

Gıda Patojenlerinin Aranmasında Empedans Mikrobiyolojisinin Yeri

Burcu Çerçi¹, İsmail Karaboz²

Özet

Gıda patojenlerinin aranmasında kullanılan pek çok yöntem vardır. Klasik yöntemler sık kullanılmasına rağmen güvenilirlik ve hızlı sonuç alabilme konusunda yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle pek çok hızlı yöntem geliştirilmiştir. Elektriksel Empedans Yöntemi uzun süredir kullanılan güvenilir ve hızlı bir yöntemdir. Son zamanlarda teknolojiye gelişmelerle birlikte bu yöntem de geliştirilmiş ve daha spesifik, duyarlı ve hızlı hale getirilmiştir. Bu derlemede, empedans mikrobiyolojisinin temeli, gıda patojenlerinin aranmasındaki yeri ve son zamanlarda empedans tekniğindeki gelişmeler anlatılmaktadır.

Giriş

Empedans dalgalı elektriksel akıma karşı olan dirençtir (16). Empedans mikrobiyolojisi gıdalardaki bakterileri belirlemede kullanılan en eski yöntemlerden biridir ve 24 saatlik sürede bakteri belirlemesini sağlayan hızlı bir yöntemdir (21). Bakteriyel büyümenin olduğu reaksiyon solüsyonunda veya ortamındaki elektriksel empedanstaki değişimlerin ölçümüne dayanmaktadır (18-21). Bu yöntem bir ortamda gelişen mikroorganizmaların aktiviteleri sonucu ortamın kimyasal bileşiminde meydana gelen değişimin, ortamın elektriksel empedansını etkilemesi ilkesine dayanır (13-18). Elektriksel değişimin ölçülebildiği bu nokta mikroorganizma sayısının saptanabildiği DÖNÜM NOKTASI 'dır. Bu noktaya kadar geçen süre empedans saptama süresi olarak tanımlanır (IDT=Impedance Detection Time) ve örnekteki bakteri sayısının logaritması ile ters orantılıdır (1, 2, 12, 13). Özellikle hızlı bakteri belirlenmesiyle ilgili çok sayıda kaynak bulunmaktadır (9). Bu yöntemde belirlenebilir empedans eğrileri elde etmek için 1×10^3 ile 3×10^7 hücre/mL olması gerekmektedir (3,17).

Empedans mikrobiyolojisinde, empedans değişimi büyüme ortamına veya reaktant solüsyonuna batırılan bir çift elektrod kullanılarak ölçülmekte ve standart plaklama yöntemindeki gibi kolonilerin görünür hale gelmesine gerek yoktur. Bu ölçüm, iki yolla olur; direkt veya indirekt ölçüm (23).

¹ Uzman Mikrobiyolog, ² Prof. Dr., Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova-İzmir. Yazışmadan sorumlu yazarın elektronik posta adresi: ismail.karaboz@ege.edu.tr

Direkt teknikte bir çift metal elektrod, test edilecek mikroorganizmanın inokule edildiği ortama batırılır (4, 23). Ortamdaki empedans değişiminin sebebi canlı hücrelerden iyonik metabolitlerin salınmasıyla oluşur(4, 23). Elektriksel karakteristiklerin değişimi canlı hücrelerden iyonik metabolitlerin salınmasıyla olmaktadır(9, 23). İyonlar bakterilerden çevreye iki şekilde bırakılır: 1- Enerji metabolizması (katabolizma) 2- Membrandan iyon değişimi (9). Katabolizmada oksijen yardımıyla şekerler CO₂ ve organik asit üretmek için parçalanmaya uğrar.

Aktif olarak taşınan N⁺ ve K⁺ iyonları da salınımın küçük bir kısmından sorumludurlar. Bu değişim, membran potansiyeli ve ozmotik basıncı düzenler (9, 14).

Direkt teknikten farklı olarak, indirekt teknikte bakteriyel büyüme ortamındaki empedans değişikliği doğrudan ölçülmez. Onun yerine, elektrotlar büyüme ortamına değil de ayrı bir solüsyona (genellikle potasyum hidroksit solüsyonu) batırılır. Bakteriyel metabolizma sonucu oluşan gazlar, potasyum hidroksit tarafından absorblanır ve bu da alkali solüsyonun iletkenliğinde düşmeye sebep olur(4, 23).

Geleneksel olarak ince metal teller ortama batırılıp elektrot olarak kullanılmaktaydı. Duyarlılığı arttırmak, empedans tekniğinin belirleme limitini düşürmek için son birkaç yılda, farklı şekillerde elektrotlar geliştirilmiştir (17).

