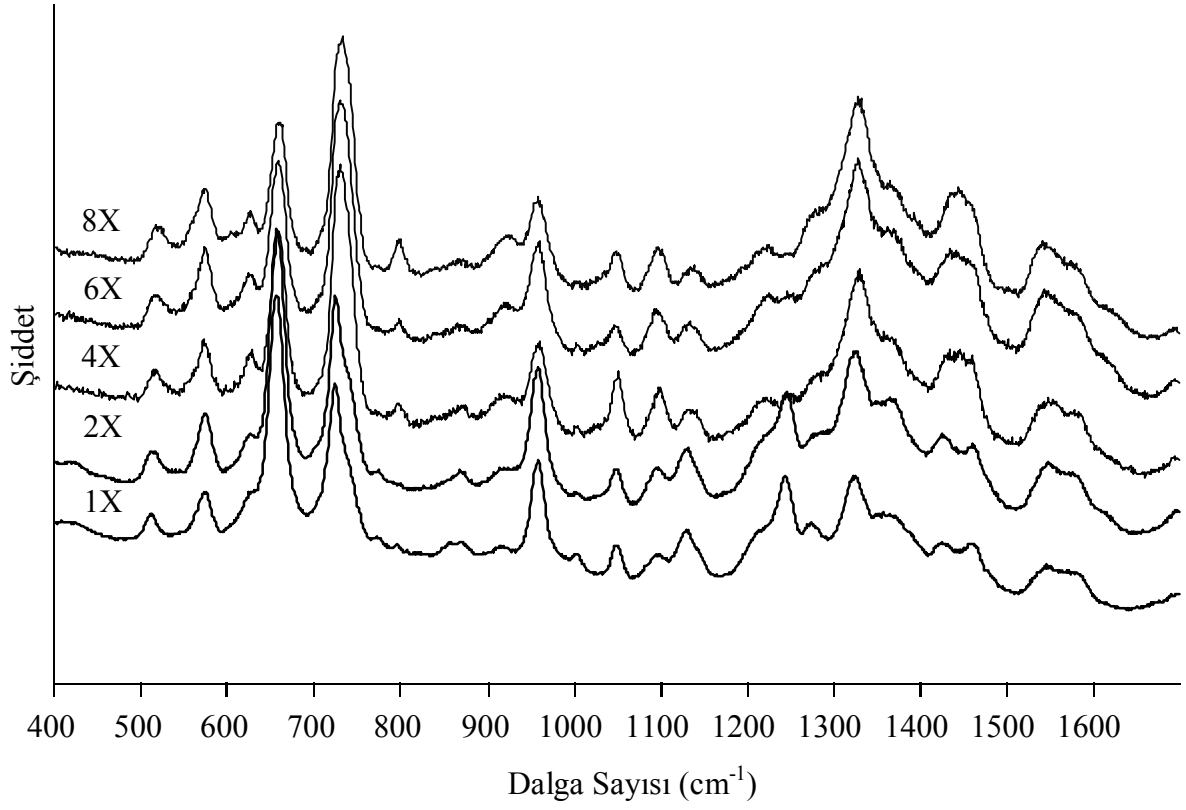
Şekil 4.16 *Escherichia coli*'nin 2X gümüş nanoparçacıkla alınan Raman spektrumları



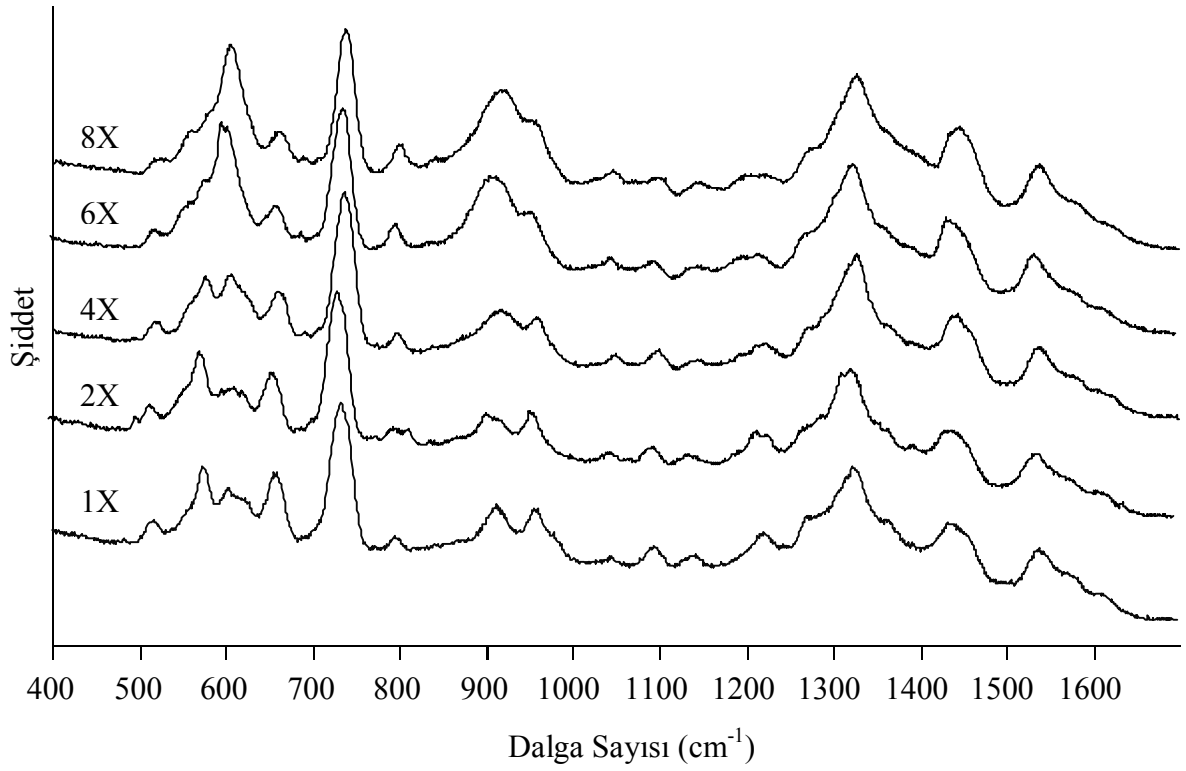
Şekil 4.17 *Escherichia coli*'nin 4X gümüş nanoparçacıkla alınan Raman spektrumları



