




## Çip-Üstü-Laboratuvar (ÇÜL) Teknolojisinin Gıda Mikrobiyolojisindeki Uygulamaları

Gamze Düven<sup>1,2</sup> , Barbaros Çetin<sup>3</sup> , Duygu Kışla<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü 35100 İzmir

<sup>2</sup>İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, 35430 Gülbahçe Köyü, Urla, İzmir

<sup>3</sup>İ.D. Bilkent Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, 06800 Ankara

*Geliş Tarihi (Received): 02.03.2017, Kabul Tarihi (Accepted): 20.07.2017*

✉ *Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): [duygukisla@gmail.com](mailto:duygukisla@gmail.com) (D. Kışla)*

☎ 0 232 311 30 13 📠 0 232 342 75 92

### ÖZ

Son 20 yılda ortaya çıkan mikro-kanal yapılarında mikro-litreler mertebesinde akışkanın proses edilmesi için kullanılan çip-üstü-laboratuvar (ÇÜL) sistemleri konvansiyonel yöntemlere bir alternatif oluşturmaktadır. Mikro-yapıların kendine has özelliklerinden dolayı ÇÜL sistemleri, karmaşık analizleri geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında daha düşük maliyette, daha düşük enerji, daha düşük kimyasal sarfiyatı ile daha verimli bir şekilde yapabilmekte ve bu yönleriyle birçok alanda (biyomedikal, gıda, kimya, tıp, eczacılık, tarım vb.) çok değerli bir seçenek oluşturmaktadır. Ayrıca bu sistemler otomasyona uygundur ve taşınabilir olma potansiyelleri vardır. Özellikle gıda endüstrisinde bazı durumlarda analiz sonuçlarının hızlı alınabilmesi işletme için büyük önem taşımaktadır. Çip-üstü laboratuvar teknolojisi bu nedenle gıda endüstrisinde özellikle mikrobiyolojik analizlerde hızlı sonuç vermesi, uzman personel gerektirmemesi, az örneğe ihtiyaç duyması vb. özellikleri ile son zamanlarda oldukça önem taşımaktadır. Bu çalışmada, ÇÜL cihazlarının çalışma prensipleri, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), akış sitometrisi ve biyosensörler ile birlikte kullanıldığı entegre sistemler ve bu sistemlerin gıda mikrobiyolojisindeki uygulamaları anlatılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Çip-üstü-laboratuvar, Gıda mikrobiyolojisi, Mikro-akışkan sistemler, Hızlı mikrobiyolojik yöntemler

### Lab-On-A-Chip (LOC) Technology Applications in Food Microbiology

#### ABSTRACT

Lab-on-a-chip (LOC) systems, which have emerged in the last two decades and used for fluid processing in a micro-channel structure at microliter levels, are alternatives to conventional methods. Because of the unique properties of microstructures, LOC systems can make complex analyses more efficient with lower cost, energy and chemical consumption than conventional systems, and they become a valuable option for many applications such as biomedical, food, chemistry, medicine, pharmacy and agriculture in these aspects. In addition, these systems are suitable for automation and have a potential to be portable. Especially in some cases of food industry, obtaining analysis results quickly has a great importance for food plants. For this reason, recently developed LOC technology has become important in food industry because of their features such as quick response in microbiological analysis, no requirement for skilled personnel, and small sample needed. In this study, principles of LOC devices, integrated systems used with polymerase chain reaction (PCR), flow cytometry, biosensors and application of these systems in food microbiology are reviewed.

**Keywords:** Lab-on-a-chip, Food microbiology, Microfluidic systems, Rapid microbiological methods

## GİRİŞ

Mikroakışkanlar dinamiği prensiplerinin kullanıldığı çip-üstü-laboratuvar (ÇÜL) teknolojisi, birçok alanda çoğu şeyin minyatürize edildiği günümüzde bilim insanlarına laboratuvarlarda geleneksel olarak yapılan birçok analizin mikro-ölçekte yapılmasına olanak sağlamaktadır [1]. İlk mikroakışkan teknolojisi, 1950 yılında mürekkep püskürtme sistemlerinin [günümüzde kullanılan mürekkep püskürtmeli yazıcıların (ink-jet printers) ilk geliştirilen tipleri] geliştirilmesi ile kullanılmıştır. İlk ÇÜL uygulaması ise 1979 yılında silikon esaslı yonga (çip) üzerinde mikro-kanallar kullanılarak üretilen gaz

kromatografisi cihazı olarak bilinmektedir [2, 3]. Birçok araştırmacı, 1990'ların başından beri geleneksel yöntemler ile laboratuvarlarda yapılan analizleri daha küçük hacimler ile daha hızlı yapabilecek sistemleri üzerinde çalışmaktadır. Mikro Bütüncül Analiz Sistemleri, bir başka deyişle ÇÜL adı verilen bu yeni teknoloji günümüzde kimya, biyoloji, tıp, gıda vb. birçok alanda araştırmaların konusu olmaktadır. Bu alanlarda araştırmalarda kullanılan ticari ürünler de bulunmaktadır. Ticari olarak pazarda bulunan ÇÜL tabanlı cihazlar Tablo 1'de verilmiştir [7]. ÇÜL teknolojisi gelişmekte olan bir sistem olduğundan henüz rutin analizlerde henüz kullanılmamaktadır [3, 4].

Tablo 1. Bazı ticari ÇÜL tabanlı cihazlar

Firma Adı	Ürün Adı	Kullanılan Teknoloji	Uygulama Alanı	Kaynak
GenMark Diagnostics Inc.	ePlex System	Elektroislatma (Elektrowetting; dijital mikroakışkanlar)	Kan, dışkı vb. örneklerde patojen tespiti	[32]
Caliper/Perkin Elmer	LabChip	Mikroçip elektroforez	DNA, RNA ve protein miktarı belirleme	[33]
Nugen	Mondrain SP	Dijital mikroakışkan	Sekanslama örneği hazırlama	[34]
Veredus Laboratory Pte.Ltd.	VereFoodborne	ÇÜL ve mPZR	Gıda kaynaklı patojenlerin tespiti, ayırt edilmesi ve tanımlanması	[35]
Agilent Technologies	Agilent 2100 Bioanalyzer	ÇÜL ve akış sitometrisi	DNA, RNA ve protein miktarı belirleme	[36]

Gıda, insanların varlığını sürdürülebilmesi için gerekli olan besin öğelerinin (proteinler, yağlar, karbonhidratlar, vitaminler, mineraller vb.) kaynağını oluşturan, tütün ve ilaç hariç yenilen ve içilen ham, yarı veya tam işlenmiş her türlü madde olarak tanımlanmaktadır. Gıdalar, mikroorganizmalarla kontamine olduğunda onların yaşam alanlarından insanlara transferinde bir araç olarak (vehicle) rol oynamaktadırlar. En bilinen patojenlerden olan *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*'in çok sayıda ve farklı gıda örneklerinde bulunduğu tespit edilmiştir. Bu patojenler ile kontamine olan gıdalar tüketildiğinde tüketiciler için zaman zaman ölümcül sonuçlara neden olabilen gıda kaynaklı hastalıklar ortaya çıkabilmektedir [5]. Bu nedenle gıdalardaki mikroorganizmaların hızlı ve hassas bir şekilde tespit edilebilmesi gıda güvenliğinin sağlanması ve tüketici sağlığının korunması açısından önem taşımaktadır [6]. Hâlihazırda, geleneksel yollarla mikroorganizmaların saptanmasında kullanılan kültürel yöntemler zaman alıcı, uzman personele ihtiyaç duyulan ve görece fazla miktarda örnek ve sarf malzemesi kullanılmasını gerektiren yöntemlerdir. Diğer taraftan, immunolojik yöntemler, moleküler teknolojiler (nükleik asit amplifikasyonu, DNA analizi vb.), biyosensörler, akış sitometrisi, spektrofotometri vb. teknikler ÇÜL ile entegre edilerek kullanılmaktadır [7]. Bu yöntemler ise geleneksel yöntemlere göre daha hızlı, küçük ölçekte analiz yapabilen, daha az örnek ve sarf malzeme harcanan yöntemler olarak bilinmektedir. Buna ilaveten ÇÜL cihazları biyolojik tehlike riskini azaltmaktadır. Çünkü bu cihazlarda kullanılan çipler tek kullanımlık

olarak tasarlanmakta ve hücre içeren örnek kapalı bir sistemde analiz edilmektedir [8].

