

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

MİKROBİYAL BİYOLOJİK OKSİJEN
İHTİYACI BİYOSENSÖRLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ

Serdar KARA
DOKTORA TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2009

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

MİKROBİYAL BİYOLOJİK OKSİJEN
İHTİYACI BİYOSENSÖRLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ

Serdar KARA
DOKTORA TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Bülent KESKİNLER

GEBZE
2009

 GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ	MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ JÜRİ ONAY FORMU
--	--

JÜRİ

ÜYE (BAŞKAN) : PROF. DR. E. BEYZA ÜSTÜN

ÜYE : PROF. DR. SEVAL SÖZEN

ÜYE : PROF. DR. MEHMET KARPUZCU

ÜYE : PROF. DR. BÜLENT KESKİNLER

ÜYE : DOÇ. DR. ELİF ERHAN

Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun **15/01/2009** tarih ve **2009/01** sayılı kararı ile yukarıdaki öğretim elemanlarından oluşmuş jüri tarafından düzenlenen **02/02/2009** tarihli Tez Savunma Tutanağı neticesinde **Doktora** öğrencisi **SERDAR KARA**'nın çalışması GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Yönetim Kurulu .../.../..... tarih ve/... sayılı kararıyla **Çevre Mühendisliği** Anabilim Dalında Doktora tezi olarak onaylanmıştır.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: Mikrobiyal Biyolojik Oksijen İhtiyacı Biyosensörlerinin Geliştirilmesi

YAZAR ADI : Serdar KARA

Bu çalışmada, atıksulardaki organik maddelerin tespiti amacıyla çözünmüş oksijen elektrodu ile birleştirilmiş immobilize *Pseudomonas syringae* esaslı Biyolojik Oksijen İhtiyacı (BOİ) sensörü geliştirilmiştir. Mikroorganizmalar, yağ ve su fazından meydana gelen mikro-gözenekli polimer disk içerisine askıda kültürün reaktörden 1 ml/dak akış hızında 24 saat süreyle geçirilmesi ile immobilize edilmiştir. Sensör ölçümleri çözünmüş oksijen probunun polimer disk üzerine yerleştirilmesi ile sürekli atıksu besleme ve akım enjeksiyonu sistemleri kullanılarak yapılmıştır. İki ölçüm sisteminde meydana gelen sensör performansı 5–100 mg/l BOİ₅ aralığında iyi bir doğrusallık göstermiştir ($r^2>0.98$). BOİ sensörünün tipik yanıt süreleri sürekli besleme metodunda 60–150 saniye, akım enjeksiyon metodunda ise 25–40 saniye olmuştur. Sürekli substrat besleme tekniğinde optimum akış hızı 1.0 ml/dak. olarak belirlenmiş, akım enjeksiyon tekniğinde ise 0.6 ml/dak en uygun debi olarak bulunmuştur. Her iki ölçüm tekniğinde optimum sensör yanıtları pH 6.8, 22 °C ve 2.0 mm disk kalınlığında gözlenmiştir. Bu biyosensör ile evsel ve endüstriyel atıksular için yapılan BOİ ölçümleri geleneksel 5 günlük BOİ testleri ile elde edilen değerlerle oldukça bağlantılı ölçülmüştür.

Anahtar Kelimeler

Mikro gözenek, biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ), *Pseudomonas syringae*, immobilize mikroorganizmalar, biyosensör.

ABSTRACT

THESIS TITLE : Development of Microbial Biochemical Oxygen Demand Biosensor

AUTHOR NAME : Serdar KARA

A biochemical oxygen demand (BOD) sensor, based on an immobilized *Pseudomonas syringae* in combination with a dissolved oxygen electrode, has been developed for the purpose of analysis of organic compounds in aqueous samples. Microorganisms were immobilized in highly porous micro-cellular polymer disk constituted of oil and water phases by recycling the suspended culture through the reactor for 24 h at a flow rate of 1 ml/min. The sensor measurements were carried out by dissolved oxygen probe placed on the polymer disk using continuous wastewater feeding and flow injection systems. The sensor performance achieved in two measurement systems showed a detection linearity over the range of 5–100 mg BOD₅/L ($r^2 > 0.98$). While the optimum flow rate was 1.0 ml/min in continuous substrate feeding technique, it was found to be 0.6 ml/min in flow injection technique. Typical response times of the BOD sensor were 60–150 sec. in continuous feeding system and 25–40 sec in flow injection system. The optimal sensor response was observed at pH 6.8, 22 °C and 2.0 mm disk height for both two measurement techniques. For municipal and industrial wastewaters, BOD values estimated by this biosensor correlate well with those determined by the conventional 5-day BOD test.

Keywords:

Micro-cellular, biochemical oxygen demand (BOD), *Pseudomonas syringae*, immobilized microorganisms, biosensor.

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanması sırasında değerli bilgi ve yardımlarını esirgemeyerek bana her türlü desteği sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Bülent KESKİNLER' e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında bilgi ve görüşleriyle yardımcı olan ve bu çalışmaların olgunlaşmasında büyük katkısı olan Sayın Doç. Dr. Elif ERHAN, Sayın Doç. Dr. Ahmet KARAGÜNDÜZ ve Sayın Yard. Doç. Dr. Melek ÖZKAN' a teşekkür ederim.

Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mehmet KARPUZCU' ya, oda ve mesai arkadaşım Sayın Öğretim Görevlisi Halil HIZ' a, laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Araştırma Görevlisi arkadaşlarım Derya İMER, Şeyda KORKUT ve Pınar KARAGÖZ' e teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarımı maddi olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na teşekkür ederim.

Bu tezin tamamlanması sırasında yaşadığım her türlü sıkıntıyı aşmamda her zaman yanımda olan ve bana destek olan sevgili eşim Fatma İlknur KARA' ya, yine maddi manevi her zaman yanımda olan ailelerimize teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iii
SUMMARY	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. BİYOSENSÖRLER	4
2.1. Biyosensörlerde Enerji Dönüştürücüler	5
2.1.1. Elektrokimyasal Biyosensörler	5
2.1.1.1. Amperometrik Biyosensörler	5
2.1.1.2. Potansiyometrik Biyosensörler	13
2.1.1.3. İletkenlik Biyosensörleri	15
2.1.2. Optik Biyosensörler	16
2.1.3. Diğer Mikrobiyal Biyosensörler	17
2.1.3.1. Piezoelektrik Biyosensörler	17
2.1.3.2. Kalorimetrik Biyosensörler	18
2.2. İmmobilizasyon Teknikleri	20
2.2.1. Kimyasal İmmobilizasyon	22
2.2.1.1. Kimyasal Çapraz-Bağlama	22
2.2.1.2. Kovalent Bağlama	22
2.2.2. Fiziksel immobilizasyon	22

2.2.2.1. Elektrot Yüzeyine Fiziksel Sorpsiyon	22
2.2.2.2. Membran ile Tutma	23
2.2.2.3. Elektrot Matrisinde Tutuklama	23
2.2.2.4. Elektropolimerizasyon	24
2.2.2.5. Diğer Fiziksel İmmobilizasyon Teknikleri	24
2.3. Biyosensörlerin Performans Özellikleri	25
2.4. BOİ Biyosensörleri	27
2.4.1. Biyofilm Tipi BOİ Biyosensörleri	27
2.4.1.1. Ölçme Prensipleri	27
2.4.1.2. Biyo-film Tipi BOİ Biyosensörlerinde Kullanılan Dönüştürücüler	30
2.4.1.3. Biyofilm Tipi BOİ Biyosensörlerinde İmmobilizasyon	31
2.4.2. Solunum-tipi BOİ Biyosensörleri	31
2.4.3. Diğer Ölçme Prensiplerine Dayalı BOİ Biyosensörleri	32
2.4.4. BOİ Biyosensörlerin Performans Özellikleri	33
2.4.4.1. Kalibrasyon Eğrisinin Lineerliği	36
2.4.4.2. Cevap ve İyileştirme Süresi	36
2.4.4.3. Doğruluk	37
2.4.4.4. BOİ _{sensör} ve BOİ ₅ Arasındaki Uyuşma	38
2.4.4.5. İşletme Stabilitesi	41
2.4.5. BOİ _{sensör} ve BOİ ₅ Arasındaki Uyuşmayı Geliştirme Teknikleri	42
2.4.5.1. Biyolojik Tanıma Elemanı Olarak Uygun Mikrobiyal Türlerin Seçilmesi	42
2.4.5.2. Uygun Kalibrasyon Çözeltisinin Seçilmesi	42
2.4.5.3. Sensörün Tekrar İnkübe Edilmesi	43
2.4.5.4. Örneğin İleri Arıtımı	43

2.5. Mikro Gözenekli Polimer (MGP) Diskin Yapısı	44
3. MATERYAL ve METOT	47
3.1. Kimyasallar	47
3.2. Kalibrasyon Çözeltisi	47
3.3. Atıksu Örnekleri	47
3.4. Mikroorganizmalar ve Tampon Çözelti	48
3.5. Mikro Gözenekli Polimer (MGP) Ortamın Hazırlanması	49
3.6. MGP Diskin Biyo-katalitik Olarak Hazırlanması	50
3.7. MGP Disklerin SEM Analizleri İçin Hazırlanması	51
3.8. Sensor Tasarımı	51
3.9. BOİ Ölçüm Sistemi	52
3.10. Biyosensörlerde Ölçüm Limiti Hesaplaması	53
3.11. Dispersiyon Modeli	55
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	59
4.1. Mikro Gözenekli Polimer Diskin Özellikleri	59
4.2. Sürekli Besleme Tekniği ile Biyosensör Ölçümleri	64
4.2.1. Farklı Akış Debilerinde Kalibrasyon Çalışmaları	65
4.2.2. Sürekli Besleme Tekniğinde Ölçüm Süresi	71
4.2.3. Sıcaklık ve pH'nın Etkisi	72
4.2.4. Biyosensörün Yanıtına Polimer Disk Kalınlığının Etkisi	74
4.3. Akım Enjeksiyon Tekniği ile Biyosensör Ölçümleri	75
4.3.1. Farklı Debilerde Kalibrasyon Çalışmaları	76
4.3.2. Akım Enjeksiyon Tekniğinde Ölçüm Süresi	85
4.3.3. Sensör Yanıtına pH ve Sıcaklık Etkisi	86
4.3.4. Sensör Yanıtına Mikro Gözenekli Polimer Disk Kalınlığının Etkisi	88

4.3.5. Sensör Yanıtına Enjeksiyon Hacminin Etkisi	89
4.4. Biyosensörün Ölçüm Limiti	91
4.5. Biyosensörün Tekrarlanabilirliği	92
4.6. Biyosensörün Üretilabilirliği	94
4.7. Biyosensörün Stabilitesi	96
4.8. Biyosensör ile Atıksu Ölçümleri	97
4.9. Dispersiyon Modelinin BOİ Biyosensörü için Uygulaması	99
5. SONUÇ ve DEĞERLENDİRME	106
6. REFERANSLAR	109

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BOİ	: Biyolojik Oksijen İhtiyacı
b₀	: Kesim noktası (nA)
b₁	: Eğim
C_{gb}	: Başlangıç glikoz konsantrasyonu (mg/l)
C_g	: Glikoz konsantrasyonu (mg/l)
C₀	: Oksijen konsantrasyonu (mg/l)
ÇO	: Çözünmüş oksijen
DVB	: Divinilbenzen
D_h	: Hidrodinamik dispersiyon katsayısı (mm ² /s)
d_{disk}	: Polimer disk çapı (mm)
GPOSB	: Gebze Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi
GGA	: Glikoz-Glutamik Asit
I	: Akım (nA)
KOİ	: Kimyasal Oksijen İhtiyacı
KCl	: Potasyum klorür
KI	: Potasyum-iyadür
k₀	: Oksijen tüketim hızı (s ⁻¹)
k_g	: Glikoz tüketim hızı (s ⁻¹)
L	: Disk uzunluğu (mm)
MGP	: Mikro Gözenekli Polimer
Q	: Debi (ml/dak)
T	: Zaman (s)
t₁	: Glikoz enjeksiyon süresi (s)
T	: Sıcaklık (°C)
V_{enj}	: Enjeksiyon hacmi (ml)
v	: Kesit alan hızı (Darcy hızı) (mm/s)
ΔI	: Akım farkı (nA)
θ	: Porozite

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Amperometrik mikrobiyal biyosensörler	11
2.2. Potansiyometrik mikrobiyal biyosensörler	13
2.3. Potansiyometrik biyosensörlerle üretilen reaksiyonlarda iyonların serbest bırakılması veya absorplanması	15
2.4. Biyo-parlaklık ve floresan esaslı mikrobiyal biyosensörler	18
2.5. BOİ biyosensörlerinin performans özellikleri	34
2.6. Çeşitli atıksu örnekleri için ölçülen klasik ve biyosensör BOİ değerleri	39
3.1. Evsel ve Endüstriyel Atıksuların KOİ ve BOİ ₅ değerleri	48
3.2. Mineral tampon çözeltinin içeriği ve hazırlanışı	49
4.1. BOİ biyosensör sisteminde sürekli besleme ile yapılan debi çalışmalarında hesap edilen ölçüm limitleri	92
4.2. BOİ biyosensör sisteminde akım enjeksiyonu ile yapılan debi çalışmalarında hesap edilen ölçüm limitleri	92
4.3. Biyosensörde sürekli besleme yapılarak elde edilen BOİ değerleri	98
4.4. Biyosensörde enjeksiyon yapılarak elde edilen BOİ değerleri	98
4.5. Model çalışmasında kullanılan reaktör bilgileri ve model sonucu elde edilen katsayılar	99

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Biyosensörün şematik gösterimi	4
2.2. Basit bir amperometrik mikrobiyal biyosensörün şematik gösterimi	6
2.3. Glikoz çözeltileri için glikoz oksidaz kullanılan amperometrik biyosensörün yanıtı	8
2.4. Biyosensör gelişiminde flavo-oksidad enzimleri için amperometrik biyosensörlerin üç jenerasyonu	9
2.5. Basit bir potansiyometrik biyosensör	14
2.6. Kalorimetrik biyosensörün şematik gösterimi	19
2.7. Geri dönüşümsüz immobilizasyon tekniklerinin şematik gösterimi	21
2.8. Geri dönüşümlü immobilizasyon tekniklerinin şematik gösterimi	21
2.9. BOİ biyosensörünün şematik gösterimi. İmmobilize olmuş mikroorganizma topluluğunun Clark tip oksijen elektrodu ile birleşimi	28
2.10. BOİ biyosensörünün sürekli atıksu beslemesi yapılarak elde edilen tipik yanıt eğrisi	29
2.11. BOİ biyosensörünün atıksu örneği için yapılan akım enjeksiyon çalışması için elde edilen yanıt eğrisi	30
2.12. PHP polimerinin şekillenmesinin şematik diyagramı	44
2.13. STY-DVB Kopolimerinin SEM görüntüsü	45
3.1. Bakterilerin MGP disk içerisine immobilizasyonunun şematik gösterimi	51
3.2. BOİ Biyosensörün şematik gösterimi	52
3.3. BOİ ölçüm sistemi	53
3.4. Lineer kalibrasyonun üst güvenilirlik limitine göre kritik seviye (y_D) ve ölçüm limitinin (LOD) tanımı	54
3.5. Biyosensör sistemine KI enjeksiyonu sonucu elde edilen C/C_0 değerleri ile model uygulaması ile bulunan C/C_0 değerleri	57
3.6. Farklı sıcaklıklarda ölçülen çözünmüş oksijen değerlerine karşılık gelen akım değerleri ve kalibrasyon eğrisi	58

4.1.	Polimer diskin SEM görüntüleri	60
4.2.	MGP diskin immobilizasyon sonucu kesit görüntüsü	61
4.3.	Mikroorganizma immobilize edilmiş MGP diskin yüzey SEM görüntüleri	62
4.4.	Reaktör çıkış suyunun katı agara ekilmesi sonucu üreyen mikroorganizmalar	63
4.5.	0.5 ml/dak. akış hızında farklı BOI_5 değerleri için elde edilen akım değişimleri	66
4.6.	0.75 ml/dak. akış hızında farklı BOI_5 değerleri için elde edilen akım değişimleri	66
4.7.	1.00 ml/dak. akış hızında farklı BOI_5 değerleri için elde edilen akım değişimleri	67
4.8.	1.50 ml/dak. akış hızında farklı BOI_5 değerleri için elde edilen akım değişimleri	67
4.9.	Farklı debilerde ΔI (nA) değerlerine göre elde edilen kalibrasyon eğrileri	68
4.10.	Farklı debilerde $\delta i/\delta t$ değerlerine göre elde edilen kalibrasyon eğrileri	69
4.11.	60 mg/l BOI_5 için elde edilen ΔI ve $\delta i/\delta t$ değerleri	70
4.12.	Sürekli besleme tekniğinde biyosensörün ölçüm süresi	71
4.13.	Sensor yanıtı üzerine sıcaklığın etkisi	72
4.14.	Sensor yanıtı üzerine pH'nın etkisi	73
4.15.	Sensor yanıtı üzerine mikro-gözenekli polimer disk kalınlığının etkisi	75
4.16.	Enjeksiyon sisteminin şematik gösterimi	76
4.17.	0.4 ml/dak. için 5–500 mg/l konsantrasyon aralığında elde edilen pik yükseklikleri	78
4.18.	0.6 ml/dak. için 5–500 mg/l konsantrasyon aralığında elde edilen pik yükseklikleri	78
4.19.	0.8 ml/dak. için 5–500 mg/l konsantrasyon aralığında elde edilen pik yükseklikleri	79
4.20.	1.0 ml/dak. için 5–500 mg/l konsantrasyon aralığında elde edilen pik yükseklikleri	79

4.21.	1.2 ml/dak. için 5–500 mg/l konsantrasyon aralığında elde edilen pik yükseklikleri	80
4.22.	Debilere göre farklı konsantrasyonlarda elde edilen pik yükseklikleri	81
4.23.	0.4 ml/dak. için pik yüksekliği ve $\delta i/\delta t$ değerlerine göre kalibrasyon eğrileri	81
4.24.	0.6 ml/dak. için pik yüksekliği ve $\delta i/\delta t$ değerlerine göre kalibrasyon eğrileri	82
4.25.	0.8 ml/dak. için pik yüksekliği ve $\delta i/\delta t$ değerlerine göre kalibrasyon eğrileri	82
4.26.	1.0 ml/dak. için pik yüksekliği ve $\delta i/\delta t$ değerlerine göre kalibrasyon eğrileri	83
4.27.	1.2 ml/dak. için pik yüksekliği ve $\delta i/\delta t$ değerlerine göre kalibrasyon eğrileri	83
4.28.	Farklı konsantrasyonlar için debi değişimlerinde elde edilen $\delta i/\delta t$ değerleri	84
4.29.	Akım enjeksiyon tekniğinde biyosensörün ölçüm süresi	85
4.30.	Sensor yanıtı üzerine pH'nın etkisi	87
4.31.	Sensor yanıtı üzerine sıcaklığın etkisi	88
4.32.	Sensör yanıtı üzerine disk kalınlığının etkisi	90
4.33.	Sensor yanıtı üzerine enjeksiyon hacminin etkisi	90
4.34.	Biyosensörün tekrarlanabilirliği için sürekli ölçüm tekniğinde yapılan (a) dinamik ve (b) kinetik ölçüm sonuçları	93
4.35.	Biyosensörün tekrarlanabilirliği için yapılan enjeksiyon çalışmaları	94
4.36.	Farklı MGP diskler için sürekli ölçüm tekniğine göre 40 mg/l BOİ ₅ konsantrasyonunda elde edilen kinetik ve dinamik ölçüm sonuçları	95
4.37.	BOİ Biyosensörün tekrar üretilebilirliği için akım enjeksiyon çalışmalarında üç farklı diskte 50–100 ve 200 mg/l için elde edilen pik yükseklikleri	96
4.38.	BOİ biyosensörünün 100 mg/l BOİ için elde edilen stabilitesi	97
4.39.	0.4 ml/dak. için farklı BOİ ₅ konsantrasyonları için elde edilen	

	deneysel ve teorik pik yükseklikleri	100
4.40.	0.6 ml/dak. için farklı BOI_5 konsantrasyonları için elde edilen deneysel ve teorik pik yükseklikleri	101
4.41.	0.8 ml/dak. için farklı BOI_5 konsantrasyonları için elde edilen deneysel ve teorik pik yükseklikleri	101
4.42.	1.0 ml/dak. için farklı BOI_5 konsantrasyonları için elde edilen deneysel ve teorik pik yükseklikleri	102
4.43.	0.4 ml/dak. için elde edilen kalibrasyon eğrileri	103
4.44.	0.6 ml/dak. için elde edilen kalibrasyon eğrileri	104
4.45.	0.8 ml/dak. için elde edilen kalibrasyon eğrileri	104
4.46.	1.0 ml/dak. için elde edilen kalibrasyon eğrileri	105

1. GİRİŞ

Biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ), su ve atıksularda biyolojik olarak parçalanabilir organik maddelerin belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir. BOİ değerleri biyolojik olarak parçalanabilir organik maddelerin miktarları yanında sülfidler ve demir gibi inorganik maddelerin okside olması için gerekli oksijen miktarını ve inhibitör tarafından engellenmemiş azotun indirgenmiş formlarını okside etmek için gerekli oksijen miktarını göstermektedir [APHA, 1992]. Biyolojik aerobik atıksu arıtma tesisleri parçalanabilen organik maddelere göre tasarlanır. Bu nedenle prosesin BOİ analizleri ile izlenmesi en doğru yöntemlerden biridir. Yüzey sularına deşarj standartlarının giderek sıkılaşması atıksu arıtma sistemlerinin de işletim verimlerinin daha etkin ve sürekli izlenmesini gerektirmektedir. Bunun sonucu olarak atıksu arıtımında kullanılan parametrelerin sistemde otomasyona izin verebilecek ve anlık değişimleri gösterebilecek özellikte olmaları gerekmektedir. Fakat BOİ₅ testi 5 günlük inkübasyon periyodunu içerdiğinden zaman alıcıdır ve çevrimiçi izleme için uygun değildir. Dolayısıyla, son yıllarda BOİ ölçümlerini hızlı ve güvenilir bir şekilde yapabilmek amacıyla mikroorganizmaların solunum hızlarına dayalı biyosensör çalışmaları yürütülmektedir. İlk BOİ biyosensör çalışması 1977 yılında Karube ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır [Karube *et al.*, 1977]. Bugüne kadar çeşitli modifikasyonlar uygulanarak geliştirilmiş biyosensör çalışmaları literatürde yer almıştır. Bu geliştirilen BOİ biyosensörlerinin ölçüm prensipleri amperometrik, respirometrik, biyo-yakıt hücreli, aracılı tip ve optik biyosensörler olarak sınıflandırılabilir [Hikuma and ark., 1979, Strand and Carlson, 1984, Karube *et al.*, 1989, Li and Chu, 1991, Tan and Qian, 1997, Gab-Joo *et al.*, 1999, Chiyui *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2004, Praet *et al.*, 1995, Sohn *et al.*, 1995, Heim *et al.*, 1999, Vaiopoulou *et al.*, 2005, Karube *et al.*, 1977a, Chang *et al.*, 2004, Chang *et al.*, 2005, Yoshida *et al.*, 2000, Yoshida *et al.*, 2001, Gab-Joo *et al.*, 2000, Yoshida *et al.*, 2001a, Kwok *et al.*, 2005].

BOİ biyosensörleri, özellikle amperometrik ölçüm tekniği kullanılarak geliştirilenler, biyolojik tanıma elemanı olarak kullanılan mikroorganizmaların poroz selüloz (dializ) membran ve gaz-geçirebilen (teflon) membran arasına hapsedilerek

oluşturulmuş biyo-film tipi sensörlerdir. Sensörün yanıtı çözünmüş oksijendeki değişim olarak alınmaktadır. Atıksu örneği sensör sistemine enjekte edildiğinde organik maddeler diyaliz membrandan difüze olarak immobilize bakteriler tarafından sindirilirler ve bunun sonucu olarak bakteri solunum hızının ve oksijen tüketiminin artmasına sebep olurlar. Dolayısıyla daha az oksijen teflon membrandan difüze olacağından sensör sinyalinde azalma görüleceği bilinmektedir. Bu proses substrat difüzyonu ile kontrol edildiğinden sensör sinyali, ölçülecek olan organik substratın konsantrasyonu ile orantılı olacaktır. Substrat difüzyonu, biyofilm tipi sensör uygulamalarında prosesin işleyişini kontrol eden önemli parametrelerden biridir. Literatürde yer alan çalışmalarda mikroorganizma kalınlığının sensör yanıtına etkisi incelenmiş ve mikroorganizma miktarının artması ile sensör sinyalinin arttığı fakat bu artışın sınırlı olduğu ve daha sonra azalmaya başladığı görülmüştür. Bu durumun organik maddenin membrandan ve mikroorganizma tabakasından sınırlı difüzyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir [Kwok ve ark., 2005, Gab-Joo ve ark., 1999, Rastogi ve ark., 2003, Chiyui ve ark., 2000, Gab-Joo ve ark., 2000]. Mikrobiyal BOİ biyosensör sistemlerinde diğer bir problemde immobilize mikroorganizmaların eriyip yok olması sonucu işletme süresinin kısıtlanması ve diyaliz membran yüzeyinin bakteriler tarafından kirlenmesi sonucu substrat geçişinin engellenmesidir.

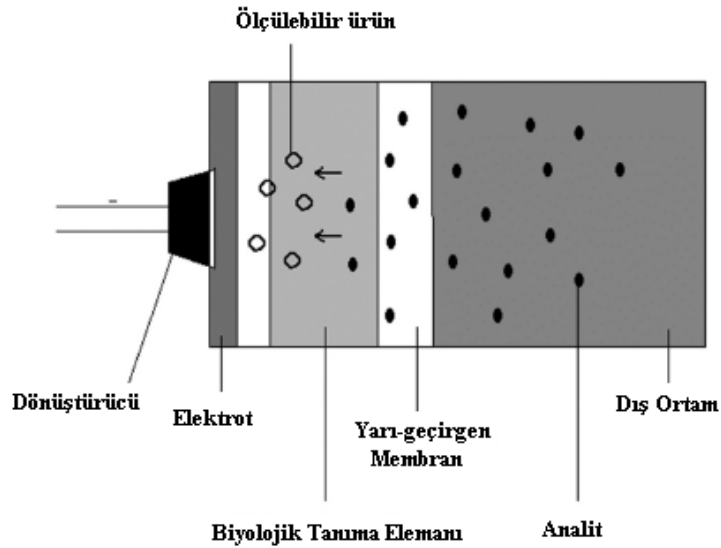
Mikrobiyal BOİ biyosensör uygulamalarında meydana gelen bu kısıtlamalar göz önüne alındığında, bu çalışmada biyo-katalitik materyali üzerinde taşıyan mikro gözenekli polimer (MGP) kullanılarak yeni bir BOİ biyosensörü geliştirilmiştir. MGP, hücrelerin tutuklandığı materyal olarak kullanılmaktadır. Polimerin hidrofobik yapısı sayesinde mikroorganizmalar ortama tutunarak polimer diskin duvarlarında gelişmektedirler. Mikroorganizmaların MGP içerisine immobilizasyonu basınç sürücülü aşılama tekniği ile yapılmaktadır. Basınç sürücülü aşılama tekniğinde mikroorganizmalar, kendi boyutlarından daha büyük iç bağlantı boşlukları olan MGP içerisine yavaşça nüfuz etmektedir [Erhan ve ark., 2004]. MGP gözenekleri içerisine nüfuz eden mikroorganizmalar basınçlı ortamda sürekli akışın meydana getirdiği kesme kuvvetlerinin sonucu olarak gözenek duvarlarında tek tabaka bir yapı oluşturmaktadırlar [Akay ve ark., 2005]. Dolayısıyla mikro gözenekli polimerik madde içerisinde meydana gelen tek tabaka biyofilm içerisine substrat ve çözünmüş oksijenin difüzyonu kolaylıkla sağlanmaktadır. Bunun yanında gözenek duvarlarında

oluşan biyofilmin kalınlığı kesme kuvvetinden dolayı sabit kalmakta ve mekanik olarak parçalanarak özelliğini kaybeden mikroorganizmalar çözelti ile birlikte sistemden uzaklaşmaktadır. Ayrıca diyaliz membranının kirlenmesi sonucu biyosensörün işletme süresinin az olması, oksijen probunun biyokatalitik MGP diskten ayrı olarak tasarlanması ile daha uzun olabilecektir.

Bu çalışmada, biyolojik olarak parçalanmaya dirençli organik maddeleri sindirmekte başarılı olan *Pseudomonas syringae* türünün MGP içerisine immobilize edilmesi ile sensörün biyo-katalitik kısmının oluşturulduğu yeni bir mikrobiyal BOİ biyosensörü geliştirilmiştir. Geliştirilen yeni sensör sistemi ile iki farklı ölçüm tekniği (sürekli ve akım enjeksiyonu) kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. Her iki ölçüm tekniği için sensörün stabilitesi ve sensör ömrü test edilmiştir. Ayrıca geliştirilen yeni sistemin tekrarlanabilirliği ve tekrar üretilebilirliği incelenmiş ve BOİ için geçerli kontrol limitlerinin altında sonuçlar elde edilmiştir. Sensör yanıtı üzerine pH, sıcaklık, MGP disk kalınlığı ve enjeksiyon hacmi gibi parametrelerin etkisi çalışılmıştır. Geliştirilen BOİ biyosensörü optimum şartlarda glikoz-glutamik asit (GGA) çözeltisi ile kalibre edilerek gerçek atıksu örnekleri analiz edilmiştir. BOİ sensörü ile elde edilen sonuçlar klasik BOİ₅ değerleri ile karşılaştırılmış ve sensörün doğruluğu test edilmiştir. Bu çalışma kapsamında son olarak bir dispersiyon modeli geliştirilmiş ve bu model verileri enjeksiyon çalışmalarında farklı debilerde elde edilen datalar ile birlikte değerlendirilmiştir. Ayrıca model sonucu elde edilen veriler ile kalibrasyon eğrileri oluşturularak deneysel olarak elde edilen kalibrasyon eğrileri ile karşılaştırılmıştır.

2. BİYOSENSÖRLER

Biyosensörler, fiziksel güç çeviricilere bağlanmış veya entegre olmuş biyolojik elementten oluşan ve ölçülen madde konsantrasyonuna bağlı olarak sinyal oluşturan ölçüm aletleri olarak bilinmektedir (Şekil 2.1). Bu sinyal, hedef bileşiğin metabolizmasına bağlı olarak meydana gelen potansiyel değişim, elektron transferi, ışığın ürün veya reaktant tarafından emilmesi, sıcaklık veya kütle değişimi gibi olayların sonucu olarak oluşmaktadır. Güç çeviriciler bu biyolojik sinyali akım, potansiyel veya ışığın optik veya elektrokimyasal yöntemlerle absorpsiyonu gibi ölçülebilir yanıtlara çevirmektedir [Turner et al., 1992, Mulchandani ve Rogers, 1998, Tran, 1993, Lei et al., 2006].



Şekil 2.1. Biyosensörün şematik gösterimi

Enzim, antikor, reseptör ve mikroorganizmalar gibi hayvan ve bitki hücre veya dokularından elde edilen biyo—moleküller biyolojik tanıma elemanı olarak kullanılmaktadırlar. Enzimler biyosensör yapımında en çok kullanılan biyolojik tanıma elemanlarıdır [Turner et al., 1992; Mulchandani ve Rogers, 1998; Tran, 1993; Mikkelsen ve Corton, 2004]. Saflaştırılmış enzimlerin ürünlere veya inhibitörlere karşı çok yüksek özgüllükleri varken biyosensör yapımındaki uygulamaları enzim saflaştırma işlemlerinin zaman alması, usandırıcı olması ve pahalı olması, ölçülebilir

ürünler elde etmek için çoklu enzimlere veya ko—enzimlere ihtiyaç duyulması gibi faktörlerden dolayı kısıtlanmaktadır. Mikroorganizmalar bu tür problemlere karşı ideal alternatifler sağlamaktadırlar [Arikawa et al., 1998]. Hücre içerisinde yer alan birçok enzim ve ko—faktörler hücrelerin çok sayıda kimyasalı tanımasını ve tüketmesini sağlamaktadırlar. Mikroorganizmalar uygun üreme koşullarında yeni organik maddeleri tüketmek ve parçalamak için kolaylıkla adapte edilebilirler [Jain et al., 1994; Leung et al., 1997; Spain and Nishino, 1987]. Ayrıca mikroorganizmaların geniş aralıkta kimyasal maddeleri sezmekte yetenekli olmaları, mutasyon veya rekombinant DNA teknolojisi gibi genetik modifikasyonlara uymaları, geniş pH ve sıcaklık aralıklarında çalışabilmeleri gibi avantajlarının olması onları biyolojik tanıma elemanı olarak ideal kılmaktadır. Mikroorganizmalar, amperometrik, potansiyometrik, sıcaklık, iletkenlik, kalorimetrik, parlaklık ve floresan gibi çeşitli dönüştürücüler ile entegre edilerek mikrobiyal biyosensör yapımında kullanılmaktadırlar [Turner et al., 1992; Mulchandani and Rogers, 1998; Tran, 1993; Mikkelsen and Corton, 2004; Blum and Coulet, 1991; Nikolelis et al., 1998; Ramsay, 1998; D’Souza, 1997].

2.1. Biyosensörlerde Enerji Dönüştürücüler

Mikrobiyal biyosensörlerde enerji çeviriciler biyo—aktif tabakadan meydana gelen uyarıyı elektrik sinyaline dönüştüren ve elektronik ile gücü artırılıp analitik uygulanabilir detaya çeviren fiziksel elementlerdir. Enerji dönüştürücüler elektrokimyasal, optik ve diğer güç çeviricileri olarak gruplandırılabilirler.

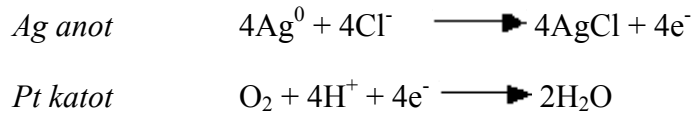
2.1.1. Elektrokimyasal Biyosensörler

2.1.1.1. Amperometrik Biyosensörler

Ampermetre, sabit potansiyel uygulanan sürekli akım durumlarını izlemek üzere kurulmuştur. Sistem, çalışan, referans ve yardımcı elektrot olmak üzere üç elektrottan oluşmaktadır. Çalışan elektrotun potansiyel kararlılığı potansiyostat ile kontrol edilmektedir. Çalışan elektrot immobilize biyo-aktif tabaka içermektedir. Bu üç elektrotun tasarımı hareketsiz veya karıştırmalı şartlarda ve akış sistemlerinde

Merkez Pt katot ile halka şeklindeki Ag anot arasında bir potansiyel uygulanmaktadır. Bu potansiyel, çözünmüş KCl çözeltisi ile elektrotlar arasında “I” akımını oluşturmaktadır. Elektrot bölmeler, sadece oksijen geçiren ince plastik membran ile biyokatalistten ayrılmaktadır. Analit çözeltisi ise substratlar ve ürünler için geçirgen olan diğer bir membran ile biyokatalistten ayrılmaktadır.