Şekil 4.18 *Escherichia coli*'nin 8X gümüş nanoparçacıkla alınan Raman spektrumları



Şekil 4.19 *Bacillus megaterium*'un konsantrasyona bağlı Raman spektrumları



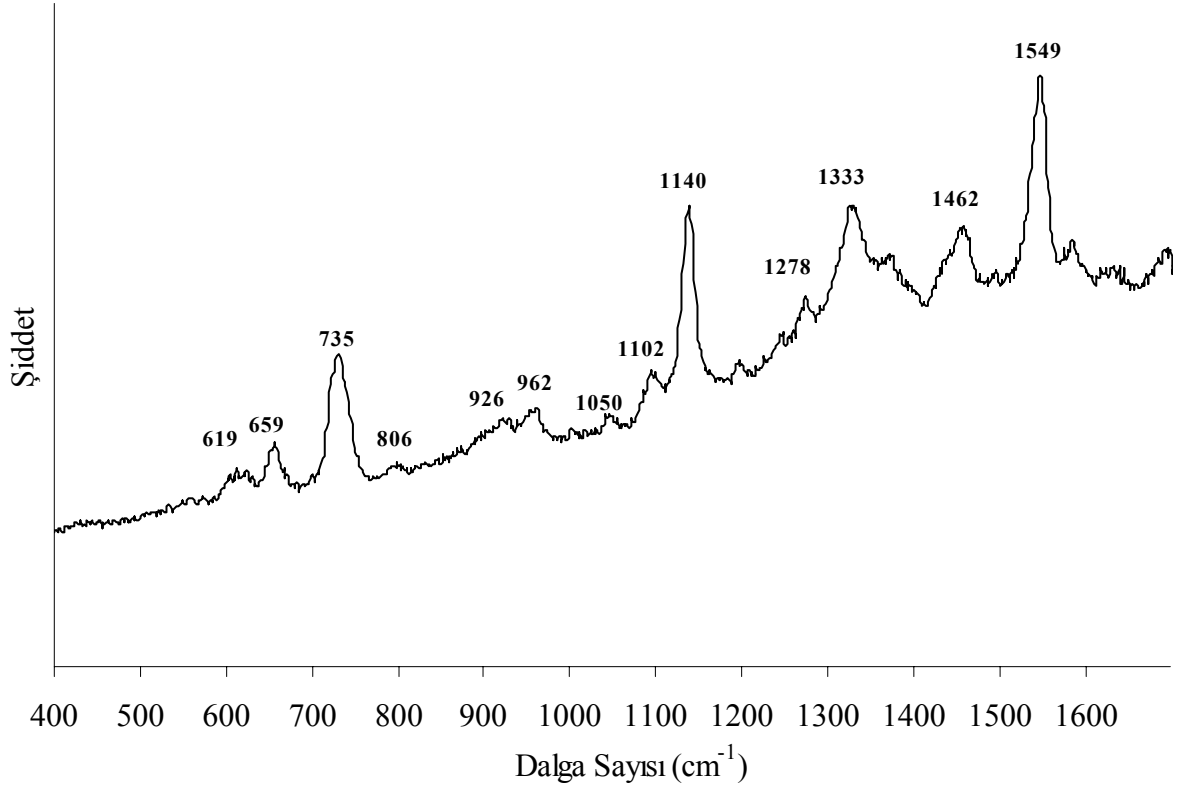
Şekil 4.20 *Escherichia coli*'nin konsantrasyona bağlı Raman spektrumları

4.5 Lazer Dalga Boyu

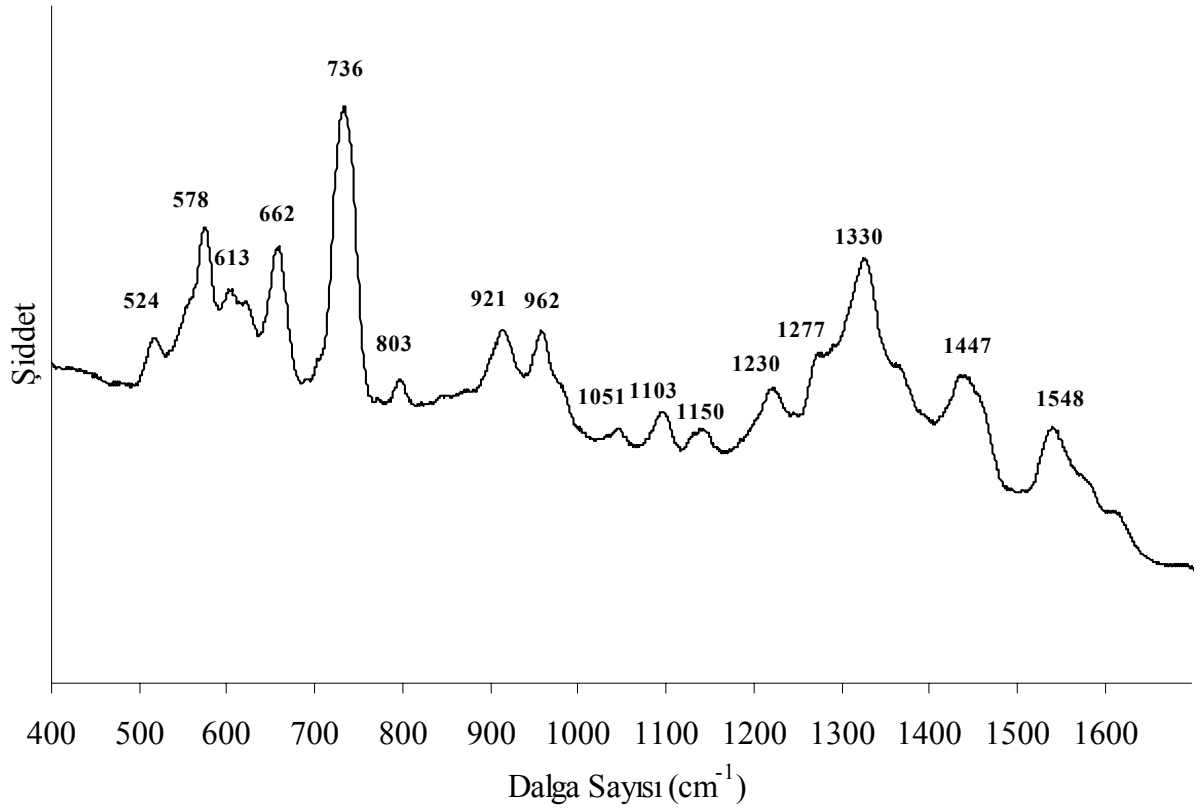
Normalde Raman saçılması lazer dalga boyundan bağımsızdır. Sadece Raman saçılmasında düşük dalga boylu lazerler kullanıldığında floresansa neden olduğu için enerjisi düşük daha uzun dalga boylu lazerler kullanılmaktadır. Ancak yüzeyde zenginleştirilmiş Raman saçılmasında zaten floresanstan etkilenmemektedir. YZRS’da lazerin dalga boyu nanoparçacıkların etrafında oluşturdukları yüzey plazmonlarını etkilemekte ve dalga boyuna bağlı olarak örneğe nüfuz etme miktarları farklıdır. Yeşil dalga boylu lazerlerle gümüş nanoparçacıkların daha iyi rezonansa geldiği bilinmektedir (Emory vd., 1998). Çünkü gümüş nanoparçacıklar sentezlendiğinde yüzey plazmonları 420 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon vermektedir. 514 nm dalga boylu lazer, absorpsiyon dalga boyuna 830 nm dalga boylu lazerden daha yakın olduğu için daha iyi rezonansa gelmektedir. Örneğe nüfuz etme lazer dalga boyuna bağlı olarak değişmektedir. Uzun dalga boylu olan 830 nm dalga boyuna sahip lazer daha düşük dalga boyuna sahip olan 514 nm lazerden daha fazla örneğe nüfuz etmektedir. Buna bağlı olarak bakterilerin YZRS’ında spektrumun ve tekrarlanabilirliği en iyi lazer dalga boyunu bulmak için 514 ve 830 nm dalga boyuna sahip lazerler kullanıldı. Şekil 4.21-22’de görüldüğü gibi 830 nm dalga boyuna sahip lazer kullanıldığında spektrumun daha detaylı olduğu görülmektedir.