ÇÜL cihazları, gıda mikrobiyolojisinde mikroorganizmaların tanımlanmasında (Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), biyosensörler ile kombine edildiği ÇÜL tabanlı cihazlar ile) ve sayısının belirlenmesinde (akış sitometrisi, biyosensörler ile kombine edildiği ÇÜL tabanlı cihazlar ile) kullanılabilir. ÇÜL cihazları ile hem gıdalarda bozulmaya sebep olan mikroorganizmaların hem de gıda kaynaklı hastalıklara neden olan patojen mikroorganizmaların tanımlanması, tespiti ve sayımı gerçekleştirilebilmektedir [6, 9, 10].

ÇÜL cihazları ile yapılmış birçok çalışma literatürde yer almaktadır ancak gıda mikrobiyolojisi alanında yapılan ulusal bir yayının olmadığı ve bu konudaki uluslararası çalışmaların da göreceli olarak daha az olduğu görülmüştür. Yapılan bu derleme ile literatürdeki eksiklerin kapatılması amaçlanmış, derlemede ÇÜL cihazları, bu cihazlar ile birlikte kullanılan kombine yöntemler (PZR, biyosensörler ve akış sitometrisi) ve ÇÜL'ün gıda mikrobiyolojisindeki uygulamaları ele alınmıştır.

## ÇİP-ÜSTÜ-LABORATUVAR (ÇÜL)

Çok düşük hacimlerde (nanolitreden pikolitreye kadar) akışkan ile tek bir mikroışlemci çip üzerinde minyatür olarak laboratuvar fonksiyonlarını birleştirebilen sistemler ÇÜL olarak adlandırılmaktadır [11]. ÇÜL teknolojisinin gelişmesi akışkanlar mekaniği, termodinamik, elektrostatik ve kimya gibi alanlardan malzeme bilimlerine kadar birçok disiplinin bir arada

çalışması ile gerçekleşmiştir [12]. ÇÜL cihazları son zamanlarda sağladığı avantajlardan dolayı araştırmacılar arasında oldukça popüler bir hale gelmiştir [7].

ÇÜL ile geleneksel yöntemler kıyaslandığında ÇÜL'ün birçok avantajı olduğu görülmektedir.

- ÇÜL cihazları düşük iç hacminden dolayı düşük akışkan hacminde çalışmaktadır. Bu nedenle daha az örnek ve pahalı ve/veya sağlığa zararlı olabilen reaktif kullanımı söz konusu olmaktadır [8].
- Bu cihazlarda akış hızı kontrollü olduğundan daha kısa difüzyon mesafesi ve daha kısa karıştırma zamanından dolayı daha etkin analiz yapılabilmektedir.
- Isıtıcı içeren ÇÜL sistemlerinde (PZR ile birlikte kullanıldığında vb.) kısa mesafeli alanlarda ısıtılacak madde miktarının az olmasından dolayı hızlı ısıtma ve dolayısıyla da daha kısa sürede analizin sonuçlanması sağlanmaktadır.
- Sistemde daha hızlı cevap alındığından daha iyi işlem kontrolü sağlanmaktadır.
- Bu cihazlarda yüksek analiz sayısına ulaşılabilmesi buna karşılık düşük fabrikasyon maliyetleri sistemin bir diğer avantajı olarak gösterilebilmektedir.
- ÇÜL cihazlarında kapalı sistemde ve küçük hacimlerde çalışıldığından tehlikeli hücre süspansiyonları veya kimyasallar ile çalışıldığında daha güvenli ve daha kolay kontrol altında tutulabilen bir analiz ortamı oluşturulabilmektedir [10].
- Daha fazla fonksiyonu bir arada içeren esnek tasarımlar yapılabilmektedir [12].

ÇÜL cihazlarının birçok avantajının yanı sıra bu cihazların bazı dezavantajları vardır ve bu sistemler ile çalışan araştırmacıların karşılaştıkları bazı zorluklar da söz konusu olmaktadır:

- ÇÜL cihazları ile gıda analizlerinin yapılmasındaki en büyük sorun gıda matrislerinin oldukça kompleks olmasıdır (Süt gibi polidispers ve kompleks yapıları gıdalar, katı gıdalar ile çalışılmaması veya homojenat hazırlama, DNA izolasyonu vb. bir ön işlem gerektirmesi vb.)
- Küçük partiküller, su veya hava kabarcıkları, yağ globülleri vb. ile çip kanalının kolaylıkla tıkanması bir diğer problemdir. Ayrıca kanal duvarlarında akış hızı sıfır olduğundan gıda örneğindeki yağ, protein vb. maddelerin birikmesi sonucu akışkan akışı kısıtlanmakta ve analizin gerçekleşmesi güçleşmekte bazen imkansız hale gelebilmektedir.
- Mutlaka bir örnek hazırlama aşaması gerektirmesi ve bu aşamaların her bir örnekte farklı (PZR için DNA izolasyonu, mikroorganizma sayımı için homojenat hazırlama vb.) olmasından dolayı cihazın tüm aşamaları kapsayacak şekilde dizayn ve entegrasyonun yapılmasının zorlaşması bir diğer sorun olarak sayılabilmektedir.
- Mikro-kanal içerisinde akan akışkanın karakteristiklerini anlayabilmek adına yüzey gerilimi, elektrostatik kuvvetler vb. parametrelerin mikro-boyutta daha iyi anlaşılabilmesi gerekmektedir. Çipin yapıldığı materyalin özellikleri bazı durumlarda ölçüm işlemi

kısıtlayabilmektedir. Böyle bir durumda materyal özelliklerine (yüzey gerilimi, hidrofobisite vb.) hakim olmak analizin ve ölçümün doğruluğu açısından büyük öneme sahiptir.

- Mikro-boyuttaki bir analizdeki en ufak bir kontaminasyon makro-boyut ile kıyaslandığında çok daha büyük hatalara yol açmaktadır ve sonucu tamamen değiştirebilmektedir.
- Ölçümün hassasiyeti ve ölçüm yöntemi kullanılan örnek ile uyum içinde olmalıdır [12].

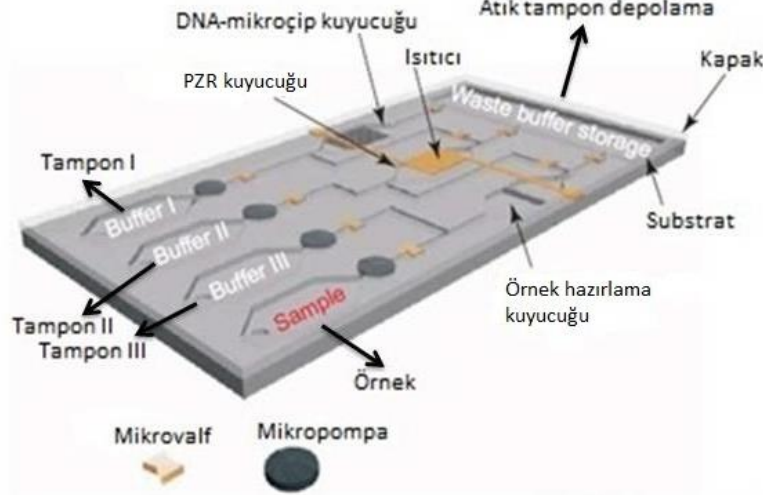
ÇÜL cihazlarında tipik olarak analiz örneğinin cihaza verildiği kuyucuklar, örneğin çip üzerinde taşınmasına imkan veren mikro-kanallar, kanallar içerisinde bir elektrik alana ihtiyaç duyulması durumunda elektrotlar ve tüm bu mimariyi üzerinde barındıran silikon, cam veya polimer substrat bulunmaktadır. Bu cihazlarda genellikle örneğin ve reaktiflerin depolandığı, taşındığı, fiziksel/ kimyasal reaksiyonların gerçekleştiği reaksiyon bölmesi ve sıvının depolandığı bölme ile mikro-kanal ağı oluşturulmaktadır. Cihazlara mikro-pompalar, mikro-valfler ve ısıtıcı cihazların da eklenmesi araştırmacılara daha çeşitli işlemlerin bir arada yapılabilmesine olanak sağlamaktadır [6]. Şekil 1'de bir ÇÜL cihazının varsayımsal bir gösterimi verilmiştir. Kuyucuklar, tampon çözeltileri ve numuneyi depolamak, atıkları toplamak, örnek hazırlamak veya PZR ve hedef DNA belirleme amaçları için tasarlanmıştır. Sıvı rezervuarları ve reaksiyon bölmeleri mikro-akışkan ağı oluşturmak için mikro-kanal ağı ile birbirine bağlanmıştır. Ayrıca mikro-pompalar, mikro-valfler ve ısıtma cihazları örnek ve/veya reaktif dağıtımı, karıştırma, inkübasyon, farklı fiziksel ve kimyasal reaksiyonlar için ayırma yapma amaçlarıyla da kullanılmaktadır [6].