Bakteriyel hücrelerin elektriksel doğası ve elektrofizyolojik özellikleri bakteriyel hücrelerle ilgili empedans yöntemlerinin geliştirilmesine uygundur. Hücre membranı birçok protein içeren çift tabakalı lipit yapısındadır ve lipit moleküllerinin polar grupları akuatik çevreye bakarken, hidrofobik hidrokarbon zincirleri membranın iç kısmına bakmaktadır. Hücrenin iç kısmı komplekstir ve pek çok membranla çevrili partikül içermektedir. (mitokondri, vakuol, nukleus v.b.) Bu sebeple hücre membranı yüksek olarak yalıtıkan hücrenin iç kısmı iletkenidir (20).

Bu yöntem AOAC (Association of Official Analytical Chemists International) tarafından gıdalarda *Salmonella* aranmasında standart teknik olarak kabul edilmiştir(9, 22). Yine AFNOR (Association Française de Normalisation) tarafından canlı deniz kabuklularında *E.coli* aranması için empedans tekniği standardize edilmiştir (2).

Birçok kaynakta, empedansın iki bileşeni olduğu belirtilmektedir: Biri ortamla ilişkili, ortam veya elektrolit empedansı, diğeri ise elektrot, elektrolit ara yüzeyi ile ilişkili, elektrot veya ara yüzey empedansıdır. (5, 8, 11, 18). Toplam empedans hem elektrot hem de ortam empedansını içerir. Bu iki bileşen birbirinden frekans değiştirilerek ayrılabilir (22).

Empedans mikrobiyolojisi antibiyotiklerin belirlenmesi, gıda analizleri, gıda hijyeni ve çevresel örneklemelemlerde, klinik ve farmasötik mikrobiyoloji gibi farklı alanlarda mikroorganizmaları gözlemlemek için kullanılmaktadır. Bu indirekt yaklaşım mikroorganizma büyümesi sırasında ortamın elektriksel iletkenliğindeki değişimin ölçümü ile mikroorganizmaların sayımından ileri gelir. Mikroorganizma büyümesi, büyüme ortamındaki yüksüz veya zayıf yüklü maddeleri yüksek yüklü maddelere dönüştürmesi ile iletkenliği artırır (17).

Empedansın Tarihçesi

Stewart 1899'da kandaki mikrobiyal kontaminasyonla kondüktansın arttığını belirlemiştir. Aynı yıl Warburg (1899) idrar örneklerinde bakteriyel seviyeyele elektrot polarizasyonu arasında ilişki olduğunu tespit etmiştir. Bu çalışma bakteriyel büyümenin elektriksel ölçümü için iki yol açmıştır: Biri elektrod yüzeyindeki değişiklikleri ölçmek, diğeri ise, ortam solüsyonun değişikliğini ölçmek. Yaklaşık 100 yıl önce empedans değeri hak ettiği değeri görememiş fakat 60 yıl sonra Schwan (1963) elektriksel sinyalin kondüktans ve kapasitans bileşenlerinin frekansa dayalı ilişkisini tanımlamıştır: düşük frekans, daha yüksek kapasitans tepkisi vermektedir. Bakteriyolojik örnekler için, Schwan elektrotlarda kapasitans değişikliği olurken, ortamda kondüktans değişikliği olduğunu göstermiştir. Bu çalışmayla 1970'lerin ortalarında empedans cihazı tasarlanmıştır. Böylece 15 yıldan daha fazla süre analizlerde kullanılan ticari empedans cihazları geliştirilmiştir. 1992'de Felice ve ark., bakteriyel büyüme sırasındaki değişikliklerin elektrot, elektrolit ara yüzeyinde yoğunlaştığını, bunun da empedans büyüme eğrisinde üçüncü bir bileşene sebep olduğunu saptamışlardır. Aynı yıl, Nobel yüksek iyonik ortamda kapasitansa tamponun etkisini araştırmış ve kapasitanstaki temel değişimin, elektrot yüzeyindeki protonlardan olduğu, iyonlardan olmadığı sonucuna varmıştır (16).