Bunun nedenini iki parametre ile açıklanabilir. İlk olarak uzun dalga boylu lazerlerin düşük dalga boylu lazerlere göre örneğe daha fazla nüfuz etmesi ve bundan dolayı daha fazla molekülden saçılma olması dolayısıyla daha detaylı Raman spektrumu elde edilir. İkinci olarak kullanılan gümüş nanoparçacıkların kendi aralarında toplanmasından dolayıdır. Homojen bir şekilde dağılmış iseler düşük dalga boyundaki lazerlerle daha iyi rezonansa geldiklerinden saçılmayı daha iyi zenginleştirirler. Ancak gümüş nanoparçacıklar toplandığı zaman etrafındaki oluşturdukları yüzey plazmonları daha uzun dalga boyuna kaymakta böylelikle daha uzun dalga boylu lazerlerle daha iyi rezonansa gelmektedirler. Böylelikle 830 nm lazer dalga boyunda saçılmayı daha fazla zenginleştirmekte ve spektrumun daha detaylı olmasını sağlamaktadır (Kneipp vd., 1998a; 1998b).

Bu iki etkiden dolayı 830 nm lazer dalga boyu ile bakterilerin YZRS’ında daha iyi ve detaylı spektrum alınmaktadır.



Şekil 4.21 *Escherichia coli*'nin 514 nm dalga boyu lazer ile alınan Raman spektrumu

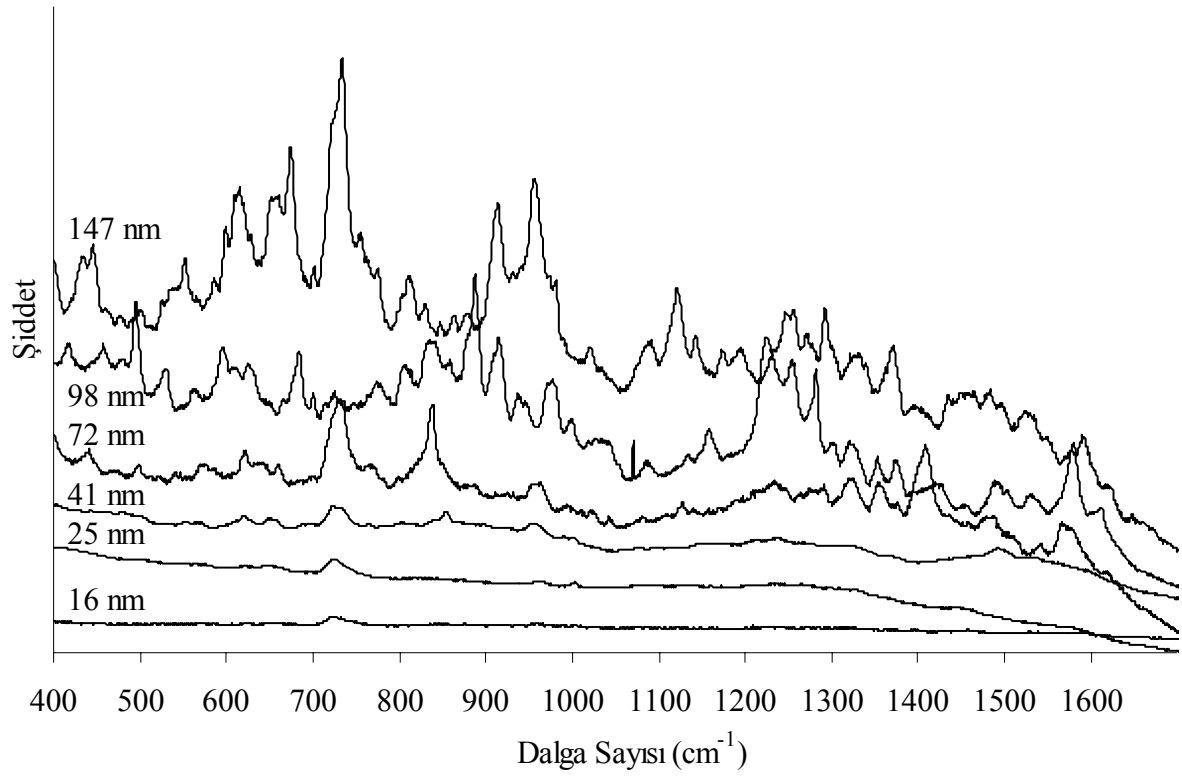


Şekil 4.22 *Escherichia coli*'nin 830 nm dalga boyu lazer ile alınan Raman spektrumu