Şekil 1'de görüldüğü gibi kabaca bir ÇÜL cihazı analiz örneğinin ve reaktiflerin depolandığı, çipe yüklendiği bir giriş kısmından, analizin gerçekleştiği reaksiyon bölmesinden (genellikle mikro-kanal) ve oluşan ürünün toplandığı ya da algılayıcı materyallerin olduğu, ölçüm işlemlerinin yapıldığı çıkış kısmından oluşmaktadır [6, 12].

Giriş kısmında, örnek ve reaktiflerin depolandığı kuyucuklar, mikro-kanalda akışın sağlanması için gerekli ekipmanlar (mikro-pompalar, mikro-valfler vb.) bulunmaktadır. Analiz genellikle mikro-kanal içerisinde gerçekleşmektedir. Bazı ÇÜL sistemlerinde analiz mikro boyutlardaki kuyucuklarda da gerçekleşebilmektedir. ÇÜL cihazlarının karakteristik kanal boyutu 10µm'den 200µm'ye kadar değişebilmektedir. Bazı çalışmalarda 1µm'ye kadar olan kanalların kullanıldığı belirlenmiştir. Burada kanal ölçülerindeki en önemli kısıt kullanılan üretim tekniğidir. Farklı çözünürlükte üretim için farklı yaklaşımlar mevcuttur [38, 39]. Mikro-kanallarda akış makro boyuttaki kanallardan biraz farklı olmaktadır. Mikro boyutta yüzey kuvvetleri hacim kuvvetlerinden baskın hale geçmektedir. Makro boyutta akış tipine etki eden en önemli güçlerden biri olan akışkan akışındaki yerçekimsel kuvvet genellikle ÇÜL cihazlarında göz ardı edilmektedir. Özellikle sıvı akışı içeren mikro-kanallarda akış genellikle laminar rejimdedir ve hatta Reynolds sayısının çok küçük olmasından dolayı akış Stokes akış rejiminde olmakta ve akışkan duvarların şeklini takip

etmektedir [39]. Mikro-kanallarda akış genellikle laminar rejimdedir ancak güçlü viskoz kuvvetler genellikle akışın laminar olmasını engellemektedir [12]. Reaksiyon/analiz bölmesinde işlem için gerekli ekipmanlar (ısıtıcı, soğutucu, mikro-karıştırıcılar, odaklama ve ayırma ekipmanları, eş zamanlı ölçüm için dedektörler vb.) bulunmaktadır. Çıkış kısmı ise analiz sonucu oluşan

ürünün toplandığı, ölçüm işlemlerinin yapıldığı bölümdür. Bu kısımda ayrıca atıkların toplandığı kuyucuklar da bulunmaktadır. Ölçüm için gerekli elemanlar, biyosensörler, optik algılayıcılar vb. bu kısımda olabildiği gibi mikro-kanalın olduğu reaksiyon bölgesinde de olabilmektedir [6, 12].



Şekil1. Bir ÇÜL cihazının varsayımsal gösterimi. Kapalı bir sistemdeki bu cihazda küçük kanallar, kuyular, elektrotlar ve filtreler bulunmaktadır (Liu ve Zhu [6] izni ile)

ÇÜL cihazları genel olarak eyleyici (aktüatörler, actuators) ve sensörlerden oluşmaktadır. Farklı fonksiyonlarından dolayı aktüatörler; mikro-valfler, mikro-pompalar, mikro-karıştırıcılar olarak sınıflandırılabilir, sensörler ise genel olarak moleküler ve hücre sel dedektörler olarak kategorize edilmektedir. Mikro-valfler; mikro-akışkan sistemin amacına göre (ayırma, zamanlama vb.) akışı kontrol etmek için kullanılmaktadır. Temel olarak "aktif" ve "pasif" olmak üzere iki tip mikro-valf bulunmaktadır. Daha detaylı olarak sınıflandırılırsa farklı işletme kuvvetine göre mekanik, pnömatis, elektrokinetik, manyetik ve kapılar mikro-valfler bulunmaktadır. ÇÜL cihazlarındaki mikropompaların kritik fonksiyonları akışkanın taşınması ve akış hızının kontrol edilmesi olarak bilinmektedir. Aktarım biçimine göre mikropompalar, pistonlu pompalar ve sürekli akış pompaları olarak ikiye ayrılmaktadır. Maksimum akış hızı, üretilen maksimum kısmi basınç ve bütün paket boyutu mikropompa seçilirken dikkate alınması gereken faktörlerdendir [12].

Dedektörler, ÇÜL cihazlarında en önemli bileşenlerden olmaktadır. ÇÜL cihazına entegre edilebilmesi için kullanılacak olan dedektörün minyatürize edilmiş olması gerekmektedir. Mikro-akışkan platformlarda yaygın olarak kütle spektrometrisi, elektrokimyasal ve optik dedektörler kullanılmaktadır. Elektrokimyasal dedektörler potansiyometri, amperometri ve iletkenlik dedektörlerini kapsamaktayken, optik dedektörler ise floresan, kimyasal ışıldama (chemiluminescence) ve absorpsiyon dedektörleri içermektedir [12].

## FARKLI YÖNTEMLER İLE ÇÜL'ÜN KOMBİNASYONLARI ve GIDA MİKROBİYOLOJİSİNDEKİ UYGULAMALARI

Mikroorganizma tespitinde kullanılan birçok ÇÜL cihazı örnek hazırlama (yoğunlaştırma, ekstraksiyon, saflaştırma) ile birlikte biyokimyasal reaksiyonların (immünojenik reaksiyonlar, enzimatik reaksiyonlar, DNA analizi vb.) gerçekleşmesi, tanımlama aşamalarını basitçe ve otomatik olarak ÇÜL ile birlikte diğer analiz yöntemlerinin de (PZR, akış sitometrisi, biyosensörler vb.) bir arada kullanılması sayesinde gerçekleştirilebilmektedir [6].

ÇÜL cihazları ile gıdalarda mikroorganizmaların saptanmasında (su ve viskoz olmayan akışkan örnekler hariç) gıda örneğinin doğrudan cihaza uygulanması mümkün olmamaktadır. Geleneksel yöntemde olduğu gibi örnek hazırlama (gıda homojenatı hazırlama, ön zenginleştirme, zenginleştirme, hedef analiti ayırma saflaştırma vb.) aşamasından sonra örnek cihaza yüklenmelidir [8]. Bu nedenle örnek hazırlama aşaması için gerekli ekipmanların ÇÜL cihazına entegre edilmiş olması gıda mikrobiyolojisi uygulamalarında oldukça önemli olmaktadır.