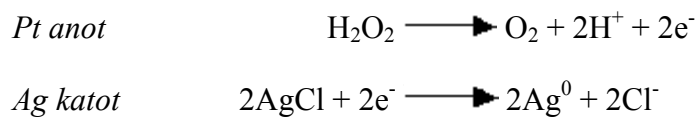
Bu sistemde aşağıdaki reaksiyon oluşmaktadır;

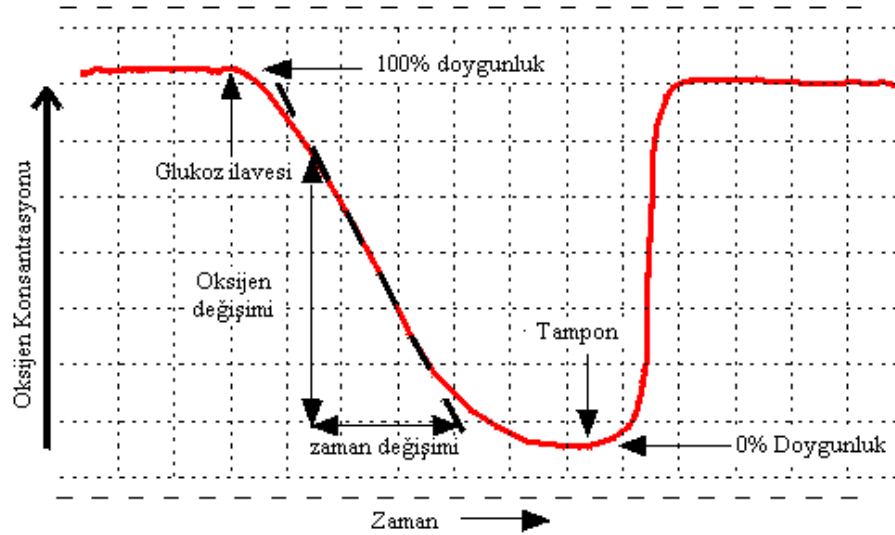


Katot yüzeyinde etkili bir oksijen azalımı zamanla oksijen konsantrasyonunun sıfır olmasına sebep olmaktadır. Bu elektrokimyasal azalma hızı, ana oksijen konsantrasyonu ve konsantrasyon gradyanına bağlı olarak çözeltideki oksijenin difüzyon hızına bağlıdır. Bu proses sırasında tüketilen oksijenin oksijen elektrotları yerine iyon seçicili elektrotlar ile ölçümü daha güvenilir sonuçlar vermektedir.

Bu tip biyosensörleri tipik bir uygulaması olarak immobilize glikoz oksidaz membran kullanarak glikoz konsantrasyonlarının belirlenmesi gösterilebilir. Bu reaksiyonda çözelti biyo-katalitik membrandan katoda difüze olurken oksijen konsantrasyonunda bir azalma gözlenmektedir. Oksijen konsantrasyonunun azalması elektrotlar arasında akı azalmasına sebep olmaktadır. Şekil 2.3’te bu reaksiyonun zamana karşı oksijen azalması gösterilmiştir.

Bu reaksiyonun hızının ölçülmesi için diğer bir alternatif metot ise platin elektrota +0.68 V potansiyel uygulayarak hidrojen peroksit üretim miktarını ölçmektir. Bu proseste aşağıdaki reaksiyonlar olmaktadır;



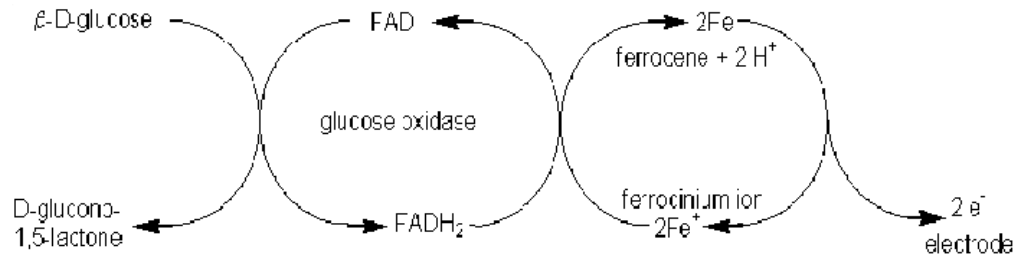


Şekil 2.3. Glikoz çözeltileri için glikoz oksidaz kullanılan amperometrik biyosensörün yanıtı.

Bu tür biyosensörlerde ana problem çözünmüş oksijen konsantrasyonuna bağımlı olmalarıdır. Bu problem elektronları direkt olarak elektrotta transfer eden ‘aracılar’ kullanılarak giderilebilir. Bu araçların uygulanabilir olması için bazı özellikleri içermelidir;

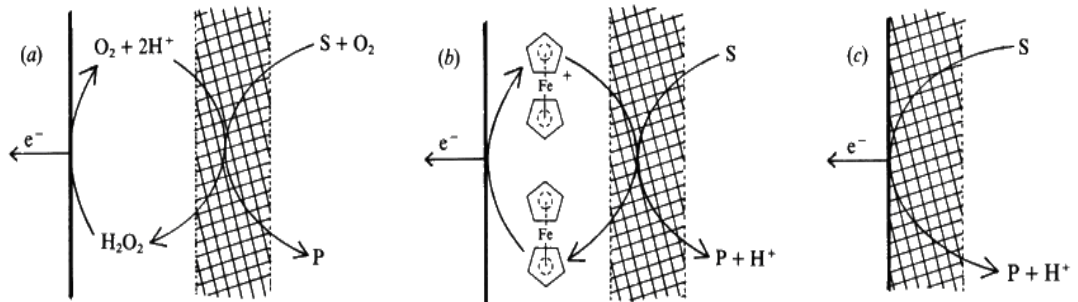
- İndirgenmiş enzimler ile hızlı bir şekilde reaksiyona girmelidirler,
- Okside olmuş veya indirgenmiş formları enzimin aktif sitesi ile elektrot yüzeyi arasında hızlı difüze olması için çözünebilir olmalıdırlar. Bu çözünürlük biyosensörden ana çözeltiye aracı kaybı olmaması için çok büyük olmamalıdır. Toksik olmamalıdırlar,
- Okside olmuş araçların elektrottaki potansiyeli düşük olmalı ve pH’ya bağlı olmalıdır,
- Aracının indirgenmiş formu oksijen ile reaksiyona girmemelidir.

Aracı olarak daha çok ferrosen kullanılmaktadır. Ferrosenin reaksiyonları aşağıda gösterilmiştir;



Günümüzde aracı kullanmadan indirgenmiş enzimlerden elektronların giderilmesinde yeni metotlar geliştirilmiştir. Bu tür elektrotlar elektrik olarak iletken organik tuzlar ile kaplanmaktadır. Bu tür enzim elektrotlar, elektrotu enzim çözeltisi içerisine daldırarak hazırlanırlar ve aylarca stabil olarak kalabilirler.

Ürün, aracı veya organik iletkenleri kullanan amperometrik biyosensörler, biyosensör gelişiminde üç jenerasyon göstermektedirler. Şekil 2.4'te biyosensör gelişiminde flavo-oksidad enzimleri için amperometrik biyosensörlerin üç jenerasyonu gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Biyosensör gelişiminde flavo-oksidad enzimleri için amperometrik biyosensörlerin üç jenerasyonu. (Taralı alan biyokatalist olarak gösterilmiştir).

Her üç biyosensörde enzimde aşağıdaki reaksiyon meydana gelmektedir:



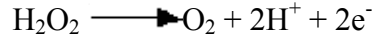
Birinci jenerasyon (a) elektrotu reaksiyon ($E_0 = +0,68 \text{ V}$) ile üretilen H_2O_2 'yi kullanmaktadır.

Reaksiyon ise şu şekilde olmaktadır;

(a) *biyokatalist*



elektrot



İkinci jenerasyonda ise reaksiyon sonucu ($E_0 = +0,19 \text{ V}$) oluşan elektronların elektrona transferi için medyatör kullanılmaktadır. İkinci jenerasyon için reaksiyon şu şekilde olmaktadır;

(b) *biyokatalist*



elektrot



Üçüncü jenerasyon elektrot ise direkt olarak reaksiyon sonucu üretilen elektronları almaktadır.

(c) *biyokatalist/elektrot*



Amperometrik biyosensörlerle üretilen akım (i) reaksiyon hızı (v_A) ile bağlantılıdır ve şu şekilde ifade edilir;

$$i = n F A v_A$$

Burada, n ; transfer edilen elektronların sayısı, A ; elektrot alanı, F ; Faraday sayısıdır. Reaksiyon hızı genelde membranların kullanılması ile difüzyon kontrollüdür. Dolayısıyla bu şartlar altında üretilen elektrik akımı analit konsantrasyonu, enzim ve elektrokimyasal kinetiklere bağlıdır.

Amperometrik mikrobiyal biyosensörler özellikle BOİ ölçümü için geliştirilmiş bunun yanında etanol, şeker, sakaroz, fenol ve fenol türevleri, siyanür, yüzey aktif maddeler ve ağır metaller gibi çeşitli parametreler için de geliştirilmiştir. Üzerinde çalışılan amperometrik mikrobiyal biyosensörlerin ölçüm parametreleri ile kullanılan türleri bakımından incelenmesi Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Amperometrik mikrobiyal biyosensörler

Analiz Edilecek Parametre	Mikroorganizma	Referans
BOİ	<i>A. adeninivorans</i> LS3	Chan et al., 2000
	<i>C. parapsilosis</i>	König et al., 2000
	<i>Maya</i>	Chen et al., 2002
	<i>T. cutaneum</i> and <i>B. subtilis</i>	Jia et al., 2003
	<i>T. candida</i>	Sangeetha et al., 1996
	<i>T. cutaneum</i>	Yang et al., 1997
	<i>T. cutaneum</i>	Marty et al., 1997
	<i>P. putida</i>	Chee et al., 1999
	<i>K. oxytoca</i> AS1	Ohki et al., 1994
	<i>B. subtilis</i> (heat killed)	Tan and Qian, 1997
	<i>B. subtilis</i>	Riedel et al., 1988
	<i>A. adeninivorans</i> LS3	Riedel et al., 1998
	<i>A. adeninivorans</i> LS3	Chan et al., 1999
	<i>A. adeninivorans</i> LS3	Tag et al., 2000
	<i>A. adeninivorans</i> LS3	Tag et al., 2000a
	<i>Serratia marcescens</i> LSY4	Kim and Kwon, 1999
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Li and Chu, 1991
	<i>P. fluorescens</i>	Yoshida et al., 2000
	<i>P. fluorescens</i>	Yoshida et al., 2001
	<i>P. putida</i> SG10	Chee et al., 2005
	<i>T. bacteria</i>	Karube et al., 1989
	<i>SEED</i>	Tan and Wu, 1999
	<i>Rh. erythropolis</i> ve <i>Is. orientalis</i>	Heim et al., 1999
	<i>B. subtilis</i> ve <i>B. licheniformis</i> 7B	Tan et al., 1992
	<i>B. subtilis</i> ve <i>B. licheniformis</i> 7B	Tan et al., 1993
	Mikrobiyal topluluk	Liu et al., 2004
	Mikrobiyal topluluk	Rastogi et al., 2003
	<i>Maya</i> SPT1 ve SPT2	Trosok et al., 2001

Çizelge 2.1. Amperometrik mikrobiyal biyosensörler (devam)

Analiz Edilecek Parametre	Mikroorganizma	Referans
Etanol	<i>G. oxydans</i> veya <i>P. methanolica</i> <i>A. aceti</i> (IFO 3284) <i>C. vini</i> <i>AOx (Hansenula polymorpha)</i> <i>C. tropicalis</i> <i>S. ellipsoideus</i>	Reshetilov et al., 2001 Ikeda et al., 1997 Macsini et al., 1989 Wu et al., 2008 Akyılmaz ve Dinçkaya, 2005 Rotariu and Bala, 2003
Şeker	<i>G. oxydans</i> <i>Glikoz oksidaz</i> <i>Glikoz oksidaz</i>	Tkac et al., 2000 Patel et al., 2003 Jia et al., 2008
Organofosfatlar	Rekombinant <i>Moraxella</i> Rekombinant <i>P. putida</i>	Mulchandani et al., 2001 Lei et al., 2005
Siyanür	<i>S. cerevisiae</i> <i>T. ferrooxidans</i> <i>P. fluorescents</i> NCIMB 11764 <i>S. cerevisiae</i>	Ikebukuro et al., 1996 Okochi et al., 2004 Lee and Karube, 1996. Nakanishi et al., 1996
Hidrojen peroksit	<i>A. peroxydans</i>	Rajasekar et al., 2000
Asetik asit	<i>F. solani</i>	Subrahmanyam et al., 2001
Bakır	Rekombinant <i>S. Cerevisiae</i> yeast	Lehmann et al., 2000 Tag et al., 2007
Kadmiyum	Rekombinant <i>E. Coli</i>	Biran et al., 2000
<i>p</i> -Nitrophenol	<i>A. JS 443</i> <i>A. JS 443</i> <i>M. sp.</i> <i>M. sp.</i>	Lei et al., 2004 Lei et al., 2003 Mulchandani et al., 2002 Mulchandani et al., 2005
Fenol bileşikleri	<i>P. putida</i> <i>Fenol oksidaz</i> <i>Tyrosinase/laccase</i> <i>H. Peroksidaz ve glikoz oksidaz</i>	Timur ve ark., 2004 ElKaoutit et al., 2008 Kochana et al., 2008 Chen et al., 2008

2.1.1.2. Potansiyometrik Biyosensörler

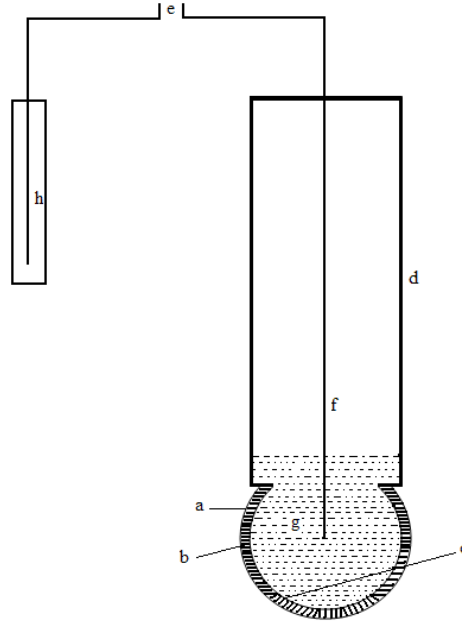
Klasik potansiyometrik biyosensörler, pH, amonyum, klor vb gibi iyon seçici elektrotlar veya karbondioksit, amonyak gibi gaz-seçici elektrotların mikrobiyal bir tabaka ile kaplanmasıyla oluşan sensörlerdir. Mikroorganizmalar analiti tüketirken iyon birikmesi veya boşalması sonucu oluşan potansiyelde bir değişim meydana getirmektedirler. Potansiyometrik enerji dönüştürücüler çalışan elektrot ile referans elektrot arasındaki farkı ölçerler ve elde edilen sinyal analitin konsantrasyonu ile korele edilir [Mulchandani and Rogers, 1998, Tran 1993, Simonian et al., 1998]. Analiz edilen örnek ile üretilen potansiyel arasında logaritmik bir ilişki olmasından dolayı bu tip biyosensörlerde geniş aralıklarda ölçümler yapmak mümkündür. Potansiyometrik mikrobiyal biyosensörlere örnekler Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Potansiyometrik mikrobiyal biyosensörler

Analiz Edilecek Parametre	Mikroorganizma	Dönüştürücü Tipi	Referans
Organofosfatlar	<i>Flavobacterium</i>	pH elektrodu	Gaberlein et al., 2000
	Rekombinant <i>E. Coli</i>	pH elektrodu	Mulchandani et al., 1998
	Rekombinant <i>E. Coli</i>	pH elektrodu	Mulchandani et al., 1998a
Penisilin	Rekombinant <i>E. Coli</i>	pH elektrodu	Galindo et al., 1990
	Rekombinant <i>E. Coli</i>	pH elektrodu	Chao and Lee, 2000
Üre	<i>Bacillus sp.</i>	NH ₄ iyon seçici elektrot	Verma and Singh, 2003
Trikloroetilen	<i>P. aeruginosa</i> JI104	Klor iyon seçici elektrot	Han et al., 2002
	<i>P. aeruginosa</i> JI104	Klor iyon seçici elektrot	Han et al., 2001
Etanol	<i>S. ellipsoideas</i>	Oksijen	Rotariu et al., 2004
Sukroz	<i>S. cerevisiae</i>	Oksijen	Rotariu et al., 2002

Potansiyometrik mikrobiyal biyosensörlerin en basit örneği, katalizlenmiş reaksiyonların olduğu veya hidrojen iyonlarının absorplandığı pH metre probunun immobilize enzim membranı ile kaplanmasıyla oluşturulan elektrottur. Şekil 2.5’te basit bir potansiyometrik biyosensör ile Çizelge 2.3’te potansiyometrik

biyosensörlerle üretilen reaksiyonlarda iyonların serbest bırakılması veya absorplanması gösterilmiştir. Cam membran yakınında meydana gelen reaksiyon pH metre tarafından direkt olarak okunabilen pH' da değişikliğe sebep olmaktadır. pH' daki bu değişim elektrik potansiyeli ile açıklanmaktadır.



Şekil 2.5. Basit bir potansiyometrik biyosensör. (a) yarı geçirgen membran, (b) biyokatalist, (c) aktif cam membran, (d) pH probu, (e) Elektrik potansiyeli, (f) Probe içindeki Ag/AgCl elektrot, (g) HCl asit, (h) dış referans elektrot.

Biyosensör olarak kullanılan üç tür iyon-seçici elektrot vardır:

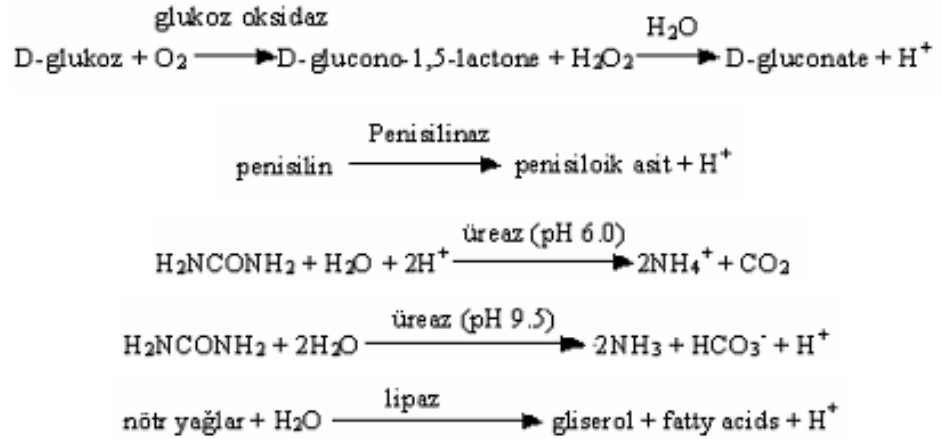
1) Spesifik bağlanma siteleri için konsantrasyona bağlı olarak katyonlar arası yarışmaya bağlı elektrik potansiyeli üreten hidrata olmuş cam membranların seçici eleman olarak kullanıldığı cam elektrotlar. Bu membranın seçiciliği camın kompozisyonu ile açıklanmaktadır. H^+ iyonuna olan seçicilik NH_4^+ iyonuna göre daha büyüktür.

2) CO_2 , NH_3 veya H_2S için seçici gaz geçiren membran ile kaplanmış cam pH elektrotu. Gazın membrandan difüzyonu sırasında membran ile elektrot arasındaki çözeltide ölçülen pH'da değişiklik meydana gelmektedir.

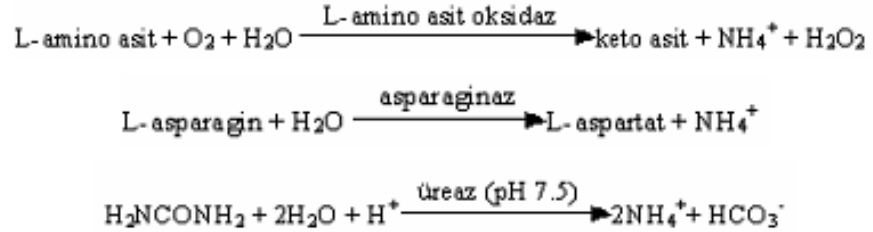
3) Gümüş sülfid ve gümüş halojenür karışımı ile yapılan spesifik iyon iletkenli ince membranın cam membran yerine kullanılması ile yapılan katı-durumlu elektrotlar.

Çizelge 2.3. Potansiyometrik biyosensörlerle üretilen reaksiyonlarda iyonların serbest bırakılması veya absorplanması

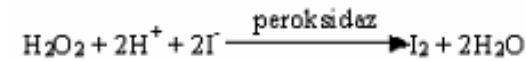
(a) H⁺ katyon



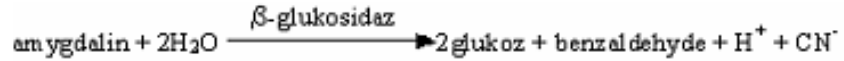
(b) NH₄⁺ katyon



(c) I⁻ anyon



(d) CN⁻ anyon



2.1.1.3. İletkenlik Biyosensörleri

Birçok mikroorganizma katalizli reaksiyonlar iyonik türlerdeki değişimi içermektedir. Bu değişim reaksiyon çözeltisindeki iletkenlikte meydana gelen net değişim ile ilişkilendirilmiştir. Bu biyosensörler biyolojik parçaların immobilize

olduğu platin veya altın elektrotlardan oluşmaktadır. Enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan ürünler elektrotlar arasında iletkenliği değiştirmekte ve sinyal oluşturmaktadır. Bu sensörlerin performansı iyonik çevrenin konsantrasyonuna bağlıdır ve böylece meydana gelen herhangi bir değişim önceden bilinmeyen sonuçları oluşturur [Turner et al., 1992, Mulchandani and Rogers, 1998, Tran, 1993].

2.1.2. Optik Biyosensörler

Optik mikrobiyal biyosensörlerde hedef analitin biyokatalist ile olan etkileşimleri sonucu UV-absorpsiyon, biyolojik/kimyasal parlaklık, yansıma ve floresan gibi optik özelliklerinin değişimi esas alınarak modülasyonu yapılmaktadır. Optik biyosensörlerde fiber optik destekler kullanılmaktadır. İki optik kurşun, bir kaynak ve detektör, reaksiyon kabı ve immobilize biyo-katman bölmeden oluşmaktadır. Kimyasal ajanlı ve ajansız fiber optik biyosensörler olmak üzere iki grupta sınıflandırılırlar. Kimyasal ajanlı fiber optik biyosensörler örnek çözeltiden gaz-geçirmez membran ile ayrılan indikatör çözelti veya boya içeren reaksiyon bölgesine bağlı tellerden oluşmaktadır. Ajansız fiber optik biyosensörlerde ise biyokataliz reaksiyon her bir ürünün veya optik olarak ölçülebilen tüketimin direkt izlenmesi olarak tasarlanmıştır. Fiber optik aletlerin diğer sistemlere göre avantajları birçok dalga boyunun tek bir optik fiber ile izlenebilmesidir. Ayrıca, ayırıcı referans elemente ihtiyaç yoktur ve sensörün tekrar kalibrasyonu için gerekli güç ölçüm oranları minimumdur.

Optik biyosensörlerin avantajlarını şu şekilde sıralayabiliriz;

- Sensör ölçümlerinde genellikle referans kaynak kullanıldığı halde optik sensörler ile yapılan ölçümlerde referans elektrota gerek yoktur.
- Elektriksel girişim bulunmamaktadır.
- Immobilize mikroorganizmalar optik tellerle temas halinde bulunmasına gerek olmadığı gibi sistemden kolaylıkla değiştirilebilirler.
- Elektriksel değişimlere dayanıklıdırlar.
- Oksijen gibi analitler denge içinde analiz edilebilirler.

- İki farklı dalga boyundaki yoğunluklarının oranı ölçülebiliyorsa kalibrasyonla ilgili olarak oldukça stabildirler.
- Birden fazla analit ile simultane olarak ölçüm yapılabilir.
- Biyo-katalitik bölümdeki değişiklikleri izlemek amacıyla çok dalga boylu ölçümler yapılabilir.
- Elektriksel dönüştürücülere göre daha fazla tanımlama içerme potansiyeli bulunmaktadır.

Optik biyosensörlerin dezavantajları ise şu şekildedir;

- Ancak uygun biyo-katalitik aktivite geliştirildiğinde çalışabilmektedirler.
- Çevrenin ışığından etkilenebilmektedirler.
- Elektriksel sensörlerle kıyaslandığında ölçüm aralığı daha dardır.
- Düşük ışık yoğunluklarında biyo-katalitik aktivitenin stabilitesini sağlamak zordur.
- Analitlerin biyo-katalitik katmana kütle transferinin uzun sürmesi dolayısıyla yanıt süresi zaman almaktadır.

Bugüne kadar üzerinde çalışılmış biyo-parlaklık ve floresan esaslı mikrobiyal biyosensörler Çizelge 2.4'te gösterilmiştir.

2.1.3. Diğer Mikrobiyal Biyosensörler

2.1.3.1. Piezoelektrik Biyosensörler

Piezoelektrik olay mekanik olarak deforme olmuş bazı kristallerin yüzeyindeki elektrik potansiyeline bağlıdır. Kristal sallanan elektrik alan içine yerleştirildiğinde oluşan ters etki piezoelektrik kristalin aynı frekansta mekanik olarak titremesidir. Pratik uygulaması kuartz tabaka üzerinde kütle değişimlerinden kaynaklanan rezonans frekans değişimlerine dayanmaktadır. Yüzeyi biyo-aktif tabaka ile kaplayarak güçlü bir biyosensör elde edilir [Nakanishi et al., 1996]. Bu biyosensör

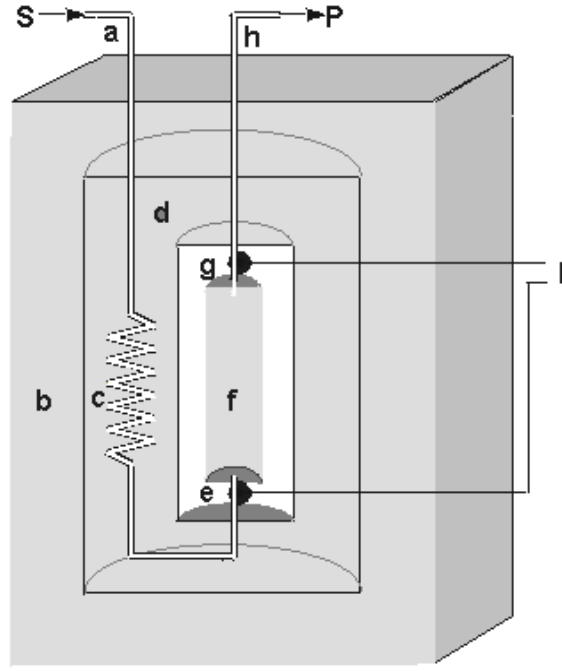
biyo-katmandaki kütle değişimlerini veya çözeltideki viskozite değişimlerini izleyebilmektedir.

Çizelge 2.4. Biyo-parlaklık ve floresan esaslı mikrobiyal biyosensörler.

Analiz Edilecek Parametre	Mikroorganizma	Dönüştürücü Tipi	Referans
Ni ²⁺ ve Co ²⁺	<i>Ralstonia eutropha</i> AE2515	Biyo-parlaklık	Tibazarwa et al., 2001
Civa	<i>E. coli</i> MC1061 <i>E. coli</i> HMS174 <i>E. coli</i> HMS174	Biyo-parlaklık	Roda et al., 2001 Rasmussen et al., 2000 Barkay et al., 1997
Bakır	<i>P. fluorescens</i> DF57	Biyo-parlaklık	Petersen et al., 2001
Fosfor	<i>Synechococcus</i> PCC 7942	Biyo-parlaklık	Schreiter et al., 2001
Naftalin	<i>P. putida</i>	Biyo-parlaklık	Werlen et al., 2004
Halojen organik asitler	Recombinant <i>E. coli</i>	Biyo-parlaklık	Tauber et al., 2001
Toksisite	<i>E. coli</i> /HB101 pUCD607	Biyo-parlaklık	Horsburgh et al., 2002 Bechor et al., 2002
Klorofenol	<i>P. fluorescens</i> 10586r pUCD607	Biyo-parlaklık	Tiensing et al., 2002
UV	Recombinant <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> FRD1	Biyo-parlaklık	Rosen et al., 2000 Elasri and Miller, 1999
Demir	Recombinant <i>Pseudomonas syringae</i>	Floresan	Joyner and Lindow, 2000
Arsenik	<i>E. coli</i> DH5	Floresan	Wells et al., 2005
Toluen	<i>P. fluorescens</i> A506	Floresan	Casavant et al., 2003
BOİ	Deniz suyu mikroorganizmaları <i>P. putida</i>	Floresan	Dai et al., 2004 Chee et al., 2000

2.1.3.2. Kalorimetrik Biyosensörler

Enzim kataliz reaksiyonların çoğu ısı oluşturan ekzotermik reaksiyonlardır. Biyosensör uygulamalarında reaksiyonlar sonucu oluşan ısı değişimi analit konsantrasyonunu ve reaksiyon hızını ölçmede kullanılmaktadır. Isı değişimleri immobilize enzimler içeren sabit yatak kolonlarının giriş ve çıkışında yer alan termistörler ile ölçülmektedir Şekil 2.6'da kalorimetrik biyosensörün şematik gösterimi verilmiştir. Kontrol edilebilen şartlarda reaksiyon sonucu oluşan ısınn yaklaşık %80'i akımda meydana gelen ısı değişimi olarak kabul edilebilir. Bu durum entalpi değişiminden ve reaksiyona giren madde miktarından hesaplanabilir.



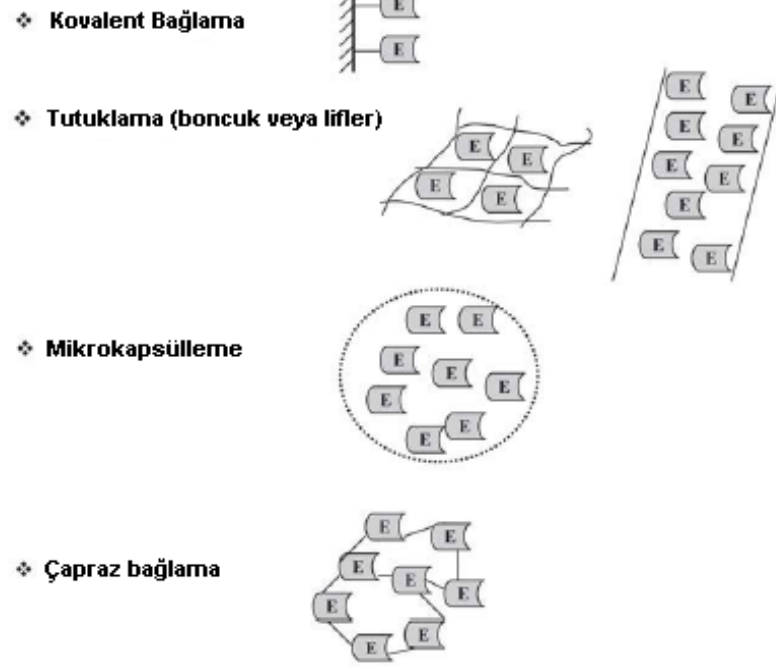
Şekil 2.6. Kalorimetrik biyosensörün şematik gösterimi. (a) giriş, (b) sıcaklık değiştirici, (c) alüminyum kütle, (d) referans termistör, (e) sabit yatak reaktör, (f) biyokatalist, (g) reaktör çıkışı, (h) dış elektronik ortam, (i) giriş ve çıkış arasındaki sıcaklık ölçümü

Deneyisel düzenek farklı biçimlerdeki termistör veya transistor parçalarından oluşmaktadır. Bunlardan bir tanesi immobilize biyo-katman içerirken diğeri aktive olmamış aynı tabakayı içermektedir. Sıcaklık farkı zamanın fonksiyonu olarak kaydedilir. Çünkü reaksiyonun ısısı katalizlenmiş enzim reaksiyonları için ölçülebilir [Danielsson ve Mosbach, 1987]. Seçicilik yüksektir fakat termal zeminin yüksek dalgalanmaları ve çözelti içindeki sıcaklığın hızlı seyrelmesi bu sensörlerin hissediciliğini engellemekte ve düşürmektedir.

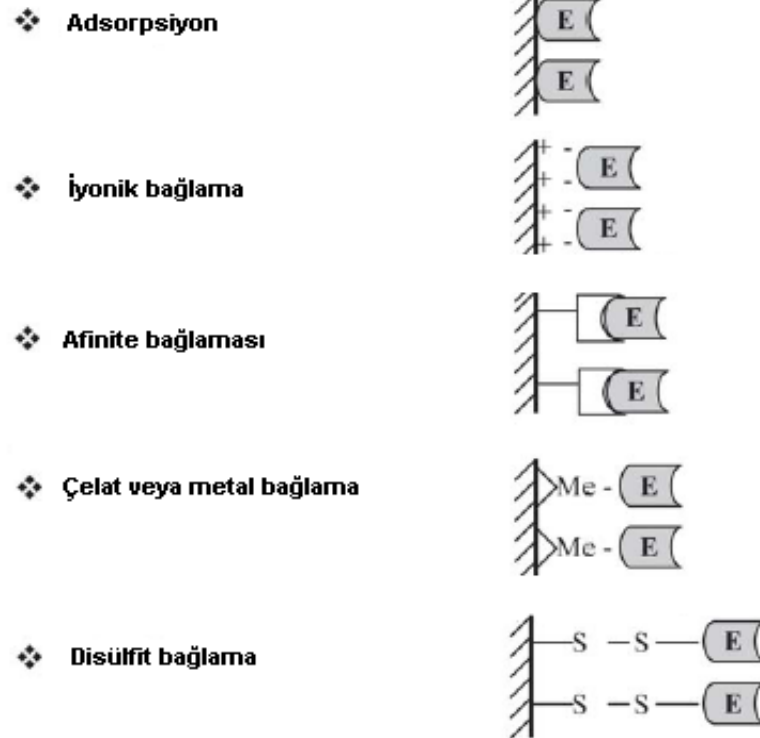
2.2. İmmobilizasyon Teknikleri

Mikrobiyal biyosensörlerin esası mikroorganizmalar ile dönüştürücü arasında yakın bir temas sağlamaktır. Dolayısıyla mikrobiyal biyosensörün yapımı dönüştürücü veya destek madde üzerine immobilizasyon gerektirir. İmmobilizasyonun amacı biyosensörün yanıtını, işletme karahlığını ve uzun süre kullanımını sağlamaktır. Biyosensör uygulamalarında immobilizasyon teknolojisi önemli bir rol üstlenmekle beraber immobilizasyon tekniğinin seçimi önemlidir. Mikroorganizmalar dönüştürücü veya destek madde üzerine kimyasal veya fiziksel metotlarla immobilize edilir. İmmobilizasyon tekniklerini geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olarak iki geniş kategori içine de sokabiliriz [Brena ve Viera, 2006]. Enzimlerin bağlanma kuvveti onların kolay dönüştürülebilir olup olmadığı ile ters orantılıdır. Stabil olma ve geri dönüştürülebilme gibi iki amaç eş zamanlı olarak uygulanması zor konulardır. Genel yaklaşım ise enzimlerin bağlanmasını kuvvetli bir şekilde yapmak ve geri dönüşümü feda etmektir.

Geri dönüşümsüz immobilizasyon enzimin veya destek maddenin biyolojik aktivitesini imha etmeden destek maddeye immobilize olmuş biyokatalizörün ayrılamayacağını ifade etmektedir. Geri dönüşümsüz enzim immobilizasyonu kovalent bağlanma, tutuklama, mikro-kapsülasyon ve çapraz bağlama olarak ayrırabiliriz. Geri dönüşümsüz immobilizasyon tekniklerinin şematik gösterimi Şekil 2.7'de verilmiştir. Geri dönüşümlü immobilizasyon ise immobilize olmuş enzimin uygun şartlar altında destek maddeden kolaylıkla koparılabilir. Bu immobilizasyon yöntemi ekonomik olması bakımından oldukça cazibeli çünkü enzim aktivitesinin bittiği veya azaldığı noktada enzimler sistemden uzaklaştırılır ve taze enzimler sisteme immobilize edilebilirler. Geri dönüşümlü enzim immobilizasyon sistemlerini adsorpsiyon, iyonik bağlama, afinite bağlaması, çelat-metal bağlama ve disülfid bağlaması olarak ayrırabiliriz (Şekil 2.8).



Şekil 2.7. Geri dönüşümsüz immobilizasyon tekniklerinin şematik gösterimi



Şekil 2.8. Geri dönüşümlü immobilizasyon tekniklerinin şematik gösterimi

2.2.1. Kimyasal İmmobilizasyon

2.2.1.1 Kimyasal Çapraz-Bağlama

Kovalent çapraz bağlama hücrelerin dış membranı üzerindeki fonksiyonel grupların glutaraldehit ve siyanür klorür gibi çok fonksiyonlu reaktantlarla köprü oluşturmaktan kaynaklanmaktadır. Hücreler dönüştürücü yüzeyine direkt olarak veya destek madde üzerine çapraz bağlanabilirler. Bu immobilizasyon tekniğinin avantajı basitliği ve herhangi bir katı yüzeye uygulanabilirliğidir. Ana problem ise çoğu enzim kimyasal bağlama reaktantlarına duyarlıdır böylece denatürasyon ile aktivitelerini kaybedebilirler. Dolayısıyla mikrobiyal biyosensörlerin yapımında hücre canlılığından ziyade hücre içi enzimlerin aktivitesi önemli ise kimyasal çapraz bağlamanın kullanılması uygundur [D'Souza, 1997].