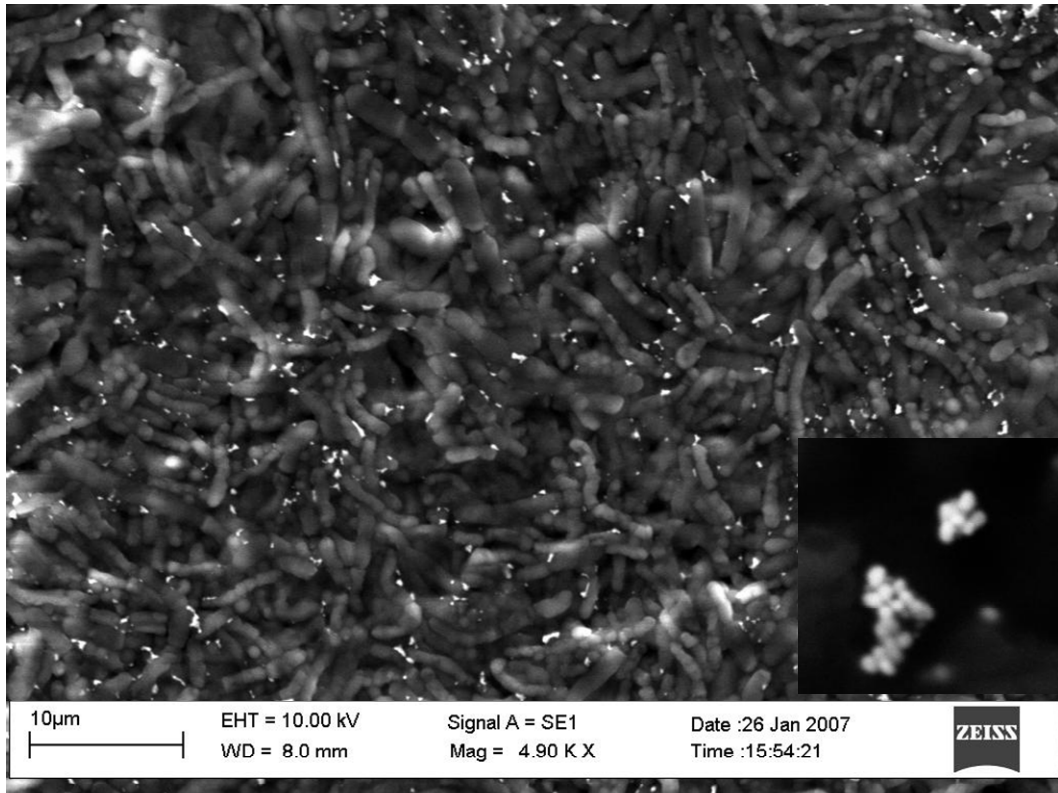
4.6 Nanoparçacıkların Cinsi ve Büyüklükleri

Raman spektroskopide saçılmayı zenginleştirmek için soymetallerin nano boyutları kullanılmaktadır. Bu nanoparçacıklar nano elektrot (Fleischmann vd., 1974; nano yüzey (Dustin vd., 2001), kontrollü nano yüzey (Lu vd., 2005) veya çözelti içerisinde kolloidal (Lee ve Meisel, 1982) olabilir. Genel olarak soymetallerden nano altın ve gümüş kullanılmaktadır. Kullanılan altın ve gümüşün oluşturdukları yüzey plazmonları birbirinden farklıdır. Yüzey plazmonları nanoparçacıkların büyüklüğüne, şekline ve cinsine bağlıdır (Barnes vd., 2003; Kreibig ve Vollmer, 1996; Liz-Marzan, 2006; Raether, 1988). Şekil 3.6'de görüldüğü gibi küresel altın nano parçacıkların büyüklüğü arttıkça oluşturdukları yüzey plazmonları daha uzun dalga boyuna kaymakta, böylelikle renkleri maviye kaymaktadır (Liz-Marzan, 2006) (Şekil 3.7). Gümüş nanoparçacıklara bakıldığında farklı şekillerdeki nanoparçacıkları yüzey plazmonları farklı dalga boyunda absorpsiyon yapmakta, böylelikle farklı renklerde görülmekte ve yüzey plazmonlarından dolayı da Raman saçılmasını zenginleştirmesi de farklıdır. Yukarıda yapılan tüm deneyler küresel gümüş nanoparçacıkları ile yapıldı. Altın nano parçacıkları da Raman saçılmasını zenginleştirmektedir. Bakterinin Raman saçılmasında altın ve gümüş arasındaki farkı anlamak ve bakteri için hangi nanoparçacığın veya büyüklüğün iyi olduğunu anlamak için standart sitrat yöntemi ortalama büyüklükleri 40–60 nm olan gümüş ve farklı büyüklüklerde altın nanoparçacıklar sentezlendi. Altın büyüklükleri 16, 25, 41, 72, 98, 147 nm boyutunda idi. Bu nano parçacıklar ile bakteri karıştırılıp analiz edildi. Raman saçılması zenginleştirmek için nanoparçacıkların büyüklükleri 30-100 nm olması gerekmektedir. Gümüş nanoparçacıklarla spektrum alındığında spektrum çok iyi olmaktadır. Bunun nedeni olarak parçacıkların büyüklükleri ve parçacıkların toplanmasıdır. Böylelikle daha uzun dalga boyundaki lazerle daha iyi rezonansa geldiklerinden daha iyi spektrum alındı. Altın ile yapılan analizlerde küçük boyutlu olanlarda spektrum güzel alınamamaktadır, ancak parçacık büyüklüğü arttıkça daha iyi spektrumlar alındığı gözlemlendi (Şekil 4.23). Bunun nedeni, Raman saçılması için parçacık büyüklüğünün belli nm boyutundan büyük olması gerektiğinden, diğer nedeni ise parçacık büyüklüğü arttıkça parçacıkların daha fazla toplanmasından ve yüzey plazmonlarının daha uzun dalga boyuna kayıp ta uzun dalga boylu lazerlerle daha iyi rezonansa gelmesi olarak açıklamak mümkündür. Şekil 4.24, 25, 26'da *B. megaterium*'un 25, 72, 147 nm altın nanoparçacıkları ile karıştırılan taramalı elektron mikroskop görüntüleri görülmektedir. Bu görüntüler büyüklük arttıkça toplanmanın daha fazla olduğunu ve her bir agralette parçacık sayısının boyutla doğru orantılı olduğunu göstermektedir. 25 nm ile hazırlanmış örnekte her bir agralette 15–20 parçacık bulunurken, 72 nm 25–35, 147 nm ise 40–50 parçacık bulunmaktadır. Aynı boyutta