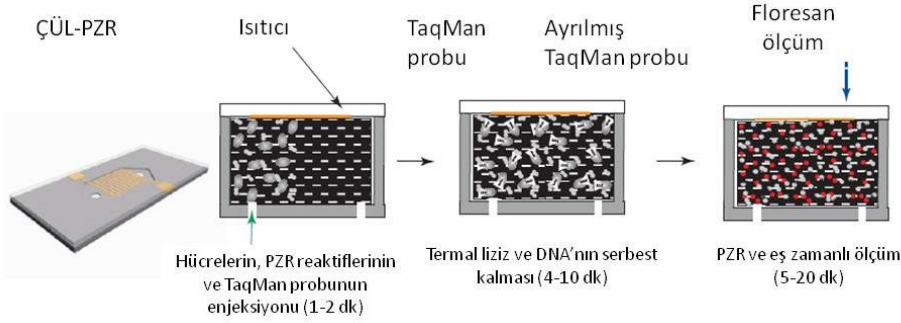
Hedef mikroorganizmalar (özellikle patojenler) bazen gıdalarda çok az miktarda bulunabilmektedir. Böyle durumlarda o mikroorganizmanın varlığını tespit etmek için büyük hacimde örnek kullanmak gerekmektedir. ÇÜL cihazlarında bu sorun yoğunlaştırma aşaması (membran filtrasyon, spesifik hücre yakalama vb.) ile çözülmeye çalışılmaktadır [6].

## ÇÜL ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR ve ÇÜL'ün birlikte kullanıldığı mikroçiplerin hızlı ve hassas mikroorganizma tespiti yapabilen yöntemlerden olduğu bilinmektedir [6]. PZR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki istenilen bölgenin çoğaltılmasını sağlayan *in vitro* DNA sentez yöntemi olarak tanımlanmaktadır. DNA sentezinin gerçekleştirilebilmesi için reaksiyonun gerçekleşeceği tüp içerisinde kalıp DNA, DNA polimeraz (Taq polimeraz) enzimi, ileri ve geri primerler, nükleotitler ve magnezyum içeren PZR tamponunun olması gerekmektedir [13]. PZR yönteminde ilk olarak çift zincirli DNA denatürasyon sıcaklığına (94-96°C/1-3 dakika) kadar ısıtılmakta ve zincirlerin birbirlerinden ayrılması sağlanmaktadır. Daha sonra tek zincir halindeki kalıp DNA'ya ileri ve geri primerlerin bağlanması için sıcaklık 50-65°C'ye yani primerlerin bağlanma sıcaklığına getirilmekte ve yaklaşık 30 saniye bu sıcaklıkta bekletilmektedir. Böylece primerler çoğaltılması istenilen bölgeye bağlanmış olmaktadır. PZR işleminin son basamağında sıcaklık 70-75°C'ye getirilmekte, bu sıcaklıkta 1-5 dakika

bekletilmekte ve DNA sentezinin gerçekleşmesi sağlanmaktadır. Bu üç basamak tamamlandığında bir PZR döngüsü tamamlanmış olmaktadır. Tüm PZR işlemi 20-40 döngü gerçekleştirildikten sonra tamamlanmış olmaktadır [5, 13, 14].

PZR ve ÇÜL'ün birlikte kullanıldığı mikroçipler farklı çalışma prensiplerine sahiptir. Bunlardan ilki Şekil 2'de gösterilmiştir. Çipe ilk olarak giriş kuyusundan örnek (DNA'sı çoğaltılmak istenen hücre), PZR reaktifleri ve TaqMan probu yüklenmektedir. İkinci adımda bir mikrosırtıcı yardımıyla hedef hücrenin termal lizisi gerçekleşmekte ve DNA hücre dışına salıverilmektedir. Son aşamada PZR işlemi gerçekleştirilmekte ve eş zamanlı olarak floresans ölçüm gerçekleştirilmektedir. Sistemde  $10^2$ - $10^4$  hücre/mL düzeyinde tespit limitinde analiz gerçekleştirilmektedir. Bu prensip ile çalışan ÇÜL cihazı 7-16 dakika içerisinde  $10^2$ - $10^4$  hücre/mL düzeyinde tespit yapılabilir ve tüm analizi tamamlayabilmektedir. Geleneksel yöntemler ile kıyaslandığında toplam analiz süresi bu ÇÜL cihazı ile 2-10 kat arasında azaltılmış olmaktadır [6].



Şekil 2. PZR ile birlikte kullanılan bir ÇÜL cihazı (Liu ve Zhu [6] izni ile)

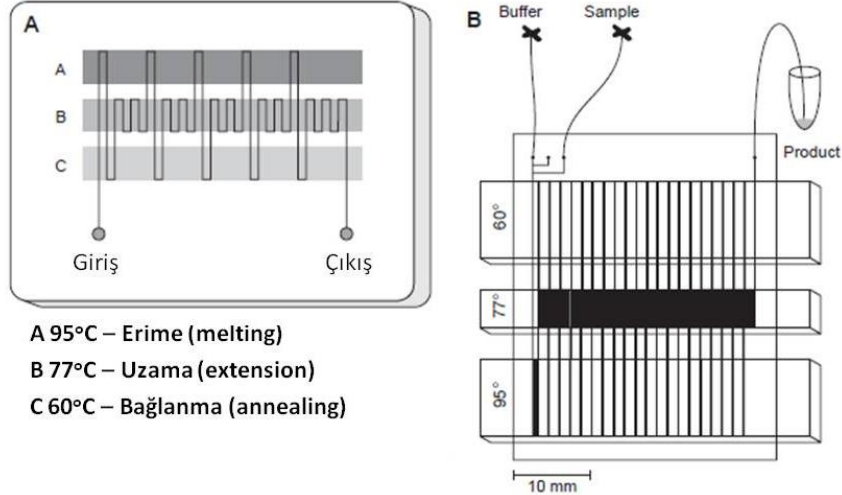
Yoon and Kim, PZR ile ÇÜL'ün birlikte kullanıldığı sistemleri üç kategoriye ayırmışlardır:

- Sabit hazne PZR (Stationary chamber PZR)
- Mikrokanal PZR
- Damlacık tabanlı PZR [5].

Sabit hazne PZR-ÇÜL cihazında (stationary chamber PCR-LOC) nano veya pikolitre düzeyinde hacme sahip hazne çip üzerine yerleştirilmiştir. Sistemde mikroorganizmanın (özellikle patojen mikroorganizmalar) ilk olarak tutulması, filtrasyon ve yoğunlaştırma, ikinci olarak hücre lizisi ve DNA/RNA izolasyonu ve son olarak çoğaltılan ürünlerin optik/elektrokimyasal tespiti gerçekleştirilmektedir [5]. Geleneksel PZR'da reaksiyon bir ependorf tüp içerisinde gerçekleşmektedir ve tüp istenilen sıcaklığa ısıtılıp soğutulurak bir ısı döngüsü oluşturulmaktadır. Geleneksel yöntemde bu döngüsel sıcaklık değişiminin sağlanması iletim ile ısı transferi mekanizması ile gerçekleştirilmektedir. İletim ile ısı transferi ısı transfer mekanizmalarından (iletim, taşınım ve radyasyon ile ısı transferi) en yavaşı olarak bilinmektedir. Bu nedenle geleneksel PZR'daki döngülerden her biri birkaç dakika sürmektedir. Toplamda 20 ile 40 döngü arasında işlem tamamlandığından toplam analiz süresi yaklaşık 1 saat sürebilmektedir. Sabit hazne PZR-ÇÜL yönteminde

kuyu olabildiğince küçük tasarlanmaktadır ve böylece geleneksel PZR'da uzun süren ısıtma ve soğutma süresi azaltılabilmektedir. Bu tip ÇÜL-PZR cihazı Şekil 2'de gösterilen cihazla benzerlik göstermektedir.

Mikrokanal PZR sistemi sabit hazne PZR sistemine bir alternatif olarak görülebilmektedir. Bu sistemdeki prensip sıvının bir çip üzerinde PZR için gerekli olan üç sıcaklık (denatürasyon 94-96°C, bağlanma 50-65°C, uzama 70-75°C) alanı arasında sırasıyla akışını sağlamaktır. Böylece ısıtma ve soğutma için gerekli süre azaltılmış olmaktadır. Şekil 3'te bu sistemin şematik gösterimi verilmiştir. Cihazın Şekil 3B'de görüldüğü gibi üç adet giriş kuyucuğu bulunmaktadır. Bu kuyucuklardan yalnızca iki tanesi kullanılmaktadır. Kuyucuklardan birisinden örnek diğerinden ise tampon çözelti akışı sağlanmaktadır. Örnek kanal içerisine Şekil 3A'da görülen giriş kuyucuğundan hidrostatik mikropompa ile pompalanmaktadır. Akışkan sıcaklığı belirlenmiş olan üç farklı sıcaklık alanından geçmektedir. Çip 20 döngü ile PZR işleminin gerçekleşmesini sağlamaktadır [5, 15]. Elde edilen PZR ürünü çıkış kuyucuğundan toplanmakta ve poliakrilamid jelde etidyum bromür ile boyama yapılarak incelenmektedir. Ürünün floresan görüntülemesi de gerçekleştirilmektedir. Yapılan bir çalışmada bu yöntem ile 10 dakikadan az bir sürede PZR'ın tamamlanabileceği gösterilmiştir [15].