Empedans Cihazları

Günümüzde 4 ticari empedans cihazı vardır: Bactometer (biomerieux Vitek, Inc), BacTrac (Sy-Lab, Inc), Malthus (Malthus Diagnostics, Inc) ve Rabit (Don Whitley Scientific, Inc). Bu 4 cihaz da, 10-55 °C arasında bakteriyel büyümeyi gösterir ve 32 ila 512 test yapabilir. Alüminyum blok (BacTrac, Rabit), su banyosu (Malthus) veya atmosferik sıcaklık kontrolü (Bactometer) ile her firma kendi cihazında farklı sıcaklık stabilitesi sağlar. Bu stabilitenin sebebi de sıcaklıktaki 1 derecelik artışın, kapasitanda %0.9 'luk, kondüktansta ise %1.8'lik artışa neden olmasıdır (16).

Bu 4 cihaz arasındaki farklılıklar, elektrot materyali, yerleştirme ve sayısından gelir. Batometer, BacTrac ve Rabit paslanmaz çelik elektrot kullanır, Malthus ise platin elektrotlar kullanır. BacTrac 4 elektrot kullanan tek sistem olup, Schwan'a göre (1963), kapasitans sinyalinin stabilitesini artırır (16).

Dört cihaz arasındaki en belirgin özellik frekanstır. Düşük frekans kapasitansın tepkisini artırıyordu. Malthus ve Rabit 10,000 Hz'de çalışır, kondüktansı maksimize ederken kapasitansı minimize eder. Bactometer ve BacTrac 2000 Hz'nin altında çalışır, kondüktanstaki değişiklikleri belirleyebildiği gibi kapasitansını da belirleyebilir. Kondüktans cihazları, kapasitans sinyalindeki değişiklikleri kaydedemez ve bu dezavantajını da düşük iyonik ortam kullanarak kondüktans değişimini maksimize ederek üstesinden gelmeye çalışır. Yine de yüksek tuz içeren seçici ortamlar veya mayaların aranmasında kondüktanstaki değişiklikler direkt ölçülemez, mikrobiyal büyüme indirekt olarak ölçülebilir. İndirekt kondüktansla, mikrobiyal karbondioksit üretimi potasyum hidroksit solüsyonuyla absorblanır. Bu durum elektrotlarla indirekt olarak belirlenir. Bu indirekt kondüktans yöntemi, mayaların empedans belirlenmesinde kapasitansın kullanımında olduğu kadar duyarlı olduğu bulunmuştur (16). Bactrac sistemi iki empedans değeri ölçer: E-değeri (elektrod

yüzeyindeki kapasitansın ölçümü) ve M-değeri (Büyüme ortamındaki kondüktivitedeki değişim) (19).

Bu cihazlarla ölçülen elektriksel sinyaller, grafiksel olarak ordinata yerleştirilirken inkübasyon süresi apsisine çizilir ve empedans büyüme eğrileri oluşturulur.(23) Empedans büyüme eğrilerinde 3 faz vardır. İlk faz, kültür ortamından gelen sinyali, ikinci faz empedanstaki artan değişimi, üçüncü faz ise empedanstaki küçük değişimleri göstermektedir.(18)

Empedans değerinin eşik değerini geçtiği noktadaki azalışa karşılık gelen zaman detection time, t_d olarak adlandırılır. Empedans değeri sonuçta bir platoya ulaşır (23). Empedans büyüme eğrisinin şekli tipik bakteri büyüme eğrisiyle eşleşmektedir, lag faz bakterinin çoğalmadığı fazdır, log veya eksponansiyal büyüme fazında bakteri düzenli olarak çoğalır ve stasyoner fazda ise bakteri sayısı sabit kalır (18, 23).

Gıda Patojenleri

Gıda kaynaklı patojenlerin sebep olduğu hastalıklar, gıda güvenliği ve halk sağlığı için çok ciddi bir tehlikedir ve toplumu en çok ilgilendiren konulardan biridir. Günümüzde, patojenik virüslerin, bakterilerin, fungusların, parazitlerin, deniz fitoplanktonlarının ve siyanobakteriler gibi farklı gıda kaynaklı patojenik mikroorganizmalar 250 den fazla hastalığa sebep olmaktadır. Bunların içinde bakteriler en yaygın gıda patojenleridir (23).