2.2.1.2 Kovalent Bağlama

Kovalent bağlama metodu mikroorganizmaların hücre duvarlarındaki amin, karboksilik gibi fonksiyonel gruplar ile dönüştürücü üzerindeki epoksi, amin ve karboksil gibi gruplarla stabil kovalent bağ oluşumuna bağlıdır. Bu yöntemin en avantajlı özelliği enzim ve matris arasında oluşan bağın stabil olması sonucu enzimin kullanım süresi boyunca çözeltiye geçmemesidir [Brena ve Viera, 2006]. Hücrelerin zararlı kimyasallar ile muamele edilerek hücre duvarının zarar görmesi ve biyolojik aktivitelerini azalması ise dezavantajlarıdır. Dolayısıyla bu yöntem mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonu için fazla başarılı bir yöntem değildir.

2.2.2 Fiziksel immobilizasyon

2.2.2.1 Elektrot Yüzeyine Fiziksel Sorpsiyon

Enzimin çözünmeyen parça (veya elektrot) üzerine adsorpsiyonu iyonik, polar, hidrojen bağlı, hidrofobik veya π -elektron etkileşimleri sonucu olmaktadır [Brena ve Viera, 2006]. Elektrot genellikle enzim çözeltisi içinde belli periyotlar diliminde tutulur. Bu metot basittir fakat adsorbe olan enzim pH, solvent, besin ve sıcaklık

değişimlerine bağlı olarak kolayca desorbe olabilir. Yine de bu teknik enzim immobilizasyonunu kuvvetlendirmek için elektro-polimerizasyondan sonra uygulanabilir.

2.2.2.2 Membran ile Tutma

Enzim tabaka veya çözelti, elektrot üzerine yerleştirilir ve O-ring kaputu ile sağlanan polimerik diyaliz membran ile tutulur. İmmobilize biyokatalist tabakası kalındır ve sensörün cevap süresi bu tabakanın kalınlığının bir fonksiyonudur. Bu membranın çalışma prensibi molekül kütlesi *ca.* 100'den daha büyük moleküllerin difüzyonunu engellemek ve H₂O₂ geçişine izin vermektir [Emr ve Yacynych, 1995].

2.2.2.3 Elektrot Matrisinde Tutuklama

Bu elektrotlar heterojendir ve elektrik ileten partiküller (metal, grafit, camısı karbon) oda sıcaklığında suda çözünmeyen iletkenlik bileşikler (plastikler), sıvılar (silikon veya parafin yağ) veya katılar ile karıştırılarak yapılırlar. Sıvı bağlama aracı içeren karbon matrisleri karbon hamuru olarak bilinirler. Bu matrisler, enzimlerin elektrot matrisi içinde tutulması ile veya kompozit elektrot yüzeyini biyo-aktif tabaka ile kaplayarak yapılan biyosensör gelişimi için güç çeviricileri gibi çalışmaktadırlar.

Yüksek enzim miktarları iletkenliği ve elektrot maddenin stabilitesini azaltmaktadır. Enzimler genelde enzim ile bazı inert hidrofilik proteinlerin karıştırılması ile oluşan liyofilik (sıvı sever) güç formlarında elektrot matrisi içine katılırlar. Bu bileşiklerin çok yüksek miktarlarda olması olayın büyümesine ve akım değerlerinin değişimine neden olmakta bununla beraber elektrot yüzeyinin erozyona uğramasına sebep olmaktadır. Enzimin tutulmuş kısmı ile yeni hazırlanmış kompozit numune çözelti içine daldırıldığında sinyali azaltmaktadır. Bu olay kompozit maddenin yüzeyindeki hidrofilik bileşiklerin dengeye gelene kadar sızmalarından kaynaklanmaktadır.

2.2.2.4 Elektropolimerizasyon

Enzim, çözülmüş monomer ve enzim içeren çözeltilerde elektrot yüzeyinde büyüyen polimer matrisi içinde tutulmaktadır. Monomerler elektrokimyasal olarak serbest radikallerin polimerizasyon potansiyelini yükselten değerlerde oksitlenirler. Bu radikaller elektrotlar üzerine adsorbe olurlar ve polimer ağına bağlı geniş reaksiyon çeşitliliğine uğrarlar. Elektropolimerizasyon, uygun formda biyolojik bileşimin polimer filme bağlanması için nötr pH' daki sulu çözelti içinde meydana gelmelidir. Bu polimerin büyümesi onun elektrik karakterine bağlıdır. Eğer polimer elektriksel olarak bağlanmamış ise büyümesi kendi kendine engellenir. Çoğu filmler çok incedir (10–100 nm). Bunun tersine bağlanmış polimerlerin büyümesi limitsizdir.

Proses, elektrot potansiyeli ve sonuç filminin kalınlığını kontrol etmemize imkan veren reaksiyon zamanına bağlı olarak yönetilir. Polimerizasyon elektrot yüzeyinde yerel ve sıkı olarak meydana gelir ve enzim elektrot yüzeyinde tutulur. Bu mikro elektrotların ve mikro elektrot araçlarının kaplanması için uygundur. Ayrıca, farklı bileşebilen veya bileşemeyen polimerlerin bileşimi azalmış (parazit) engellemeler ile birlikte hızlı cevap veren sensörlere bağlı düşük kalınlıklı çok tabakalı yapıların yapılmasına izin verir. Film potansiyeli geri devrettirilerek veya sabit potansiyelde oluşturulur [Wang ve Chen, 1994, Reynolds ve Yacynych, 1994].

2.2.3 Diğer Fiziksel İmmobilizasyon Teknikleri

Mikro-enkapsülasyon yönteminde ince-duvar partiküllerden oluşan kapsüllerde besin ve ürün difüzyonu olurken enzim olmaz. Bu tekniğin en önemli dezavantajı ara yüz polimerizasyonunun biyo-katalizörün aktivitesini düşürmesidir.

Diğer bir immobilizasyon tekniği ise enzim içeren çözelti içindeki polimerizasyonu jel matrisi içine katmaktır. Bu jel immobilizasyon tekniğinin avantajı enzimin dokunulmadan durmasıdır. Dezavantajı ise jelin porozitesidir. Besin difüzyonu küçük moleküllü partiküller ile sınırlıdır.

2.3. Biyosensörlerin Performans Özellikleri

Biyosensörlerin performansını karakterize etmek amacıyla kullanılan parametreleri şu şekilde sıralayabiliriz [Cammann et al., 2001, Gründler, 2007];

- **Hassasiyet:** Analitin birim konsantrasyonuna bağlı olarak ölçüm sinyalindeki değişim olarak tanımlanabilir. Kalibrasyon grafiğinin eğimi hassasiyeti vermektedir. Bazı sensörlerde hassasiyet aletin ölçüm ömrü süresince maksimum değerlerine ulaşmaktadır. Dolayısıyla hassasiyetin kalite ölçümleri performans testleri ile kontrol edilmelidir. Örnek matrisi, sıcaklık, basınç ve nem gibi çevresel faktörlerin hassasiyet üzerine etkileri olduğundan kalibrasyon süresince ve örneklerin analizinde çevresel şartların aynı kalmasına dikkat edilmelidir.
- **Ölçüm limiti:** Belirlenmiş şartlar altında sensör tarafından ölçülebilen en küçük konsantrasyondur. Ölçüm limitinde ölçülen bir analitin konsantrasyonunu kesin olarak açıklamak mümkün değildir. Sadece analitin varlığı yüksek olasılıkla kanıtlanmış olur. Kesin olarak ölçülebilecek konsantrasyon değeri ölçüm limitinin on katı değerine tekabül eden konsantrasyon değeridir. Ölçüm limitinin belirlenmesinde kullanılan prosedür yapılması düşünülen sensörün türüne göre değişiklik göstermektedir.
- **Dinamik aralık:** Ölçüm limitindeki konsantrasyon ile üst limit konsantrasyonu arasındaki aralıktır. Potansiyometrik ölçüm aletleri logaritmik bir ilişki ile ölçüm yaparken amperometrik ve diğer elektrokimyasal sensörler lineer bir ilişki ile ölçüm yapmaktadırlar. Dinamik aralığın geniş olması sensör sisteminde ölçüm yapılacak örneğin hazırlanmasında seyreltmenin ve örneğin iyileştirme adımlarının önemini azaltmaktadır. Ölçüm aralığı, en düşük konsantrasyon değeri olarak ölçüm limiti ve en yüksek konsantrasyon değerleri olarak ta doygunluk değerleri arasında kalan konsantrasyon değerlerini ifade etmektedir.

- **Seçicilik:** Bu parametre biyosensörler için en önemli karakteristiklerden biridir. Farklı maddeler arasında ayırt etme özelliğı olarak tanımlanabilir. Sensörün yanıtının tek bir tür analit için veya bir grup analit için seçici olup olmadığı önemlidir.
- **Lineerlik:** Deneysel olarak tanımlanmış kalibrasyon grafiğinde elde edilen düz çizginin relatif sapmasıdır. Lineerlik için değerler genellikle kesin bir konsantrasyon aralığı için tanımlanmaktadır.
- **Yanıt süresi:** Bir sensörün sıfır konsantrasyondan farklı olarak ölçülen bir konsantrasyon değeri için gerekli yanıt süresidir. Kimyasal sensörlerde yanıt süresi saniyelerle ifade edilirken biyosensörlerde birkaç dakikaya kadar çıktığı görülmektedir. Sensör yüzeyinin düzgünlüğü ve ölçüm hücresinin ölü hacmi sensör yanıt süresine etkileyen önemli etkilere dir. Ölçüm hücresindeki duvarlarda oluşturulan küçük çatlaklar analit rezervuarı gibi davranarak analit seyrelme hızını yavaşlatabilirler. Dolayısıyla sensörün yanıt süresi artabilir.
- **Stabilite:** Sensörün ölçüm performansını belli bir süre koruyabilme kabiliyetidir. Stabilite ölçümü olarak bir konsantrasyon için elde edilen sinyallerin sapma değerleri kullanılmaktadır. Mikrobiyal biyosensörlerde sensörün stabilitesi prosesin yaşı ile ilgilidir. Bu tür sensörlerde seçicilik, hassasiyet ve stabilite gibi özellikler zaman ile azalmaktadır. Dolayısıyla biyosensörlerde biyo-katalitik bölümün belli aralıklarla yenilenmesi sensörün çalışma performansı bakımından önemlidir.
- **Doğruluk:** Doğrulun birkaç türü bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi bir sensör ile yapılan ölçümlerin analitik olarak doğruluk derecesini içermekte diğeri ise farklı ölçüm teknikleri ile yapılan ölçümlerde herhangi bir iyileştirme yapmadan standart sapma değerlerinin düşük olmasını içermektedir.
- **Sensör ömrü:** Sensörün ne kadar süre ile işletildiğidir. Maksimum saklama süresi maksimum işletme süresinden ayırt edilmelidir. Sensör ömrü sürekli çalışan bir sensörün ömrü olarak tanımlanmaktadır. Biyosensörlerin ömrü mikrobiyal özelliklerinden dolayı genellikle kısa olmaktadır.

2.4. BOİ Biyosensörleri

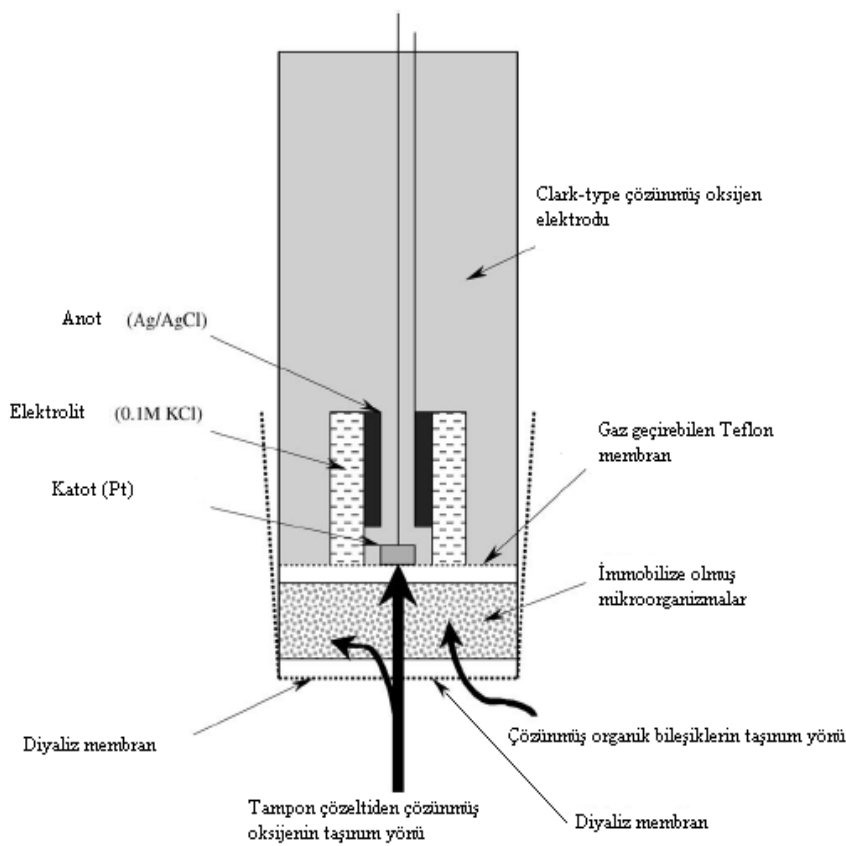
2.4.1. Biyofilm Tipi BOİ Biyosensörleri

2.4.1.1. Ölçme Prensipleri

Biyofilm tipi BOİ sensörleri bakteriyel solunum hızını ölçme prensibi üzerine dayanan hücre esaslı mikrobiyal biyosensörlerdir. Bu tip biyosensörler selüloz membran ve gaz geçirebilen membran arasında biyolojik tanıma elemanı olarak kullanılan mikrobiyal bir film içermektedir. Bu mikrobiyal film organik maddeyi biyolojik olarak oksitleyebilen immobilize mikrobiyal topluluktan oluşur. Mikrobiyal BOİ biyosensörlerinde çoğunlukla çözünmüş oksijen konsantrasyonu ölçülmektedir. Bununla beraber ışık emisyonu gibi optik esaslara dayalı parametreler de son yıllarda üzerinde çalışılan ölçüm teknikleridir. Fiziksel dönüştürücüler mikrobiyal faaliyet sonucu meydana gelen değişimleri elektriksel veya optik sinyallere çeviren aletlerdir. Fiziksel dönüştürücülerle elde edilen sinyal, çözelti içerisindeki mevcut biyolojik olarak parçalanabilir materyalin miktarı ile orantılı olmaktadır.

Biyofilm tipi BOİ sensörlerinin genel tasarımı Şekil 2.9'da gösterilmiştir. BOİ biyosensörlerinde sensörden sürekli örnek çözelti geçirilmesi ve akım enjeksiyon edilerek yapılan ölçüm metotları bulunmaktadır. Sürekli örnek çözelti geçirilerek yapılan ölçüm için tipik yanıt eğrisi 2.10'da, akım enjeksiyon edilerek yapılan ölçüm için elde edilen tipik yanıt eğrisi ise Şekil 2.11'de gösterilmiştir. Her iki ölçüm metodunda havalandırılmış fosfat tamponundan çözünmüş oksijen diyaliz membrandan immobilize hücre tabakasına doğru difüze olur ve oksijenin bir kısmı immobilize mikroorganizmalar/enzimler tarafından kullanılır. Artan oksijen ise gaz geçiren Teflon membrandan geçer ve oksijen elektrotu tarafından okunur. Sürekli ölçüm metodunda oksijen difüzyonu ve immobilize bakterilerin solunum hızı arasındaki denge durumundan durgun hal akımı gözlenir. Atıksu örneği sensör sistemine yüklendiğinde, sindirilebilir organik maddeler diyaliz membrandan difüze olurlar ve immobilize bakteriler tarafından sindirilerek bakteri solunum hızının ve biyo-oksidasyon prosesi için oksijen tüketiminin artmasına sebep olurlar. Bu yüzden teflon membrandan geçen ve oksijen elektrotu tarafından ölçülen oksijen miktarında

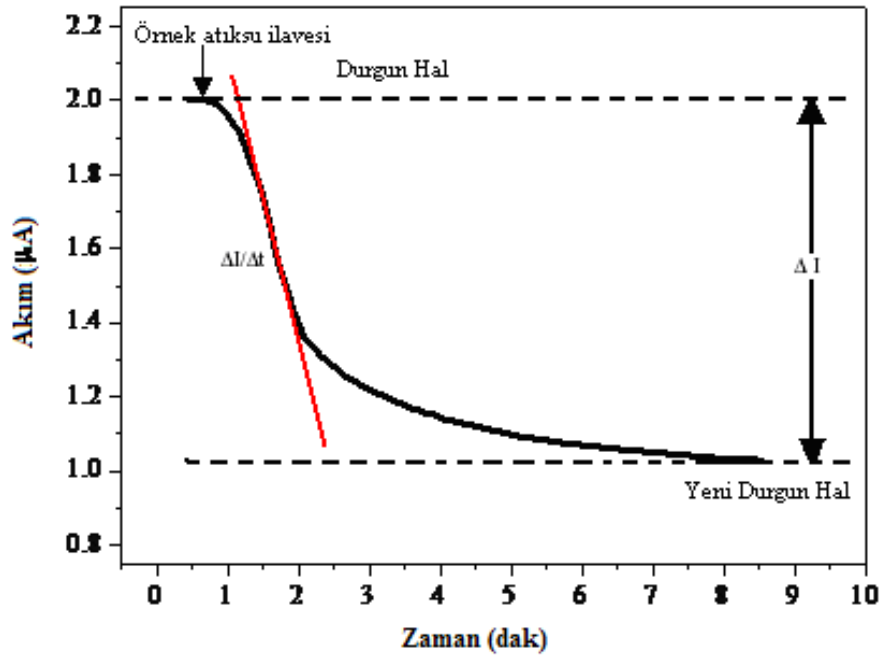
azalma meydana gelir. Sensör tarafından ölçülen akım oksijen için yeni denge değerine kadar azalır [Liu ve Mattiasson, 2002]. Akım enjeksiyon metodunda ise sistemden tampon çözelti geçişi olurken belli hacimde atıksu örneği sisteme enjekte edilir. Çözünmüş oksijen konsantrasyonu atıksu örneğinin organik madde içeriğine ve enjekte edilen atıksu hacmine bağlı olarak azalır fakat sistemde taşıyıcı sıvının oksijen ile doymuş tampon çözelti olmasından dolayı oksijen konsantrasyonu bir pik oluşturarak Şekil 2.11’de görüldüğü gibi tekrar yükselişe geçer. Her iki ölçüm yönteminde de proses substrat difüzyonu ile kontrol edildiğinden, sensör sinyali örnek içindeki kolay biyolojik parçalanabilir organik madde ile orantılıdır.



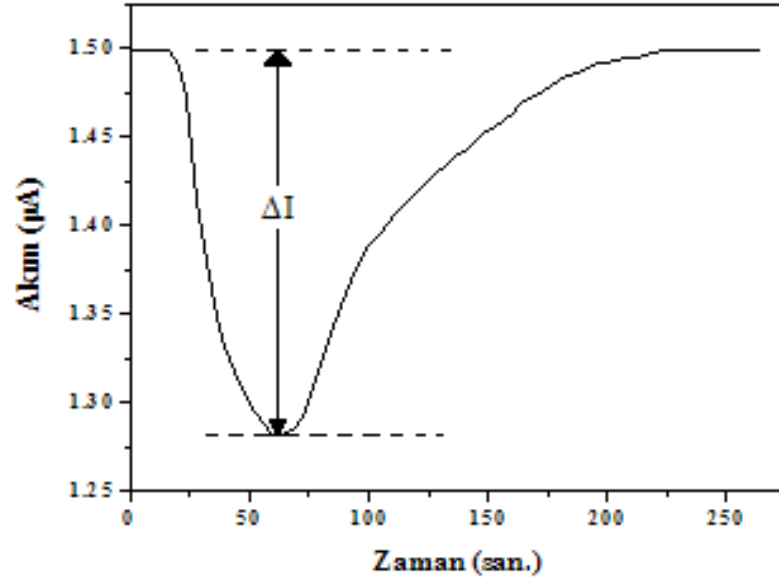
Şekil 2.9. BOİ biyosensörünün şematik gösterimi. İmmobilize olmuş mikroorganizma topluluğunun Clark tip oksijen elektrodu ile birleşimi.

Biyofilm tipi BOİ sensörlerinde sürekli ölçüm metodunda iki tür ölçme yöntemi vardır. Bunlar; durgun hal metodu ve giriş hızı metodudur. Durgun hal metodunda iki durgun hal arasındaki akım farkı (ΔI) $BOI_{sensör}$ tahmini için kullanılır.

Ölçüm süresi 15–20 dakika olurken iyileştirme süresi 15–60 dakika arasında olmaktadır. Giriş hızı metodunda ise örnek ilavesinden sonra oluşan giriş akımı değişimi ($\Delta I/\Delta t$) kullanılmaktadır. Bu parametre atıksu örneğindeki substrat konsantrasyonuna bağlı olarak bakteri solunum hızının göstermektedir. Bu metotta sensör cevap hızı 15–30 saniyede kaydedilir ve iyileştirme süresi de 10 dakikadan azdır. BOİ ölçümlerinde sürekli ölçüm metodunda uygulanan durgun hal ile giriş hızı yöntemleri birbirleriyle kıyaslandığında giriş hızı yönteminin hızlı olması gibi avantajı bulunmaktadır. Dolayısıyla eğer proses kontrolü yapılacak ise sık sık ölçüm alınması gerektiğinden sürekli izleme için giriş hızı yöntemi ile ölçüm yapma daha avantajlıdır.



Şekil 2.10. BOİ biyosensörünün sürekli atıksu beslemesi yapılarak elde edilen tipik yanıt eğrisi.



Şekil 2.11. BOİ biyosensörünün atıksu örneği için yapılan akım enjeksiyon çalışması için elde edilen yanıt eğrisi.

2.4.1.2. Biyo-film Tipi BOİ Biyosensörlerinde Kullanılan Dönüştürücüler

BOİ biyosensörlerinde en çok kullanılan dönüştürücü 1956 yılında Clark tarafından geliştirilen amperometrik bir sensör olan Clark-tipi çözünmüş oksijen (ÇO) probudur. Bu çözünmüş oksijen probu oksijen geçirebilen membran ile kaplı gümüş anot ve altın veya platin katot içeren iki elektrot sisteminden oluşmaktadır. Clark tipi ÇO probunun kullanım ömrü elektrolitin tüketimi ve anot metalin oksidasyonundan dolayı kısalmaktadır [Lambrechts ve Sansen, 1992]. Çözünmüş oksijen probunda meydana gelen bu olumsuzluklardan dolayı zamanla kalibrasyon değerlerinde sapmalar meydana gelebilmektedir. Dolayısıyla düzenli olarak probun içinde olduğu elektroliti değiştirmek ve anot yüzeyini temizlemek gerekmektedir.

Bu tip sensörlerden başka ÇO ölçümünde ve BOİ sensörlerinin yapımında kullanılan optik teknikler geliştirilmiştir [Preininger et al., 1994, Li et al., 1994, Chee

et al., 2000]. Optik sensörlerde oksijene duyarlı materyalden floresan sinyallerinin emilerek optik teller vasıtası ile iletilerek ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Amperometrik oksijen problemleri yerine optik oksijen sensörlerinin kullanılmasında hiç oksijenin tüketilmemesi ve uzun süreli stabilitesini koruyabilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Bunun yanında kalibrasyonda sapmaların meydana gelmemesi ve akış hızı ile karıştırma hızı gibi faktörlerden dolayı değişiklik gösteren çözünmüş oksijen değerlerinin optik sensörlerde ölçümü etkilememesi gibi avantajları da bulunmaktadır. Optik metotlar tek kullanımlık sensörlerin düşük maliyetli olarak tasarlanması fikrini ortaya çıkarmaktadır.

2.4.1.3. Biyofilm Tipi BOİ Biyosensörlerinde İmmobilizasyon

BOİ biyosensörlerinde mikrobiyal hücreler genellikle basit adsorpsiyon ile immobilize edilebilmektedirler. Hücreler genellikle gözenekli diyaliz membran ile teflon membran arasına soğurma tekniği ile direkt yerleştirilerek immobilize edilmektedirler [Kim and Kwon, 1999, Liu et al., 2000, Chee et al., 1999, Rastogi et al., 2003, Kim and Park, 2001, Yoshida et al., 2001]. Hücrelerin polivinilalkol/polisülfanit çözeltileri kullanarak delikli matris membran üzerine hücrelerin tutulması şeklinde olan hidrojel tutuklanması metotları da uygulanmaktadır [Chan et al., 1999, Chan et al., 2000]. Tek kullanımlık BOİ biyosensörleri geliştirilirken mikroorganizmaları minyatür oksijen elektrot yüzeyine direkt immobilize etmek amacıyla ultraviyole çapraz bağlı reçineler kullanılmıştır [Yang et al., 1996]. Ayrıca manyetik aktif çamur kullanılarak geliştirilen BOİ biyosensörlerde bulunmaktadır [Sakai et al., 1995]. Bu tip biyosensörlerde manyetik aktif çamur Teflon membran üzerine manyetik katot ile oluşan manyetik etkileşimler sayesinde tutunmaktadır.

2.4.2. Solunum-tipi BOİ Biyosensörleri

Solunum tipi BOİ biyosensörleri kısa süreli BOİ ölçümlerinde kullanılmaktadır. Solunum hızı, aktif çamurun sindirim hızını ölçmek ve yorumlamaktır. Solunum tipi BOİ biyosensörlerinde farklı ölçüm prensipleri

olmasına rağmen genelde aktif çamur ile substratın karıştırıldığı biyo-reaktör şeklinde kurulmuş tipleri kullanılmaktadır [Spanjers et al., 1996].

Solunum tipi BOİ biyosensörlerinde kesikli ve sürekli olmak üzere iki tip ölçüm tekniği uygulanabilmektedir. Kesikli sistemde respirometreye atıksu ilavesinden sonra respigromda gözlenen BOİ değeri hesaplanır. Sürekli sistemde ise reaktöre sürekli atıksu girişi vardır. Ölçümde kullanılan bir yaklaşım, iki paralel sürekli çamur reaktöründe (bir tanesinde atıksu örneği varken diğerinde saf su bulunmaktadır) oksijen tüketimini hesaplamaktır. Diğer bir yaklaşım ise aktif çamurun içsel, anlık ve gerçek solunum hızlarını ölçerek oksijen tüketim hızını hesaplamaktır. Burada içsel solunum hızı biyolojik parçalanabilir maddeden yoksun çamurun oksijen tüketim hızı olarak ifade edilir. Anlık hız, havalandırma tankındaki çamurun respirometreden geçerken ölçülen oksijen tüketim hızı ve gerçek solunum hızı ise havalandırma tankındaki gerçek oksijen tüketim hızıdır [Spanjers et al., 1991, Spanjers et al., 1993].

Respirometrik prensipte biyo-reaktör tipindeki BOİ sensör sistemleri *Bacillus polymyxa*, *Trichosporon cutaneum* ve *Rhodococcus erythropolis* ile *Issatchenkia orientalis*'in karışımı gibi tanımlanmış mikrobiyal türleri kullanılmaktadırlar [Su et al., 1986; Praet et al., 1995; Sohn et al., 1995; Heim et al., 1999]. Biyo-reaktör tipindeki BOİ sensörünün mikrobiyal sistemi etkilemeden dönüştürücüyü değiştirebilme gibi faydaları vardır. Biyofilm tipinde bunu yapmak imkânsızdır. Bundan başka aynı substrat ve aynı mikrobiyal türlerle biyo-reaktör tipindeki BOİ sensörleri daha kararlı performans gösterirler [Praet et al., 1995].

2.4.3. Diğer Ölçme Prensiplerine Dayalı BOİ Biyosensörleri

Değişik ölçme prensiplerine bağlı BOİ biyosensörleri üzerine çalışılmıştır. Bunlardan bir tanesi BOİ ölçümü için geliştirilen biyo-yakıt hücre sensörüdür. Bu sensörde biyo-yakıt hücre tarafından oluşan akım hidrojenin biyo-oksidasyonu veya hidrojen üreten *Clostridium butyricum* bakterisi tarafından anaerobik şartlarda üretilen organik bileşiklerin oluşumuna bağlıdır [Karube et al., 1977; Karube et al., 1977a].

Photobacterium phosphoreum bakterisi ile oluşturulan BOİ sensöründe ölçme prensibi bakteri tarafından üretilen ışığın yoğunluğu ile atıksu örneğindeki organik bileşiklerin hücresel sindirimi arasındaki ilişkiye bağlıdır [Hyun et al., 1993].

Substratın oksijen ile mikrobiyal oksidasyonu sonucu oluşan asidik bileşiklerin ölçümü ile de BOİ ölçülebilmektedir. Bu tip biyosensörler pH'a duyarlı elektronik etki-tipi transistor (pH-ISFET) ve yüzey foto-voltaj (SPV) aletlerinden oluşmaktadır [Mitsubishi Electric Corp., 1983; Murakami et al., 1998].

BOİ ölçümü genelde, oksijenin elektron alıcı olduğu atıksu örneğindeki ÇO miktarından etkilenen mikrobiyal solunum prensiplerine dayanmaktadır. Bununla birlikte bazı mikroorganizmalar tarafından oksijen giderim adımı pas geçilerek redoks-aktif maddeler giderilebilir. Bu yüzden aerobik solunum prensiplerine dayalı BOİ metotlarındaki bu gerçek problemi gidermek için aracı-tip BOİ sensörleri geliştirilmiştir [Yoshida et al., 2000; Trosok et al., 2001].

Atıksu örneğinin BOİ değeri, organik maddelerin mikroorganizmalar tarafından oksidasyonu sırasında açığa çıkan metabolik ısıнын ölçülmesi ile hesaplanabilmektedir. Açığa çıkan ısı potansiyel sinyale dönüştürülerek ölçümler alınabilmektedir [Matsubara, 1998; Mattiasson et. al., 1977; Vogel and Binz, 1997].

2.4.4. BOİ Biyosensörlerin Performans Özellikleri

BOİ biyosensör uygulamalarında kalibrasyon eğrisinin lineerliği, kullanılan mikroorganizma türlerine göre değişiklik gösteren cevap süresi ve işletme stabilitesi, kalibrasyon çözeltisi, ölçme teknikleri ve işletme şartları sensör performans karakteristiklerini oluşturmaktadır. Biyosensör uygulamalarında bir özelliği değiştirmek diğer performans özelliklerini etkileyeceğinden sensör sisteminin optimizasyonu çok karmaşık bir iştir. Çizelge 2.5'te BOİ biyosensörlerinde kullanılan mikroorganizma türlerine göre ölçüm aralığı, yanıt süresi ve tekrarlanabilirlik gibi performans özellikleri değerlendirilmiştir.

Çizelge 2.5: BOİ biyosensörlerinin performans özellikleri.

İmmobilize Mikroorganizmalar	Ölçüm aralığı (mg/L BOİ)	Yanıt süresi (dak)	Tekrarlanabilirlik ($\pm$ %)	İşletme Stabilitesi (gün)	Referanslar
<i>Trichosporon cutaneum</i>	3-60	18	6	17	Hikuma et al., 1979
	4-100	0.5, 5	3.3	48	Riedel et al., 1990.
	0-110	3-10	4	7-30	Preininger et al., 1994
	0.2-18	7-20	8	-	Yang et al., 1996
	0.5-30	3	7	-	Yang et al., 1997
	10-70	5	<3	40	Marty et al., 1997
	1-60	3-10	8.6	40	Jia et al., 2003
<i>Trichosporon cutaneum</i> , <i>Bacillus subtilis</i>					
<i>Hansenula anomala</i>	1-45	13-20	6	-	Li ve Chu, 1991
<i>Pseudomonas</i> sp./	1-40	13-20	6	-	Li ve Chu, 1991
<i>Pseudomonas putida</i>	0.5-10	2-15	10	10	Chee et al., 1999
<i>Klebsiella oxytoca</i> ASI	<44	2.5	-	-	Ohki et al., 1994
<i>Bacillus subtilis</i>	2-22	0.25	5	30	Riedel et al., 1988.
<i>Bacillus subtilis</i> (ısıtılarak öldürülmüş)	<80	25	2.4-3.4	140	Tan ve Qian, 1997
<i>Arxula adenivorans</i> LS3					
	8-550	1.2	5	30	Qian ve Tan, 1998
	2-550	1.2	10	40	Riedel et al., 1998
	<150	1.7	5	62	Lehman et al., 1999
	7-75	1, 10	-	-	Chan et al., 2000
<i>Torulopsis candida</i>	44	15	-	-	Sangeetha et al., 1996
<i>Serratia marcescens</i> LSY4	<70	4-15	5	22	Kim ve Kwon, 1999
<i>B. subtilis</i> + <i>B. Licheniformis</i>	<80	0.25 - 0.5		60	Tan et al., 1992 Tan et al., 1993

Çizelge 2.5: BOİ biyosensörlerinin performans özellikleri. (Devam)

İmmobilize Mikroorganizmalar	Ölçüm aralığı (mg/L BOİ)	Yanıt süresi (dak)	Tekrarlanabilirlik ($\pm$ %)	İşletme Stabilitesi (gün)	Referanslar
<i>Rh. erythropolis</i> + <i>Is. orientalis</i>	6-600	0.25-0.5	<5	40	Riedel, 1998
Mikrobiyal topluluk	5-40 30-90 0-350 <10	0.5 5-10 30 7	4.7-5.6 5.0 6	<7	Liu et al., 2000 Rastogi et al., 2003 Karube et al., 1977 An et al., 1998
Toprakta izole edilmiş bakteri				40	
Termofilik bakteri				22	Tan ve Wu, 1999
Çok türlü kültür (BODSEED)	0-45	45-60	2.9-4.8	22	Tan ve Wu, 1999
Çok türlü kültür (BODSEED) (ısı ile öldürülmüş)	0-45	35-50	8.5-12.4	22	
Aktif çamur	<60 0-60 3.3-32.8	30 20 6	5 5.5 1.3	45 48	Sakai et al., 1995 Kwok et al., 2005 An et al., 1998
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	15-200 15-260 1.2-40	15 3-20	13.9 12.7 3.8	35 0.5-4 (saat)	Yoshida et al., 2000 Yoshida et al., 2001 Chen et al., 2008
<i>E. marium</i> , <i>B. Horikoshii</i> , <i>H. marina</i>					
<i>Bacillus subtilis</i>	0-25 0.5-200	20 14-30	5.5 2.54	45 270	Kwok et al., 2005 Dai et al., 2004
Evsel atık sudan izole edilmiş bakteri				270	Dai et al., 2004
Deniz suyundan izole edilmiş bakteri	0.5-200	23-32	0.95	270	
Termal olarak öldürülmüş aktif çamur	0-40	40-45	6.75	6-12	Tan and Lim, 2005

2.4.4.1. Kalibrasyon Eğrisinin Lineerliği

BOİ biyosensörlerinin kalibrasyon lineerliği değişik substrat konsantrasyonlarındaki atıksuların analizinde biyosensörün analiz kapasitesinin ölçülmesidir. Yüksek hassaslık, seçicilik ve spesifiklik isteyen diğer biyosensör uygulamalarının aksine BOİ biyosensörlerinin rölatif olarak düşük seçicilikte kompleks bileşikler içeren atıksu örneklerini geniş lineer aralıkta inanılır ve doğru olarak ölçmesi istenir. Böylece seyreltmenin önemli olduğu BOİ ölçümlerinde herhangi bir seyreltme yapmadan atıksuların ölçülmesi mümkün olmaktadır [Liu et al., 2004].

Lineerlik sensör yapımına, tipine ve hücre yoğunluğuna bağlıdır. Yüksek konsantrasyonlu hücre biyofilmi içeren BOİ sensörleri örnek analizlerinde daha duyarlıdır fakat daha dar lineer oranları vardır. Ayrıca, lineerlik sensörün partiküler organik maddeye olan duyarlılığından etkilenmektedir. Kalibrasyon çözeltisi ile çeşitli organik madde içeren numunelerdeki sensör sinyalleri karşılaştırıldığında BOİ sensörü farklı lineer karakteristik vermektedir. Lineerliğin karşılaştırılması aynı kalibrasyon çözeltisi uygulandığında yapılmalıdır.