Şekil 3 Mikrokanal PZR-ÇÜL sistemi (Koop ve ark. [15] izni ile)

Damlacık tabanlı PZR sisteminde dijital mikroakışkan yöntemlerinden faydalanılarak örnek damlacığının düz bir yüzey üzerinde hareket ettirilmesi ve mikrokanal PZR'ye benzer bir sistem ile PZR'nin gerçekleştirilmesi sağlanmaktadır. Burada kullanılan dijital mikroakışkan yöntemleri, dielektrik üzerinde elektroslatma (electrowetting on dielectric; EWOD), yüzey akustik dalgası (surface acoustic wave; SAW), manyetoakışkanlar olarak sayılabilmektedir. EWOD yönteminde, dama tahtası şeklinde elektrotlar dielektrik bir yüzeye (ayrıca hidrofobik) yerleştirilmektedir. Damlacık bu elektrotlardan biri üzerine koyulmaktadır. Yakınlardaki elektrotlardan birine elektrik uygulandığında yüzey üzerinde biriken elektrik yükünden dolayı hidrofobik yüzey hidrofilik hale gelmektedir. Bu olay damlacığın elektrik uygulanan elektroda doğru hareket etmesine neden olmaktadır. SAW yönteminde, damlacık birbirine bağlanmış iki dönüştürücü (interdigitated transducers; IDTs) arasına yerleştirilmektedir. Bu dönüştürücülere alternatif akım uygulandığında akım malzemenin sıkışıp gevşemesine ve yüzeyde akustik dalga oluşmasına neden olmaktadır. Bu SAW, yüzeyde bir okyanus dalgası gibi yayılmakta ve damlacığın da yayılımı boyunca hareket etmesini sağlamaktadır. X ve Y yönlerinde dönüştürücülerin yerleştirilmesi ile damlacık iki boyutlu olarak hareket ettirilebilmektedir. Manyetoakışkanlarda ise manyetik parçacıklar ilave edilmiş damlacık hidrofobik bir yüzey (genellikle süper hidrofobik) üzerine bırakılmaktadır. Yüzeyin altındaki daimi bir mıknatısın hareketi damlacık içindeki manyetik parçacıklara etki etmektedir. Damlacık mıknatısın hareketi boyunca yer değiştirilmektedir. Her üç yöntemde de damlacık farklı şekillerde hareket ettirilerek üç farklı sıcaklık alanından geçmesi sağlanmaktadır ve PZR ısı döngüsü sağlanmaktadır. Damlacığın bu üç farklı sıcaklık bölgesinde 20-40 kez döngü yapması ile PZR işlemi çip üzerinde gerçekleştirilmektedir [15].

Li ve ark. [16], su kaynaklı rotavirüs tespitinde mikroakışkan eş zamanlı PZR yöntemi ile floresans mikroskopiyi kombine etmişlerdir. Bu entegre cihaz ile rotavirüs RNA'sı çoğaltılmış, 1 saatten az sürede ve  $3.6 \times 10^4$  kopya/ $\mu$ L konsantrasyonda RNA tespit edilmiştir.

Yapılan bir diğer çalışmada *L.monocytogenes*'in doğal olarak kontamine olmuş gıda örneklerindeki tespiti için mikroakışkan tabanlı kapiler elektroforez sistemi ile PZR kullanılmış ve geleneksel PZR ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada gıda örneklerine önce iki kez ön zenginleştirme uygulanmıştır. Daha sonra bu örneklerden DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA izolatu ÇÜL tabanlı cihaza yüklenerek analiz gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda mikroakışkan elektroforez ile PZR yönteminin ISO referans yöntemi ile %100, klasik yöntem ile %96 nispi doğruluk sağladığı bulunmuştur [17].

PZR ve ÇÜL'ün birlikte kullanıldığı bir çalışmada, gıdalarda hızlı, kolay ve eş zamanlı patojen tespiti için çoklu boncuk tabanlı mezoakış sistemi (multiplexed bead-based mesofluidic system) geliştirilmiştir. Sistemde spesifik oligonükleotit probu ile immobilize edilmiş boncuklar mikrokanallar içerisine yerleştirilmiştir. Patojen olarak *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter sakazakii*, *E.coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* serovar Typhi; gıda olarak yumurta, domuz, tavuk ve yumuşakça eti, balık, dondurma ve süt tozu kullanılmıştır. Analiz edilen gıda örneklerinden önce homojenat hazırlanmış, ön zenginleştirme yapılmış daha sonra DNA izolasyonu yapılmış ve ÇÜL cihazına yüklenmiştir. Patojen mikroorganizmalardan elde edilen floresans etiketli PZR ürünleri mikrokanallar içerisine pompalanmıştır. Burada oligonükleotit immobilize edilmiş boncuklar ile hibridizasyon gerçekleştirilmiş ve elde edilen hibridizasyon sinyali (floresans sinyal) ölçülmüştür. Tespit işlemi 30 dakikadan az bir sürede, yüksek hassasiyet ve spesifiklikte gerçekleştirilmiştir. Bakteri türleri için tespit limitinin  $5 \times 10^2$  ile  $6 \times 10^3$  kob/mL arasında olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, geliştirilen PZR-ÇÜL sisteminin farklı gıda örneklerinde çoklu patojen tespitinde etkili bir şekilde kullanılabileceği görülmüştür [18].

Yapılan bir çalışmada, *Salmonella* Enteritidis ile kontamine edilmiş domates örneklerinde *Salmonella* tespiti için döngü aracılı izotermal amplifikasyon (loop

mediated isothermal amplification, LAMP) entegre edilmiş disk şeklinde ÇÜL platformu kullanılmıştır. Çalışmada domates örneklerinden hazırlanan homojenizattan DNA izolasyonu yapılmış ve izolat ÇÜL cihazına yüklenmiştir. Çalışma için geliştirilen bu santrifugal ÇÜL cihazı ile sırasıyla patojen tespiti, reaktif hazırlama, LAMP ve belirleme (SYBR Green I boyası ile renk değişimi mekanizmasıyla) yapılmıştır. Cihazın tespit limitinin  $5 \times 10^3$  ng/ $\mu$ L DNA konsantrasyonu olduğu bulunmuştur. Örnek hazırlama aşaması da dahil tüm analizin 70 dakika içerisinde ve tam otomatik olarak tamamlandığı belirtilmiştir [19].

### ÇÜL ve Akış Sitometrisi

ÇÜL teknolojisinin en önemli uygulamalarından birisi hücre ve parçacıkların akış sitometrisi ile analizi olarak bilinmektedir. Akış sitometrisi hematoloji, immunoloji, genetik, gıda bilimleri, eczacılık, mikrobiyoloji, onkoloji ve birçok diğer alandaki geniş kullanımı ile güçlü ve popüler bir teknolojidir [20]. Akış sitometrisi; partiküllerin veya hücrelerin floresan işaretleyiciler ile işaretlendiği, sıvılardaki parçacık veya biyolojik parçacıkların (hücre vb.) sayım, sınıflandırma ve analizlerinin yapılabildiği bir yöntemdir [21]. Bu yöntemde, bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilmekte ve hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilmektedir. Oluşan sinyallerin kaynağı hücrenin büyüklük, şekil vb. fiziksel özellikleri olabileceği gibi hücreye bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilmektedir. Böylece hücre ya da partikülün immunofenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilmektedir [22].