Gıda patojenlerinin aranma yöntemleri

Konvensiyonel mikrobiyolojik yöntemlerin kullanımı, yaklaşık yüzyıldır gıdalardaki patojenlerin tanımlanmaları ve belirlenmesi için bir standarttır ve gıda güvenliği için güvenilir bir standart oluşturur. Bu konvensiyonel yöntemler spesifik agar ortamlarının kullanımıyla izolasyon ve örneklerdeki bakteri hücre sayımını içerir. Böyle bir yöntemin prosedürü mikrobiyal kültür ve patojenlerin izolasyonunu içerir, bunu serolojik/biyokimyasal testler izler ve belirli bir patojen organizmanın tanımlanması 5-7 gün sürer. Güvenilir olmasına rağmen konvensiyonel yöntemler zaman alıcıdır ve emek gerektirir, bu sebeple modern gıda güvenliği için uygun değildir. Sonuç olarak son 25 yıl içinde, işlem süresini azaltmak için birçok hızlı yöntem denenmiştir. Bu çalışılan ve hala çalışılmakta olan yaklaşımlar, minyatürize edilmiş biyokimyasal testleri, bakteriyel metabolitleri ölçen fizikokimyasal yöntemleri, yüksek spesifikiteye sahip nükleik aside dayalı testleri, antikora-dayalı testleri, ve tamamen otomatize edilmiş enstrümental tanımlama sistemlerini içermektedir. İyi çalışılmış hızlı yöntemlerden örneğin ELİSA ve PCR işlem zamanını 10-24 saatle, 4-6 saate indirmektedir(sırasıyla) ve 10^1 - 10^6 kob/ mL arasında değişen limitlerde tanımlama yapabilmektedirler (23).

Kaliteyi belirlemek için günlük ürünler hızlı, gerçekçi ve güvenilir yöntemlere ihtiyaç duyar. Enzimatik-kolorimetrik yöntemler, plaka sayım yöntemleri, DNA'ya dayalı yöntemler gibi pek çok yöntem gıdalarda patojenlerin aranmasında ve sayılmasında kullanılmaktadır. Gıdalardaki bakterilerin aranmasında alternatif bir yöntem de empedanstır (19). Birçok çalışmada kondüktans veya empedans ölçümlerinin sudaki ve gıda ürünlerindeki mikroorganizmaları belirlemede kullanıldığı gösterilmiştir (2).

Empedans mikrobiyolojisi gibi hızlı yöntemler konvensiyonel yöntemlere göre pek çok avantaja sahiptir. Çünkü bu teknik farklı gıda ürünlerinin ham maddelerinin bakteriyolojik kalitelerini ve raf ömürlerini belirlemek için etkili, hızlı, tekrarlanabilir. Empedans yöntemleri çok çeşitli gıdaların (ör: et ve balık) ve farmasötiklerin analizleri için geliştirilmiştir (1).

Neden Elektriksel Empedans Yöntemi?

Gıda güvenliğini arttırmanın temelinde, matematiksel çalışmalarda farklı koşullar altında mikrobiyal büyüme hızlarında sayısal verilerin belirlenmesi gereklidir. Fakat konvensiyonel yöntemler zaman alıcıdır ve mikroorganizmaların büyümesi ile ilgili verilerin miktarını kısıtlar (15). Risk yönetimi ve raf ömrü belirlenmesi gibi uygulamalarda yeterli veri gereklidir. Bu sebeple mikrobiyal büyüme hızlarının hesaplanmasında hızlı ve kesin bir yöntem ihtiyacı vardır (15).

Pek çok otomatize yöntem manuel yöntemlerle karşılaştırılabilir duyarlılık ve güvenilirliğe sahiptirler. En duyarlı otomatize yöntem ölü ve canlı hücreleri birbirinden ayıramaz. Canlı bakteriyel hücreleri ayırt etmek için tüm belirleme yöntemleri canlı hücrelerin sayısını arttırmak için 24-48 saatlik büyüme basamağı içerirler. Çok yaygın bir otomatize yöntem bakterilerin kültüre edildikleri ortamın elektriksel karakteristiklerinin değişimine dayanır. Bu değişimler canlı hücrelerden salınan iyonik metabolitler ile oluşturulup, ortamla ilişkide olan elektrotlarla ölçülür. Bu yöntem yaklaşık 100 yıl önce bulunmuştur ve bakteriyel büyümeyi gözlemlenmede uzun yıllardır kullanılmaktadır (8).

Konvensiyonel empedans yöntemi, örnekteki bakteri sayısı az ise biraz daha uzun sürebilir. Bu kısıtlamanın üstesinden gelmek için de eğer bu birkaç hücre küçük hacimlere sığdırılırsa empedans ölçülebilir. Bu yolla hücre sayısı artmadan, hücre konsantrasyonu arttırılabilir (8).