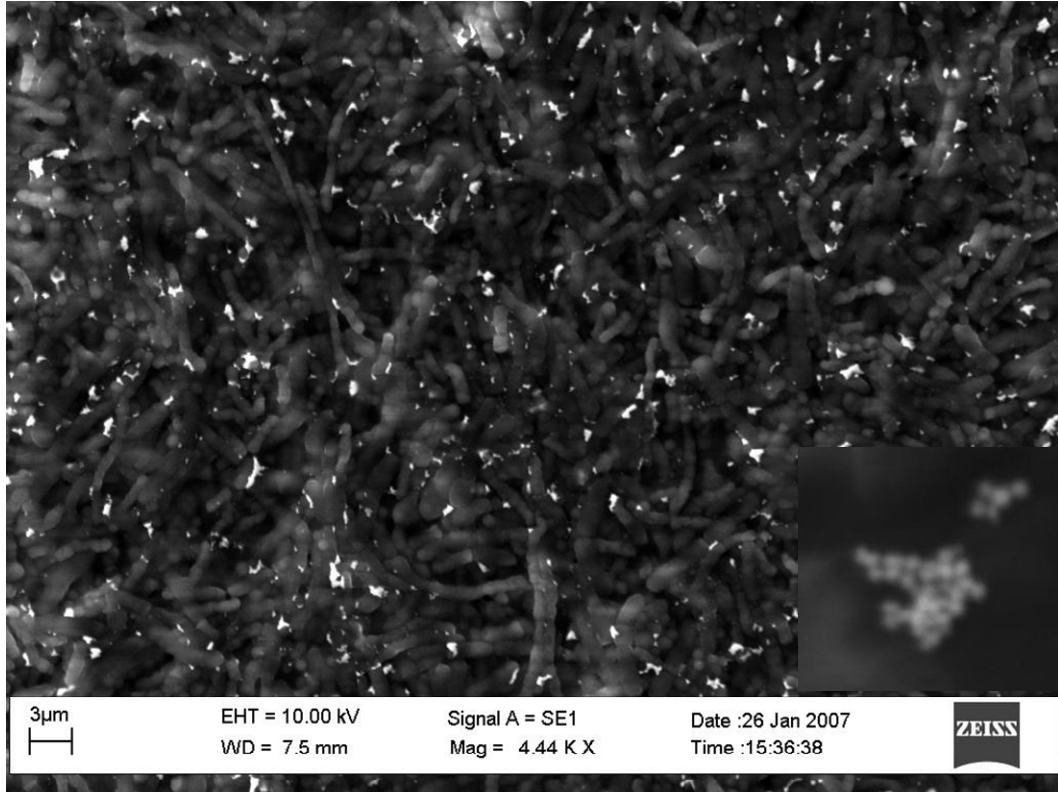
altın ve gümüş nanoparçacıkları karşılaştırıldığında gümüş nanoparçacık içeren örneklerden daha iyi spektrum alındığı görülmektedir (Şekil 4. 27).



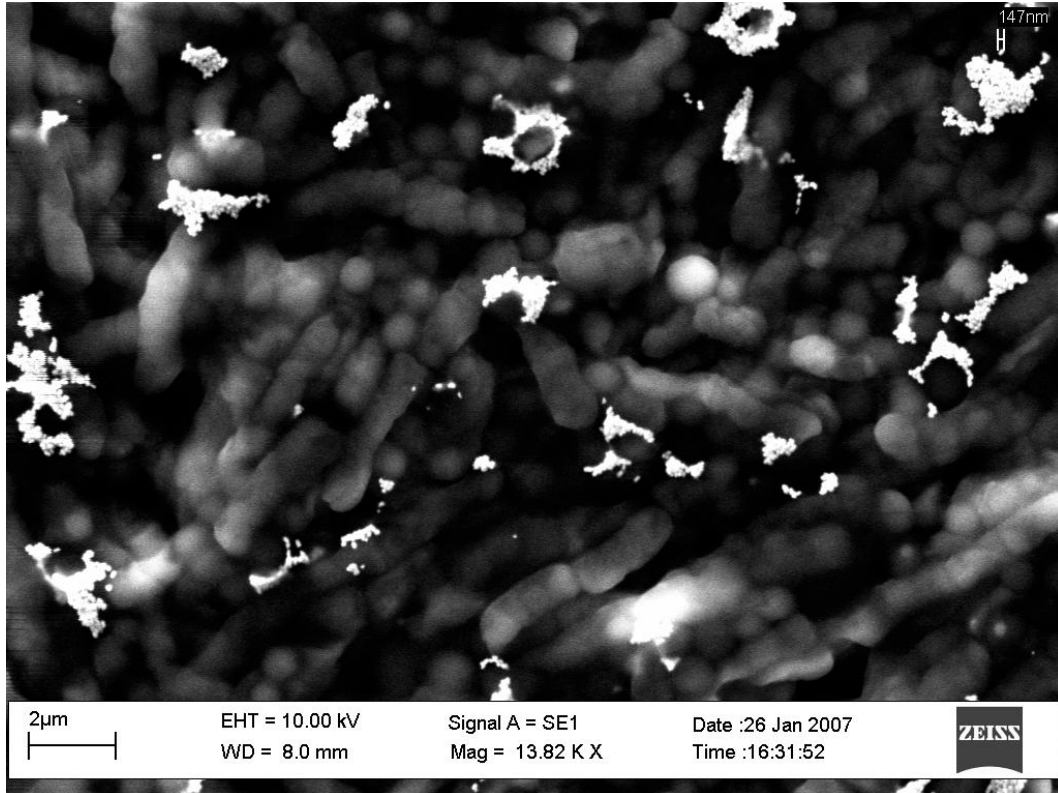
Şekil 4.23 *Bacillus megaterium*'un farklı büyüklüklerdeki altın nanoparçacıklar ile alınan Raman spektrumları