Akış sitometrisi; akışkan örnekler için geleneksel yöntemlere alternatif etkili bir mikroorganizma tespit yöntemi olarak bilinmektedir [8]. Yöntemin mikrobiyoloji için en önemli özelliği; her bir bireysel hücre için veri toplanabilmesi olarak bilinmektedir. Böylece araştırmacı hücrelerin popülasyon içindeki dağılım özelliğini veya özelliklerini ölçebilmektedir [22]. Akış sitometrisi yönteminin avantajları, hızlı (saniyede binlerce hücre ile ilgili veri toplanabilmekte), hassas ve doğruluğunun yüksek olması, herhangi bir optik özelliğe veya bunların kombinasyonlarına bağlı olarak hücrelerin fiziksel olarak birbirlerinden ayrılabilmesine olanak sağlaması, tek hücre miktarını ölçebilmesi olarak sayılabilmektedir [22]. Ancak, akış sitometrisi çoğunlukla pahalı, yer kaplayan ve eğitilmiş personele ihtiyaç duyulan ve karmaşık bir yöntem olarak bilinmektedir [8]. ÇÜL ile akış sitometrisinin birlikte kullanıldığı sistemlerde daha yüksek hızda, daha ekonomik analiz yapılabilmektedir. Bu sistemlerde saniyede 25000'den fazla hücre sayılabildiği ve sistemin daha az yer kapladığı bildirilmiştir [9]. ÇÜL ile akış sitometrisinin birlikte kullanıldığı sistemler üç ana kısımdan oluşmaktadır. Bunlar; hücre taşınım ve odaklamasının yapıldığı kısım (mikro-pompalar yardımıyla), hücre tespitinin yapıldığı kısım (optik dedektörler ve floresans boyalar yardımıyla), hücre sınıflandırması ve sayımının yapıldığı kısım (spesifik hücre grubu sayımı ve diğerlerinden ayrılmasıyla) olarak sayılmaktadır.

Yapılan bir çalışmada; örnek hazırlama aşaması gerektirmeden, içilebilir sularda (toplam bakteri sayısı  $10^4$  ve  $10^6$  kob/mL olan) bakteri yoğunluğunu tespit edebilen akış sitometrisi ile birlikte kullanılan ÇÜL cihazının etkinliği geleneksel metotlar ile karşılaştırarak tespit edilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar Tablo 2'de gösterilmiştir [8].

Tablo 2. İçilebilir sulardaki toplam bakteri sayısının ÇÜL ile tespit edilmesi [8].

Yöntem Adı	Toplam Bakteri Sayısı (kob/mL)		
	Kaynak Suyu 1*	Kaynak Suyu 2**	Çeşme Suyu
Çip ile akış sitometrik sayım	$7.7 (\pm 0.48) \times 10^4$	$1.4 (\pm 0.15) \times 10^5$	$3.2 (\pm 0.28) \times 10^5$
Üstten ışıklı floresans mikroskop ile sayım	$7.8 (\pm 1.1) \times 10^4$	$1.9 (\pm 0.36) \times 10^5$	$3.7 (\pm 0.59) \times 10^5$
İki yöntemden elde edilen sonuçların birbirine yakınlığı (%)	99	75	87

\*Kaynak Suyu 1: Şişelenmiş doğal kaynak suyu (iki farklı markanın), \*\*Kaynak Suyu 2: Saflaştırılmış ev çeşme suyu

Yamaguchi ve ark. [23] ÇÜL-akış sitometrisi sistemi kullanılarak sütte *Pseudomonas* hücrelerinin sayımını yapmış ve elde edilen sonuçları geleneksel plak sayım yöntemiyle kıyaslamışlardır. Çalışmada, sütteki *Pseudomonas* hücreleri optimize edilmiş koşullar altında *Pseudomonas* spp.'ye özgü Cy-5 etiketli prop ile *in situ* olarak hibridize edilmiştir. Durağan fazdaki (starved state) *Pseudomonas* hücreleri sayısı hem geleneksel plak sayım yöntemiyle hem de ÇÜL-akış sitometrisi kombinasyonunu kullanan cihaz ile belirlenmiştir. 10 kob/mL'den az hedef hücre içeren kontamine süt örneğinde basit bir yöntem ile [12 saat hücre zenginleştirmesini takiben 0.5 saat süt temizleme (floresans boyaya veya proba spesifik olmayan bağlanmalar nedeniyle oluşan yanlış pozitif sonuçları ya da floresans boyama sırasında yanlış negatif sonuçlara neden olan etkileşimleri önlemek amacıyla uygulanan işlem), 1 saat fiksasyon, 2 saat hibridizasyon ve 0.5 saat çip üstü akış sitometrisi] ÇÜL-akış sitometrisi sistemiyle

hücre sayısı belirlenebilmiştir. Yapılan çalışma ile ÇÜL-akış sitometrisi sisteminin floresans *in situ* hibridizasyon ile sütteki bozulma yapan mikroorganizmaların basit bir yöntem ile tespit edilebileceği gösterilmiştir.

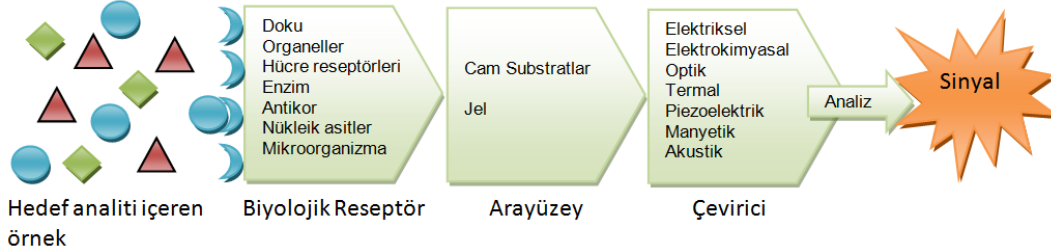
Yapılan bir çalışmada, manyetik işaretlenmiş hücrelerin akış halinde tespitini yapabilmek için manyetik alan direnç sensörüyle (magnetoresistive sensors) kombine edilmiş hücre sitometrisi tabanlı bir ÇÜL yapılmaya çalışılmıştır. Yapılan cihaz ucuz, taşınabilir ve mevcut akış sitometrisi uygulamalarına alternatif olarak tasarlanmıştır. Denemeler; çiğ süt, yağı uzaklaştırılmış süt ve PBS tamponunda *Streptococcus agalactiae* hücrelerinin spesifik tespiti için yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda çiğ süt içeriğinin (yağ globülleri, kazein vb.) manyetik nanopartiküllerin bakterilere bağlanmasını engelleyerek daha düşük sinyal genliğine neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca; kanal girişinde hücre kümelenmesinin olduğu bulunmuş, bunun nedeninin

güçlü manyetik değişim olduğu ve bunun farklı kanal tasarımıyla ya da homojen manyetik alan ile üstesinden gelinilebileceği düşünülmüştür [24].

## ÇÜL ve Biyosensörler

Biyosensör; biyolojik duyarlı bir elementin (analiz edilecek madde ile seçici olarak etkileşime girebilen

biyoaktif bir bileşen) fiziksel ya da kimyasal dönüştürücü ile kombinasyonu yoluyla belirli bir çevrede spesifik bir bileşimin selektif ve kantitatif analizini yapmayı sağlayan cihazlar olarak tanımlanmaktadır [10]. Genel olarak bir biyosensörün temel bileşenleri Şekil 4'te gösterilmiştir [25].



Şekil 4. Biyosensörlerin temel bileşenleri [25].

Mikrobiyal tespit ve tanımlama amacıyla kullanılacak olan biyosensörlerde bulunması gereken bazı özellikler vardır:

- İlk olarak biyosensörden alınan verilerin doğruluğunun yüksek olması gerekmektedir.
- Patojen mikroorganizma tespitinde yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçlar ya çok az olmalı ya da hiç olmamalıdır. Özellikle dayanıksız gıdalar test edildiğinde biyosensörün gerçek zamanlı yanıt vermesi gerekmektedir.
- Gıda mikrobiyolojisinde yalancı negatif sonuç almak, analizin hassasiyetini azaltmaktadır ve tolere edilemez. Bu nedenle kullanılacak biyosensörün yüksek hassasiyetli olması gerekmektedir.
- Biyosensörün hedef mikroorganizma, toksin veya diğer mikroorganizmaları birbirlerinden kolaylıkla ayırt edebilecek spesifikliğe sahip olması gerekmektedir.
- Gerçekleştirilen her analiz tekrarlanabilir olmalı ve sensörün kolay kalibre edilebilir olması gerekmektedir.
- Sensör sıcaklık, pH, iyonik güç değişimine ve sterilizasyona dayanıklı olmalı, analizi tam otomatik gerçekleştirebilmelidir.
- Rutin analizlerde eğitilmiş personele minimum ihtiyaç gerektirmeli, kullanımı kolay olmalıdır.
- Son olarak da mevcut standart teknikler ve referans yöntemler ile geçerliliğinin onaylanmış olması gerekmektedir [25, 26].