Bakterilerin Belirlenmesinde Empedans Yöntemi

Bakteriyel büyümeyi belirleyen yaygın bir empedans tekniği EMPEDANS MİKROBİYOLOJİSİ'dir. Bakteriyel büyümenin sonucunda reaksiyon solüsyonundaki veya kültür ortamındaki elektriksel empedanstaki değişikliklerin ölçümüne dayanmaktadır. Büyümeye dayalı empedans tekniği bize canlı ve ölü hücreleri ayırma şansı verir. Böyle bir yöntemle 24 saat içinde bakteri aranması sonuçlanabilir (23).

Son birkaç yılda bu konuya başka bakış açıları da eklenmiş ve bakteriyel büyüme belirlenmesi çalışmaları için empedans tekniği oldukça değerli bir teknik haline gelmiştir. Bu yeni bakış açıları, farklı elektrot sistemlerinin kullanımını ve belirleme sistemlerinin daha iyi geliştirilmesi için eşdeğer devreler kullanılarak empedans bileşenlerinin analizini içermektedir. Mikrofabrikasyon teknolojisindeki avantajlar, empedans belirlenmesinde mikrofabrike mikroelektrotların kullanımını başlatmış ve empedans mikrobiyolojisini çip formatına minyatürize etmiştir. Bu şekilde hızlı bir bakteriyel büyümeyi belirlemek olası hale gelmiştir (23).

Empedans tekniğinin biyosensör teknolojisiyle birleştirilmesi hızlı bakteri aramayı sağlayan empedans biyosensörlerinin gelişimine götürür. Bakteriyal aramada empedans biyosensörleri, elektrotlarla ilişkiye giren ya da elektrotlara tutunan bakteriyal hücrelerin elektriksel özelliklerine dayanır. Empedans biyosensör yöntemleri, büyüme bazlı empedans yöntemleri ile karşılaştırıldığında işlem süresini 30 dakika ile 2 saat arasına kadar düşürmektedir. Kayda değer ilerleme, mikrofabrikasyon ve elektromekaniksel nanoteknolojinin avantajlarını kullanan platformların gelişmesini sağlar. Bu mikrofabrike biyosensörlerin hedef bakteriyel hücrelerle büyük boyutta uyumluluğu herhangi bir amplifikasyon basamağı olmadan yüzeyine bağlanan bakteriyel hücrelerin belirlenmesine olanak sağlar (23).

Son Gelişmeler

Bakteri aranmasında biyolojik tanımlama teknolojisiyle empedansın birleştirilmesi, son yıllarda yaygın kullanım alanı bulan empedans biyosensörlerinin geliştirilmesi sağlanmıştır. Bu derleme gıda kaynaklı patojenik bakterilerin aranmasında empedans mikrobiyolojisinin uygulaması ve gidişatını içermekle birlikte, mikroelektrotların kullanımı, çip bazlı empedans mikrobiyolojisi ve empedans sisteminin analizi için eşdeğer devrelerin kullanılması gibi son birkaç yıl içinde geliştirilen konularda eklenmiştir (23)

Empedans Ayırıcı (Splitting) Yöntemler

Birçok empedans mikrobiyolojik yöntem inokule edilmiş bir ortama bir çift elektrodun batırılarak ortamın kondüktansını ölçerken, birçok çalışma, farklı frekans aralıklarında ölçülebilen, iki bileşenden oluşan bakteriyel büyüme sırasında toplam empedansın ölçüldüğü bulunmuştur. Bir bileşen ortamda oluşur, ortam veya elektrolit empedans olarak bilinir, diğer bileşense elektrottan ve elektrot/elektrolit yüzeyiyle ilişkilidir (23).

Elektrot ve ortam empedans bileşenlerinin belirlenmesi, bakteri aranmasında empedans ayırıcı (splitting) yöntemlerin geliştirilmesini sağlamıştır. SY-lab (Neupurkersdorf, Austria) BacTrac™ denen ticari bir cihaz üretmişlerdir, hem elektrot empedansı için (E-değeri) hem de ortam empedansı için (M-değeri) ölçümleri 1kHz de yapılmaktadır. *Bacillus stearothermophilus*'un hızlı belirlenmesi empedans ayırıcı yöntemle başarılmıştır (6, 23).

Empedans Bileşenleri İçin Eşdeğer Devre Analizleri

Ortam empedansı ve elektrot empedansı ve total empedansa katkı yapan frekansları, eşdeğer devre kullanılan sistemle analiz edilerek yorumlanabilir. Elektriksel anlamda bakarsak, rezistör ve kapasitörün basit bir eşdeğer devresi, iletken bir ortama iki elektrot batırıldığında, empedans test sisteminin davranışlarını sunmak için yeterlidir. Kullanışlı olması için, eşdeğer devredeki elementlerin, sistemin fiziksel elektrokimyasal temele sahip olması gerektiğini göstermektedir (23).