2.4.4.2. Cevap ve İyileştirme Süresi

BOİ sensörünün cevap süresi ölçme tekniğine göre farklılık göstermektedir. Durgun hal yöntemi ile 5–25 dakika süren bir ölçüm giriş hızı tekniği ile 15–30 saniye sürmektedir. Durgun hal yönteminde yeni durgun hale ulaşmak için gereken süre örnek içindeki substrat miktarına bağlıdır. Bu yüzden yüksek substrat konsantrasyonlu numunelerin analizinde daha fazla zaman gerekmektedir. Bunun yanında mikroorganizmaların metabolik hızları farklı besin maddeleri için değişiklik gösterebilmektedir. Giriş hızı tekniğine göre yapılan çok kısa süreli ölçümlerde örnek çözelti içerisindeki farklı türdeki organik maddelerin mikroorganizmalar tarafından sindirilmesi için gerekli süre az olabilmektedir. Dolayısıyla BOİ biyosensörü ile ölçülen örneğin BOİ konsantrasyonu durgun hal yöntemi ile ölçülen konsantrasyondan çok farklı olabilmektedir [Yang et al., 1997].

BOİ biyosensörlerinde iyi tekrarlanabilirlik sağlamak için sensörde immobilize mikroorganizmaların içerisinde organik madde bulunmayan tampon çözelti ile beslenerek endojen solunum yapmaları sağlanmalıdır. Mikroorganizmaların endojen solunum yapması için gerekli süre durgun hal yönteminde 15-60 dakika iken giriş-hızı tekniğinde bu süre 5-10 dakika olmaktadır.

2.4.4.3. Doğruluk

BOİ biyosensörlerinin geliştirilmesinin amacı klasik testlerle eşit performansta daha hızlı ölçümler yapabilen alternatif analitik metot geliştirmektir. Laboratuvar şartları için oluşturulan ISO 5725-6 standardına göre laboratuvarda yapılan ölçümlerde hatalar rastgele veya sistematik hatalar olabilmektedir. Doğruluk rastgele hataları içerirken gerçeklik sistematik hataları içermektedir. Doğruluk, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik olarak ikiye ayrılır. Tekrarlanabilirlik, aynı şartlarda tek bir operatör ile test edilen tek sensörün standart sapmasıdır. Tekrar üretilebilirlik ise farklı şartlarda birden fazla operatör ile test edilen sensörlerin standart sapmasıdır [Liu et al., 2004].

APHA standart metot kitabında belirtilen klasik BOİ₅ ölçümleri için laboratuvar şartlarında glukoz-glutamik asit (GGA) çözeltisi ile yapılan ölçümlerde 198 mg/l stok çözelti için standart sapma 30.5 mg/l olarak bulunmuştur [APHA, 1992]. Bu değer yaklaşık olarak $\pm\%15.4$ 'lük bir hataya tekabül eder. Çizelge 2.2'de verilen daha önce yapılmış BOİ biyosensörü çalışmalarında tekrarlanabilirlik hata değerleri tek türlü sensörler için $\pm\%0.95$ ile $\pm\%13.9$ arasında, iki türlü olanlar için $\pm\%5$ ile $\pm\%10$ arasında ve çok kültürlü türler içinde $\pm\%1.3$ ile $\pm\%12.4$ arasında bulunmuştur. Fakat tekrar üretilebilirlik değerleri sadece birkaç çalışmada kontrol limiti diyebileceğimiz $\pm\%15$ 'in altında kalmıştır [Sakai et al., 1995, Liu et al., 2004]. Dolayısıyla literatürde yer alan çalışmalarda BOİ biyosensörlerinin tekrar üretilebilirliği kısıtlı olmakla beraber üzerinde çalışılması gerekli önemli bir konudur.

2.4.4.4. $BOI_{sensör}$ ve BOI_5 Arasındaki Uyuşma

Sensörlerin performansını doğrulamak için geleneksel BOI analizleri ile sensör BOI ölçümleri arasında karşılaştırmalı testler yapılmaktadır. Biyosensörler ile ölçülen BOI ile geleneksel olarak ölçülen BOI arasında farklılıklar görülmektedir. Bu değişik ölçme prensiplerine ve atıksu örneklerinin değişik bileşimlerinden kaynaklanmaktadır. Klasik BOI prosedürü karıştırılmış mikrobiyal popülasyonun değişik metabolik reaksiyonlarını etkileyen 5 veya 7 günlük inkübasyon zamanını içermektedir. Inkübasyon, mikroorganizmaların büyümesi için mikrobiyal adaptasyonu, istenilen bileşiklerin sindirilmesi için gerekli enzimlerin faaliyet göstermesini ve polimerlerin enzimatik hidrolizi için gerekli periyodu içermektedir. Klasik metot ile ölçülen mikrobiyal oksijen tüketimi sindirilebilen bileşiklerin ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin oksitlenmesi için kullanılan oksijen miktarıdır. Bunun aksine biyofilm tipi sensörlerle ölçülen BOI ise seçilmiş mikrobiyal türlerle yapılan bir ölçüm metodudur. Sensör üzerine immobilize olmuş bakteriler ile çok kısa bir zaman periyodu içinde polimerlerin bozulmasının yer almadığı sadece atıksudaki kolay ve hızlı parçalanabilir bileşiklerin sindirilmesine cevap veren sistemlerdir. Bu analiz atıksudaki organik bileşiklerin metabolik proseslerinin anlayışını tanıtmaktadır ve biyolojik aktivitenin hızlı bir ölçümüdür. Ayrıca sensör BOI analizleri istenilen bileşiklerin sindirilmesi için gerekli enzimlerin adaptasyon periyodunu içermemektedir. Sonuç olarak, hesaplanan BOI atıksu örneğindeki organik bileşiklerin türlerine bağlıdır. Fakat yine de biyolojik tanıma elemanı olarak uygun mikrobiyal türü seçerek, sensör için inkübasyon adımı yaparak ve benzer arıtma adımı yaparak bu problemleri en aza indirebiliriz.

Çizelge 2.6'da evsel atıksular ve çeşitli endüstriyel atıksu örnekleri için BOI_5 ve $BOI_{sensör}$ değerleri verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü üzere BOI_5 ile $BOI_{sensör}$ değerleri arasındaki hata değerlerinin 0.40 ile 2.81 arasında değişmekte olduğu görülmüştür. Dolayısıyla yukarıda ifade edildiği üzere sensör okumalarında bazı iyileştirmelerin yapılması gerekliliği görülmektedir.

Çizelge 2.6. Çeşitli atıksu örnekleri için ölçülen klasik ve biyosensör BOİ değerleri.

Atıksu Kaynağı	Mikroorganizma Türleri	BOİ ₅	BOİ _{sensor}	BOİ _{sensor} / BOİ ₅	Referans
Evsel Atıksular	<i>Trichosporon cutaneum</i>	252	165	0.65	Yang et al., 1996
		486	825	1.70	
		832	973	1.17	
		175	237	0.74	
	<i>Arxula adeninivorans</i> LS3	131	98	0.75	Yang et al., 1997 Riedel et al., 1998
		123	86	0.70	
		180	123	0.68	
		112	89	0.79	
		53	37	0.70	
		108	86	0.80	
		153	77	0.50	
		114	46	0.40	
		166	175	1.05	
		82.6	121.2	1.47	
		59	40.7	0.69	
		116	124	1.09	
	<i>Mycelia of Arxula adeninivorans</i> LS3	52.3	54.2	1.04	Tag et al., 2000
		49.5	42.8	0.86	
		19.6	22.5	1.15	
		28.2	26.3	0.93	
		168	182	1.08	
		1237	1128	0.91	
		300	288	0.96	
		170	154	0.91	
	<i>Bacillus subtilis</i> (termal olarak öldürülmüş)	168	182	1.08	Qian and Tan, 1998 Tan and Qian, 1997
		1237	1128	0.91	
	<i>B. subtilis</i> + <i>B. Licheniformis</i>	170	154	0.91	Tan et al., 1993
		170	154	0.91	
	<i>Trichosporon cutaneum</i> + <i>B. subtilis</i>	6.6	6.4	0.97	Jia et al., 2003
		6.6	6.4	0.97	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	209.2	222.8	1.07	Yoshida et al., 2000
		388.5	364.2	0.94	
	Mikrobiyal topluluk	68	191	2.81	Liu et al., 2000 Tan and Lim, 2005
		4905	4453	0.91	
		3679	3336	0.91	
		1226	1233	1.01	
		58	49	0.85	
	Mikrobiyal topluluk (termal olarak öldürülmüş)	4905	4294	0.88	Tan and Lim, 2005
		3679	2813	0.76	
		1226	1063	0.87	
		58	51	0.88	
	Aktif çamurdan izole bakteri	61.1	67.6	1.11	An et al., 1998
	Çok türlü kültür (BODSEED)	51.6	38.6	0.75	Tan and Wu, 1999
		75.7	62.1	0.82	
	Çok türlü kültür (BODSEED) (151 ile öldürülmüş)	51.6	41.3	0.80	Tan and Wu, 1999
		75.7	54.2	0.72	

Çizelge 2.6. Çeşitli atıksu örnekleri için ölçülen klasik ve biyosensör BOİ değerleri
(devam).

Atıksu Kaynağı	Mikroorganizma Türleri	BOİ ₅	BOİ _{sensor}	BOİ _{sensor} / BOİ ₅	Referans
Gıda Endüstrisi	<i>Trichosporon cutaneum</i>	152	155	1.02	Hikuma et al., 1979
		4000	4250	1.06	
		8000	8764	0.91	Riedel et al., 1990
		425	357	0.84	Yang et al., 1996
		413	506	1.23	Yang et al., 1997
	<i>Hansenula anomala</i>	479	484	1.01	Li and Chu, 1991
		52250	49750	0.95	
	<i>Pseudomonas sp./</i>	39800	38300	0.95	Li and Chu, 1991
	<i>Pseudomonas putida</i>				
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	62.2	115.2	1.85	Yoshida et al., 2000
		139	174	1.25	
	<i>Bacillus subtilis</i>	348	319	0.92	Tan and Qian, 1997
	(ısıtılarak öldürülmüş)	585	567	0.97	Qian and Tan, 1998
		332	305	0.92	
		1473	1388	0.94	
	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	151	147	0.97	Tan et al., 1992
	Aktif çamurdan izole bakteri	350	378	1.08	An et al., 1998
		198	297	1.50	
		53.7	55	0.98	
	Mikrobiyal topluluk	411	401	0.98	Liu et al., 2000
Fermentasyon Endüstrisi		29352	29041	0.99	Rastogi et al., 2003
	<i>Trichosporon cutaneum</i>	2700	2275	0.84	Riedel et al., 1988
	<i>Bacillus subtilis</i>	2700	2245	0.83	Riedel et al., 1988
	<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	15040	15640	1.04	Tan et al., 1992
	Aktif çamurdan izole bakteri	10700	11600	1.08	An et al., 1998
Kimya Endüstrisi	<i>Trichosporon cutaneum</i>	726	853	1.17	Riedel et al., 1990
	<i>Torulopsis candida</i>	1326	1657	1.25	Sangeetha et al., 1996
	Çok türlü kültür (BODSEED)	400	395.8	0.99	Tan and Wu, 1999
	Çok türlü kültür (BODSEED) (151 ile öldürülmüş)	400	341.4	0.85	Tan and Wu, 1999
İlaç Endüstrisi	<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	2076	1897	0.91	Tan et al., 1993
		1032	1042	1.01	
		699	689	0.99	
		659	701	1.06	
	Aktif çamurdan izole bakteri	250	185	0.74	An et al., 1998
	Çok türlü kültür (BODSEED)	638	772	1.21	Tan and Wu, 1999
	Çok türlü kültür (BODSEED) (151 ile öldürülmüş)	638	724	1.13	Tan and Wu, 1999
Deri Endüstrisi Kağıt Endüstrisi	Mikrobiyal topluluk	1164	1098	0.94	Rastogi et al., 2003
	Mikrobiyal topluluk	414	305	0.74	Rastogi et al., 2003

2.4.4.5. İşletme Stabilitesi

Biyosensör sistemlerinin güvenilir olabilmesi için sensör performansının işletme süresince sabit kalması istenir. BOİ biyosensörlerinin işletme kararlılığı sensör şekline ve kullanılan mikroorganizma türlerine bağlı olduğu kadar immobilizasyon tekniklerine de bağlıdır. İşletme kararlılığı özellikle biyofilm tipi biyosensörlerde sınırlayıcı besi maddelerine ve bu besi maddelerinin difüzyona da bağlıdır. BOİ biyosensörlerinde eğer farklı mikroorganizma türlerinin karışımı seçildiyse karışık kültürlerin davranışları düşünülmelidir [Pirt, 1975]. Çok kültürlü mikrobiyal topluluklarda daha karmaşık etkiler görülebilmektedir. Bu sebeple belirli bir işletme süresi sonunda özellikle çok kültürlü türlerden oluşan biyosensörlerin performansı mikrobiyal topluluğu oluşturan türlerin zamanla değişmesi sonucu bozulabilmektedir. Karışık olmayan mikrobiyal kültürler karışık kültürlü sensörlere göre eğer saklama koşulları iyi olursa daha iyi bir stabilite gösterebilmekte ve işletme periyotları daha uzun olabilmektedirler.

BOİ biyosensörünün işletme kararlılığını örnek kompozisyonu, örnek konsantrasyonu, tampon kompozisyonu, ortalama ölçüm süresi, analiz sırasında dışarıdan sağlanan besinlerin varlığı, işletme ve saklama sıcaklıkları gibi bazı faktörler etkilemektedir. Genel olarak yaygın bir şekilde yapılan ölçümlerde kararlılık sağlanmakta fakat ara sıra yapılan ölçümlerde mikrobiyal ölümün olmasından kaynaklanan düşük kararlılık göstermektedir. Bu yüzden 4°C’de tampon içinde sensörü saklamak mikropların metabolik aktivitelerinin aktifsizleştirilerek var olan hücrelerin korunması sağlanır ve yeni hücrelerin büyümesi engellenmiş olur. Ölçüm yapmadan önce istenilen besin çözeltisi ile birkaç saat immobilize enzimleri aktif hale getirmek kısmen de olsa sensör kararlılığını bize sağlayacaktır.

Bu uzun dönem kararlı BOİ sensörlerine alternatif olarak tek kullanımlık BOİ sensörleri ve sensör yüzeyindeki biyofilm tabakanın kolaylıkla yer değiştirmesi ile elde edilen sensörler geliştirilebilir. Biyosensörün veya biyofilm tabakanın değiştirilmesi ile biyolojik tanıma elemanı olarak karışık kültürlerin kullanıldığı BOİ biyosensörleri, geniş ölçüm aralığında kararlılığın bozulup bozulmadığı konusunda kaygılanmadan kullanılabilirler.

2.4.5. BOİ_{sensör} ve BOİ₅ Arasındaki Uyuşmayı Geliştirme Teknikleri

BOİ_{sensör} ile BOİ₅ arasındaki uyuşmayı geliştirmek amacıyla aşağıdaki teknikler kullanılabilir.

2.4.5.1. Biyolojik Tanıma Elemanı Olarak Uygun Mikrobiyal Türlerin Seçilmesi

BOİ sensörleri kompleks kirlilik içeren örnekleri hızlı bir şekilde analiz edebilme özelliğine sahiptirler. Böylece sensör örnek içindeki biyolojik olarak parçalanabilir organik maddelerin her türü için yanıt verebilmelidir. Bu yüzden geniş substrat spektrumu için yüksek tanıma kapasitesine sahip biyolojik tanıma elemanına ihtiyaç vardır. *Torulopsis candida* [Sangeetha et al., 1996], *Trichosporon cutaneum* [Yang et al., 1997, Marty et al., 1997], *Pseudomonas putida* [Che et al., 1999], *Klebsiella oxytoca* AS1 [Ohki et al., 1994], *Bacillus subtilis* [Tan ve Qian, 1997, Riedel et al., 1988], *Arxula adenivorans* LS3 [Riedel et al., 1998, Chan et al., 1999, Tag et al., 2000, Tag et al., 2000], *Serratia marcescens* LSY4 [Kim ve Kwon, 1999], *Pseudomonas sp.* [Li ve Chu, 1991], *P. fluorescens* [Yoshida et al., 2000, Yoshida et al., 2001], *P. putida* SG10 [Chee et al., 2005], *Thermophilic bacteria* [Karube et al., 1989], *Hansenula anomala* [Kulys ve Kadziauskiene, 1980] ve maya [Chen et al., 2002] biyosensör uygulamalarında biyolojik tanıma elemanı olarak kullanılan türlerdir. BOİ biyosensörlerinde tek türlerin kullanımı kompleks türlerin analizinde sınırlı olmasından dolayı iki tanımlanmış mikrobiyal türün kombinasyonu yada değişik substrat spektrumlarında çoklu-türlerin kullanılması biyosensörün ölçüm performansında daha etkili sonuçlar verebileceği görülmüştür [Tan ve Wu, 1999, Heim et al., 1999, Tan et al., 1992, Tan et al., 1993, Li et al., 1994, Liu et al., 2004, Rastogi et al., 2003].

2.4.5.2. Uygun Kalibrasyon Çözeltilisinin Seçilmesi

BOİ_{sensör}, ile BOİ₅ arasındaki uygunluğun sağlanabilmesi bakımından uygun kalibrasyon çözeltisinin seçilmesi önemli parametrelerden bir tanesi olarak

düşünülmektedir. Geleneksel BOİ testleri için kullanılan GGA çözeltisi mikrobiyal BOİ biyosensörleri için kullanılan kalibrasyon çözeltisi olmasına rağmen biyosensörler için kullanılması uygun olmayan bir standart çözeltilerdir. Bunun sebepleri olarak; (i) mikrobiyal kirliliğe karşı stabil olmamaları, (ii) mikroorganizmaların glutamik asit reaksiyonları glikoz varlığında azalması, (iii) bu çözeltinin basit iki bileşik içermesinden dolayı kompleks kirlenici karışımları içeren atıksular için kalibrasyonunun gerçekçi olmaması olarak gösterilebilir.

Atıksuları analiz etmek için kullanılan BOİ sensörünün kalibrasyonu atıksu ile aynı bileşime sahip sentetik standart çözeltiler hazırlanarak yapılabilir. Fakat bu kalibrasyon çözeltilerini farklı bileşime sahip atıksularda kullanılmak uygun olmayabilir. Bu yüzden kalibrasyon çözeltisinin hazırlanmasında her özel durum göz önüne alınmalıdır.

2.4.5.3. Sensörün Tekrar İnkübe Edilmesi

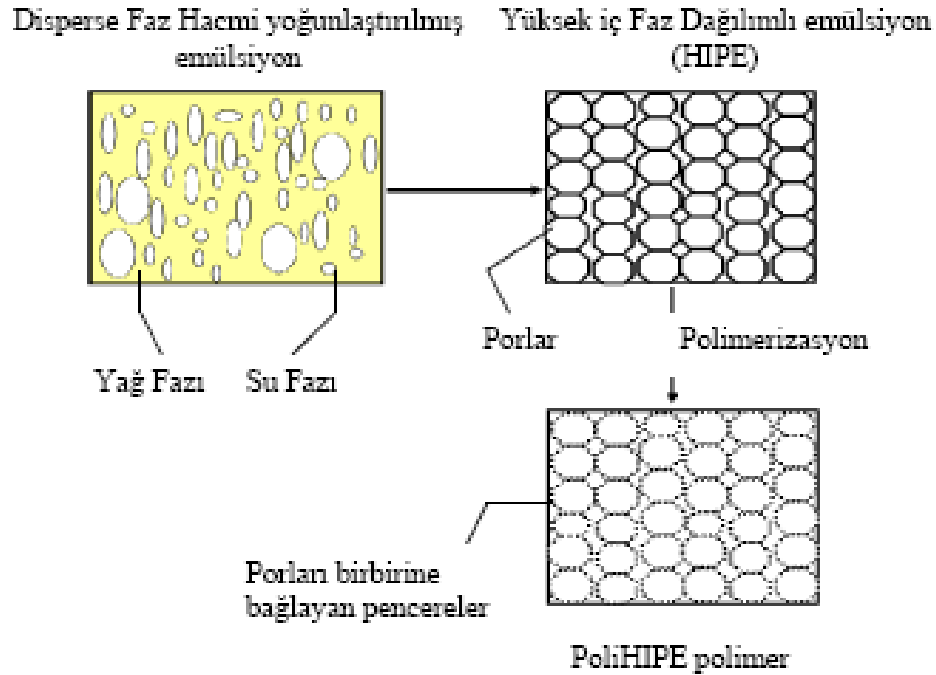
BOİ sensörünün örnek analizlerinden önce uygun substrat içeren çözelti içerisine daldırılarak birkaç saat inkübe edilmesi $BOI_{sensör}$ ile BOI_5 arasındaki uygunluğu geliştirecek ve duyarlılığını arttıracaktır. Bu mikrobiyal adaptasyon periyodu istenen bileşiklerin sindirilmesi için gerekli enzimlerin oluşmasını sağlamak için kullanılmaktadır. Literatürde yer alan çalışmalarda da görüldüğü üzere biyosensörün inkübe edilmesi ile yapılan sensör okumalarında inkübe edilmeden yapılan okumalara göre daha iyi verimler alınmıştır.

2.4.5.4. Örneğin İleri Arıtımı

BOİ biyosensörlerinin biyolojik parçalanabilir polimerlere cevap vermesini sağlamak örneğin asit hidrolizi veya enzimatik adım gibi ikinci arıtım adımları ile sağlanabilmektedir. Bu hidroliz olayı, polimerelerin mono-sakkarit, amino asit, glikol ve yağ asitleri gibi monomerlerine bölünmesinden dolayı $BOI_{sensör}$ değerinin artmasına sebep olacaktır. Daha sonra immobilize olmuş mikroplar, bu kolay parçalanabilir ikincil ürünleri sindirebilirler.

2.5. Mikro Gözenekli Polimer (MGP) Diskin Yapısı

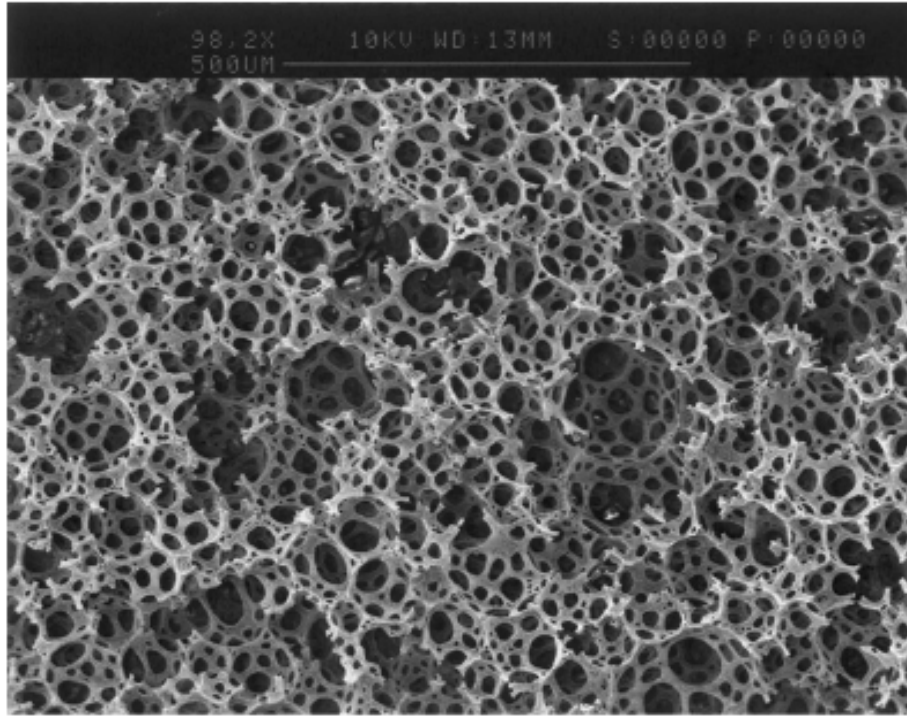
Gözenekli polimerlerin üretimi için farklı yöntemler bulunmaktadır. Mevcut polimerler sıvı ya da sıcak polimerden gaz habbeleri geçirilerek üretilmektedir. Proses esnasında gaz habbelerinin sabit kalması sağlanır ve daha sonra polimer soğutularak katılaşması sağlanır [Elme et al., 1988]. Bir başka yöntemde ise polimer/tuz kompoziti hazırlanır ve daha sonra kurutulan kompozit yapıdan tuz partikülleri uzaklaştırılır. Bu şekilde açık gözenekli bir yapı elde edilmiş olur. Bu maddeler oldukça yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen yapıları oldukça düzensiz ve kontrol etmek zordur [Mercier, et al.,2000]. Yeni bir metod olan, sürekli bir yağ fazı ve onun içerisinde iyi dağıtılmış bir su fazından oluşmuş emülsiyon anlamına gelen HIPE (high internal phase emulsion) ile bu poroz maddeleri daha düzenli bir yapıda üretmek mümkün olmuştur. HIPE, disperse su fazının sürekli yağ fazı içerisinde yüksek oranda dağıtılmasıyla elde edilen yağda su (W/O) emülsiyonudur. Bu emülsiyonun; yağ fazının polimerleştirilmesiyle ve ardından kurutulmasıyla disperse faz, yapıda boşluk olarak kalacaktır. Ürün; porozitesi yüksek, düşük yoğunluklu, açık hücresel yapıya sahip, rijit bir polimerdir ve polihipe (PHP) olarak adlandırılır [Barlık, 2006].



Şekil 2.12. Polihipe polimerinin şekillenmesinin şematik diyagramı

Şekil 2.12’de polimerik köpüğün şekillenmesi şematik olarak verilmiştir. PHP’nin en önemli özelliklerinden birisi açık hücresel yapısı yani gözenekleri birbirine bağlayan daha küçük çaplı pencerelerin oluşmasıdır [Akay, 1998].

STY-DVB kopolimeri olarak üretilen PHP polimeri en önemli karakteristiklerini hazırlanma tekniğinden almaktadır. İç fazın sürekli fazda yüksek oran da dağıtılmasıyla elde edilen emülsiyonun polimerleşme ürünü olarak PHP; açık hücresel yapısına, düşük yoğunluğa ve yüksek poroziteye sahiptir. Emülsiyonun hazırlanmasında kontrol edilebilir etken parametreler karıştırma hızı ve süresidir. Bir akışkan olarak emülsiyon girdiği kabın şeklini almakta ve farklı amaçlara uygun geometrilerde polimer üretimi sağlanmaktadır. Şekil 2.13’te verilen STY-DVB polimerinin SEM görüntüsünde polimerin boşluk yapısı ve pencere yapıları görülmektedir.



Şekil 2.13. STY-DVB Kopolimerinin SEM görüntüsü

Akay ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada PHP’ nin en önemli özellikleri şöyle sıralanmıştır:

- Gözenek hacmi % 97’ye kadar yükseltilebilir.
- Gözenekler küçük hollerle birleştirilirler veya delikli yapılabilir.

- Gözenek ve hol ebatları birbirlerinden bağımsız olarak kontrol edilebilir.
- Katılma veya polikondenzasyon reaksiyonları yapılabilir.
- Proteinler, silikatlar ya da organik polimer ile çapraz bağlanabilir. Bu yüzden geniş aralıkta poroz materyaller elde edilebilir.
- PHP' nin post polimerizasyonu / çapraz bağlanma modifikasyonu mümkündür. Bu, emülsiyon halde monomerler kullanılarak daha da kolaylaştırılabilir.
- PHP, blok ya da partiküler halde üretilebilir.
- Emülsiyon pompalanabildiğinden modül şeklinde üretmek mümkündür [Akay, et al.,1995].

STY-DVB polimeri yapısı sebebiyle birçok alanda kullanım alanı bulmaktadır. Polimer kimya sektöründe katı fazdaki diğer polimer ve yapıların sentezlenmesinde destek vazifesi görür. Bunun yanında polimer poroz olma özellikleri dolayısıyla elektrokimyasal sensör geliştirilmesinde sıkça kullanım alanı bulmaktadır. Ayrıca biyoloji ve biyomedikal alanlarda da kullanım alanı bulan PHP doku mühendisliğinde biyolojik olarak parçalanabilen polyester yapısıyla substrat ve enzim immobilizasyonunda destek malzemesi olarak kullanılmaktadır. Bunların dışında kimya ve mühendislik alanında; iyon değiştirici reçine üretiminde ve diğer amaçlar için ve tarımda su tutucu olmak üzere günlük hayatta da birçok kullanım alanına sahiptir. Spesifik olarak bu köpüklerin atık su arıtımında kullanılabilecek potansiyelleri olduğu bulunmuştur [Barlık, 2006].

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Kimyasallar

Glikoz, glutamik asit, fenol, stiren, divinilbenzen (DVB), sorbitan monooleate (Span 80) ve izo-propanol kimyasalları Sigma-Aldrich (Buchs, İsviçre) firmasından temin edilmiştir. Kullanılan bütün kimyasallar mümkün olan en yüksek safsızlıkta temin edildiği şekliyle kullanılmıştır.

3.2. Kalibrasyon Çözeltisi

1.5 g/100 ml glikoz ve 1.5 g/100 ml glutamik asit içeren “Glikoz-Glutamik Asit” (GGA) çözeltisi BOİ sensörün kalibrasyonu için standart çözelti olarak seçilmiştir [APHA, 1992]. Hazırlanan bu standart çözeltinin BOİ₅ değeri standart metotlar kitabında belirtilen klasik ölçüm yöntemine göre ölçülmüş ve $20425 \pm 7\%$ mg/l (n=6) olarak bulunmuştur. BOİ biyosensörün kalibrasyonu için gerekli kalibrasyon çözeltileri stok GGA çözeltisinden seyreltmeler yapılarak hazırlanmıştır.

3.3. Atıksu Örnekleri

Atıksu örnekleri Gebze’de bulunan üç farklı evsel ve endüstriyel atıksu arıtma tesislerinden alınmıştır. Arıtma tesislerinden alınan atıksuların hangi arıtma tesislerinden alındığı ve KOİ ile BOİ₅ değerleri Çizelge 3.1’de gösterilmiştir. Tuzla Evsel Atıksu Arıtma Tesisi’nden alınan atıksu örneği sadece evsel nitelikli atıksuları, Şekerpınar Evsel ve Endüstriyel Atıksu Arıtma Tesisi’nden alınan atıksu örneği sadece endüstriyel nitelikli atıksuları ve Gebze Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi (GPOSB) Endüstriyel Atıksu Arıtma Tesisi’nden alınan atıksu örneği ise hem evsel hem de endüstriyel nitelikli atıksuları içermektedir. Atıksu örnekleri çözünmemiş partikülleri uzaklaştırmak için 0.45 µm Millipore membran ile filtre edilerek -20 °C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. Evsel ve Endüstriyel Atıksuların KOİ ve BOİ₅ değerleri

Atıksu Örneği	KOİ (mg/l)	BOİ ₅ (mg/l)
Tuzla Evsel Atıksu Arıtma Tesisi	750	330
Şekerpınar Evsel ve Endüstriyel Atıksu Arıtma Tesisi	15000	9000
Gebze Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Endüstriyel Atıksu Arıtma Tesisi	675	190

3.4. Mikroorganizmalar ve Tampon Çözelti

Fenol parçalayan bakterilerden *Pseudomonas syringae* (AEK1), aromatik hidrokarbonları kolaylıkla sindirebilmeleri ve çok geniş spektrumda biyolojik olarak zor parçalanabilir türleri parçalama kabiliyetlerinin olmasından dolayı sensörün biyo-katalitik bölümü olarak seçilmişlerdir. *P. Syringae*, katı ortam olarak içerisinde karbon ve enerji kaynağı olarak fenol bulunan besin agarı içeren Petri kaplarına ekilerek oda sıcaklığında 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Bakteriler, besin olarak fenol içeren besin agarına ekilmişleridir çünkü fenol, eğer bakteriler adapte edilmemiş ise biyolojik sindirim sırasında onlara toksik olan dirençli bir bileşiktir [Bajaj et al., 2008]. Böylece fenol ile ekim yapıldığından *P. Syringae* dışında diğer türlerin gelişimi ve üremesi engellenmiştir.

Besin agarında büyüyen *P. Syringae* kültürleri içerisinde tampon çözelti bulunan 250 ml'lik erlenler içerisine aşılanarak yeterince çoğalmaları sağlanmıştır. Tampon çözelti içerisinde mikroorganizmalar için gerekli minerallerin bulunduğu üç farklı çözeltinin belirli oranlarda karıştırılması ile elde edilen ve pH 6.8 değerinde olan bir çözeltidir (Çizelge 3.2) [Akay ve ark., 2005, Liu ve Mattiasson, 2002]. *P. Syringae* kültürlerinin erlenler içerisinde çoğalma işlemi tampon çözelti içerisine fenol ilavesi 28 °C'de 3 gün süre ile 250 rpm'de karıştırarak yapılmıştır. Stok *P. Syringae* kültürleri 4 °C'de saklanmış ve periyodik olarak besin agarları değiştirilmiştir.

Çizelge 3.2. Mineral tampon çözeltinin içeriği ve hazırlanışı

<u>Çözelti A^a</u>	
Na ₂ HPO ₄	141.2 g
KH ₂ PO ₄	136 g
<u>Çözelti B^a</u>	
MgSO ₄	14.45 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	3.33 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	9.25 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	99 mg
Metal 44	50 ml
<u>Çözelti C^a</u>	
(NH ₄) ₂ SO ₄ .7H ₂ O	200 g
<u>Metal 44^a</u>	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10.95 g
MnSO ₄ .7H ₂ O	1.54 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	5.00 g
CuSO ₄ .4H ₂ O	392 mg
Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	248 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	177 mg
1 L'lik tampon çözeltinin hazırlanışı:	
Çözelti A: 40 ml	
Çözelti B: 20 ml	
Çözelti C: 5 ml	
Distile su: 935 ml	

^a Kimyasallar distile su içerisinde çözülmüş ve son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

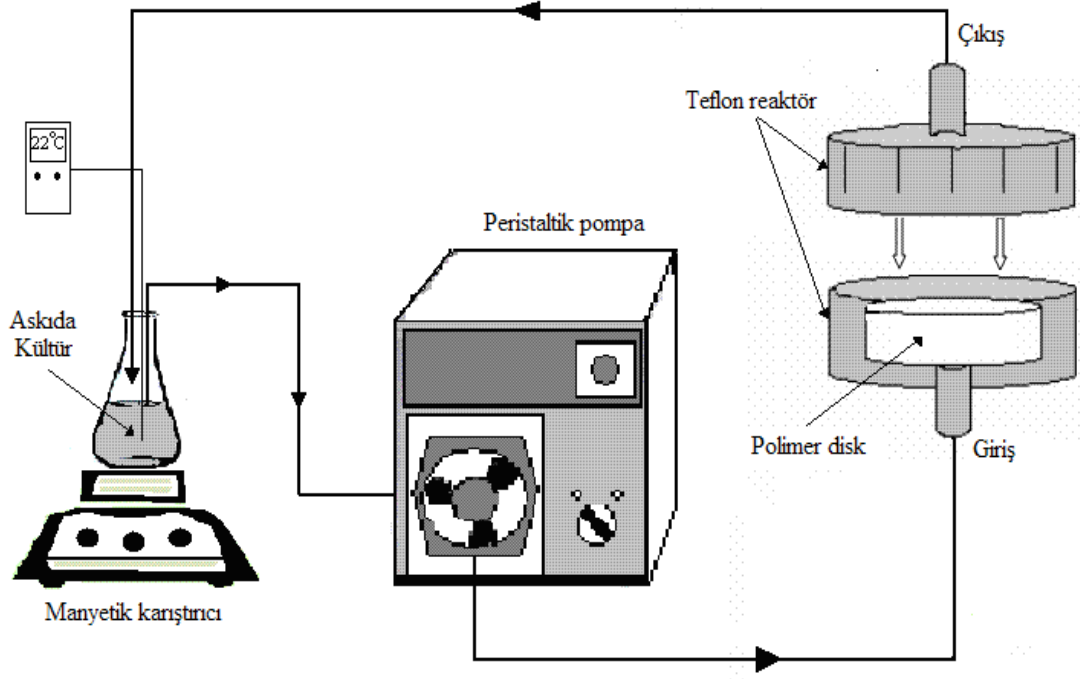
3.5. Mikro Gözenekli Polimer (MGP) Ortamın Hazırlanması

Mikro gözenekli polimerin (MGP) üretimi için yağ fazında monomer olarak stiren (STY), çapraz bağlanma ajanı olarak divinil benzen (DVB) ile yağda çözünen surfaktan Span80 (Sorbitan monoleate) kullanılmıştır. Mikro gözenekli polimer

(MGP) diskler %90 su fazı ile %10 organik fazdan hazırlanan emülsiyonun polimerizasyonu ile elde edilmektedir. 50 ml'lik kapalı bir tüp içerisine içinde radikalik polimerizasyon reaksiyonunu başlatmak için 0.7 g potasyum peroksidosülfat bulunan 45 ml'lik su konulmuştur. Bu su fazın üzerine % 59 stiren (monomer), % 26 divinil benzen (çapraz bağlama maddesi) ve %15 span-80 (yüzey aktif madde)'den oluşan 5 ml'lik organik faz ilave edilmiş ve 500 rpm hızda manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Emülsiyonun hazırlanmasından sonra polimerizasyon için süspansiyon 80°C'lik etüvde yaklaşık 3 saat bekletilmiştir. Daha sonra polimer blok tüpten çıkarılarak 60–65 °C'de 1 gün süre ile kurutulmuştur. Kurutma işlemi bittikten sonra disk yaklaşık 0.5 cm. kalınlığında kesilerek propanol ve su ile yıkanarak disk içerisindeki monomer/çapraz bağlayıcıların giderilmesi sağlanmıştır. Yıkama işleminden sonra kurutularak mikroorganizma immobilizasyonu için hazır hale getirilen diskler sensör uygulamaları için saklanmıştır.