Biyosensörlerde kullanılan biyoalgılama materyallerinin (biyoreseptörler) mekanizmalarına göre biyosensörler dört gruba ayrılmaktadır. Bunlar; enzim sensörleri, immunoglobulin sensörleri, antijen sensörleri, mikrobiyal hücre sensörleri olarak sınıflandırılmaktadır [27]. Enzim sensörleri, enzim reaksiyonlarındaki uygun substratların değişimlerinin ölçülebilmesini sağlamaktadırlar. İmmunoglobulin sensörler, organizmaların, onların hedef antijenlerinin kullanılarak gıdalarda bulunup bulunmadığının tanımlanmasında kullanılmaktadır. Antijen sensörleri, genellikle antikorları tanımlamak için kullanılmaktadırlar. Mikrobiyal hücre sensörleri solunum aktivitesi ölçen sensörler ve metabolit ölçen sensörler olarak iki ana grupta incelenebilmektedir. Solunum

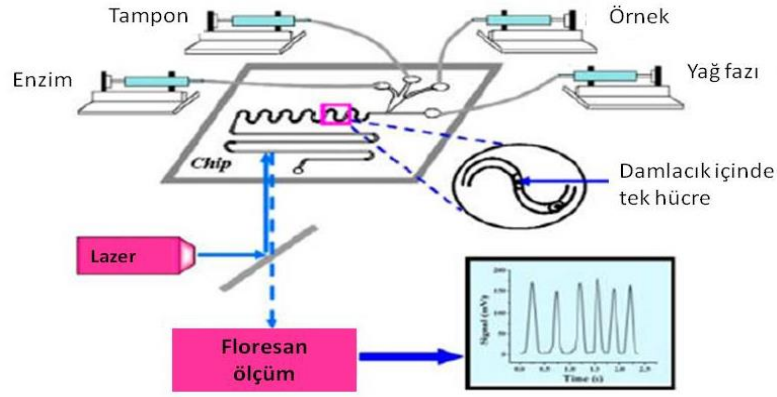
aktivitesini ölçen sensörlerde aerobik mikroorganizmalar kullanılmaktadır ve ortamdaki substrat miktarına bağlı olarak çözülmüş oksijen miktarındaki değişimi algılamaktadırlar. Metabolit ölçen biyosensörlerde ise hem aerobik hem de anaerobik mikroorganizmalar kullanılabilir. Bu tip mikrobiyal sensörler elektrokimyasal aktif metabolitlerin tayininde kullanılmaktadır [27].

ÇÜL teknolojisi ile biyosensörlerin bir arada kullanılması bazı avantajları da beraberinde getirmektedir. Biyoalgılama materyaline analit molekülün difüze olması için gerekli uzaklığın azaltılması, biyosensörün cevap zamanında azalmaya bu da difüzyon kısıtlı proseslerdeki koşulları önemli ölçüde iyileştirmektedir [28]. Şekil 5'te ÇÜL ve biyosensörlerin birlikte kullanıldıkları cihazlardan birinin şematik olarak gösterimi verilmiştir [31].

Şekil 5'te görüldüğü gibi analiz için gerekli olan örnek, tampon maddeler, biyolojik algılama materyali (enzim), yağ fazı vb. akışkanlar şırınga pompa yardımıyla çipe yüklenmektedir. Çipin kanalında oluşan reaksiyon sonucu elde edilen sinyalin algılanması için optik çevirici (lazer) kullanılmakta, sinyal floresan ölçüm ile analiz edilmektedir. Biyosensör ile ÇÜL'ün kombine edildiği sistemlerde kabaca işlem bu şekilde bir çip üzerinde gerçekleşmektedir.

Pöhlmann ve ark. [29] *Escherichia coli* ile kontamine edilmiş et suyu örneğinde elektrokimyasal biyosensör ile ÇÜL'ün birlikte kullanıldığı bir sistemde gıda kaynaklı bakteri tanımlamasında bu sistemin uygulanabilirliği incelemişlerdir. Sistemde amperometrik dedektör kullanılmıştır. *E. coli* için tespit limitinin  $5.5 \times 10^2$  kob/mL olduğu bulunmuş ve sistemin gıdalardaki bakteri kontaminasyonunu gösterme kapasitesinin olduğu görülmüştür. Ayrıca bu sistemde haberci enzim kullanılarak iki Gram pozitif (*E. coli* ve *Hafnia alvei*) ve iki Gram negatif (*Listeria innocua* ve *Bacillus subtilis*) bakterinin ayrımının ve tespitinin bu sistem ile yapılabildiği gösterilmiştir.





Şekil 5. Tek canlı hücredeki membran proteininin hassas tespitinde biyolojik algılama materyali olarak aptamer (spesifik hedef moleküllerine bağlanabilen peptid molekülleri veya oligonükleik asitlerdir) ve enzimin kullanıldığı damlacık tabanlı bir ÇÜL-biyosensör sistemi [31].

Yapılan bir çalışmada, DNA sensörü ile ÇÜL'ün birlikte kullanıldığı ve gıdalarda *Campylobacter* spp.'nin tespitinde kullanılmak üzere amaçlanan bir sistem elde edilmeye çalışılmıştır. Sistemde siklo olefin polimer substrat üzerine yerleştirilmiş ince film altın elektrot tabanlı elektrokimyasal gene dayalı sensör (tanıma yüzeyi olarak nükleik asit içeren biyosensör) kullanılmıştır. Sistemde *Campylobacter* spp. PZR ürünlerinin konsantrasyonunun 1-25 nM aralığında doğrusal ilişki göstermekte olduğu ve 90 pM tespit limitinde çalışıldığı belirlenmiştir. Gerçek gıda ürünlerini temsil etmesi amacıyla çığ kümes hayvanı eti ile denemeler gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda DNA sensör teknolojisinin ÇÜL sistemine entegre edilmesi ile gıdalarda *Campylobacter* spp.'nin elektrokimyasal tespitinin mümkün olduğu görülmüştür [30].

## SONUÇ

Çalışmada, ÇÜL cihazlarının çalışma prensipleri, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), akış sitometrisi ve biyosensörler ile birlikte kullanıldığı entegre sistemler ve bu sistemlerin gıda mikrobiyolojisindeki uygulamaları anlatılmıştır. Buradaki amaç, ÇÜL cihazlarının gıda mikrobiyolojisine olan katkılarını anlatmak, gıda endüstrisi için hızlı mikrobiyolojik yöntemlerin önemini göstermek ve birçok uygulama alanı olan ÇÜL'ün kombine edildiği sistemler ile sağladığı avantajların arttığını ve gıda mikrobiyolojisine uygulanabilirliğini göstermektir. Yapılan bu çalışma ile ÇÜL ile entegre edilmiş sistemlerin (PZR, akış sitometrisi, biyosensörler vb.) ticari ürünlere dönüştürülmesinin ve gıdalarda mikroorganizma tespit ve sayımı için taşınabilir sistemler geliştirilmesinin önemi ortaya koyulmuştur.

İleride yapılacak çalışmalar ile çok daha hızlı sonuçların alınabileceği, kullanımı kolay, taşınabilir, yerinde analize imkan sağlayan, maliyeti düşük, az örnek ve sarf malzeme kullanımı gerektiren, diğer teknolojiler ile entegre edilmiş, yüksek hassasiyet ve doğrulukla sonuç alınabilen ÇÜL cihazlarının geliştirebileceği ve bu

sistemlerin gıdalarda mikroorganizma sayım ve tespitinde kullanılabileceği görülmüştür.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenen 114M597 numaralı proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. Projenin gerçekleştirilmesindeki desteğinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkürü bir borç biliriz.