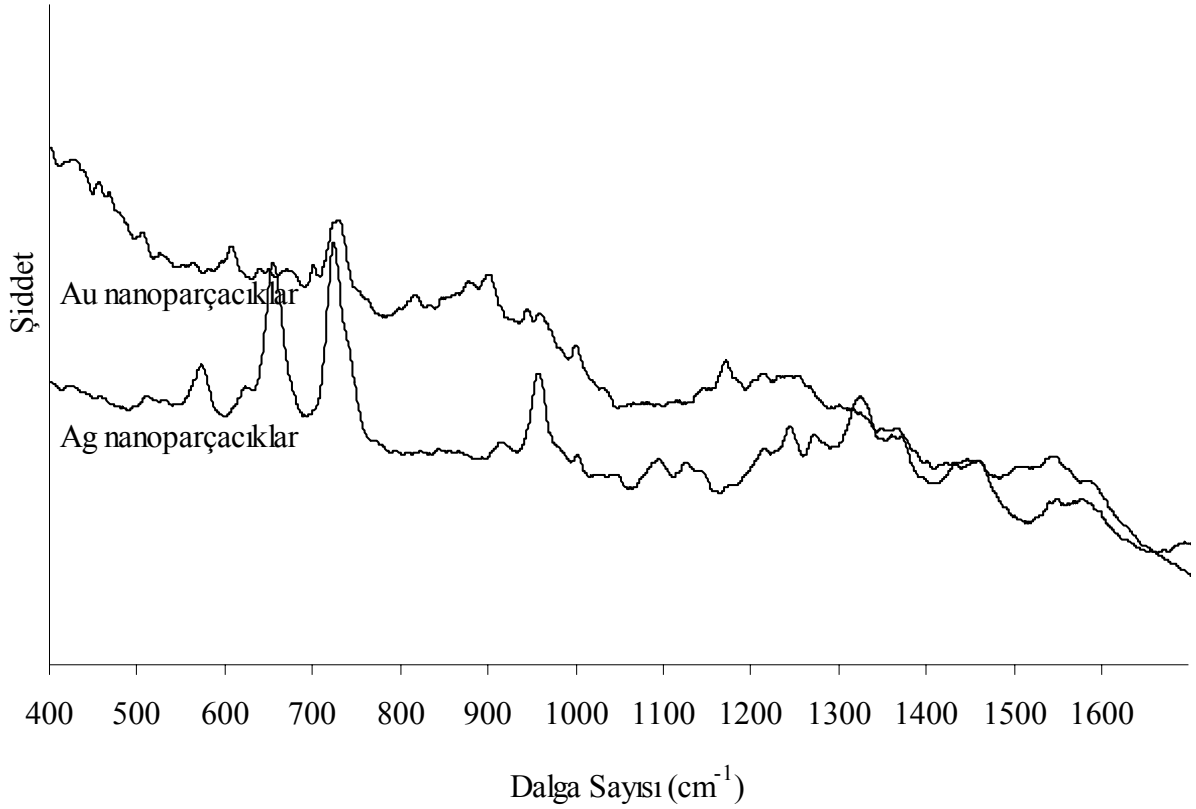
Şekil 4.24 *Bacillus megaterium*'un 25 nm altın nanoparçacıkla karıştırılan taramalı elektron mikroskop görüntüsü



Şekil 4.25 *Bacillus megaterium*'un 72 nm altın nanoparçacıkla karıştırılan taramalı elektron mikroskop görüntüsü



Şekil 4.26 *Bacillus megaterium*'un 147 nm altın nanoparçacıkla karıştırılan taramalı elektron mikroskop görüntüsü



Şekil 4.27 *Bacillus megaterium*'un aynı büyüklükteki altın ve gümüş nanoparçacıklarla alınan Raman spektrumları

Sonuç olarak, yapılan tüm deneyler sonucunda bakterilerin yüzeyde zenginleştirilmiş Raman spektrumlarını etkileyen optimum deneysel koşullar bulundu. Bunun yanı sıra, deneysel parametrelere bağlı olarak biyolojik bir yapı olan bakteri ile nanoparçacık etkileşimleri hakkında bilgi sahibi olundu.

Bakterilerin YZRS'indeki optimum koşullar; gümüş nanoparçacıklar için, sitrat ile hazırlanan kolloitlerin 4 defa deriştirilmesi ile elde edilen nanoparçacıklar kullanılması, karışım oranının 5 μL bakteri ve 100 μL kolloitten oluşması, lazer dalga boyunun 830 nm seçilmesi ve nanoparçacıkların hazırlandığı pH'da yani pH 9 da kullanılması ile elde edilir. Altın nanoparçacıklar için ise; parçacık büyüklüğünün en az 72 nm boyutunda ve kullanılan lazer dalga boyununda 830 nm olması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Albrecht, M. G. ve Creighton, J. A., (1977), "Anomalously Intense Raman Spectra of Pyridine at a Silver Electrode", J. Am. Chem. Soc., 99:5215-7.
- Al-Khaldi, S. F. ve Mossoba, M. M., (2004), "Gene and Bacterial Identification Using High-throughput Technologies: Genomics, Proteomics, and Phenomics.", Nutrition, 20:32-38.
- Alvarez-Puebla, A. R., Arceo, E., Goulet, P. J. G., Garrido, J. J. ve Aroca, R. F., (2005), "Role of Nanoparticle Surface Charge in Surface-Enhanced Raman Scattering", J. Phys. Chem. B, 109:3787-3792.
- Asher, S.A., (1993), Anal. Chem., 65:59A, 201A.
- Barnes, W. L., Dereux, A. ve Ebbesen, T. W., (2003), "Surface Plasmon subwavelength optics", Nature, London, 424:824-830.
- Bilgehan, H., (1999), Temel Mikrobiyoloji ve Bağımsızlık Bilimi, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir.
- Bouzar, H., Jones, J. B., Stall, R. E., Hodge, N. C., Minsavage, G. V., Benedict, A. A. ve Alvarez, A. M. (1994), "Physiological, Chemical, Serological, and Pathogenic Analyses of a Worldwide Collection of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*", Phytopathology, 84: 663-671.
- Carey, P.R., (1982), Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopy, Academic Press, New York.
- Chase, B., (1987), Anal. Chem., 59:888A.
- Claydon, M.A., Davey, S.N., Edwards-Jones, V. ve Gordon, D.B., (1996), "The Rapid Identification of Intact Microorganisms Using Mass Spectrometry", Nat. Biotechnol., 14:1584-1586.
- Creighton, J. A., Blachford, C. G. ve Albrecht, M. G., (1979), J. Chem. Soc. Faraday Trans., 75:790.
- Daimay, L., Colthup, N.B., Fataly, W.G. ve Grasselli J.G., (1971). The Handbook of Infrared & Raman Characteristic Frequencies of Organic Compounds, Wiley-Interscience, New York.
- Efrima, S. ve Bronk, B. V., (1998), "Silver Colloids Impregnating or Coating Bacteria", J. Phys. Chem. Ser. B., 102:5947-5950.
- Efrima, S., Bronk, B. V. ve Czege, J., (1999), "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Bacteria Coated by Silver", Proc. SPIE., 3602:164-171.
- Emory S. R., Haskins, W. E. ve Nie, S., (1998), "Direct Observation of Size-Dependent Optical Enhancement in Single Metal Nanoparticles", J. Am. Chem. Soc., 120:8009-8010.