3.6. Mikro Gözenekli Polimer (MGP) Diskin Biyo-katalitik Olarak Hazırlanması

Bakterilerin MGP disk içerisine immobilizasyonu basınç sürücülü akış tekniği ile yapılmaktadır. Bu teknikte, MGP diskler 0.2 cm kalınlıkta ve 1.4 cm çapta hazırlanarak Şekil 3.1'de gösterilen Teflon disk tutucu içerisine yerleştirilir. MGP disklerin etkili çapı 1.0 cm'dir. Fenol ilavesi ile tampon çözelti içinde çoğaltılan *P. Syringae* kültürleri Teflon tutucu içerisine yerleştirilen MGP diskten 24 saat süreyle 22 °C sıcaklıkta ve 1.0 ml/dak. hızda geçirilmesi suretiyle bakteri immobilizasyonu gerçekleştirilmektedir. İmmobilizasyon işlemi sırasında tampon çözelti içerisindeki bakteri hücreleri MGP diskin mikro gözenekli duvarlarına tutunmaktadırlar. Daha sonra bu mevcut mikro biyo-reaktör, içerisinde 100 mg/l fenol bulunan tampon çözelti ile 5 gün boyunca sürekli beslenmektedir. Böylece MGP disk içerisine immobilize olmuş bakteri hücrelerinin gelişmesi ve çoğalması sağlanmaktadır.



Şekil 3.1. Bakterilerin MGP disk içerisine immobilizasyonunun şematik gösterimi

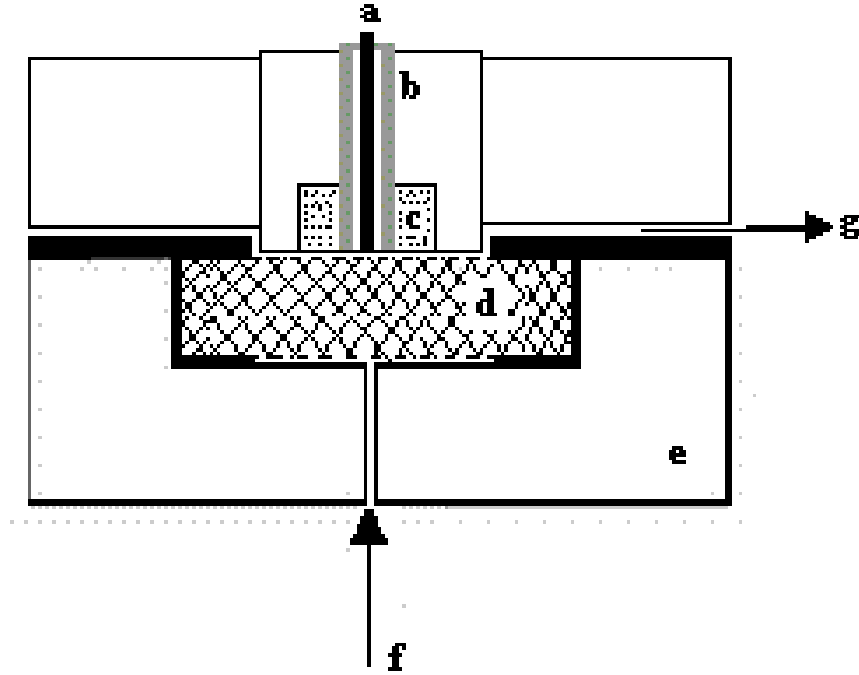
3.7. MGP Disklerin SEM Analizleri İçin Hazırlanması

MGP diskler, gözeneklerinde immobilize olmuş mikroorganizmaları açıklamak amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analiz edilmiştir. Bakteri içeren polimerik maddeler %2.5 glutaraldehit içeren distile su içinde 4 °C sıcaklıkta saklanmıştır. MGP örnekleri dikey olarak kesilerek bakterilerin diskin yüzey, orta ve alt kısımlarında ne oranlarda immobilize olduğu SEM (FEG-SEM Leo Supra 35, Oberkochen, Germany) ile analiz edilmiştir.

3.8. Sensor Tasarımı

Biyo-katalitik aktiviteyi içeren MGP disk ile mikro oksijen probunun birleştirilmesi ile elde edilmiş mikrobiyal BOİ biyosensörü Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Biyo-katalitik olarak aktifleştirilen MGP disk Teflon tutucudan çıkarılarak Clark tip mikro çözünmüş oksijen probu (Yellow Springs Instrument Co.

Inc. [YSI 5775]) içeren akış hücresine Şekil 3.2’de görüldüğü gibi yerleştirilir. Çözünmüş oksijen probu çalışan elektrot olarak platin katot, referans elektrot olarak gümüş anot ve 0.1 M potasyum klorür (KCl) elektroliti içermektedir. Taşıyıcı çözelti çapı 1.5 mm olan giriş kanalından reaktöre girmekte ve 0.14 ml toplam gözenek hacmi olan MGP disk içerisine dağılmaktadır. Çözünmüş oksijen, polimer diskten çıkan suyun toplandığı 0,2 ml’lik bir hacimde ölçülmektedir.

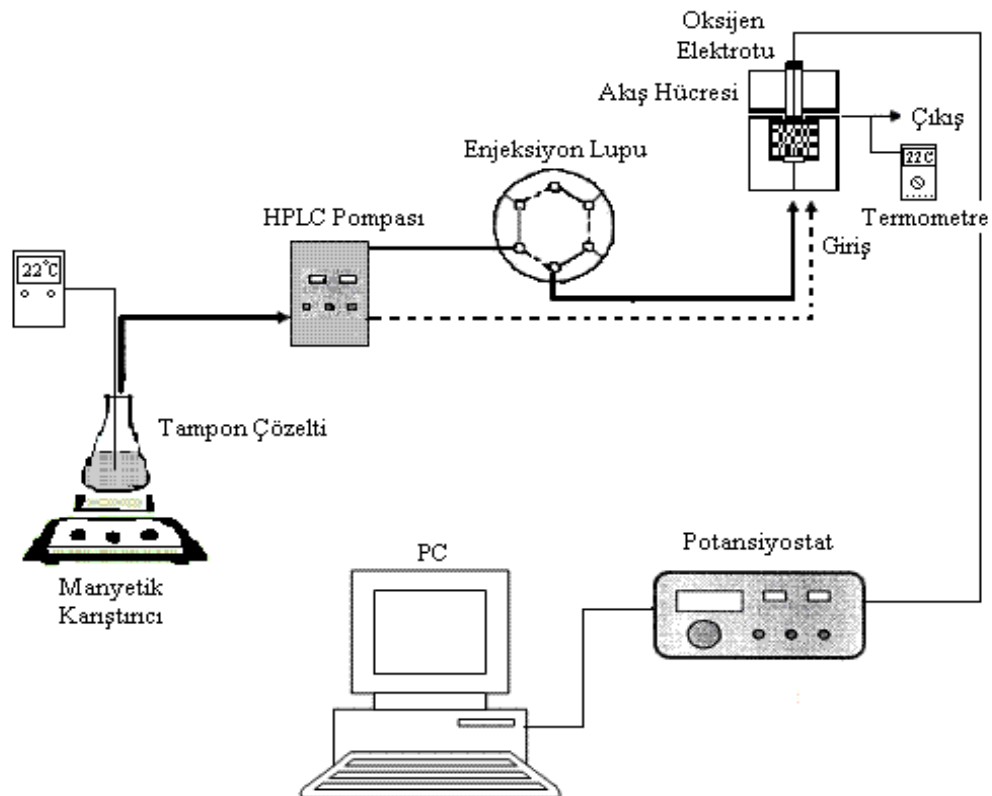


Şekil 3.2. BOİ Biyosensörün şematik gösterimi: (a) katot (Pt), (b) anot (Ag/AgCl), (c) elektrolit (KCl), (d) MGP disk, (e) Teflon, (f) giriş ve (g) çıkış.

3.9. BOİ Ölçüm Sistemi

Akış hücresi Şekil 3.3’te görüldüğü gibi biyosensör sistemine yerleştirilir. Biyosensör sistemi, biyo-katalitik aktivitenin olduğu MGP diskten, HPLC pompasından (LC1120, GBC Scientific Equipment, Australia), akım enjeksiyon çalışması yapılacak ise enjektörden (Rheodyne, Model 7725(i), Manual Sample Injector, USA), 1 ml hacmindeki enjektör lupundan ve taşıyıcı sıvı olan tampon çözeltiyi karıştırmak için bir manyetik karıştırıcıdan meydana gelmektedir. Tampon

çözültü çözünmüş oksijen konsantrasyonunu sabit tutmak amacıyla 500 rpm hızda karıştırılarak sıcaklığı kontrol edilmektedir. Clark tip özünmüş oksijen probunun çalışan ve referans elektrotları potansiyostata (CHI Instruments Electro Analyzer, Austin, TX, USA) bağlanır ve Ag/AgCl referans elektroda -800 mV potansiyel uygulanarak akım değerleri okunmaktadır. Akım değerleri bilgisayara yüklü CHI 842B elektro-analiz programı ile bilgisayara aktarılarak kaydedilmektedir.

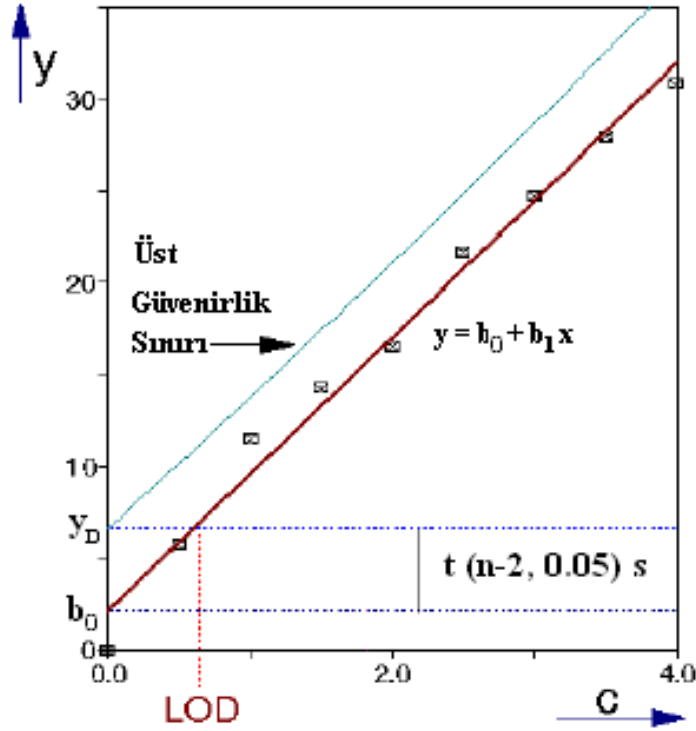


Şekil 3.3. BOİ ölçüm sistemi

3.10. Biyosensörlerde Ölçüm Limiti Hesaplaması

Kimyasal analizlerde ölçüm limiti, şahit numuneden farklı analitik ölçümlerin istatistiksel olarak tanımlanabilen en küçük konsantrasyonu tayin etmek için uygulanan genel bir performans karakteristiğidir [IUPAC, 1978]. Uluslararası Kuramsal ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tanımına göre konsantrasyon ve sinyal terimi olarak ifade edilen ölçüm limiti şahit numune ölçümlerinin ortalamasına ve standart sapma değerlerine bağlı olarak ölçülebilmektedir. Hubaux ve Vos ölçüm

ve karar limitlerinin kalibrasyon eğrisinden bulunmasına öncülük etmişler ve şahit numunelerin deneysel tekrarlarına bağlı kalmaksızın regresyon eğrisinin güvenilirlik limitlerinden ölçüm limitlerini hesaplamışlardır [Hubaux and Vos, 1970].



Şekil 3.4. Lineer kalibrasyonun üst güvenilirlik limitine göre kritik seviye (y_D) ve ölçüm limitinin (LOD) tanımı [Mocak ve ark., 1997].

Şekil 3.4'ten görüldüğü üzere “ y_D ” ölçülebilir minimum sinyal olup bu değer altında elde edilen sinyaller ihmal edilebilir. y_D 'ye bağlı olarak elde edilen güvenilir limit (LOD) ise şahit örnekten elde edilen sinyalden farklı olarak ölçülebilen en küçük konsantrasyondur. Bu durum şunu ifade etmektedir ki ölçüm limiti (LOD) değerinden daha düşük konsantrasyonlu örneklerde β güven aralığı dışında kalan ve y_D sinyalinden daha küçük sinyaller elde edilebilir. Bu limitlerle regresyon eğrisinin güven aralığı arasındaki matematiksel ifade şu şekilde ifade edilebilir:

$$y_D = b_0 + t_{1-\alpha, n-2} \cdot s \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{c}^2}{\sum_{i=0}^n (c_i - \bar{c})^2}} \quad (3.1)$$

$$LOD = t_{1-\alpha, n-2} \cdot \frac{s}{b_1} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{c}^2}{\sum_{i=0}^n (c_i - \bar{c})^2}} \quad (3.2)$$

Bu denklemlerde b_0 ; kesim noktasını, b_1 ; eğimi, s ; ölçüm noktalarının standart sapmasını, $\bar{c}$; standart ölçümlerin ortalamasını, m ; analiz edilen numunenin ölçüm tekrar sayısını, n ; kalibrasyon oluştururken ölçülen nokta sayısını, $t_{1-\alpha, n-2}$; $n-2$ serbestlik derecesi ve α olasılığı için tek taraflı istatistiksel t-dağılım değerini ifade etmektedir.

3.11. Dispersiyon Modeli

BOİ sensör çalışmalarında glikozun tükenme hızı birinci mertebeden kabul edilmiş ve oksijen konsantrasyonunun ortamda fazla miktarda bulunması nedeniyle kısıtlayıcı olmadığı kabulü yapılmıştır. Ancak oksijen tüketimi ortamdaki glikoz konsantrasyonunun bir fonksiyonu şeklinde ifade edilmiştir. Kinetik denklemler aşağıda verilmiştir.

$$\frac{dC_g}{dt} = -k_g C_g \quad (3.3)$$

$$\frac{dC_o}{dt} = -k_o C_g C_o \quad (3.4)$$

burada, C_g ; glikoz konsantrasyonu (mg/l), C_o oksijen konsantrasyonu (mg/l), k_g ve k_o glikoz ve oksijen tüketim hızları (s^{-1}) ve t ise zamanı ifade etmektedir.

Bu kinetik ifadeler, taşınım (adveksiyon dispersiyon) denklemleri ile ilişkilendirildiğinde disk içindeki oksijen ve glikoz konsantrasyonlarının taşınımı modellenenir.

$$\theta \frac{\partial C_g}{\partial t} = D_h \frac{\partial^2 C_g}{\partial x^2} - v \frac{\partial C_g}{\partial x} - k_g C_g \quad (3.5)$$

$$\theta \frac{\partial C_o}{\partial t} = D_h \frac{\partial^2 C_o}{\partial x^2} - v \frac{\partial C_o}{\partial x} - k_o C_g C_o \quad (3.6)$$

burada, θ diskin porozitesini, D_h hidrodinamik dispersiyon katsayısını ve v ise kesit alan hızını (Darcy hızı) ifade etmektedir. Denklemler simültane olarak Crank Nicholson yöntemi ile çözülmüş olup başlangıç ve sınır koşulları aşağıdaki şekilde belirlenmiştir.

Başlangıç koşulları:

$$@t = 0, \quad 0 \leq x \leq L, \quad C_g = 0, \quad C_o = C_b$$

burada C_b belirli deney şartlarında elde edilen doymuş oksijen konsantrasyonudur.

Sınır şartları:

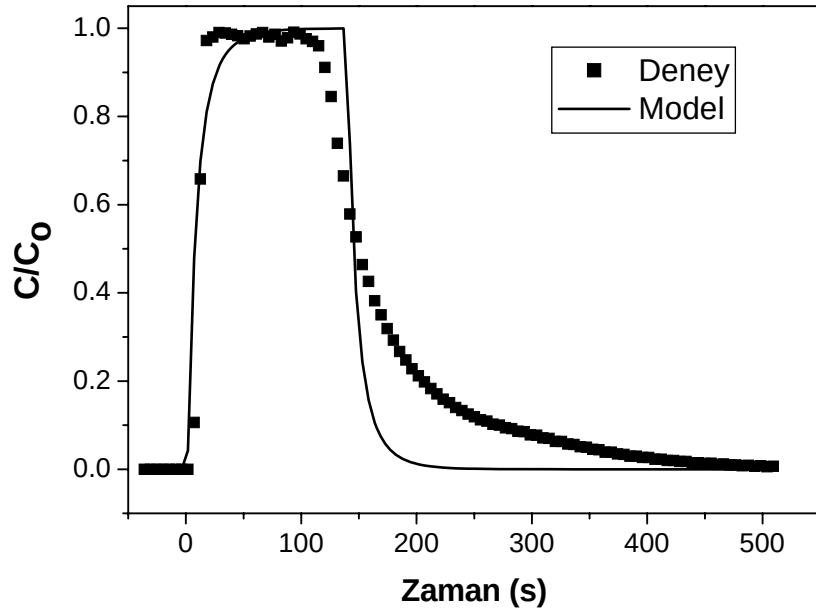
$$@x = 0, \quad C_o = C_b, \quad t \geq 0$$

$$@x = 0, \quad C_g = C_{gb}, \quad 0 \leq t \leq t_1, \quad C_g = 0, \quad t > t_1$$

$$@x = L, \quad \frac{\partial C_o}{\partial x} = \frac{\partial C_g}{\partial x} = 0$$

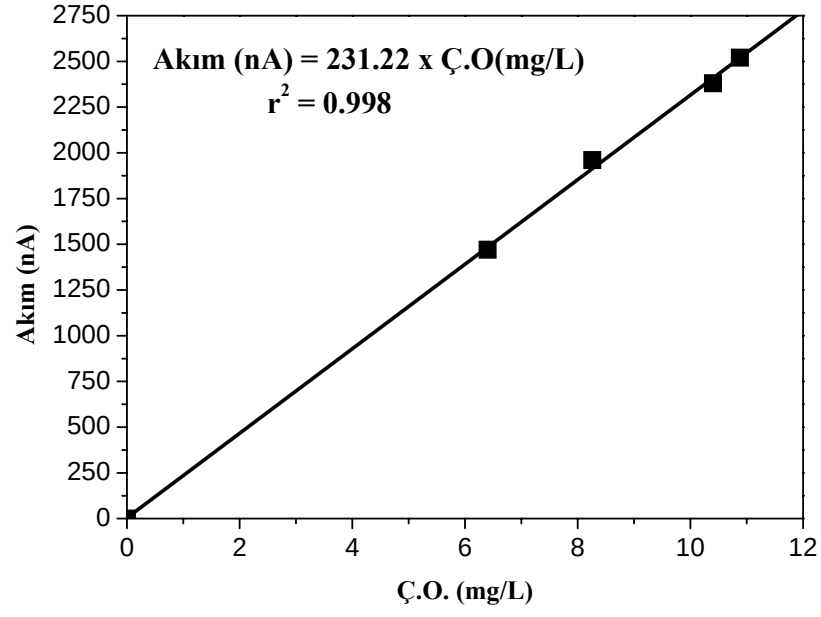
burada, L disk uzunluğu, C_{gb} başlangıç glikoz konsantrasyonu (mg/l), ve t_1 de glikoz enjeksiyon süresini (s) ifade etmektedir.

Modelin uygulanmasında gerekli dispersiyon katsayısının bulunması amacıyla reaktörde iz element çalışması reaktöre potasyumiyadür (KI) enjekte edilerek yapılmış ve elde edilen grafik Şekil 3.5'te gösterilmiştir. İz element reaktöre enjekte edilerek reaktör içerisinde hiçbir reaksiyon olmadığında nasıl bir dağılım yaptığı gösterilmiştir. Ayrıca iz element için yapılan enjeksiyon çalışmasında elde edilen dotalar için dispersiyon modeli uygulanarak Şekil 3.5'te karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Biyosensör sistemine KI enjeksiyonu sonucu elde edilen C/C_0 değerleri ile model uygulaması ile bulunan C/C_0 değerleri

Mikrobiyal BOİ biyosensörü için model çalışması uygulamalarında her bir deney için potansiyostat ile ölçülen akım değerleri “mg/l” ifadesine dönüştürülmüş ve modelde çözünmüş oksijen değerleri kullanılmıştır. Akım değerleri çözünmüş oksijen cinsinden ifadesi Şekil 3.6’da görülen kalibrasyon eğrisi kullanılarak yapılmıştır. Bu kalibrasyon eğrisi, farklı sıcaklıklarda (10, 20, 30 ve 40 °C) elde edilen çözünmüş oksijen değerlerine karşılık potansiyostat ile ölçülen akım değerleri ölçülerek oluşturulmuştur. Çözünmüş oksijen ölçümleri WTW marka çözünmüş oksijen ölçüm aleti ile yapılmıştır. Şekil 3.6’da verilen çözünmüş oksijen değerleri farklı sıcaklıklarda ölçülen değerler olup 40 °C sıcaklıkta çözünmüş oksijen değeri 6.4 mg/l, 10 °C’de ölçülen çözünmüş oksijen değeri ise 10.88 mg/l olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.6. Farklı sıcaklıklarda ölçülen çözünmüş oksijen değerlerine karşılık gelen akım değerleri ve kalibrasyon eğrisi

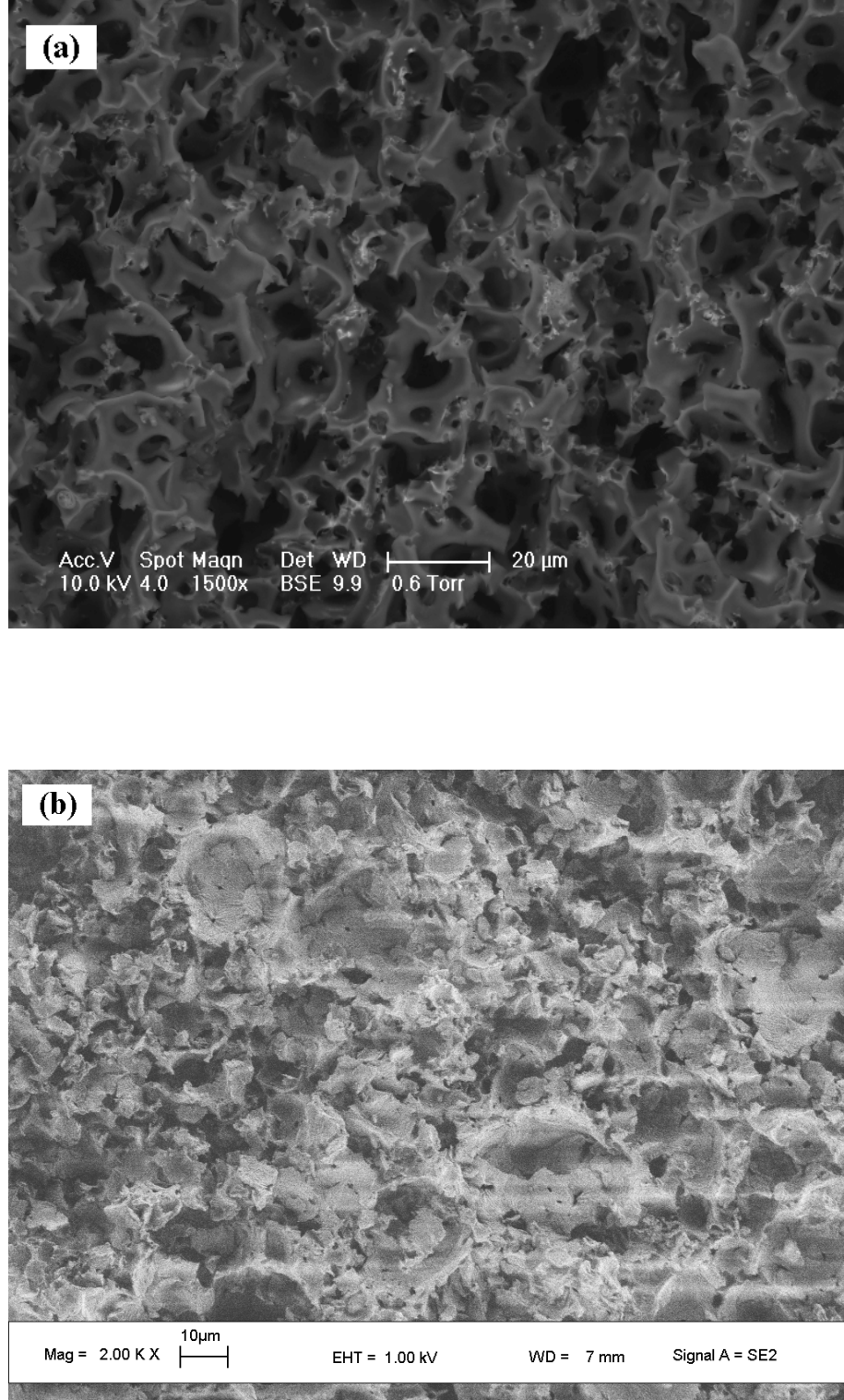
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Mikrobiyal BOİ biyosensörü geliştirmek amacıyla mikro gözenekli polimer (MGP) diskte yapılan çalışmalarda polimer diske *Pseudomonas syringae* immobilize edilerek sürekli besleme ve akım enjeksiyonu teknikleri kullanılarak kalibrasyon çalışmaları yapılmış ve gerçek atıksular kullanılarak BOİ ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca polimer diskin SEM görüntüleri çekilerek mikroorganizmaların disk içerisine adsorpsiyonu ve immobilizasyonu incelenmiştir. Bunlara ilave olarak dispersiyon modeli geliştirilerek akım enjeksiyonu tekniğinde elde edilen datalar için uygulanmıştır.

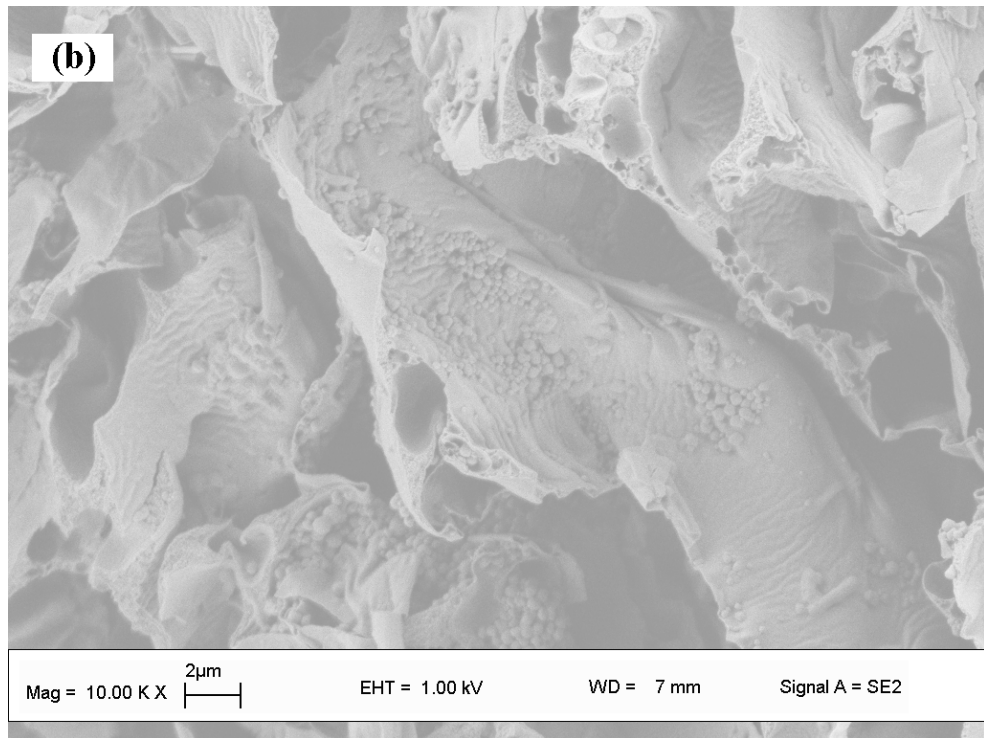
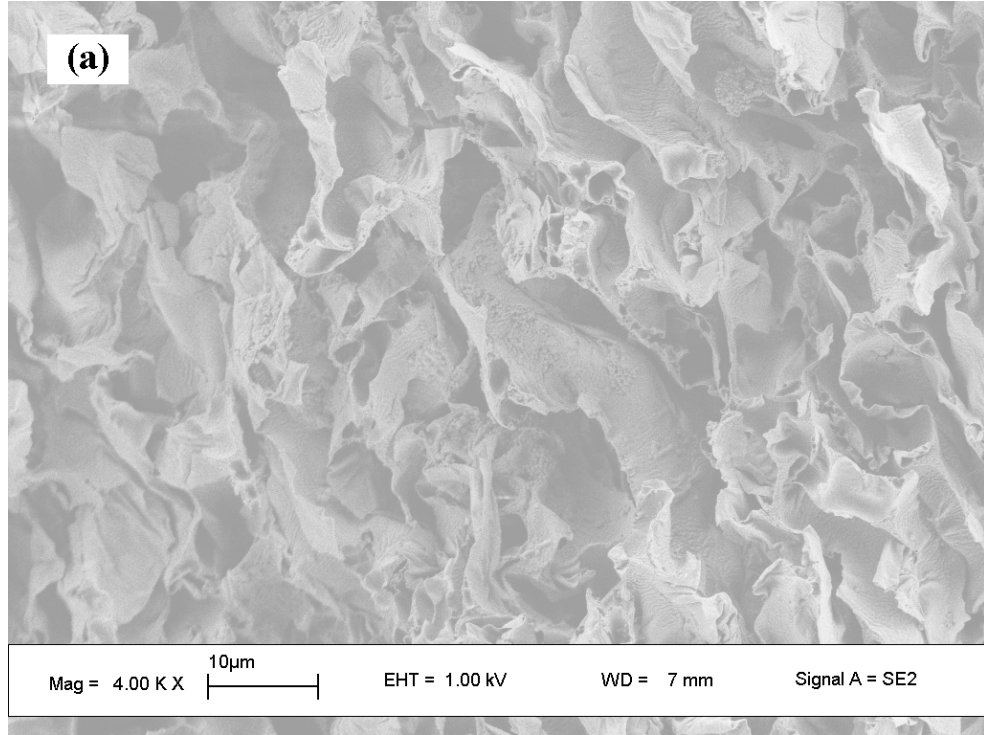
4.1. Mikro Gözenekli Polimer Diskin Özellikleri

Su ve yağ fazından hazırlanan MGP diskin SEM grafikleri Şekil 4.1’de verilmiştir. Polimer diskin geniş gözenekleri olduğu ve bu gözeneklerin birbiriyle bağlandıkları Şekil 4.1.(a)’dan görülmektedir. Ancak Şekil 4.1.(b)’de görüldüğü üzere MGP disk akış hücresine yerleştirildikten sonra hücrede meydana gelen basınç sonucunda buruşarak gözenek boyutları küçülmektedir. Dolayısıyla %90 su fazı ve %10 yağ fazından meydana gelen polimer disk akış hücresinde basınç altında sıkışma sonucu Şekil 4.1 (a)’da görülen porozitesini kaybetmektedir.

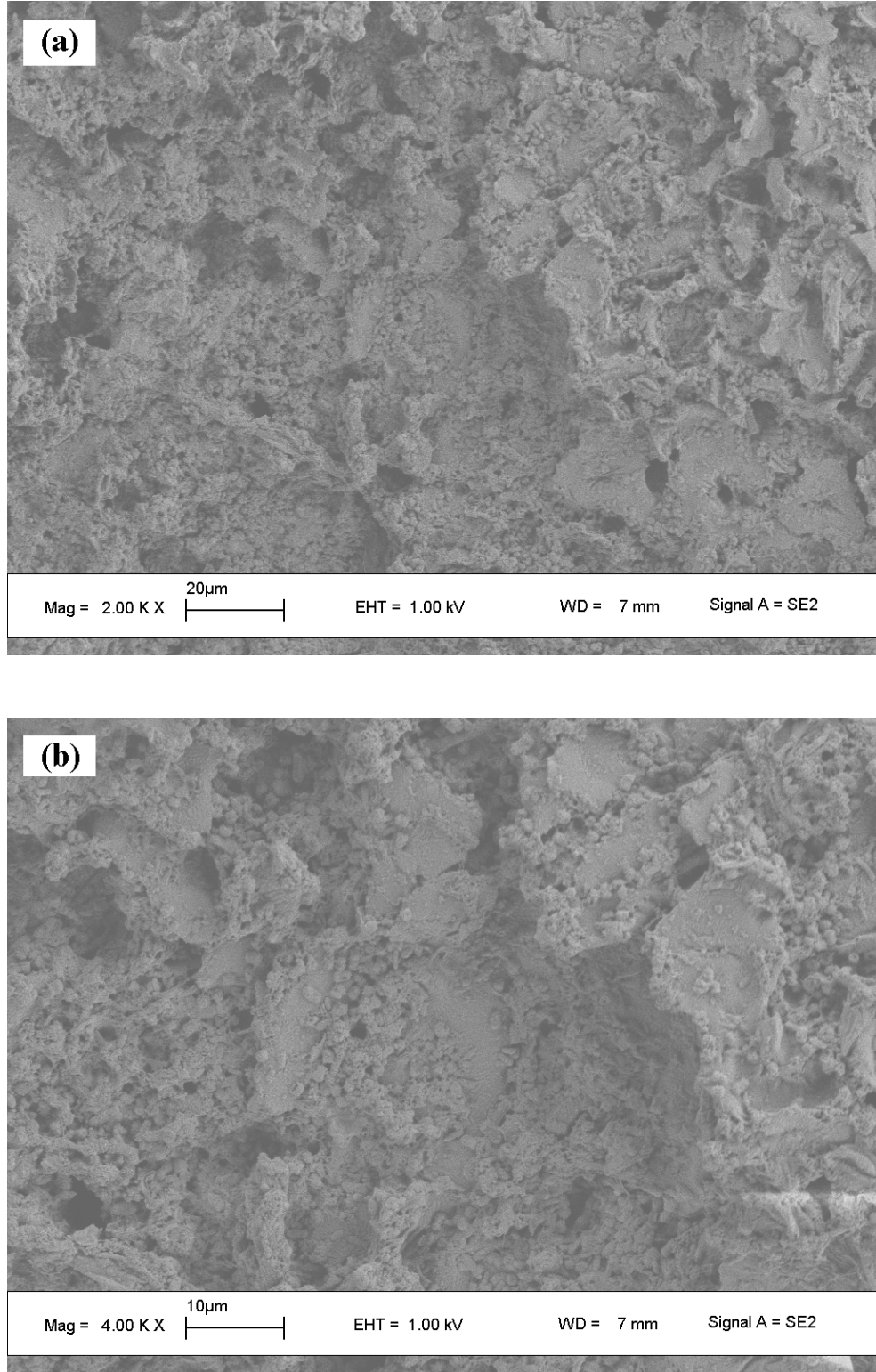
Şekil 4.2 ve 4.3’te mikroorganizma immobilizasyonu sonucu elde edilen polimer diskin SEM görüntüleri verilmiştir. Şekil 4.2’de MGP diskin kesit görüntüleri verilmekte olup gözenek duvarlarına tutunarak burada gelişip çoğalan bakterilerin olduğu görülmektedir. Hücrelerin gözenek duvarları yüzeyinde hiçbir hücre dışı matris oluşturmada tek tabaka oluşturdıkları görülmüştür. Şekil 4.3’te ise MGP diskin yüzeyinde düşük ve yüksek çözünürlüklü çekilmiş SEM görüntüleri verilmektedir. Şekillerden de anlaşılacağı üzere MGP diskin yüzeyi bakteriler tarafından yoğun bir şekilde kaplandığı görülmektedir.