İki elektrotun arasındaki empedans Şekil 2B 'de gösterilen basit devre serileri ile gösterilebilir. Bu sistem iki elektrot arasında solüsyon rezistöründen (R_s) ve her elektrotun iki tabakalı kapasitöründen (C_{dl}) oluşur (23).

Empedans Ölçümlerinde Birbirine Bağlı Sıralı Mikroelektrodlar (IDA)

Analitik ölçümler için mikroelektrotlar konvensiyonel elektrotlara göre düşük rezistans, yüksek sinyal oranı, sabit duruma hızla gelebilme ve düşük solüsyon hacimleri kullanımı gibi avantajlara sahiptirler. Son yıllarda, mikrofabrike IDA mikroelektrodları impedimetrik immunosensing ve biosensing ve biyolojik hücre davranışlarını ölçmek için olan empedans ölçüm çalışmaları alanlarında ilgi görmüştür. IDA'da çoklu elektrot çiftleri bulunmakta ve elektrotların arasındaki mesafe mikronla nanometre arasında olabilmektedir (23).

IDA sistemi konvensiyonel elektrot sisteminden biraz farklıdır. Konvensiyonel elektrot sistemi genellikle bakteriyel büyümeyi göstermek için çift tabakalı kapasitansı ölçer. Bu farklılıktan kaynaklanan olası neden IDA yüzeyine bakteri hücrelerinin yapışmasıdır. IDA sisteminde, büyüme ortamındaki bakteriyel hücrelerin IDA elektrotların yüzeyine yapışmak için pek çok fırsatları vardır. Çünkü, IDA oldukça geniş bir yüzey alanına sahiptir ve sistem büyük bir yüzey hacim oranına sahiptir (23).

IDA empedans sisteminin avantajları, örnek hacmindeki azalma ve daha hızlı bir belirleme sistemidir. IDA sistemi ile örnek hacmi 10-15 mL'den 1-2 mL 'ye düşer (23).

Empedans Ölçümleri İçin Mikroçipler

Son zamanlarda, çipe dayalı bir cihazla empedans belirleme sisteminin minyatürize edilmesi bakterilerin büyümelerinin belirlenmesinde büyük bir avantaj sağlamıştır. Gomez ve ark., (2001, 2002,2005) mikrobiyal metabolizmanın empedansla belirlenmesi için silikon bazlı mikroçipler üretmişlerdir (8, 9, 10) Temel fikir nano veya pikolitrelerdeki hacimde canlı bakteriyel hücreleri hapsetmektir. Böylece düşük iletkenlikteki bir tampondaki birkaç canlı hücrenin metabolizması, mikro-elektrotlarla yapılan empedans ölçümü ile hızlı bir şekilde belirlenebilir. Belirlemenin eşiği düşebilir, böylece birkaç hücrenin metabolizması belirlenebilir (8, 9,10, 23).

Bakteriyel Belirleme İçin Empedans Biyosensörleri

Bakteriyel hücre belirlenmesi için yeni çıkan bir empedans biyosensörü, elektrot yüzeyindeki bakteriyel hücrelere spesifik olan immobilize antikorlarla oluşturulmuştur. Sensör, hücre membranının yalıtkanlık özelliğinden dolayı, sensörün elektriksel özelliklerindeki değişiklikleri ölçerek bakteriyel hücrelerin yapışmasını inceler.

Elektrotlar üzerindeki sağlam hücre membranlarının varlığı akımı belirler böylece de sensör sinyal verir. Sensörün empedansı frekansı sorgulama görevi yaparak ölçülür, ismi ise elektriksel/ elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS)'dir (23).