## KAYNAKLAR

- [1] Wen-Ming, L., Li, L., Li, R., Jian-Chun, W., Qin, T., Xue-Qin, W., Jin-Yi, W., 2012. Diversification of microfluidic chip for applications in cell based bioanalysis. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 40(1): 24-31.
- [2] Ürkmez, B., 2014a. Minyatür Laboratuvarlar-2. <http://www.acikbilim.com/2014/02/dosyalar/minyatür-laboratuvarlar-2.html>, Erişim Tarihi: 21.08.2016.
- [3] Erickson, D., Li, D., 2004. Integrated microfluidic devices. *Analytica Chimica Acta* 507: 11-26.
- [4] Ürkmez, B., 2014b. Minyatür Laboratuvarlar-1. <http://www.acikbilim.com/2014/01/dosyalar/minyatür-laboratuvarlar-1.html>, Erişim Tarihi: 23.08.2016.
- [5] Yoon, J., Kim, B., 2012. Lab-on-chip pathogen sensors for food safety. *Sensors* 12: 10713-10741.
- [6] Liu, W., Zhu, L., 2005. Environmental microbiology-on-a-chip and its feature impacts. *Trends in Biotechnology* 23(4): 174-179.
- [7] Mortari, A., Lorenzelli, L., 2014. Recent sensing technologies for pathogen detection in milk: a review. *Biosensors and Bioelectronics* 60: 8-21.
- [8] Sakamoto, C., Yamaguchi, N., Yamada, M., Nagase, H., Seki, M., Nasu, M., 2007. Rapid quantification of bacterial cells in potable water using a simplified microfluidic device. *Journal of Microbiological Methods* 68: 643-647.
- [9] Skurtys, O., Aguilera, J., M., 2008. Applications of microfluidic devices in food engineering. *Food Biophysics* 3: 1-15.
- [10] Timur, S., 2010. Protein Analitiği Bölüm: Protein Chip'leri, Editörler A., Telefoncu, A. Kılınç, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir.

- [11] Anonymous, 2015. Lab-on-a-chip. <http://www.epa.gov/radiation/docs/cleanup/nanotechnology/chapter-3-lab-on-a-chip.pdf>, Erişim Tarihi: 21.05.2015.
- [12] Guo, L., Feng, J., Fang, Z., Xu, J. and Lu, X., 2015. Application of microfluidic "lab-on-a-chip" for the detection of mycotoxins in foods. *Trends in Food Science & Technology* 46: 252-263.
- [13] Anonymous, 2016a. Polymerase Chain Reaction (PCR). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>, Erişim Tarihi: 30.08.2016.
- [14] Anonymous, 2016b, Thermo scientific Standard PCR protocol reaction set up.
- [15] Koop, M.U., de Mello, A.J., Manz, A., 1998. Chemical amplification: Continuous-flow PCR on a chip. *Science* 280: 1046-1047.
- [16] Li, Y., Zhang, C., Xing, D., 2011. Integrated microfluidic reverse transcription-polymerase chain reaction for rapid detection of food or waterborn pathogenic rotavirus. *Analytical Biochemistry* 415: 87-96.
- [17] Delibato, E., Gattuso, A., Minucci, A., Auricchio, B., De Medici, D., Toti, L., Castagnola, M., Capoluongo, E., Gianfranceschi, M.V., 2009. PCR experion automated electrophoresis system to detect *Listeria monocytogenes* in foods. *Journal of Separation Science* 32: 3817-3821.
- [18] Jin, S., Yin, B., Ye, B., 2009. Multiplexed bead-based mesofluidic system for detection of foodborne pathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 75(21): 6647-6654.
- [19] Sayad, A.A., Ibrahim, F., Uddin, S.M., Pei, K.X., Mohktar, M.S., Madou, M., Thong, K.L., 2016. A microfluidic lab-on-a-disc integrated loop mediated isothermal amplification of foodborne pathogen detection. *Sensors and Actuators B: Chemical* 227: 600-609.
- [20] Zourob, M., Elwary, S., Turner, A., 2008. Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems. Part IV Chapter 33: Microfabricated Flow Cytometers for Bacterial Detection. Edited by, S., Yang, G., Lee, Springer Science and Business Media, USA, 869-890p.
- [21] Kang, Y., Wu, X., Wang, Y., Li, D., 2008. On-chip fluorescence-activated particle counting and sorting system. *Analytica Chimica Acta* 626: 97-103.
- [22] Karaboz, İ, Kayar, E., Akar, S., 2008. Flow sitometri ve kullanım alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi* 6(2): 1-18.
- [23] Yamaguchi, N., Ohba, H., Nasu, M., 2006. Simple detection of small amounts of *Pseudomonas* cells in milk by using a microfluidic device. *Letters in Applied Microbiology* 43: 631-636.
- [24] Fernandes, A.C., Duarte, C.M., Cardoso, F.A., Bexiga, R., Cardoso, S., Freitas, P.P., 2014. Lab-on-chip cytometry based on magnetoresistive sensors for bacteria detection in milk. *Sensors* 14: 15496-15524.
- [25] Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B., 2010. Moleküler Biyoloji. Bölüm 16: Biyoteknoloji ve Biyoinformatik, Editörler B., Tanyolaç, H., B., Kaya, S., Soya, C. Akkale, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, Türkiye, 601s.
- [26] Leonard, P., Hearty, S., Brennan, J., Dunne, L., Quinn, J., Chakraborty, T., O'Kennedy, R., 2003. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. *Enzyme and Microbial Technology* 32: 3-13.
- [27] Erkmen, O., 2011. Gıda Mikrobiyolojisi. 7. Kısım Bölüm 26: Hızlı Mikrobiyolojik Gıda Analiz Yöntemleri, Editörler: F., Y., Ekinci, A., Sofu, Efil Yayınevi, Ankara, Türkiye, 484 s.
- [28] Lafleur, J.P., Jönsson, A., Senkbeil, S., Kutter, J., P., 2016. Recent advances in lab-on-a-chip for biosensing applications. *Biosensors and Bioelectronics* 76: 213-233.
- [29] Pöhlmann, C., Wang, Y., Humenik, M., Heidenreich, B., Gareis, M., Sprinzl, M., 2009. Rapid, specific and sensitive electrochemical detection of foodborne bacteria. *Biosensors and Bioelectronics* 24: 2766-2771.
- [30] Carmen Morant-Miñana, M., Elizalde, J., 2015. Microscale electrodes integrated on COP for real sample *Campylobacter* spp. detection. *Biosensors and Bioelectronics* 70: 491-497.
- [31] Luka, G., Ahmadi, A., Najjaran, H., Alocilja, E., DeRosa, M., Wolthers, K., Malki, A., Aziz, H., Althani, A., Hoorfar, M., 2015. Microfluidics integrated biosensors: a leading technology towards lab-on-a-chip and sensing applications. *Sensors* 15: 30011-30031.
- [32] [www.genmarkdx.com](http://www.genmarkdx.com), Erişim Tarihi: 10.05.2017.
- [33] <http://www.perkinelmer.com/catalog/category/id/lab-chip%20systems>, Erişim Tarihi: 10.05.2017.
- [34] <http://www.nugeninc.com/nugen/index.cfm/product/s/msp/>, Erişim Tarihi: 10.05.2017.
- [35] [www.vereduslabs.com](http://www.vereduslabs.com), Erişim tarihi: 10.05.2017.
- [36] [www.genomics.agilent.com](http://www.genomics.agilent.com), Erişim tarihi: 10.05.2017.
- [37] Streets, A.M., Huang, Y., 2013. Chip in a lab: Microfluidics for next generation life science research, *Biomicrofluidics* 7: (011302) 1-23.
- [38] Çetin, B., Özer, M.B., Solmaz, M.E., 2014. Microfluidic bio-particle manipulation for biotechnology, *Biochemical Engineering Journal* 92: 63-82.
- [39] Yeşil-Çeliktaş, Ö., Çetin, B., Yıldırım, E., 2016. Mikroakışkan Sistemlere Yönelik Gelecek Tahminleri. Mikroakışkan Teknolojilerin Temelleri ve Uygulamaları, Editör: Ö., Yeşil Çeliktaş, Ege Üniversitesi Yayınevi, Bornova, İzmir.