Şekil 4.1. Polimer diskin SEM görüntüleri (a) Akış hücresi içerisine yerleştirilmeden önce (b) Akış hücresinde saf su ile yıkandıktan sonra.

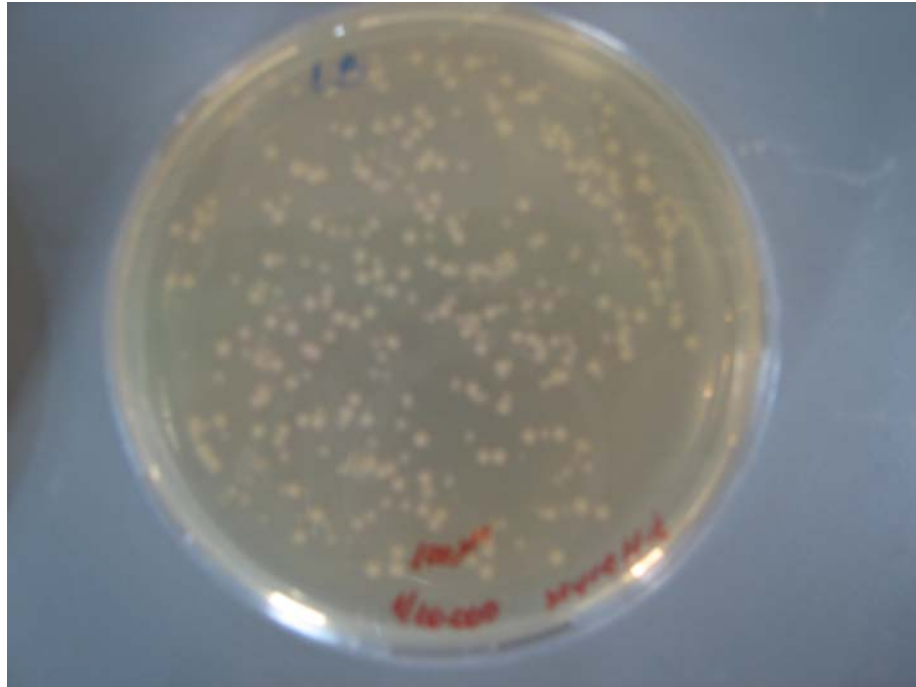


Şekil 4.2. MGP diskin immobilizasyon sonucu kesit görüntüsü (a) Düşük çözünürlük (b) Yüksek çözünürlük



Şekil 4.3. Mikroorganizma immobilize edilmiş MGP diskin yüzey SEM görüntüleri (a) düşük çözünürlük, (b) yüksek çözünürlük

Mikroorganizmaların polimer disk içerisinde immobilizasyon işlemi yavaş bir prosestir. Gözenekler içerisinde çoğalmaları için önce hücre çoğalmasına ihtiyaç vardır ve proses, hücrelerin gözenekler içine difüzyonu ile kontrol edildiğinden hücrelerin çoğalma hızı azaltılmıştır. Hücrelerin gözenekler içine transferi hücre çoğalması ve biyofilm içinde sonuçlanan hücre-dışı matris oluşumunun sonucu olarak iç bağlantı boşluklarının azaltılması ile daha fazla zayıflatılmıştır. Bu yüzden, basınç altında hücre beslemesi hücrelerin mekanik olarak eriyip yok olmasını engellemektedir. Hücre dispersiyonunun gözenekli ortam boyunca olması tek veya toplu hücrelerin gözenekler içinde zapt edilmesini sağlamaktadır [Erhan ve ark., 2004]. Mekanik olarak yok olan hücreler ise çözelti ile birlikte yıkanarak ortamdan uzaklaştırılabilmektedir. Polimer diskte tutuklanmış mikroorganizmalar da akış ile birlikte sistemden uzaklaşmaktadırlar. Bu uzaklaşma sonucu gözeneklerin tıkanması engellenmiş olmakta ve sürekli akış ile birlikte metabolitler ve ürünler kolaylıkla mikro-reaktörü terk etmektedirler. Şekil 4.4'te polimer diskten kopan mikroorganizmaların varlığını ispatlamak amacıyla reaktör çıkış suyu katı agara ekim yapılarak mikroorganizmaların üremesine bakılmıştır. Şekil 4.4'te reaktör çıkışında mikroorganizmaların yoğun bir şekilde bulunduğu görülmektedir.



Şekil 4.4. Reaktör çıkış suyunun katı agara ekilmesi sonucu üreyen mikroorganizmalar

4.2. Sürekli Besleme Tekniği ile Biyosensör Ölçümleri

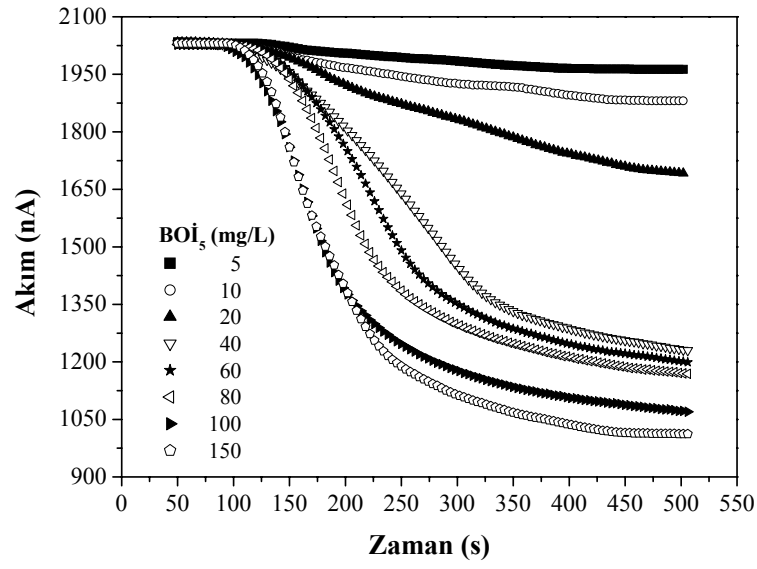
Mikrobiyal BOİ biyosensörünün geliştirilmesi aşamasında yapılan çalışmalardan sürekli besleme yöntemi ile BOİ ölçümünde reaktörden sürekli tampon çözelti geçirilirken akım değerleri stabil duruma geldiği zaman tampon çözelti içerisine besi maddesi ilave edilerek mikro gözenekli ortamda immobilize olan mikroorganizmalar ile reaksiyona girmesi ve bunun sonucu akım değerlerinin azalarak tekrar stabil hale gelmesi sağlanmaktadır. Sürekli besleme ile yapılan ölçümlerde Şekil 2.10'da görüldüğü üzere iki farklı ölçüm yöntemi bulunmaktadır. Bu ölçüm yöntemleri “*kinetik*” ve “*dinamik*” metotlar olarak isimlendirilmektedirler. Kinetik ölçümde giriş akım değişiminin zamanla değişimi ($\delta i / \delta t$) substrat konsantrasyonu bağlı olarak ölçülür. Dinamik metotta ise BOİ ölçümleri için giriş ve çıkıştaki durgun hal akımları arasındaki akım farkı kullanılır. Dinamik ve kinetik ölçüm metotları arasında kıyaslama yapıldığında kinetik metodun daha hızlı sonuç vermesi, kolay işletimi ve sürekli izlemeler için daha uygun olması gibi avantajları vardır [Liu ve ark., 2000].

Sürekli besleme yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda farklı akış debilerinde BOİ ölçümleri yapılmıştır. Farklı debilerde 5–150 mg/l BOİ₅ konsantrasyonları için yapılan sensör okumaları ile kalibrasyon çalışmaları yapılmıştır. BOİ biyosensörü için yapılan farklı debilerdeki çalışmalar sonucu en uygun debi seçimi yapılmıştır. Sürekli ölçüm tekniğinde dinamik ve kinetik yöntemler için ayrı ayrı ölçüm süreleri bulunmuştur. BOİ biyosensörü ile optimum debide farklı sıcaklık ve pH değerlerinde ölçümler yapılarak biyosensörün davranışı incelenmiştir. Ayrıca farklı disk hacimlerinde de ölçümler yapılarak disk kalınlığının buna bağlı olarak mikroorganizma yoğunluğunun sensör yanıtına etkisi araştırılmıştır. Son olarak atıksu ölçümleri yapılarak kinetik ve dinamik metoda göre atıksuların BOİ değerleri hesaplanarak klasik BOİ₅ analizleri ile karşılaştırılmıştır.

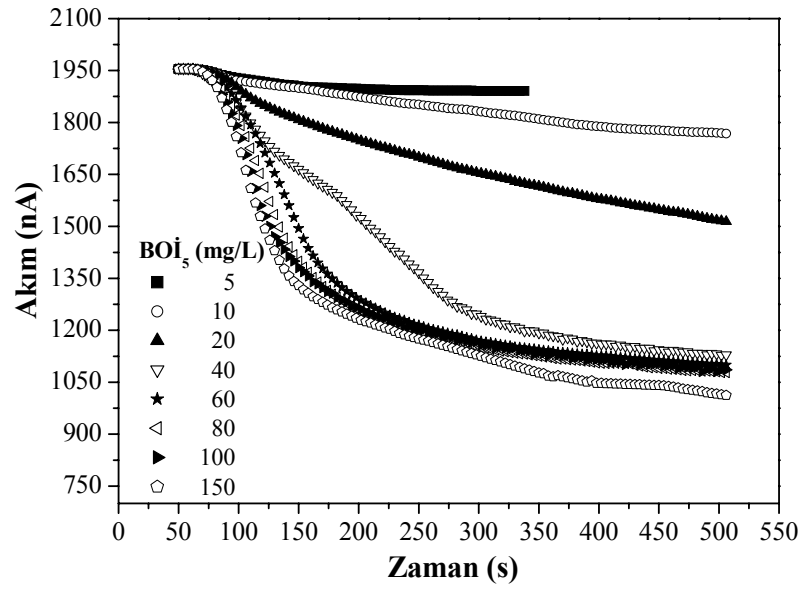
4.2.1. Farklı Akış Debilerinde Kalibrasyon Çalışmaları

Sürekli besleme yöntemi ile yapılan kalibrasyon çalışmalarında 0.50, 0.75, 1.00 ve 1.50 ml/dak debilerde 5–150 mg/l BOI_5 konsantrasyon aralıklarında çalışılmıştır. Debi değişimine bağlı olarak farklı konsantrasyonlara göre elde edilen akım değişimleri sırasıyla Şekil 4.5–4.8’de gösterilmiştir. Farklı debiler için yapılan çalışlarda sıcaklık 22°C’de sabit tutulmuş, pH değerleri de 6.8 olarak ayarlanmıştır.

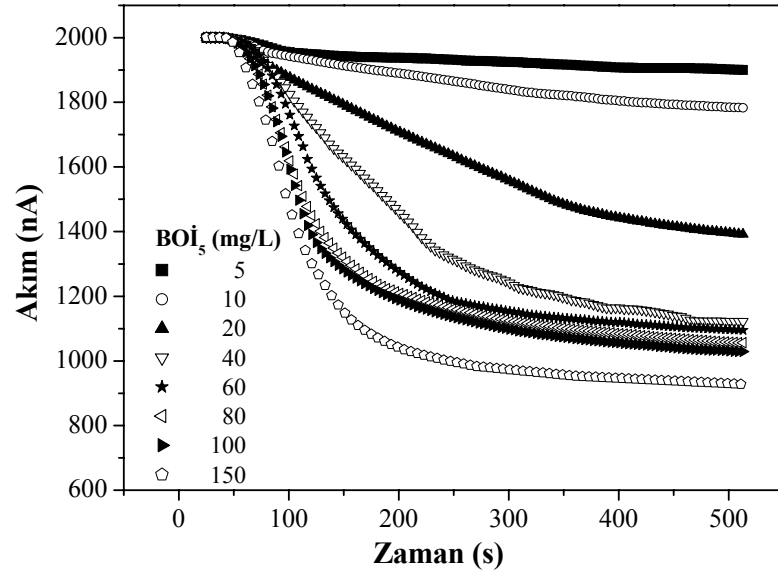
Akımın zamanla değişimi grafiklerinden görüldüğü üzere her bir debide giriş BOI konsantrasyonları arttıkça giriş akım değerleri ile durgun hal akım değerleri arasındaki fark (ΔI) özellikle 40 mg/l BOI_5 konsantrasyonuna kadar hızlı bir şekilde artmaktadır. 40 mg/l’den daha yüksek BOI_5 konsantrasyonlarında artış devam etmektedir fakat bu artış hızının azaldığı görülmektedir. Dolayısıyla 40 mg/l’den büyük konsantrasyonlarda biyosensör reaktörü içerisinde meydana gelen reaksiyonun 0. derece reaksiyon bölgesine geldiği söylenebilir. Çünkü mikro gözenekli polimer disk içerisinde immobilize olmuş bakterilerin substrat tüketim hızlarının substrat konsantrasyonundan bağımsız olarak devam ettiği düşünülmektedir. Reaksiyonun besi maddesinden bağımsız olarak 0. derece reaksiyon bölgesinde devam etmesinden dolayı yüksek konsantrasyonlarda meydana gelen ΔI değişimi düşük konsantrasyonlarda meydana gelen fark kadar olmamaktadır. Şekil 4.5–4.8 incelendiğinde her bir debide 40 mg/l BOI_5 konsantrasyonları için akım farkı yaklaşık 850 nA olmaktadır. Fakat daha yüksek konsantrasyonlarda bu fark yaklaşık 150 nA artış ile 1000 nA seviyelerinde olmaktadır. Eğer bu artış lineer olarak devam etmiş olsaydı 80 mg/l BOI_5 konsantrasyonu için yaklaşık 1700 nA seviyelerinde olması beklenmektedir. Dolayısıyla yüksek BOI_5 yüklemeleri için biyosensörde meydana gelen reaksiyonun substrat konsantrasyonundan bağımsız olarak 0. derece reaksiyon bölgesinde devam ettiği söylenebilir.



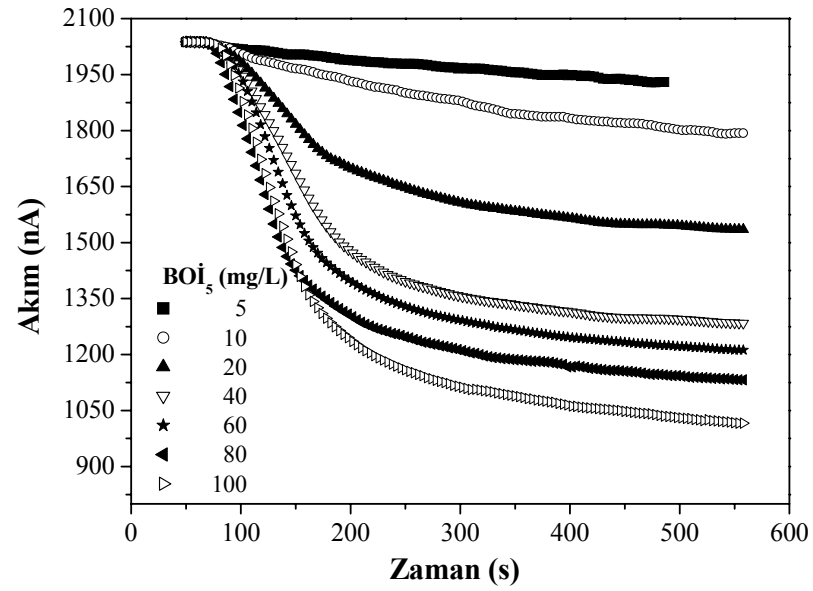
Şekil 4.5. 0.5 ml/dak. akış hızında farklı BOI_5 değerleri için elde edilen akım değişimleri



Şekil 4.6. 0.75 ml/dak. akış hızında farklı BOI_5 değerleri için elde edilen akım değişimleri

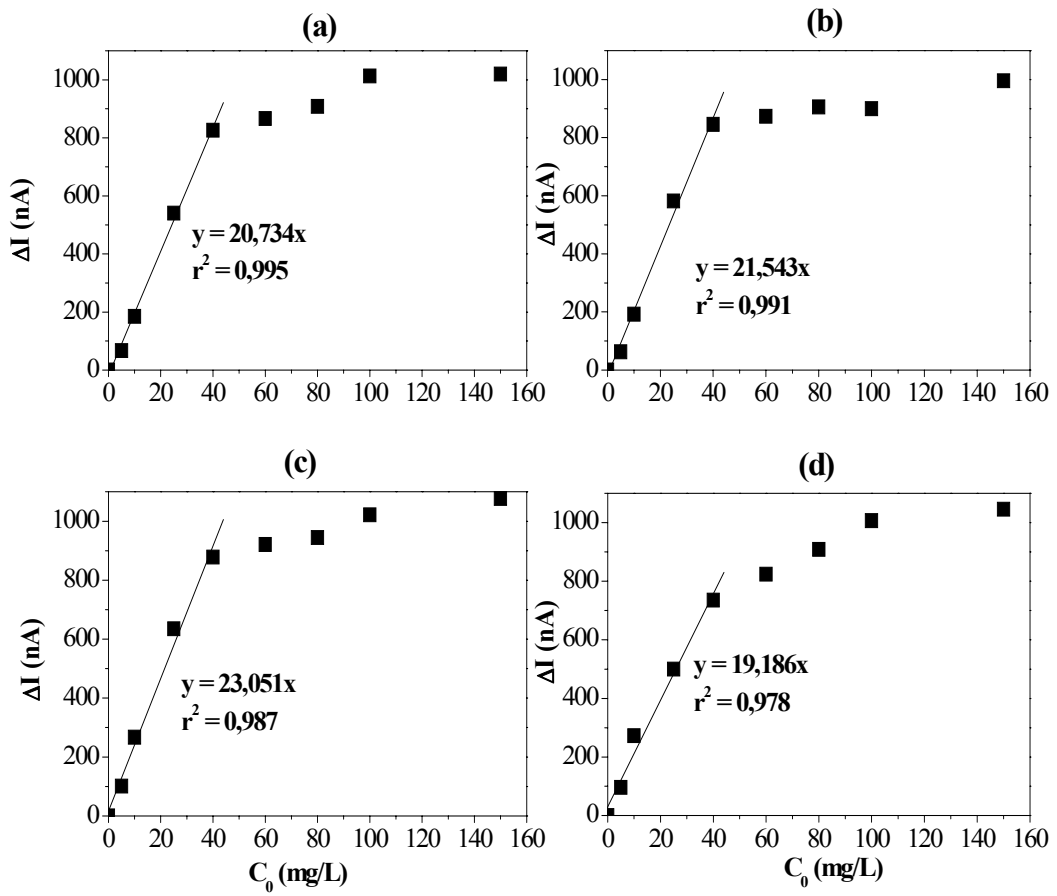


Şekil 4.7. 1.00 ml/dak. akış hızında farklı BOI_5 değerleri için elde edilen akım değişimleri



Şekil 4.8. 1.50 ml/dak. akış hızında farklı BOI_5 değerleri için elde edilen akım değişimleri

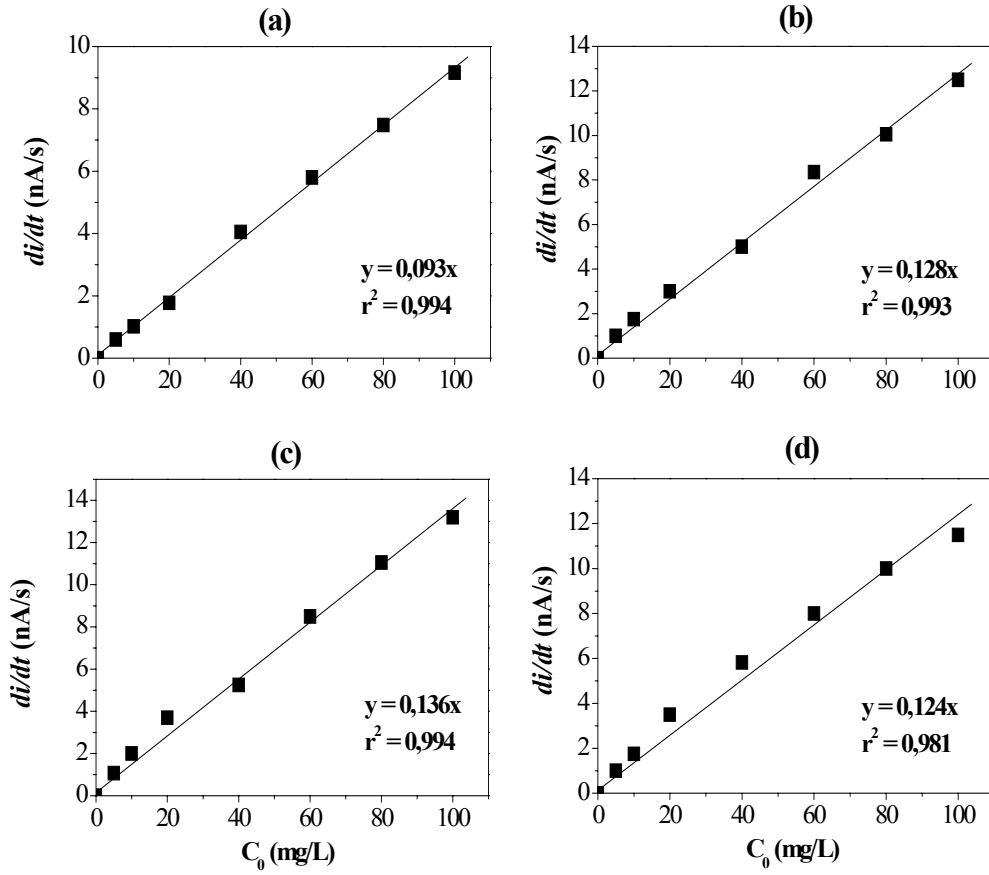
Sürekli substrat beslemesi ile yapılan akım değişimi çalışmalarında dinamik ve kinetik metotlar kullanılarak kalibrasyon çalışmaları yapılmış ve elde edilen kalibrasyon eğrileri için sırasıyla Şekil 4.9 ve 4.10'da gösterilmiştir. Dinamik metotta başlangıç stabil akım ile deney sonu stabil akım değerleri arasındaki farka göre kalibrasyon eğrisi oluşturulurken kinetik metotta başlangıç hızına göre kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.



Şekil 4.9. Farklı debilerde ΔI (nA) değerlerine göre elde edilen kalibrasyon eğrileri (a) 0.50 ml/dak, (b) 0.75 ml/dak, (c) 1.00 ml/dak, (d) 1.50 ml/dak.

Şekil 4.9'da görüldüğü üzere her bir debi için kalibrasyon eğrisi 40 mg/l değerine kadar oldukça yüksek r^2 değerleri vermektedir. Şekil 4.10'da ise reaksiyon hızları kullanılarak kalibrasyon eğrileri elde edilmiş ve 100 mg/l başlangıç

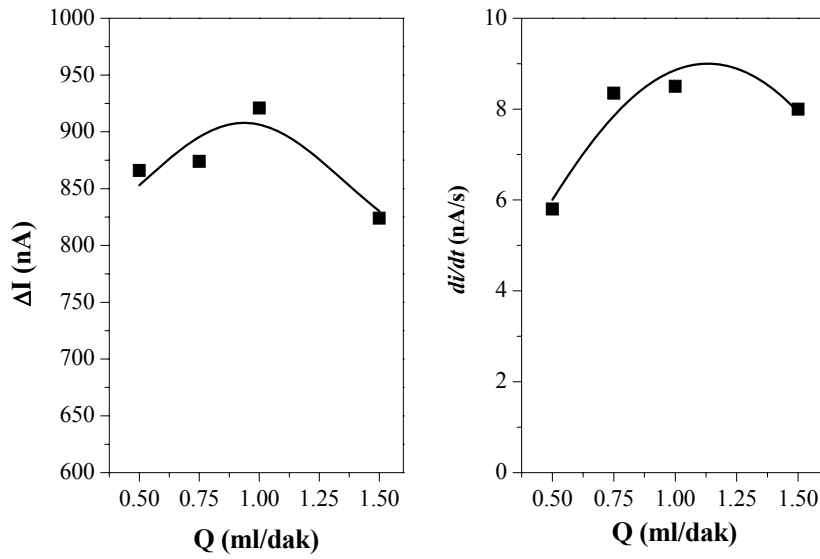
konsantrasyonu değerlerine kadar yüksek r^2 değerlerini sağladığı görülmüştür. Akım değişimi şekillerinde görüldüğü üzere reaksiyonun başlamasından hemen sonra akım değerleri hızlı bir şekilde azalmakta ve daha sonra akımın azalma hızı yavaşlayarak lineerleşme eğilimi göstermektedir. Dolayısıyla kinetik metoda göre elde edilen kalibrasyon eğrileri akım değerlerinin hızlı bir şekilde azaldığı ilk saniyelerde elde edildiğinden $\delta i/\delta t$ değerleri kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrileri durgun hal metoduna göre elde edilen eğrilere göre daha geniş bir aralıkta olmaktadır. Bu durum $\delta i/\delta t$ değerleri kullanılarak elde edilen grafikler ile daha yüksek kalibrasyon aralığında çalışma yapılabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.10. Farklı debilerde $\delta i/\delta t$ değerlerine göre elde edilen kalibrasyon eğrileri (a) 0.50 ml/dak, (b) 0.75 ml/dak, (c) 1.00 ml/dak, (d) 1.50 ml/dak.

Dinamik ve kinetik metotlara göre yapılan çalışmalarda debi 0.5 ml/dak.'dan 1.0 ml/dak.'ya arttığında elde edilen kalibrasyon eğrilerinde eğimler artmakta ve daha yüksek debi olan 1.5 ml/dak.'da ise azalmaktadır. Şekil 4.9 ve 4.10'da 1.0 ml/dak. akış hızında kalibrasyon eğimi dinamik ve kinetik metoda göre maksimum değerleri aldığı görülmektedir. Bu durum reaksiyon içerisinde tampon çözeltinin akış hızı arttığında organik maddenin immobilize olmuş bakteriler içerisine difüzyonunu arttırdığını ve böylece daha fazla biyolojik parçalanmaya maruz kaldığını göstermektedir. Akış hızı 1.5 ml/dak.'ya çıktığında ise organik maddenin bakteriler ile olan temas süresinin azalması ve reaktör içerisinde meydana gelen reaksiyonun kinetik kontrollü duruma geçmesinden dolayı ΔI ve $\delta i/\delta t$ değerlerinde azalma meydana geldiği söylenebilir.

Şekil 4.11'de 60 mg/l BOİ konsantrasyonu için farklı debilerde elde edilen debiye karşılık çizilen ΔI ve $\delta i/\delta t$ grafikleri gösterilmiştir. Şekil 4.11'den görülmektedir ki akış debisi 0.5 ml/dak olduğunda ΔI ve $\delta i/\delta t$ değerleri sırasıyla 866 nA ve 4.47 nA/s olmakta 1.0 ml/dak.'da ise 921 nA ve 6.92 nA/s olmaktadır. Debi 1.5 ml/dak.'ya arttırıldığında ise bu değerler sırasıyla 824 nA ve 5.22 nA/s olmaktadır. Dolayısıyla bundan sonra yapılan sürekli besleme ile akım ölçümü deneylerinde optimum debi olarak 1.0 ml/dak çalışılmıştır.

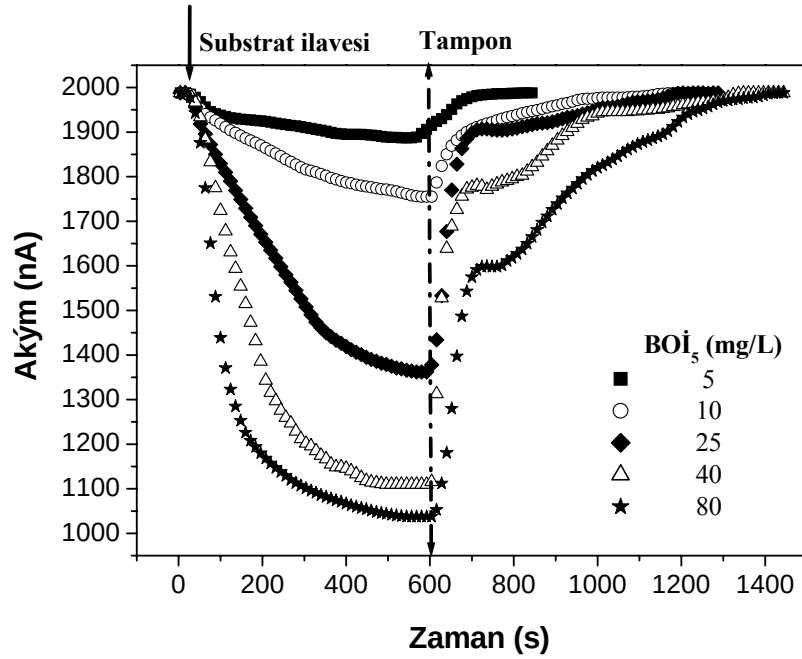


Şekil 4.11. 60 mg/l BOİ₅ için elde edilen ΔI ve $\delta i/\delta t$ değerleri

4.2.2. Sürekli Besleme Tekniğinde Ölçüm Süresi

Mikrobiyal BOİ biyosensörü ile sürekli besleme tekniği kullanılarak bir analizin ne kadar sürede tamamlandığını gösteren grafik Şekil 4.12’de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere 1.0 ml/dak. debide dinamik yöntem kullanılarak 5–80 mg/l BOİ₅ konsantrasyonları için ölçüm süresi yaklaşık 10 dakika olarak bulunmuştur. Kinetik teknik kullanıldığında ise bu süre daha kısa sürmekte ve konsantrasyonlara bağlı olarak yaklaşık 40-60 saniye sürmektedir.

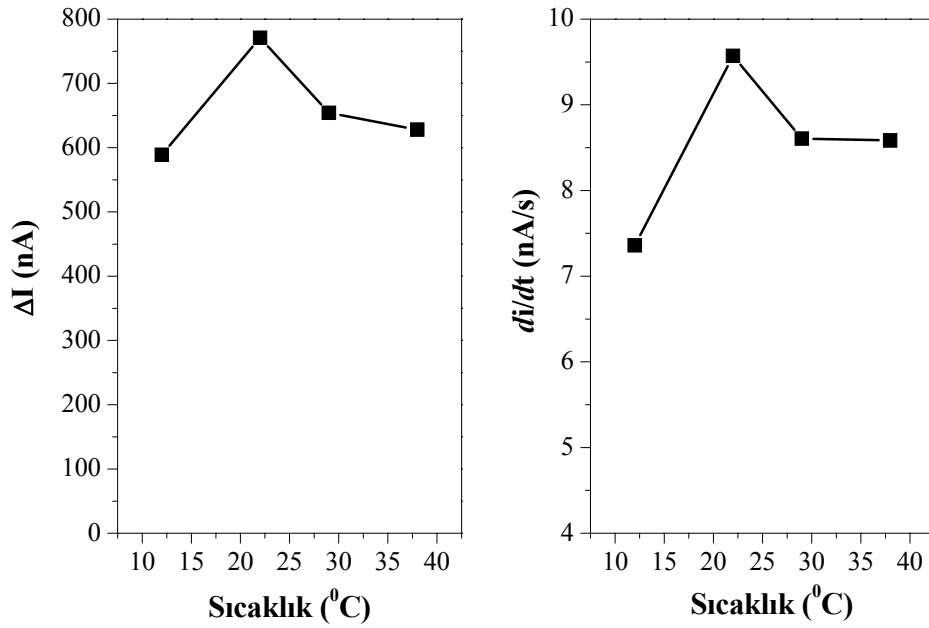
Biyosensörün akım sinyallerinin içerisinde organik madde bulunmayan tampon çözelti ile beslenmesi sonucu geri dönüşüm süreleri Şekil 4.12’den görüldüğü üzere 5 mg/l BOİ₅ konsantrasyonu için 4 dakika iken 10 ve 25 mg/l BOİ₅ konsantrasyonları için yaklaşık 10 dakika ve 40 ve 80 mg/l BOİ₅ konsantrasyonları için ise yaklaşık olarak 15 dakika olmaktadır. Bu durum yüksek konsantrasyonlarda MGP diskin gözeneklerine daha fazla besi maddesinin difüze olmasını böylece bu gözenekler içerisindeki besinlerin mikroorganizmalar tarafından tüketilmesinin daha uzun sürmesine bağlı olduğu söylenebilir.



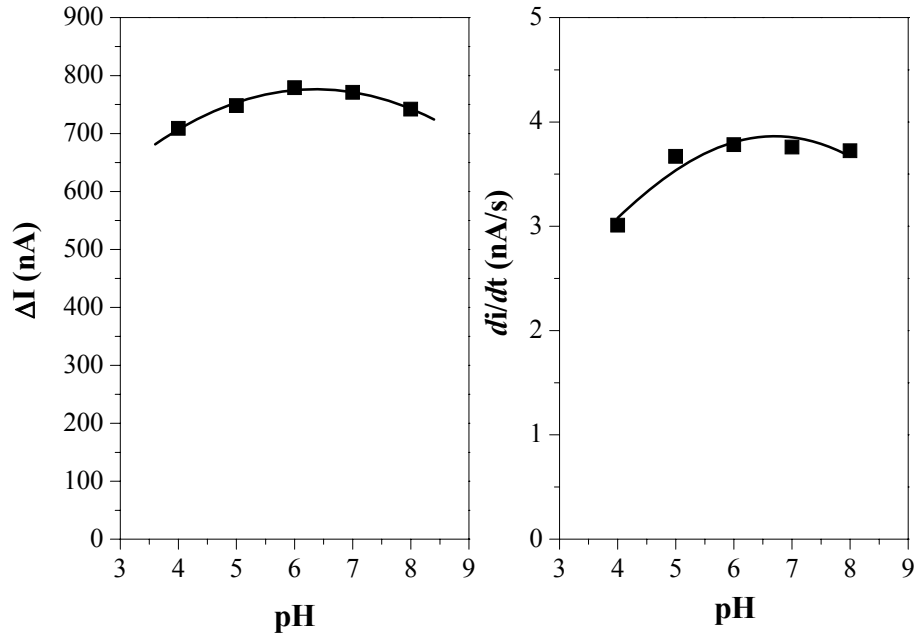
Şekil 4.12. Sürekli besleme tekniğinde biyosensörün ölçüm süresi

4.2.3. Sıcaklık ve pH'nın Etkisi

Pseudomonas syringae immobilize olmuş mikro-gözenekli polimer diskin optimum çalışma şartlarını belirlemek amacıyla 1.0 ml/dak debide ve 40 mg/l BOI_5 konsantrasyonunda sıcaklık ve pH değişimlerinin biyosensör yanıtı üzerine etkisi araştırılmıştır. Sıcaklığın etkisi çalışmalarında 10, 22, 30 ve 40 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklıklarda çalışılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.13'te gösterilmiştir. pH'nın biyosensör yanıtı üzerine etkisi için yapılan çalışmalarda 4, 5, 6, 6.8 ve 8 pH değerlerinde çalışılmış olup pH'ya bağlı grafikler de Şekil 4.14'te gösterilmiştir. Sıcaklık ve pH çalışmalarında optimum debi olan 1.0 ml/dak'da kullanılmış ve başlangıç konsantrasyonu olarak 40 mg/l seçilmiştir.