Empedansın ölçülmesi redoks probunun varlığı veya yokluğunda oluşturulabilir, Faradaik ve non-Faradaik empedans ölçümleri olarak belirtilir, bir veya diğer tipi toplam empedans sinyaline hükmeder. Redoks probu olmadan, ölçülen empedans sinyali, yapışkan olarak büyüyen veya fiziksel olarak elektrot yüzeyine tutunan sağlam bakteri hücrelerinden kaynaklanır, temel olarak da hücre membranlarının yalıtkan etkilerindedir. Empedans yapışkan hücrelerin morfolojik davranışları, büyüme ve sayıdaki değişikliklerle etkilenir. Redoks probunun varlığında, Faradaik empedanstaki indüklenen değişikliklerin ölçümü ile sensörün yüzeyinde görülen biyolojik olayları inceler. Bu teknik elektrot yüzeylerindeki antijen-antikor, biyotinavidin kompleksleri, oligonukleotit-DNA interaksiyonları ve yüzeyler arası (kapasitans, elektron transfer rezistansı) özelliklerin incelenmesiyle ayak ve ağız virüslerinin bağlanmasının oluşumlarını duyumsayan etkili bir yoldur (23).

Sonuç

Empedans tekniği bakteri aranmasında kullanılan etkili ve hızlı bir yöntemdir. Klasik empedans yöntemi uzun bir zaman önce belirlenmiştir ve 24 saatte bakteri belirlenmesi için hızlı otomatize bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Şimdilerde ise empedans tekniği çip bazlı bir yöntem olarak yeni bir aşamaya gelmiştir. Mikrofabrikasyondaki avantajlar empedans mikrobiyolojisinin mikrocihazlar ve biyoçip seviyesinde miniatürize edilmesini sağlamıştır, ki bu yöntemlerle empedans sinyali maksimize edildiği, test edilen örnek hacmini minimuma indirdiği, duyarlılığı arttırdığı ve gıda kaynaklı patojenlerin belirlenmesinde süreyi kısalttığı kanıtlanmıştır. İlgi çekici olan, empedans tekniği büyüme bazlı bir bakteri belirleme yöntemidir ve ölü ve canlı hücreleri birbirinden ayırabilir. Canlı hücrelerin belirlenmesi, hem ölü hem canlı hücrelerin belirlenmesinden daha kullanışlıdır, çünkü ölü hücreler genellikle patojenik değildirler. Canlı ve ölü hücrelerin ayrılması gıda güvenliğini artırır ve sağlık açısından yarar sağlar.

Empedans biyosensörleri, ELISA ve belirleme limiti 10^1 ile 10^6 arasında değişen PCR ile ve belirleme limiti ideal koşullarda yöntem süresi 2 saat olan 10^3 - 10^4 kob/mL arasında olan çeşitli biyosensörlerle karşılaştırılabilir (23).

Empedans tekniği gıda kaynaklı patojenlerin belirlenmesinde iki önemli probleme çözüm bulur: Hızlılık ve Belirleme limiti.

Hızlılık her uygulama için yöntem süresini ve örnek sayısını içerir. Mikroçip bazlı empedans mikrobiyolojisi yöntem süresini oldukça azaltırken, yüksek hızlı mikroçipler her uygulama için örnek sayısını artırır. Yüksek hızda görünebilen ve devamlı monitorizasyonu sağlayan 96- 1536 mikroplak formatında empedans ölçümleri dizayn edilebilir. Minyatürize cihazlar el ile çalışmayı ve maliyeti azaltıp, daha hızlı, alandan tasarruf ettiren ve daha ekonomik olan bir işlem sağlar.

Tek hücre seviyesinde belirleme empedans biyosensörlerinin araştırılması ile olabilir. Yöntem süresinin kısaltılması ve belirleme limitinin düşürülmesinin yanı sıra, tek bir hücre seviyesinde belirleme daha henüz başarısızdır. Mikromakineleştirilmiş empedans spektroskopi akım sitometrisinde gösterildiği gibi (Gawad et al., 2001), bireysel hücrelerin spektral empedansını ölçebilen bir cihaz dizayn edilebilir (7). Böylece empedans tekniği ile bireysel hücrenin belirlenmesi mümkün olabilir.

Empedans biyosensörleri farklı bakterilerin multipleks analizi için geliştirilebilir. Mikro ve nano-fluidics ile biyosensörlerin başarılı bir şekilde birlikte kullanımıyla, bir çok birim uygulaması, ayırma, karıştırma, inkübasyon, konsantrasyon vs. doğrudan lab-on-chip formatında yapılabilir. Mikrolitre ve nanolitre hacimlerle analiz yapılması, pahalı reagentlerin daha az kullanılmasını ve daha büyük analitik duyarlılığı sağlar (23)