Ferraro, J.R. ve Nakamoto, K., (1994), *Introductory Raman Spectroscopy*, Academic Press, New York.

Fleischmann, M., Hendra, P. J. ve McQuillan A. J., (1974), "Raman Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver electrode", *Chem. Phys. Lett.*, 26:163-6.

Garrell, R. L., (1989), *Anal.Chem.*, 61:401A.

Goodacre, R., Hiom, S.J., Cheeseman, S.L., Murdoch, D., Weightman, A.J. ve Wade, W.G., (1996), "Identification and Discrimination of Oral Asaccharolytic Eubacterium spp. by Pyrolysis Mass Spectrometry and Artificial Neural Networks", *Curr. Microbiol.*, 32:77-84.

Grasselli, J.G. ve Bulkin, B.J., (1991), *Analytical Raman Spectroscopy*, Wiley, New York.

Gutierrez, M. ve Henglein, A., (1993), "Formation of Colloidal Silver by Push-Pull Reduction of Ag^+ ", *J. Phys. Chem.*, 97:11368-11370.

Haag, A.M., Taylor, S.N., Johnston, K.H. ve Cole, R.B., (1998), "Rapid Identification and Speciation of Haemophilus Bacteria by Matrixassisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry", *J. Mass Spectrom.*, 33: 750-756.

Handley D.A., (1989), *Colloidal Gold, Principles, Methods, and Applications*, Vol.1 (Ed.: M.A. Hayat), Academic Press, New York.

Harvey, A.B., (1978). *Anal. Chem.*, 50:905A.

Harvey, A.B., (1981), *Chemical Applications of Nonlinear Raman Spectroscopy*, Academic Press, New York.

Henglein, A., (1998), "Colloidal Silver Nanoparticles: Photochemical Preparation and Interaction with O_2 , CCl_4 , and Some Metal Ions", *Chem. Mater.*, 10:444-450.

Hossain, M.K., Shibamoto, K., Ishioka, K., Kitajima, M., Mitani, T. ve Nakashima, S., (2007), "'2D Nanostructure of Gold Nanoparticles: An Approach to SERS-Active Substrate'", 122-123:792-795.

Jarvis, R. M. ve Goodacre R., (2004a), "Discrimination of Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy", *Anal. Chem.*, 76:40-47.

Jarvis, R. M., Brooker, A. ve Goodacre. R., (2004b), "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Bacterial Discrimination Utilizing a Scanning Electron Microscope with a Raman Spectroscopy Interface", *Anal. Chem.*, 76:5198-5202.

Jarvis, R. M. ve Goodacre, R., (2004c), "Ultra-Violet Resonance Raman Spectroscopy for the Rapid Discrimination of Urinary Tract Infection Bacteria", *FEMS Microbiol. Lett.*, 232:127-132.

Jarvis, R. M., Brooker, A. ve Goodacre. R., (2006), "Surface-Enhanced Raman Scattering for the Rapid Discrimination of Bacteria", *Faraday Discussions*, 132: 281-292.

- Jeanmaire, D. J. ve Van Duyne, R. P., (1977), "Surface Raman spectroelectrochemistry. Part I. Heterocyclic Aromatic and Aliphatic Amines Adsorbed on the Anodised silver electrode", J. Electroanal. Chem., 84:1-20.
- Jeon, J. S. ve Yeh, C. S., (1998), "Studies of Silver Nanoparticles by Laser Ablation Method", J. Chin. Chem. Soc., 45:721-726.
- Kapoor, S., (1998), "Preparation, Characterization, and Surface Modification of Silver Particles", Langmuir, 14:1021-1025.
- Kılıç, E., Köseoğlu, F. ve Yılmaz, H., (1998), Enstrümantal Analiz İlkeleri, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Kreibig, U. ve Vollmer, M., (1996), Optical Properties of Metal Clusters, Springer-Verlag, Berlin.
- Küçüker, M. A., Tümbay, E., Anğ, Ö. ve Erturan, Z., (2002), Tıbbi Mikrobiyoloji Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Lee, P.C. ve Meisel, D., (1982), "Adsorption and Surface-enhanced Raman of Dyes on Silver and gold sols", J. Phys. Chem., 86:3391-3395.
- Lelliot, R. A. ve Stead, D. E., (1987), "Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants", Black well Scientific Publicatio, Oxford.
- Li, Y.-S., Cheng, J. ve Coons, L. B., (1999), "A Silver Solution for Surface-Enhanced Raman Scattering", Spectrochim. Acta A Part A, 55:1197-1207.
- Li, Y.-S., Wang, Y. ve Cheng, J., (2001), "Interaction Effects on Surface-Enhanced Raman Scattering Activities in Silver Sols", Vib. Spectrosc., 27:65-72.
- Liz-Marzan, L. M., (2006), "Tailoring Surface Plasmons Through the Morphology and Assembly of Metal Nanoparticles", Langmuir, 22: 32-41.
- Lopez-Diez, E. C. ve Goodacre, R., (2004) "Characterization of Microorganisms Using UV Resonance Raman Spectroscopy and Chemometrics", Anal.Chem., 76:585-591.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., ve de Bruijn, F. J., (1995), "Determination of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*", Phytopathology, 85: 528-536.
- Lu L., Randjelovic, I., Capek, R., Gaponik, N., Yang, J., Zhang, H. ve Eychmüller, A., (2005), "Controlled Fabrication of Gold-Coated 3D Ordered Colloidal Crystal Films and Their Application in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy", Chem. Mater., 17:5731-5736.
- Manoharan, R., Ghiamati, E., Dalterio, R. A., Britton, K. A., Nelson, W. H. ve Sperry, J. F., (1990), UV Resonance Raman Spectra of Bacteria, Bacterials spores, Protoplasts, and Calcium Dipicolinate", J. Microbiol. Methods, 11:1-15.