Şekil 4.13. Sensor yanıtı üzerine sıcaklığın etkisi (Q = 1.0 ml/dak., pH = 6.8, BOI_5 = 40 mg/l)



Şekil 4.14. Sensor yanıtı üzerine pH'nın etkisi ($Q = 1.0$ ml/dak., $T = 22$ °C, $BOI_5 = 40$ mg/l)

Sıcaklığın sensör yanıtına etkileri üzerine yapılan çalışmalarda dinamik ve kinetik metoda göre veriler elde edilmiş olup her iki metoda göre optimum sıcaklık 22 °C olarak belirlenmiştir. ΔI ve di/dt değerleri sıcaklık 10 °C'den 22 °C'ye çıktığında artmakta ve daha yüksek sıcaklık olan 30 ve 40 °C'de ise azalmaktadır. Şekil 3.6'da verilen grafiğe göre suyun sıcaklığı arttıkça çözünmüş oksijen doygunluğu azalmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda mikroorganizmaların kullanabileceği çözünmüş oksijen doygunluğu azalacak ve buna bağlı daha az çözünmüş oksijen biyofilm içerisine difüze olacağından mikroorganizmaların sindirme faaliyetleri azalacaktır. Dolayısıyla yüksek sıcaklıklarda görülen daha küçük sinyal değişimlerinin bu sindirim faaliyetlerin yavaş olmasından kaynaklanabileceği söylenebilir. Buna ilave olarak çok düşük veya çok yüksek sıcaklıklarda immobilize bakterilerin aktivitelerinin azalması veya bozulması ΔI ve di/dt değerlerinin yüksek sıcaklıklarda azalmasına sebep olabilmektedir. Dolayısıyla biyosensörün optimum çalışma sıcaklığı 22 °C olarak seçilmiştir.

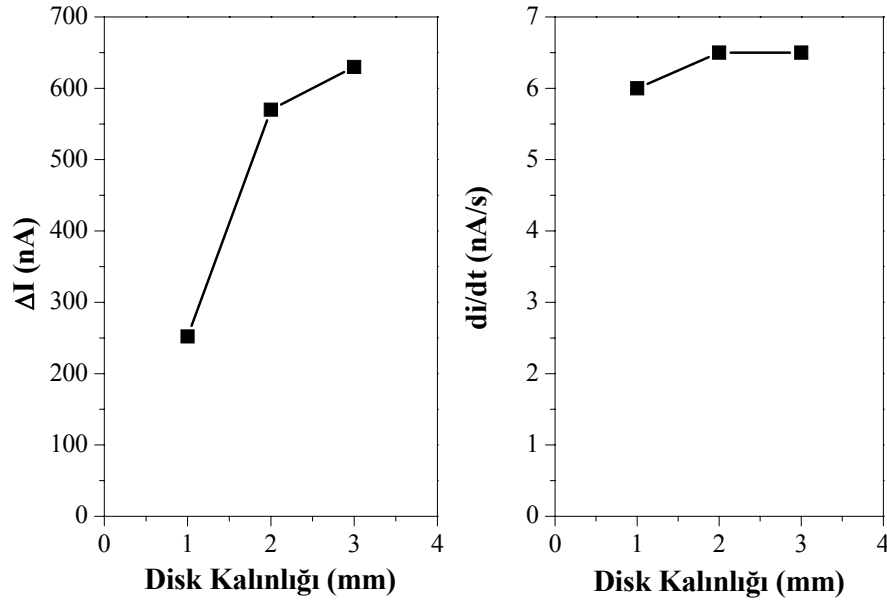
Biyosensör yanıtı üzerine pH'nın etkisi üzerine yapılan çalışmalarda ise optimum pH değeri olarak tampon çözelti değeri olan 6.8 olarak belirlenmiştir. Dinamik ve kinetik metotlara göre yapılan ölçümlerde pH değerinin 5'ten büyük olduğu durumlarda mikroorganizmaların hemen hemen aynı aktiviteyi gösterdiği fakat pH = 4 değerlerinde ise kinetik metoda göre aktivitelerinde azalma olduğu anlaşılmaktadır. Atıksu pH değerlerinin genellikle 6.5 ile 8.5 aralığında olduğu göz önüne alındığında mikro gözenekli polimer diske immobilize olmuş *P. syringae* bakterilerinin bu pH aralıklarında kullanılabilmesi mümkündür.

4.2.4. Biyosensörün Yanıtına Polimer Disk Kalınlığının Etkisi

Mikro gözenekli polimer disk farklı kalınlıklarda hazırlanarak bakteri immobilize edilmiş ve biyosensörün yanıtına etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 3 mm kalınlığındaki diske mikroorganizma immobilizasyonu yapılmış ve 3 mm kalınlık için çalışmalar yapıldıktan sonra disk kesilerek sırasıyla 2 ve 1 mm kalınlıkta diskler oluşturulmuştur. 3 mm kalınlığındaki diskte sensör okumaları yapıldıktan sonra polimer disk alt kısımdan kesilerek kalınlığı 2.0 mm' ye indirilmiş ve daha sonra tekrar kesilerek 1.0 mm' ye indirilmiştir. Bu durumda MGP diskin üst kısmındaki disk özellikleri ve mikroorganizma popülasyonu değişmeyeceğinden her bir disk kalınlığını karşılaştırmak daha kolay olacağı düşünülmüştür. Her bir disk yüksekliği çalışmalarında 40 mg/l BOI₅ konsantrasyonuna sahip glikoz-glutamik asit çözeltisi geçirilerek dinamik ve kinetik metoda göre akım değerleri Şekil 4.15'te gösterilmiştir.

Biyosensör üzerine disk kalınlığının etkisini incelemek üzere yapılan çalışmada Şekil 4.15'te görüldüğü üzere dinamik metoda göre disk kalınlığı arttıkça ΔI değerleri de artmaktadır. Bu durum disk kalınlığı arttıkça mikro-gözenekler içerisinde immobilize olmuş bakteri konsantrasyonunun artmasına bağlıdır. Dolayısıyla reaktör içerisine giren organik madde daha yoğun bakteri popülasyonu tarafından sindirilebilmektedir. Fakat kinetik metoda göre yapılan ölçümlerde ise 2 ve 3 mm disk kalınlıklarında $\delta i/\delta t$ değerleri aynı olmakla beraber 1 mm disk kalınlığında ise daha az olmaktadır. Buna karşılık disk kalınlığının artmasıyla ΔI

değerlerinin artması ise organik maddeler ile mikroorganizmaların daha uzun süre reaksiyona girmesinden kaynaklandığı söylenebilir. Çünkü polimer disk kalınlığı arttıkça çözeltinin disk içerisinde bekleme süresi artmaktadır. Dolayısıyla sürekli ölçüm tekniğinde 2 mm disk kalınlığında çalışmak uygun olacaktır.

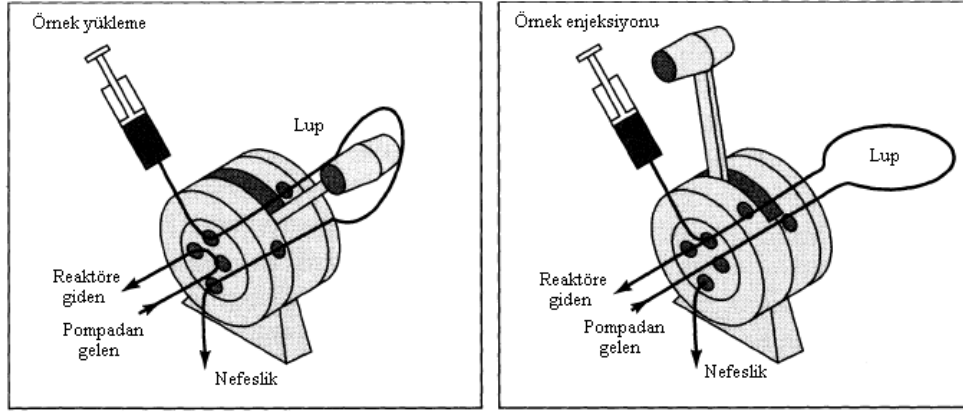


Şekil 4.15. Sensor yanıtı üzerine mikro-gözenekli polimer disk kalınlığının etkisi (Q = 1 ml/dak., T = 22 °C, BOİ₅ = 40 mg/l)

4.3. Akım Enjeksiyon Tekniği ile Biyosensör Ölçümleri

Akım enjeksiyonu çalışmalarında reaktörden sürekli tampon çözelti geçirilirken enjeksiyon vanası ile reaktöre atıksu beslemesi yapılmakta ve atıksu reaktör içerisine girdiğinde mikro gözenekli ortamda immobilize olan mikroorganizmalar ile reaksiyona girerek mikroorganizmaların solunum sırasında oksijen tüketmesine bağlı olarak akımın düşmesine sebep olmaktadır. Şekil 4.16'da enjeksiyon sisteminin şematik gösterimi verilmiş olup enjeksiyon işlemi iki aşamada yapılmaktadır. İlk aşamada lup içerisine atıksu yüklemesi yapılmakta olup ikinci aşamada vana açılarak lup içerisindeki atıksuyun reaktör içerisine enjeksiyon işlemi

gerçekleşmektedir. Enjeksiyon işlemi ile lup hacmine ve atıksu konsantrasyonuna bağlı olarak akımda pikler meydana gelmektedir. Meydana gelen piklerin yükseklikleri atıksuyun BOİ konsantrasyonuna bağlı olduğundan atıksu konsantrasyonu hesaplanabilmektedir.



Şekil 4.16. Enjeksiyon sisteminin şematik gösterimi

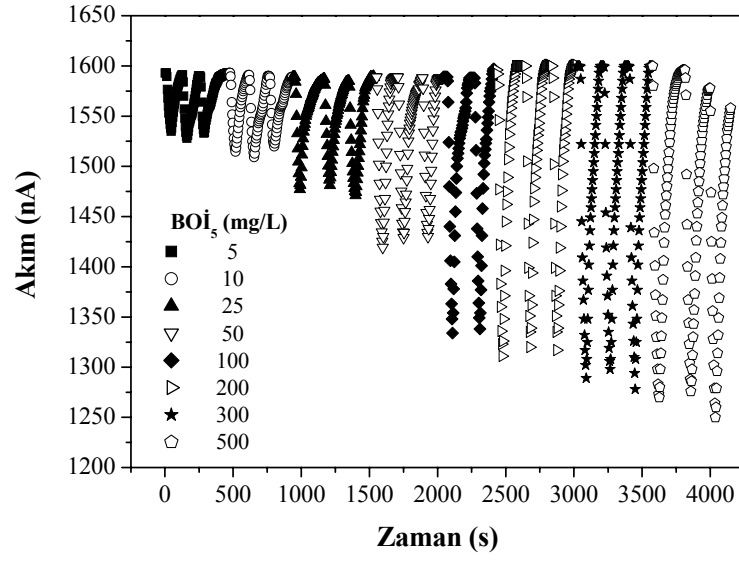
Akım enjeksiyonu tekniği kullanılarak yapılan çalışmalarda farklı akış debilerinde kalibrasyon çalışmaları yapılmış ve BOİ biyosensörü için çalışılması en uygun debi bulunmuştur. Biyosensör için uygun debi belirlendikten sonra bu debide biyosensörün farklı BOİ₅ konsantrasyonları için ölçüm sürelerine bakılmıştır. Farklı sıcaklık ve pH değerlerinde ölçümler yapılarak biyosensörün davranışı incelenmiş ve ayrıca farklı MGP disk hacimlerinde de ölçümler yapılarak disk kalınlığının sensör yanıtına etkisi araştırılmıştır. Bunlara ilave olarak farklı hacimlerde enjeksiyon vanaları kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. Son olarak atıksu ölçümleri yapılarak BOİ₅ ile sensör BOİ' si arasındaki ilişkiye bakılmıştır.

4.3.1. Farklı Debilerde Kalibrasyon Çalışmaları

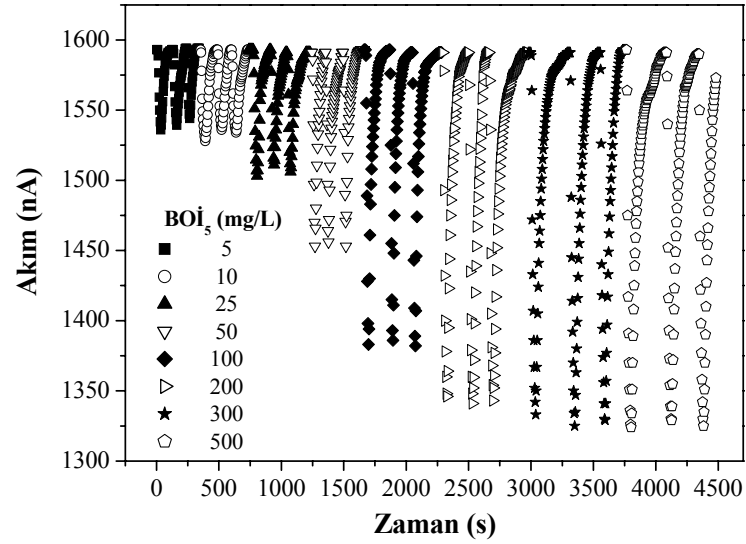
Akım enjeksiyonu tekniği kullanılarak 5–500 mg/l BOİ₅ konsantrasyon aralığında yapılan kalibrasyon çalışmalarında 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ve 1.2 mL/dak olmak üzere 5 farklı debide çalışılmıştır. Enjeksiyon çalışmaları 1.0 ml' lik enjeksiyon lupunda yapılmış olup çeşitli konsantrasyonlardaki glikoz-glutamik asit çözeltilerinin enjeksiyonu sonucu elde edilen pik yükseklikleri Şekil 4.17–4.21'de 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ve 1.2 ml/dak. debiler için sırasıyla gösterilmiştir.

Şekil 4.17–4.21 incelendiğinde biyosensör sistemine enjekte edilen BOİ konsantrasyonu arttıkça sensörde meydana gelen pik yükseklikleri artmaktadır. Şekillerden görüldüğü üzere pik yükseklikleri 100 mg/l' ye kadar lineer olarak artmakta fakat daha yüksek konsantrasyonlarda ise piklerin yükseklikleri artmasına rağmen lineerlik bozulmaktadır. Özellikle 200 mg/l' den daha yüksek konsantrasyonlarda pik yüksekliklerindeki artış hızı azalmaktadır. Bu durum mikrogözenekli polimer disk içerisinde immobilize olmuş mikroorganizmaların organik maddeleri parçalama kapasitelerinin maksimum değerlerine ulaştığını göstermektedir. Enjekte edilen organik madde miktarının mikroorganizmaların özümleme kapasitesinden daha fazla olmasından dolayı pik yüksekliklerinde fazla bir artış meydana gelmemektedir.

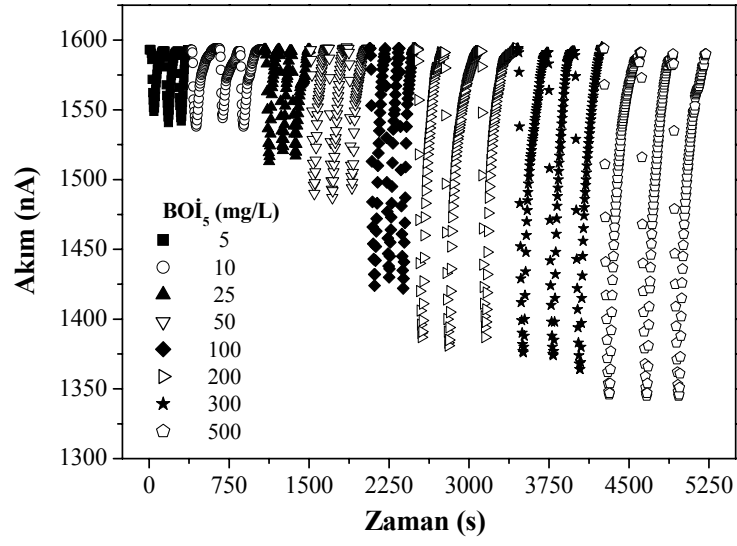
İçerisinde organik madde bulunmayan bir çözeltiyi enjeksiyon vanası ile biyosensör sistemine beslediğimizde reaktör içerisinde herhangi bir reaksiyon meydana gelmediği halde oksijen konsantrasyonunda azalma meydana gelmektedir. Bu durum enjekte edilen çözelti ile sistemden geçen tampon çözelti arasındaki sıcaklık farkından meydana geldiği düşünülmektedir. Dolayısıyla pik yüksekliğine göre kalibrasyon eğrisi oluştururken tampon çözelti için ölçülen akımda meydana gelen bu azalma hata olarak kabul edilmiş ve her bir konsantrasyonda elde edilen pik yüksekliklerinden hata olarak kabul edilen bu değer çıkarılarak kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrilerinde oldukça yüksek r^2 değerleri (>0.976) elde edilmiştir. Ayrıca pik yüksekliğine göre elde edilen kalibrasyon eğrilerinde akış hızı arttıkça eğimin azaldığı görülmektedir. Eğim 0.4 ml/dak. için 2.034 iken 1.2 ml/dak' da azalarak 0.613 olmaktadır. Eğimin düşük hızlarda yüksek hızlara göre daha büyük olması düşük hızlarda pik yüksekliklerinin dolayısıyla akım değişikliklerinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Debisi küçük akış hızlarında organik madde içeren çözeltinin reaktör içerisinde daha uzun süre kalması sonucu immobilize mikroorganizmalar tarafından daha fazla tüketilmekte ve böylece reaksiyon sonucu tüketilen oksijen miktarının artmasına sebep olmaktadır. Dolayısıyla aynı organik madde konsantrasyonlarında düşük debilerde pik yükseklikleri daha yüksek olmaktadır. Şekil 4.22'de debinin artması ile pik yüksekliğinde meydana gelen azalma 50, 100 ve 200 mg/l BOİ₅ değerleri için gösterilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere aynı konsantrasyonlar için düşük debilerde oluşan pikler daha yüksek olmaktadır.



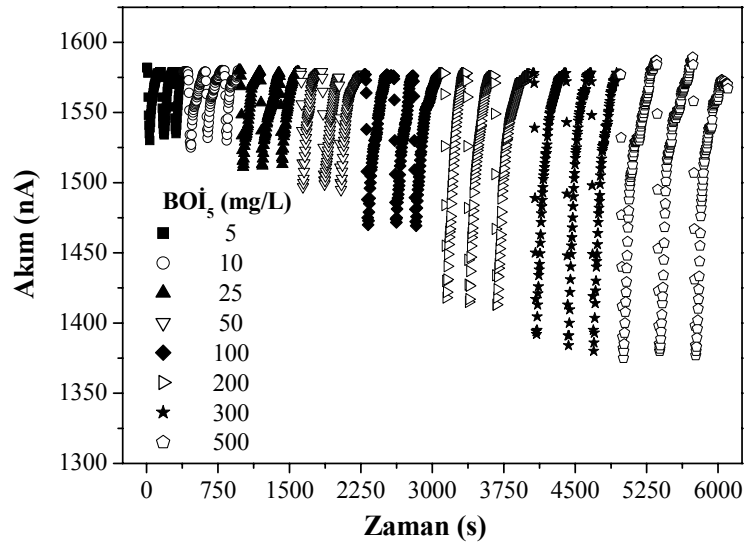
Şekil 4.17. 0.4 ml/dak. için 5–500 mg/l konsantrasyon aralığında elde edilen pik yükseklikleri ($V_{\text{enj}} = 1$ ml, $T = 22^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6.8$)



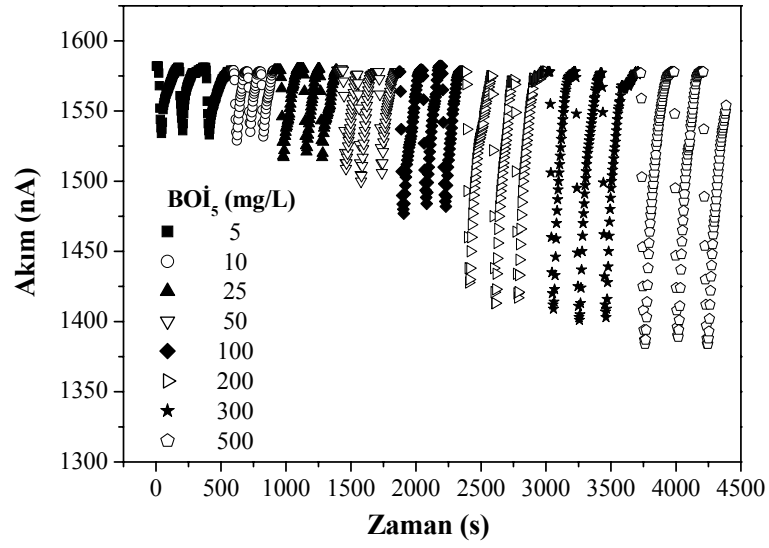
Şekil 4.18. 0.6 ml/dak. için 5–500 mg/l konsantrasyon aralığında elde edilen pik yükseklikleri ($V_{\text{enj}} = 1$ ml, $T = 22^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6.8$)



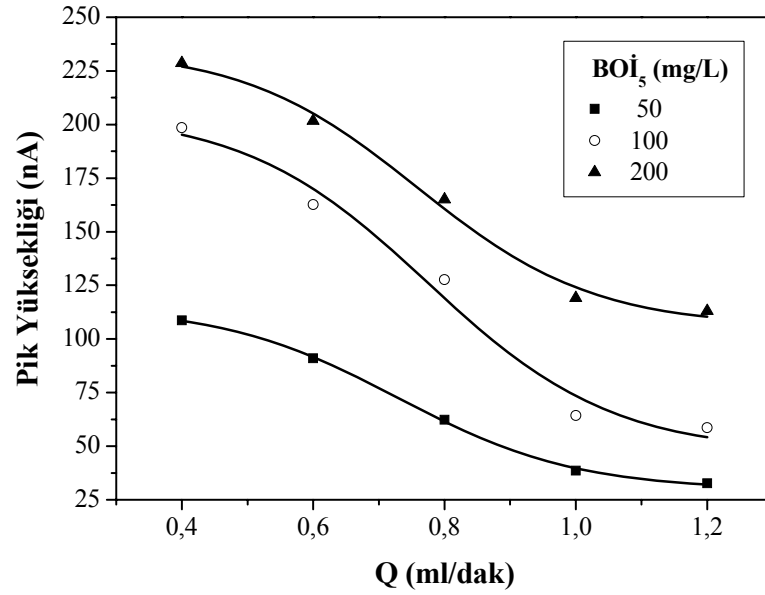
Şekil 4.19. 0.8 ml/dak. için 5–500 mg/l konsantrasyon aralığında elde edilen pik yükseklikleri ($V_{\text{enj}} = 1$ ml, $T = 22^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6.8$)



Şekil 4.20. 1.0 ml/dak. için 5–500 mg/l konsantrasyon aralığında elde edilen pik yükseklikleri ($V_{\text{enj}} = 1$ ml, $T = 22^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6.8$)

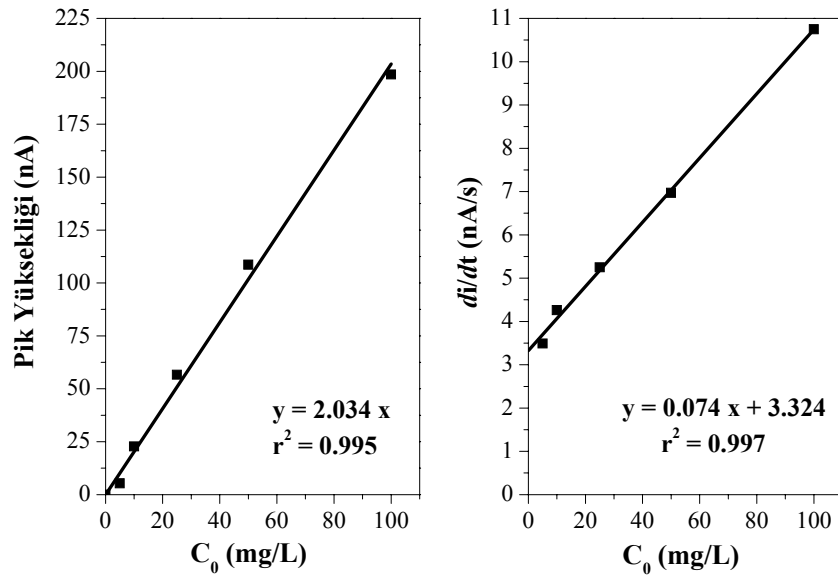


Şekil 4.21. 1.2 ml/dak. için 5–500 mg/l konsantrasyon aralığında elde edilen pik yükseklikleri ($V_{\text{enj}} = 1$ ml, $T = 22$ °C, pH = 6.8)

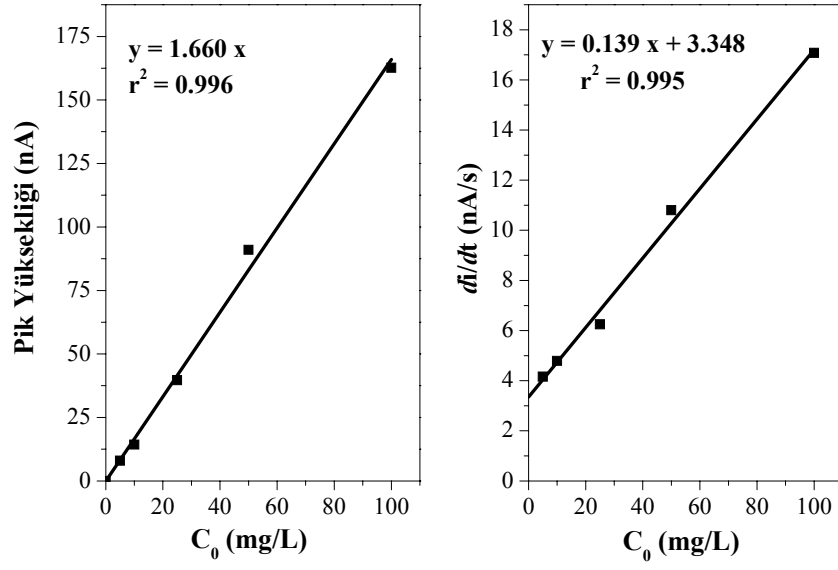


Şekil 4.22. Debilere göre farklı konsantrasyonlarda elde edilen pik yükseklikleri

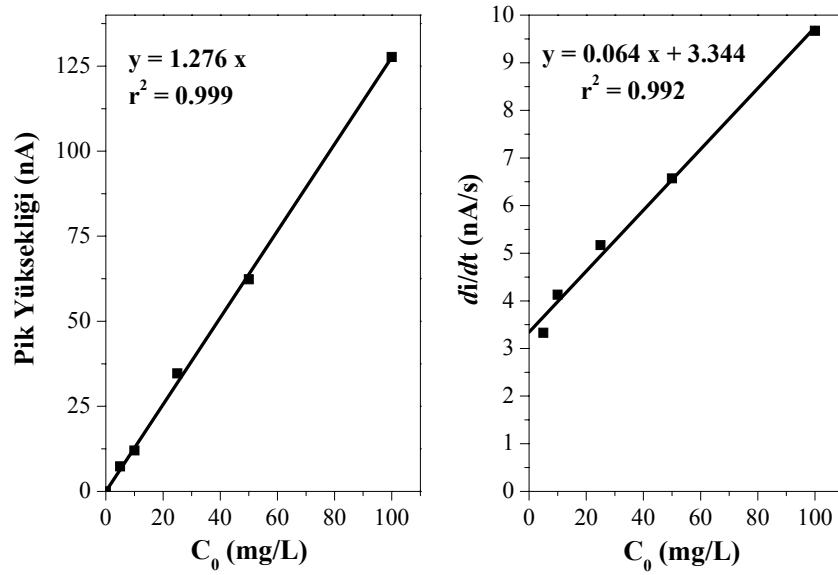
Pik yüksekliklerinin artışının lineer olduğu 5-100 mg/l konsantrasyon aralığı için hem pik yüksekliği hem de $\delta i/\delta t$ değerlerine göre kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve elde edilen eğriler Şekil 4.23–4.27’de her bir debi için ayrı ayrı gösterilmiştir. Akımın zamanla değişimine bağlı olarak elde edilen $\delta i/\delta t$ (nA/s) değerlerine göre oluşturulan kalibrasyon eğrileri incelendiğinde 5–100 mg/l BOI_5 konsantrasyon aralığında yüksek r^2 değerleri (>0.983) elde edilmiştir. Bu grafiklerde elde edilen kalibrasyon eğrileri pik yüksekliklerine göre elde edilen eğrilere göre farklılık göstermektedir. Pik yüksekliğine göre elde edilen grafiklerde kalibrasyon eğrisinin eğimi debi yükseldikçe azalırken $\delta i/\delta t$ değerlerine göre elde edilen grafiklerde ise debi 0.4’ten 0.6 ml/dak.’ya çıktığında $\delta i/\delta t$ değerleri artmakta reaktördeki akış hızı 0.8 ml/dak. olduğunda ise tekrar azalmaktadır.



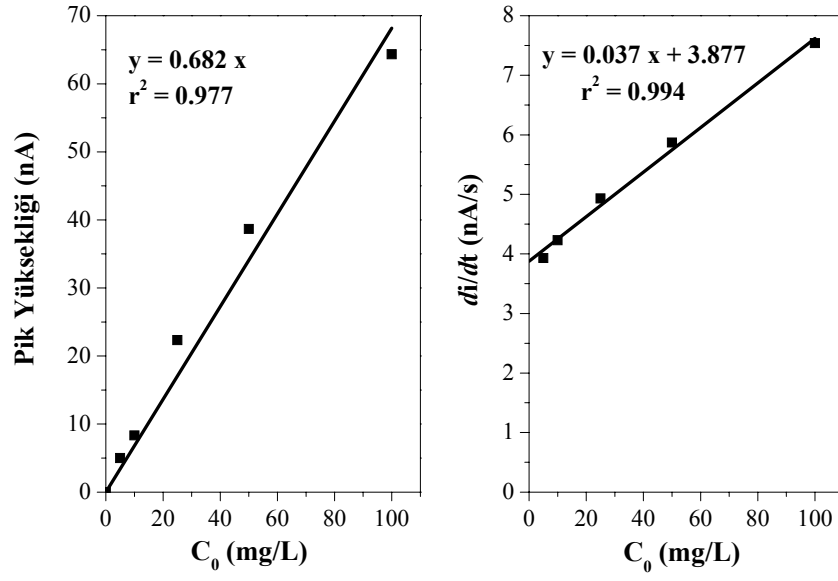
Şekil 4.23. 0.4 ml/dak. için pik yüksekliği ve $\delta i/\delta t$ değerlerine göre kalibrasyon eğrileri



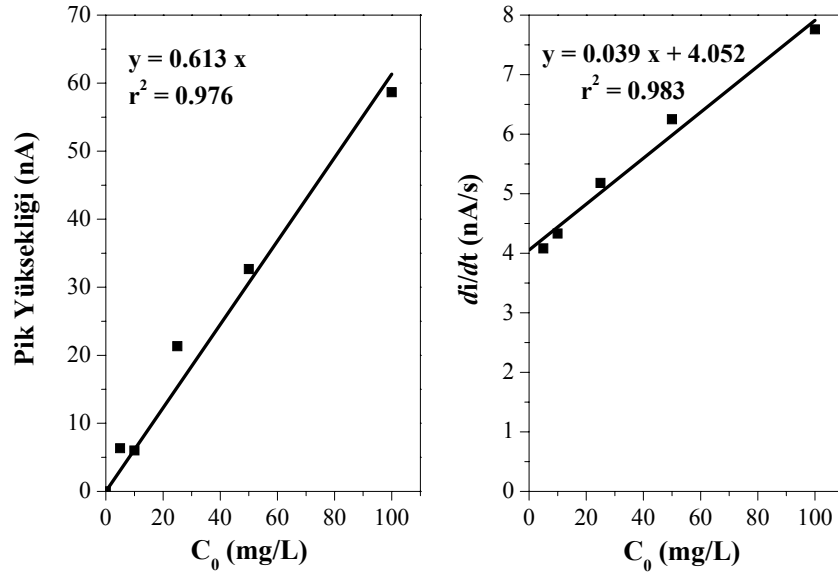
Şekil 4.24. 0.6 ml/dak. için pik yüksekliği ve di/dt değerlerine göre kalibrasyon eğrileri



Şekil 4.25. 0.8 ml/dak. için pik yüksekliği ve di/dt değerlerine göre kalibrasyon eğrileri

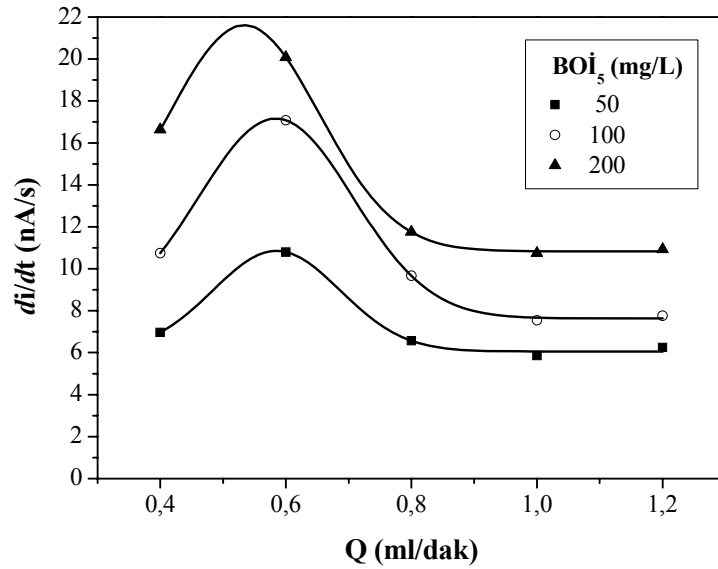


Şekil 4.26. 1.0 ml/dak. için pik yüksekliği ve $\delta i/\delta t$ değerlerine göre kalibrasyon eğrileri



Şekil 4.27. 1.2 ml/dak. için pik yüksekliği ve $\delta i/\delta t$ değerlerine göre kalibrasyon eğrileri

Şekil 4.28’de üç farklı konsantrasyon için debi değişimlerinde elde edilen $\delta i/\delta t$ değerleri gösterilmiştir. Bu grafikte de görülmektedir ki akış debisi 0.4 ml/dak.’dan 0.6 ml/dak.’ya yükseldiğinde $\delta i/\delta t$ değişimi artmakta daha sonra ise azalarak 1.0 ml/dak.’dan sonra yaklaşık aynı değerlerde devam etmektedir. Enjekte edilen çözelti içerisindeki organik maddelerin immobilize mikroorganizmaların meydana getirdiği biyofilm içerisine difüzyonu çözeltinin reaktör içerisindeki hızına bağlıdır. Düşük hızlarda difüzyonun sınırlı olması yüksek hızlarda ise difüzyonun daha fazla olmasına rağmen organik maddelerin parçalanması için yeterli temas süresi olmamasından dolayı Şekil 4.28’de görülen durum meydana gelebilmektedir.



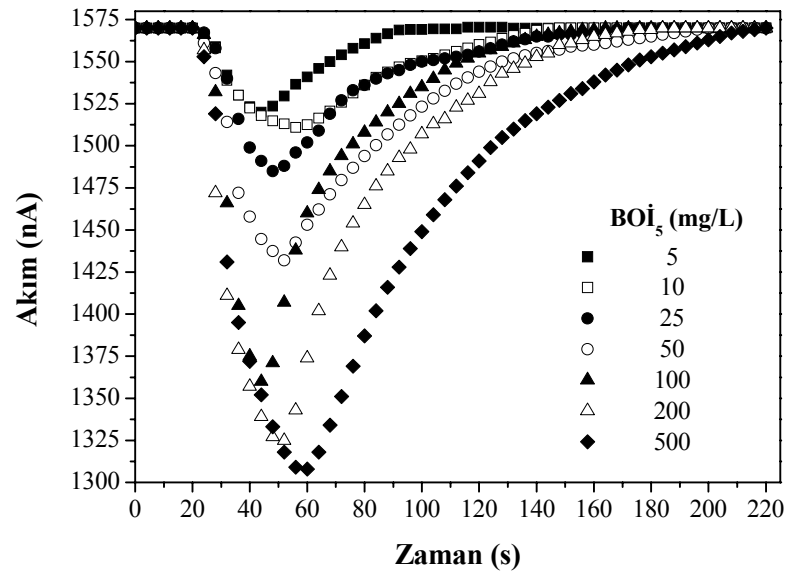
Şekil 4.28. Farklı konsantrasyonlar için debi değişimlerinde elde edilen $\delta i/\delta t$ değerleri.