Kaynaklar

1. Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P. (2003). Impedimetric method for estimating the residual activity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. International Dairy Journal, 13, 463-468.
2. Dupont, J., Dumont, F., Menanteau, C., Pommepuy, M.(2004). Calibration of the impedance method for rapid quantitative estimation of *Escherichia coli* in live marine bivalve molluscs. Journal of Applied Microbiology, 96, 894-902.
3. Felice, C.J., Valentinuzzi, M.E.(1999). Medium and Interface Components in Impedance Microbiology. IEEE Transactions on biomedical engineering, 46: 12, 1483-1487.
4. Felice, J.C., Madrid, E.R., Olivera, J.M., Rotger, V.I., Valentinuzzi, M.E. (1999). Impedance microbiology: quantification of bacterial content in milk by means of capacitance growth curves. Journal of Microbiological Methods, 35, 37-42.
5. Felice, C.J., Valentinuzzi, M.E., Vercellone, M.I., Madrid, R.E. (1992). Impedance bacteriometry: medium and interface contributions during bacterial growth. IEEE Trans. Biomed. Eng. 39, 1310–1313.
6. Flint, S.H., Brooks, J.D. (2001). Rapid detection of *Bacillus stearothermophilus* using impedance-splitting. J Microbiol Methods, 44, 205–208.
7. Gawad, S., Schild, L., Renaud, P. (2001). Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing. Lab Chip ;1. 76–82.
8. Gomez, R. Impedance Microbiology-on-a-Chip Microfluidic Bioprocessor for Rapid Detection of Bacterial Metabolism. Journal of Microelektromechanical Systems, 1-8.
9. Gomez, R., Bashir R., Bhunia, A.K. (2002). Microscale electronic detection of bacterial metabolism. Sensors and Actuators B, 86, 198-208.
10. Gomez, R., Bashir, R., Sarikaya, A., Ladisch, M., Sturgis, J., Robinson, J., et al. (2001). Microfluidic biochip for impedance spectroscopy of biological species. Biomed Microdevices, 3, 201– 209.
11. Hause, L.L., Komorowski, R.A., Gayon, F., 1981. Electrode and electrolyte impedance in the detection of bacteria growth. IEEE Trans. Biomed. Eng. 28 :5, 403–410.
12. Marino, M., Bersani, C., Comi, G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. International Journal of Food Microbiology, 67, 187-195.
13. Önver, Ö. (1999). Elektriksel İmpedans Yöntemi ve Mikrobiyolojideki Uygulamaları. Diploma Çalışması, E.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2-28.

14. Sezdi, M., Sönmezoğlu, M., Tekeli,Ö., Ülgen, Y., Bayık, M. (2004). Kan bankasında saklanan eritrosit süspansiyon- larında, elektriksel empedans değişiminin sodyum ve potasyum değişimleriyle ilişkilendirilmesi. BİYOMUT, Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı, İstanbul-TÜRKİYE, 184-188.
15. Sherry, A.E., Patterson, M.F., Kilpatrick, D., Madden, R.H. (2006). Evaluation of the use of conductimetry for the rapid and precise measurement of *Salmonella spp.* growth rates. Journal of Microbiological Methods 67. 86-92.
16. Tortorello, M.L., Gendel, S.M. (1997). Food Microbiology and Analytical Methods: New Technologies. In "Food Microbiological Analysis" (IFT Basic Symposium Series), CRC Press.
17. Varshney, M., Li, Y. (2008). Double interdigitated array microelectrode-based impedance biosensor for detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 in growth medium. Talanta 74. 518-525.
18. Wu, J.J., Lee, Y.C., Leaw, S.N., Lin, M.C., Chang, T.C. (2004). Evaluation of an impedance method for subtyping of *Pseudomonas aeruginosa*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 48, 181-189.
19. Walker, K., Ripandelli, N., Flint, S. (2005). Rapid enumeration of *Bifidobacterium lactis* in milk powders using impedance. International Dairy Journal, 15, 183-188.
20. Yang, L. (2008). Electrical impedance spectroscopy for detection of bacterial cells in suspensions using interdigitated microelectrodes. Talanta, 74, 1621-1629.
21. Yang, L., Li, Y., Griffis, C.L., Johnson, G.M. (2004). Interdigitated micro- electrode (IME) impedance sensor for the detection of viable *Salmonella typhimurium*. Biosensors and Bioelectronics, 19, 1139-1147.
22. Yang, L., Ruan, C., Li, Y. (2003). Detection of viable *Salmonella typhimurium* by impedance measurement of electrode capacitance and medium resistance. Biosensors and Bioelectronics, 19, 495-502.
23. Yang, L., Bashir R. (2008). Electrical/ electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. Biotechnology Advances, 26, 135-150.