- Maquelin, K., Choo-Smith, L. P., Vreeswijk, T. V., Endtz, H. P., Smith, B., Bennett, R., Bruining, H. A. ve Puppels, G. J., (2000), "Raman Spectroscopic Method for Identification of Clinically Relevant Microorganisms Growing on Solid Culture medium", *Anal. Chem.*, 72:12-19.
- Maquelin, K., Choo-Smith, L. P., Endtz, H. P., Bruining, H. A. ve Puppels, G. J., (2002a), "Rapid Identification of *Candida* Species by Confocal Raman Microspectroscopy" *J. Clin. Microbiol.*, 40:594-600.
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L. P., van den Braak, N., Endtz, H. P., Naumann, D. ve Puppels, G. J., (2002b), "Identification of Medically Relevant Microorganisms by Vibrational Spectroscopy", *J. Microbiol. Methods*, 51:255-271.
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L. P., Ngo-Thi, N. A., van Vreeswijk, T., Stammler, M., Endtz, H. P., Bruining, H. A., Naumann, D. ve Puppels, G. J., (2003), "Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures", *J. Clin. Microbiol.*, 41:324-329.
- Maquelin, K., Dijkshoorn, L., van der Reijden, T. J. K. ve Puppels, G. J., (2006), "Rapid Epidemiological Analysis of *Acinetobacter* Strains by Raman Spectroscopy", *Journal of Microbiological Methods*, 64:126-131.
- Maxwell D. J., Emory, S. R. ve Nie, S., (2001), "Nanostructured Thin-Film Materials with Surface-Enhanced Optical Properties", *Chem. Mater.*, 13:1082-1088
- Morris, M. D. ve Wallan, D. J., (1979), *Anal. Chem.*, 51:182A.
- Moskovits M., (1985), "Surface-Enhanced Spectroscopy", *Rev. Mod. Phys.*, 57(3):783-826.
- Nagata, Y., Watanabe, Y., Fujita, S., Dohmaru, T. ve Taniguchi, S., (1992), "Formation of Colloidal Silver in Water by Ultrasonic Irradiation", *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 211620-1622.
- Nakamoto, K., (1996), *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination compounds*, 5th ed., Wiley, New York.
- Naumann, D., Helm D., Labischinski, H. ve Giesbrecht, P., (1991), The Characterization of Microorganisms by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), p. 43–96. In W. H. Nelson (ed.), *Modern techniques for rapid microbiological analysis*. VCH Publishers, New York, N.Y.
- Naumann, D., (2000), *Infrared Spectroscopy in Microbiology*, p. 102–131. In R. A. Meyers (ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, United Kingdom.
- Newman, C. D., Bret, G. C. ve McCreery, R. L., (1992), *Appl. Spectros.*, 46:263.
- Otto, A., Mrozek, I., Grabhorn, H. Ve Akemann, W., (1992), *J. Phys. Con. Matter.*, 4:1143.

- Premasiri, W. R., Moir, D. T., Klempner, M. S., Krieger, N., Jones II, G. Ve Ziegler, L. D., (2005), "Characterization of the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of Bacteria", J. Phys. Chem. B., 109:312-320.
- Raether, H., (1988), Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings, Springer-Verlag, Berlin.
- Sasser, M., (1990), Identification of Bacteria Through Fatty Acid Analysis. Pages 199-204 in: Methods in Phytobacteriology. Z. Klement, K. Rudolph, and D. Sands, eds. Akademiai Kiado, Budapest.
- Sato, T., Onaka H. ve Yonezawa Y., (1999), "Sensitized Photoreduction of Silver Ions in the Presence of Acetophenone", J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 127:83-87.
- Sengupta, A., Laucks, M. L. ve Davis, E. J., (2005), "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Bacteria and pollen", Applied Spectroscopy, 59:1016-1023.
- Sengupta, A., Mujacic, M. ve Davis. E. J., (2006), "Detection of Bacteria by Surface Enhanced Raman Spectroscopy", Analytical and Bioanalytical Chemistry, 386:1379-1386.
- Smith, E. ve Dent, G., (2005), Modern Raman Apectroscopy - A Practical Approach, John wiley & Sons, Ltd, New York.
- Strommen, D. P. ve Nakamoto, K., (1977). J. Chem. Educ., 54:474.
- Strommen D. P. ve Nakamoto, K., (1981), Amer. lab., 43(10):72.
- Swings, J. G. ve Civerolo, E. L.,(1993), *Xanthomonas*. 1st eds, Chapman and Hall, London.
- Tessier, P.M., Velez, O. D., Kalambur, A. T., Rabolt, J. F., Lenhoff, A. M. ve Kaler, E. W., (2000), "Assembly of Gold Nanostructured Films Templated by Colloidal Crystals and Use in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy", J.Am. Chem. Soc., 122:9554-9555.
- Tortora, G. j., Funke, B. R. ve Case, C. L., (2004), Microbiolgy An Introduction, 8th ed., Pearson Benjamin Cummings, San Francisco..
- Tu, A. T., (1982). Raman Spectroscopy in Biology, Wiley, New York.
- Zeiri, L., Bronk, B. V., Shabtai, Y., Czege, J. ve Efrima, S., (2002), "Silver Metal Induced Surface Enhanced Raman of Bacteria", Colloids Surf. Ser., 208:357-362.
- Zeiri, L., Bronk, B. V., Shabtai, Y., Eichler, J. ve Efrima, S., (2004), "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy as a Tool for Probing Specific Biochemical Components in Bacteria", Applied Spectroscopy, 58:33-40.
- Zhao H, Yuan, B. ve Dou, X., (2004), "The Effects of Electrostatic Interaction Between Biological Molecules and Nano-metal Colloid on Near-infrared Surface-Enhanced Raman scattering", J. Opt. A: Pure Appl. Opt., 6:900-905.

İNTERNET KAYNAKLARI

<http://textbookofbacteriology.net>

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	29/09/1981	
Doğum yeri	Kahramanmaraş	
Lise	1995-1999	Kahramanmaraş Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi
Lisans	2000-2005	Çukurova Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Kimya Böl.
Yüksek Lisans	2005-	Yıldız Teknik Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Bölümü

Çalıştığı Kurum

2005- Devam ediyor, Yeditepe üniversitesi, Genetik ve
Biyomühendislik Bölümü Araştırma Görevlisi