50, 100 ve 200 mg/l BOİ₅ konsantrasyonları için Şekil 4.22’de verilen pik yükseklikleri ile Şekil 4.28’de verilen $\delta i/\delta t$ değerleri beraber incelendiğinde 0.6 ml/dak. BOİ biyosensörü için enjeksiyon çalışmalarında optimum debi olarak seçilmiştir. 0.4 ml/dak.’da elde edilen pik yükseklikleri daha yüksek olmasına karşılık birim zamanda oluşan sinyal gücünün 0.6 ml/dak.’da daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca biyosensörün yanıt süresinin debi azaldıkça daha uzun sürmesi düşük debilerin tercih edilmemesinin diğer bir sebebidir. Daha yüksek

debilerde ise yanıt süresinin azalmasına karşılık pik yüksekliklerinin ve birim zamanda oluşan sinyal gücünün düşük olmasından dolayı 0.6 ml/dak. debide çalışılması uygun görülmüştür.

4.3.2. Akım Enjeksiyon Tekniğinde Ölçüm Süresi

Mikrobiyal BOİ biyosensörü ile akım enjeksiyon tekniği kullanıldığında farklı konsantrasyonlardaki BOİ₅ örneklerin ölçüm sürelerini gösteren grafik Şekil 4.29'da gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere 0.6 ml/dak. debide 5–500 mg/l BOİ₅ konsantrasyonları için elde edilen pik yüksekliklerinin zamana göre değişimi gösterilmiştir.



Şekil 4.29. Akım enjeksiyon tekniğinde biyosensörün ölçüm süresi (Q = 0.6 ml/dak., T = 22 °C)

Biyosensör sistemine 5 mg/l BOİ₅ çözeltisi enjekte edildiğinde 20 saniyede pik oluşmaktadır. Akımın tekrar eski seviyesine gelmesi için gerekli süre ise 40 saniye kadar sürmektedir. Dolayısıyla 5 mg/l'lik bir örneğin ölçüm süresi toplam 60 saniye sürmektedir. BOİ₅ konsantrasyonu arttıkça ölçüm süresi de artmaktadır. 500 mg/l için yaklaşık 40 saniye pik oluşumu ve 140 saniye de geri dönüşüm süresi olmak

üzere toplam 200 saniye ölçüm süresi gerekmektedir. Sensöre enjekte edilen substrat konsantrasyonu arttıkça mikroorganizmalar besi maddelerini tüketmek için daha fazla çözünmüş oksijen tüketmektedir. Dolayısıyla çözünmüş oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak ölçülen akım değerlerinin başlangıç değerlerine ulaşması BOİ₅ konsantrasyonu yüksek çözeltilerde daha uzun zaman almaktadır.

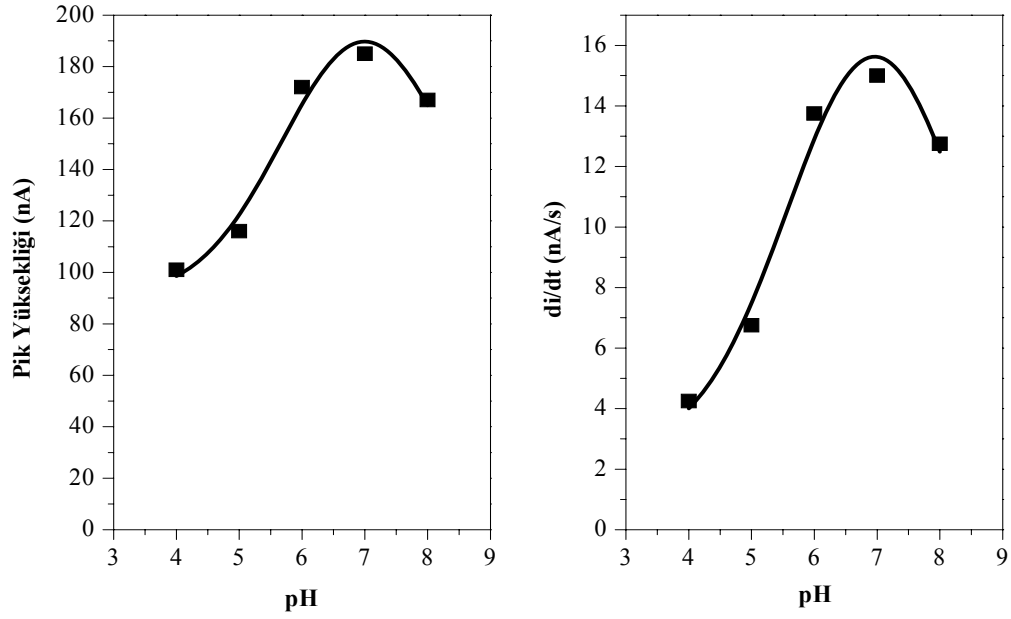
4.3.3. Sensör Yanıtına pH ve Sıcaklık Etkisi

Mikro-gözenekli polimer diskte akım enjeksiyonu çalışmalarında optimum çalışma şartlarını belirlemek amacıyla 0.6 ml/dak debide ve 100 mg/l BOİ₅ konsantrasyonlarında sıcaklık ve pH değişimlerinin biyosensör yanıtı üzerine etkisi araştırılmıştır. pH'nın biyosensör yanıtı üzerine yapılan çalışmalarda 4, 5, 6, 6.8 ve 8 pH değerlerinde çalışılmış olup pH'ya bağlı grafikler Şekil 4.30'da gösterilmiştir. Sıcaklığın etkisi çalışmalarında ise 10, 22, 30 ve 40 °C'de çalışılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.31'de gösterilmiştir.

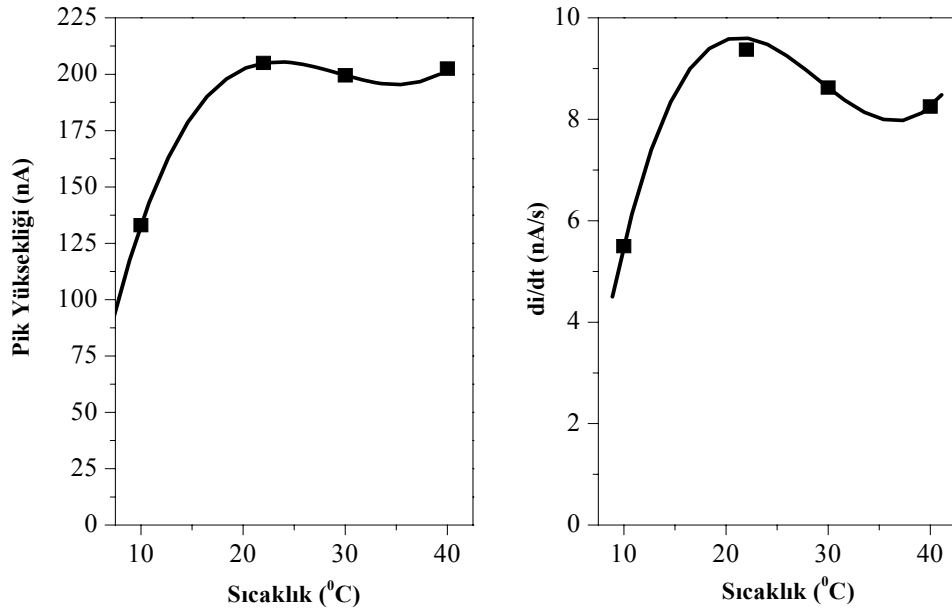
Şekil 4.30'da görülen farklı pH'larda elde edilen pik yükseklikleri ve reaksiyon hızları grafiğinde pH 6, 6.8 ve 8'de pik yükseklikleri ve $\delta i/\delta t$ değerleri diğer pH'larda elde edilen değerlerden daha yüksek olmaktadır. Düşük pH'larda ise meydana gelen pik yükseklikleri ile $\delta i/\delta t$ değerlerinin diğer pH değerlerinde elde edilenlere göre yarı yarıya azaldığı görülmüştür. Dolayısıyla tampon çözeltinin ve BOİ stok çözeltisinin pH değerleri sırasıyla 6.8 ve 7 olduğu göz önüne alındığında herhangi bir pH ayarlaması yapmadan sensör çalışmaları yapmanın uygun olacağı görülmüştür. Ayrıca çoğu atıksuların pH değerlerinin 6.5 ile 8.5 arasında olduğu düşünülürse hiçbir pH ayarlaması yapmadan geliştirilen biyosensör ile analizler yapmak ilave maliyet getirmemesi bakımından avantaj olacağı düşünülmüştür.

Sıcaklığın etkileri üzerine yapılan çalışmalarda optimum çalışma sıcaklığı olarak 22 °C olarak belirlenmiştir. Şekil 4.31'de görüldüğü üzere 10 °C'de sensör yanıtı diğer sıcaklıklarda meydana gelen yanıtı göre daha az olmaktadır. 30 °C ve daha yüksek sıcaklıklarda ise reaksiyon hızlarında çok küçük bir azalma meydana gelmektedir. Yüksek sıcaklıklarda BOİ biyosensörlerinin çalışma ömrü kısılacağından biyosensör çalışmaları için optimum sıcaklık olarak 22 °C seçilmiştir [Lin et al., 2006]. Ayrıca yüksek sıcaklıklarda çözelti içerisinde çözünmüş oksijen

çözünürlüğünün azalması sonucu biyofilm içerisine difüze olacak çözünmüş oksijen miktarının azalması söz konusu olacak ve böylece daha az sinyal elde edilebilecektir. Buna karşı olarak ta düşük sıcaklıklarda çözünmüş oksijen konsantrasyonunun artmasına rağmen mikroorganizmaların aktivitelerini kaybetmesi bakımından düşük sıcaklıklarda çalışmak avantajlı olmayacaktır.



Şekil 4.30. Sensor yanıtı üzerine pH'nın etkisi ($Q = 0.6$ ml/dak., $T = 22$ °C, $BOI_5 = 100$ mg/l)



Şekil 4.31. Sensor yanıtı üzerine sıcaklığın etkisi ($Q = 0.6$ ml/dak., $pH = 6.8$, $BOİ_5 = 100$ mg/l)

4.3.4. Sensör Yanıtına Mikro-Gözenekli Polimer Disk Kalınlığının Etkisi

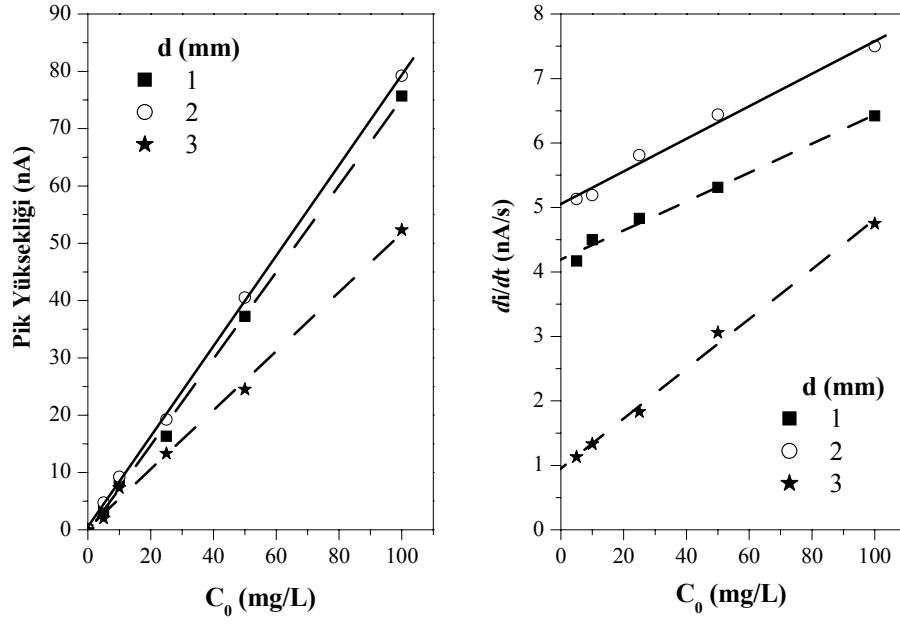
Mikro-gözenekli polimer disk 1.0, 2.0 ve 3.0 mm olmak üzere üç farklı kalınlıkta çalışılmış ve biyosensörün yanıtına etkisi araştırılmıştır. Farklı disk kalınlıklarında 5–100 mg/l $BOİ$ konsantrasyonlarında elde edilen pik yükseklikleri ile $\delta i/\delta t$ grafikleri Şekil 4.32’de gösterilmiştir.

Mikro gözenekli polimer diskte yapılan disk kalınlığının sensör yanıtı üzerine etkisi çalışmalarında 3.0 mm kalınlığındaki diske mikroorganizma immobilizasyonu yapılmış ve 3.0 mm kalınlık için çalışmalar yapıldıktan sonra disk kesilerek sırasıyla 2.0 ve 1.0 mm kalınlıkta diskler oluşturulmuştur. Polimer disk kesildiğinde immobilize mikroorganizmaların bir kısmının kesilen bölge ile kaybedileceği göz önüne alınmış fakat üst bölgelerdeki popülasyon değişmeyeceğinden bize daha kolay karşılaştırma yapma olanağı sağlayacağı düşünülmüştür. Şekil 4.32’de görüldüğü üzere disk kalınlığı 1.0 mm’ den 2.0 mm’ ye çıktığında pik yüksekliğinde de artış

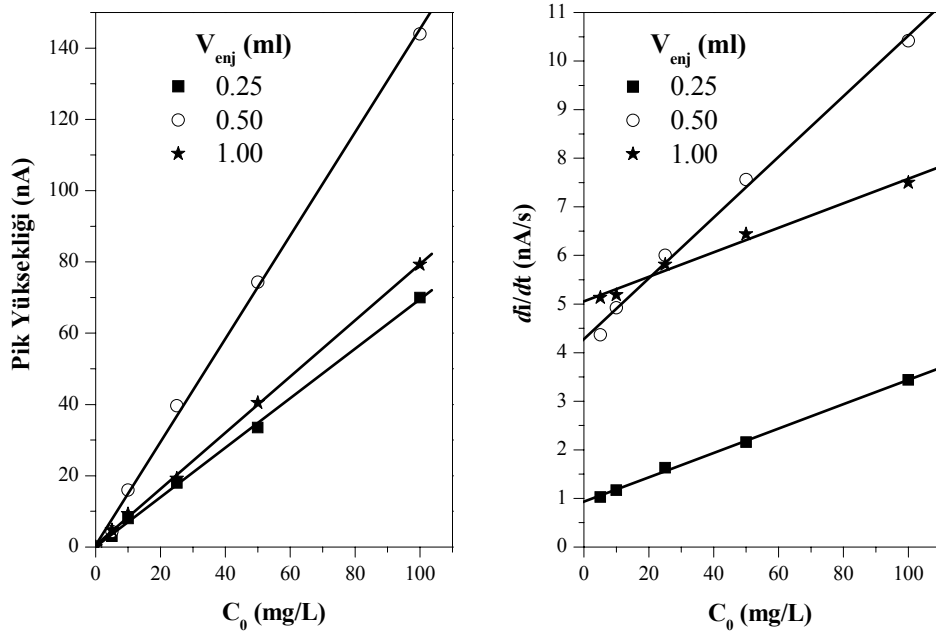
meydana gelmektedir. Fakat disk kalınlığı 3.0 mm olduğunda ise hem pik yüksekliği hem de $\delta i/\delta t$ değerleri azalmaktadır. Disk kalınlığının artması ile daha fazla mikroorganizma immobilize olacağından pik yüksekliği ve $\delta i/\delta t$ değerlerinin artması beklenir fakat burada aksine bir durum gözlenmiştir. Mikro-gözenekli polimer diskin poroz bir ortam olmasından dolayı mikroorganizmaların immobilizasyonu difüzyona bağlı olarak yavaş olmaktadır. Dolayısıyla mikroorganizmaların disk içerisine immobilizasyon işlemi henüz polimer diskin daha derin bölgelerinde tamamlanmadığı söylenebilir. Akay ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda 30 günlük işletim sonunda polimer disk içerisinde hücre dağılımı 2.5 mm kalınlığa kadar aynı yoğunlukta olmakta fakat disk kalınlığı arttığında hücre popülasyonu keskin bir şekilde azalmaktadır [Akay ve ark., 2005]. Dolayısıyla 3.0 mm disk kalınlığında polimer diskin daha derin kısımlarında mikroorganizmaların çok az olduğu veya olmadığı söylenebilir. Bundan dolayıdır ki reaktör içerisine giren organik madde içeren çözelti ancak diskin üst bölgelerinde reaksiyona girmekte daha derin bölgelerde ise mikroorganizma bulunmadığından hiçbir reaksiyona uğramadan diskten çıkmaktadır. Polimer diskin hacminin artması ve buna bağlı olarak ta daha fazla seyrelmenin meydana gelmesi ile daha küçük sinyaller oluşmaktadır. Disk kalınlığının 1.0 mm olduğu durumlarda ise mikroorganizma konsantrasyonunun 2.0 mm olduğu durumdakinden daha az olmasından dolayı oluşan sinyallerin azaldığı görülmektedir. Dolayısıyla 2.0 mm disk kalınlığında meydana gelen pik yüksekliği ve $\delta i/\delta t$ değerlerinin sensör için uygun kalınlığın 2.0 mm olduğunu göstermektedir.

4.3.5. Sensör Yanıtına Enjeksiyon Hacminin Etkisi

Biyosensörün yanıtına enjeksiyon hacminin etkisini araştırmak amacıyla sırasıyla 0.25, 0.50 ve 1.0 ml hacimlerinde luplar ile çalışılmıştır. Enjeksiyon hacmi için yapılan çalışmalarda optimum şartlar olan 0.6 ml/dak, 22 °C sıcaklık ve 6.8 pH değerinde çalışmalar yapılmıştır. Üç farklı enjeksiyon hacmi ile yapılan çalışmalarda elde edilen pik yükseklikleri ile $\delta i/\delta t$ grafikleri Şekil 4.33'te gösterilmiştir. Enjeksiyon hacmi için yapılan çalışmalarda 5–100 mg/l BOİ₅ konsantrasyon aralığında her bir enjeksiyon hacmi için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.



Şekil 4.32. Sensör yanıtı üzerine disk kalınlığının etkisi ($Q = 0.6$ ml/dak., $pH = 6.8$, $T = 22^\circ C$, $V_{enj} = 1$ ml)



Şekil 4.33. Sensör yanıtı üzerine enjeksiyon hacminin etkisi ($Q = 0.6$ ml/dak., $pH = 6.8$, $T = 25^\circ C$, $d_{disk} = 2$ mm)

Şekil 4.33'te görüldüğü üzere enjeksiyon hacmi 0.25 ml olduğunda hem pik yüksekliği hem de $\delta i/\delta t$ değerleri en düşük olmaktadır. Bu durum beklenen bir durumdur çünkü enjekte edilen BOİ₅ yükü azalmaktadır. Yani reaktör içerisine giren organik madde miktarı azalmakta ve dolayısıyla mikroorganizmaların solunumu için gerekli oksijeni daha az tüketmektedirler. Enjeksiyon hacmi 0.5 ml olduğunda sensörün yanıtı da artmakta fakat 1 ml enjeksiyon hacminde tekrar azalmaktadır. Şekil 4.33'te verilen $\delta i/\delta t$ grafiğinde görüldüğü üzere düşük konsantrasyonlarda 1 ml. enjeksiyon hacmi için daha fazla sinyal elde edilirken konsantrasyon arttıkça (>25 mg/l) 0.5 ml hacim için elde edilen sinyaller artmaktadır. Elde edilen bu grafiklere göre enjeksiyon hacmi 0.5 ml. olduğunda sensör yanıtı daha iyi olmaktadır. Enjeksiyon hacmi 0.5 ml olduğunda 100 mg/l BOİ₅ konsantrasyonda toplam 0.05 mg organik madde MGP disk içindeki mikroorganizmalar tarafından tüketilmek üzere reaktör sistemine girerken 1 ml hacim için aynı konsantrasyonda 0.1 mg organik madde reaktör içerisine girmektedir. Yani enjeksiyon hacmi arttıkça aynı konsantrasyonda reaktöre giren organik madde miktarı artmaktadır. Şekil 4.33'e göre immobilize mikroorganizmaların aynı konsantrasyonlar için 0.5 ml enjeksiyon hacminde sisteme verilen organik madde yükünü sindirirken daha fazla oksijen tükettiklerini söylemek mümkündür. Şekil 4.33'te verilen pik yükseklikleri grafiği incelendiğinde aynı konsantrasyonlar için 0.5 ml enjeksiyon hacminde elde edilen sensör sinyali 1.0 ml enjeksiyon hacminde elde edilen sinyalin iki katı olmaktadır. 0.5 ml enjeksiyon hacminde 50 mg/l BOİ₅ konsantrasyonu için elde edilen pik yüksekliği, 1.0 ml enjeksiyon hacminde verilen 100 mg/l konsantrasyon ile aynı olmaktadır. Dolayısıyla biyosensörün yanıtı üzerine enjeksiyon hacminin etkisi incelendiğinde en iyi sonuçlar 0.5 ml enjeksiyon hacmi ile yapılan çalışmalarda elde edilmiştir.

4.4. Biyosensörün Ölçüm Limiti

Geliştirilen BOİ biyosensörünün ölçüm limiti hesaplamalarında daha önce Bölüm 3.10'da verilen denklemler kullanılmış olup biyosensörün ölçüm limiti sürekli besleme ve akım enjeksiyonu çalışmaları için ayrı ayrı hesaplanmış ve sırasıyla Çizelge 4.1 ve 4.2'de gösterilmiştir. Ölçüm limitleri hesaplanırken denklem 3.1 ve 3.2'de verilen $t_{1-\alpha}$ dağılımının %95 güven aralığında olması esas alınmıştır.

Çizelge 4.1. BOİ biyosensör sisteminde sürekli besleme ile yapılan debi çalışmalarında hesap edilen ölçüm limitleri

Debi	Eğim (b_1)	Kesim Noktası (b_0)	y_D (nA)	Ölçüm Limiti (mg/l)
0.50	0.093	0.030	0.499	4.38
0.75	0.123	0.335	0.627	4.10
1.0	0.129	0.504	0.554	3.30
1.5	0.113	0.773	0.788	5.98

Çizelge 4.1’de gösterilen ölçüm limitleri sürekli besleme ile yapılan çalışmalarda akımın zamanla değişimi ($\delta i/\delta t$) için elde edilen kalibrasyon eğrilerinden hesaplanmıştır. Bu hesaplamalara göre optimum debi olarak seçilen 1 ml/dak. için ölçüm limiti 3.30 mg/l olarak bulunmuş ve diğer debiler için bulunan ölçüm limitleri ile karşılaştırıldığında düşük olduğu görülmüştür.

Akım enjeksiyonu için yapılan debi çalışmalarında hesaplanan ölçüm limitleri incelendiğinde ise 0.6 ml/dak. debide 4.97 mg/l olarak hesaplanmış diğer debilerde daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.2. BOİ biyosensör sisteminde akım enjeksiyonu ile yapılan debi çalışmalarında hesap edilen ölçüm limitleri

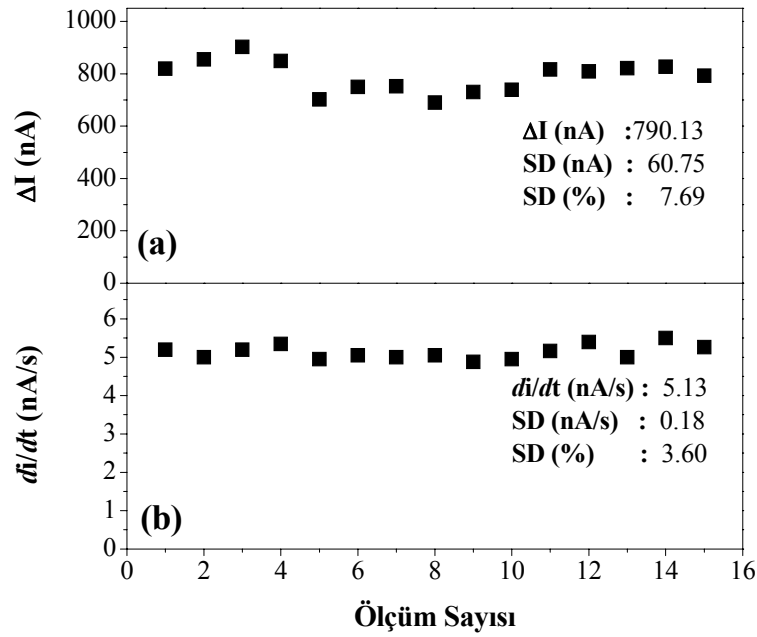
Debi	Eğim (b_1)	Kesim Noktası (b_0)	y_D (nA)	Ölçüm Limiti (mg/l)
0.4	2.002	56.349	13.390	5.69
0.6	1.658	46.138	9.896	4.97
0.8	0.933	46.146	7.819	7.38
1.0	0.624	46.013	6.073	8.73
1.2	0.560	43.731	5.136	8.18

4.5. Biyosensörün Tekrarlanabilirliği

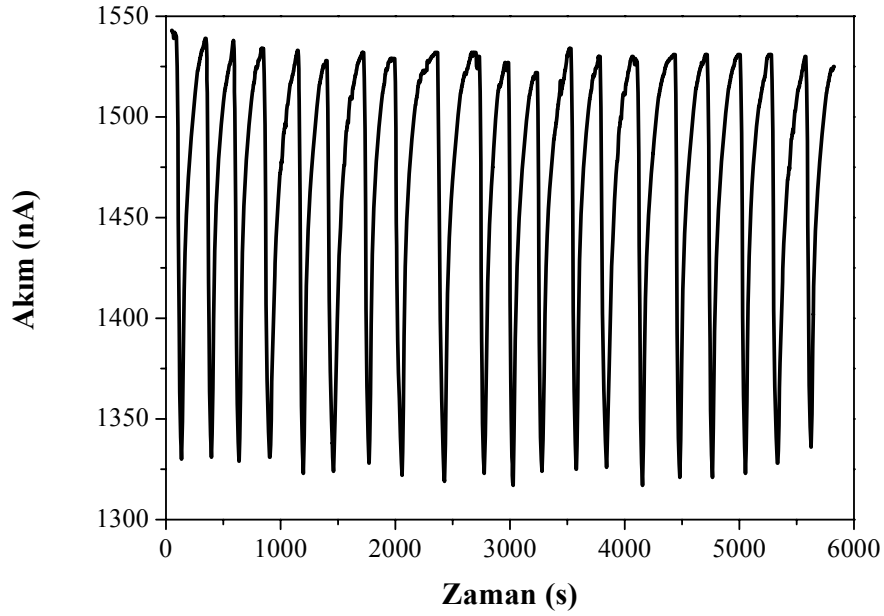
Biyosensörün tekrarlanabilirliğini hesaplamak amacıyla her iki ölçüm yöntemi ile aynı konsantrasyonlar için tekrar deneyleri yapılmıştır. Sürekli ölçüm tekniğine göre optimum debi olan 1.0 ml/dak’da 40 mg/l BOİ₅ için dinamik ve kinetik ölçüm sonuçları Şekil 4.34’te gösterilmiştir. Şekil 4.35’te ise akım enjeksiyon tekniğine

göre optimum debi olan 0.6 ml/dak.'da 100 mg/l BOI_5 için 10 saat süreyle yapılmış ölçüm sonuçları gösterilmiştir.

Sürekli ölçüm tekniğine göre yapılan tekrar deneylerinde özellikle kinetik ölçüm tekniği kullanıldığında oldukça iyi sonuçlar elde edilmiş ve 40 mg/l için 5.13 nA/s ortalama $\delta i/\delta t$ değeri elde edilirken standart sapma değeri ± 0.18 (nA/s) (%3.60) (n=14) olarak bulunmuştur. Akım enjeksiyonu yöntemi kullanılarak yapılan ölçümlerde ise 100 mg/l için ortalama 206 nA pik yüksekliği elde edilirken standart sapma ± 4.48 (%2.22) (n=20) olarak bulunmuştur. Şekil 4.35'ten görüldüğü üzere 10 saatlik deney sonunda sensörün stabilitesinde değişiklik meydana gelmemekte mikroorganizmalar aynı aktiviteyi gösterebilmektedirler.



Şekil 4.34. Biyosensörün tekrarlanabilirliği için sürekli ölçüm tekniğinde yapılan (a) dinamik ve (b) kinetik ölçüm sonuçları. ($\text{BOI}_5 = 40$ mg/l, $Q = 1.0$ ml/dak.)



Şekil 4.35. Biyosensörün tekrarlanabilirliği için yapılan enjeksiyon çalışmaları.
($\text{BOI}_5 = 100 \text{ mg/l}$, $Q = 0.6 \text{ ml/dak.}$)

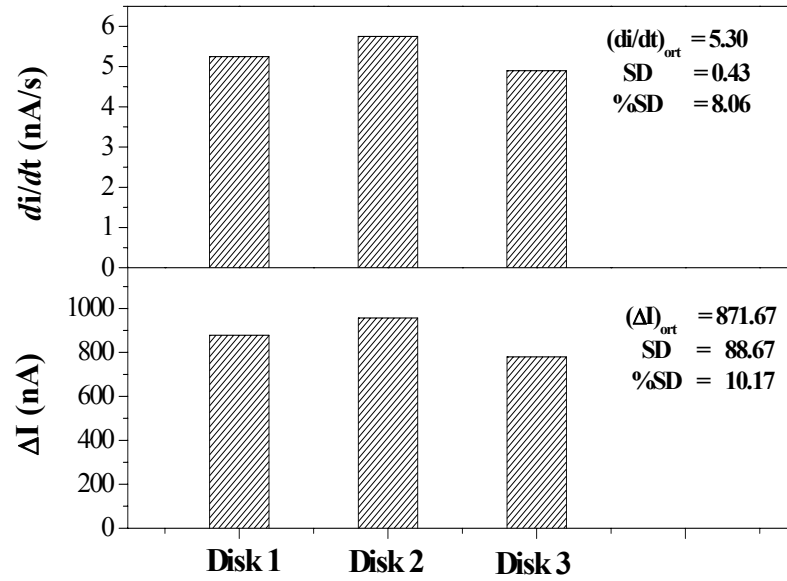
4.6. Biyosensörün Üretilabilirliği

BOİ testleri için kabul edilebilir limit %15 standart sapma olarak kabul edilmektedir [Apha, 1992]. BOİ biyosensörünün amacı atıksular içerisinde bulunan çözünmüş organik maddeleri aynı üretilabilirlik ve doğruluk ile ölçebilmektir. Geliştirilen biyosensörün üretilabilirliğini araştırmak amacıyla 3 farklı MGP disk hazırlanarak sürekli ölçüm ve akım enjeksiyon tekniklerine göre çalışmalar yapılmıştır.

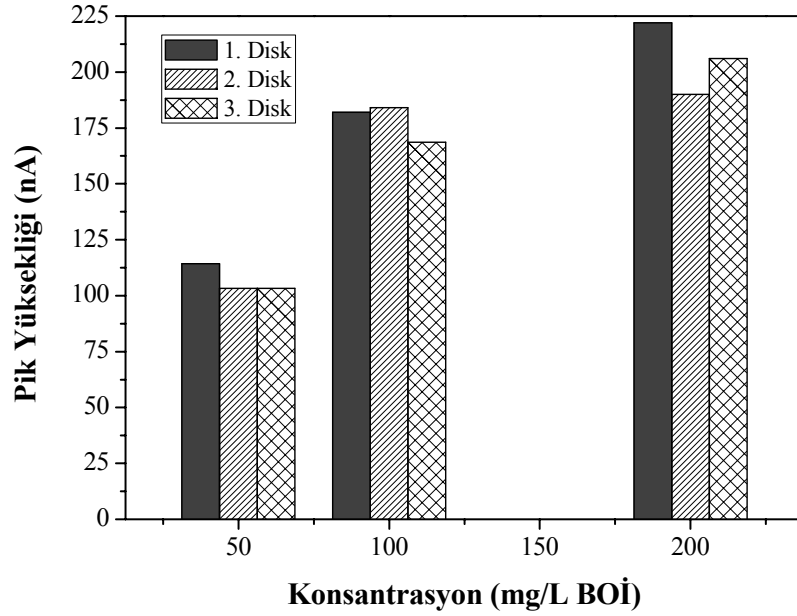
Sürekli ölçüm tekniğine göre yapılan çalışmalara ait grafikler Şekil 4.36'da gösterilmiştir. Sürekli ölçüm tekniğinde 40 mg/l BOI_5 konsantrasyonu için yapılan üretilabilirlik çalışmalarında kinetik ve dinamik ölçümlere göre sonuçlar bulunmuştur. Kinetik ölçüm tekniğine göre 3 disk için ortalama 5.30 nA/s sinyal elde edilmiş ve standart sapma değeri %8.06 olarak bulunmuştur. Dinamik ölçüm tekniğine göre ise ortalama 871.67 nA sinyal elde edilirken standart sapma değeri %10.17 bulunarak kinetik ölçüm tekniğine göre daha yüksek olmuştur.

Akım enjeksiyonu çalışmalarında ise tekrar üretilebilirliği bulmak amacıyla üç farklı polimer diskte 50–100 ve 200 mg/l BOİ konsantrasyonları için ölçümler yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.37’de gösterilmiştir. Üç farklı polimer disk ile ölçülen 50–100 ve 200 mg/l BOİ₅ konsantrasyonları için elde edilen standart sapmalar sırasıyla %5.96, %4.68 ve %7.77 olarak bulunmuştur.

Geliştirilen mikrobiyal BOİ biyosensörünün üretilebilirliğini göstermek amacıyla 3 farklı MGP diskte yapılan bu çalışmalara göre her iki ölçüm tekniği için bulunan standart sapma değerleri BOİ₅ için kabul edilen %15 kontrol limitinin altında kalmıştır. Dolayısıyla BOİ biyosensörünün üretilebilirliğinin oldukça iyi olduğu söylenebilir.



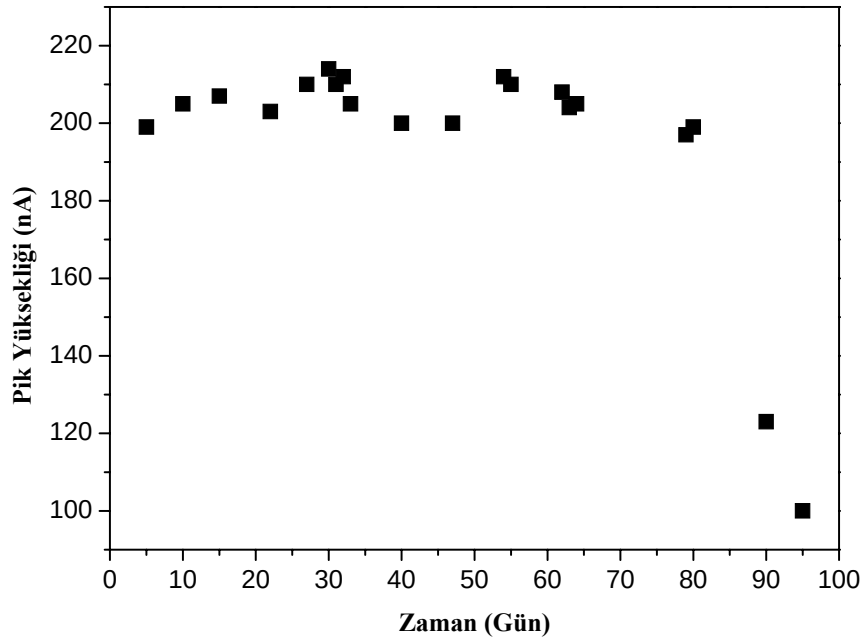
Şekil 4.36. Farklı MGP diskler için sürekli ölçüm tekniğine göre 40 mg/l BOİ₅ konsantrasyonunda elde edilen kinetik ve dinamik ölçüm sonuçları



Şekil 4.37. BOİ Biyosensörün tekrar üretilebilirliği için akım enjeksiyon çalışmalarında üç farklı diskte 50–100 ve 200 mg/l için elde edilen pik yükseklikleri

4.7. Biyosensörün Stabilitesi

Mikrobiyal BOİ biyosensörünün stabilitesini ne kadar süreyle koruduğunu belirlemek amacıyla farklı günlerde yapılan BOİ ölçümlerinden 100 mg/l BOİ konsantrasyonu için elde edilen pik yükseklikleri hesaplanarak Şekil 4.38’de gösterilmiştir. Şekil 4.38’de görüldüğü üzere sensör immobilizasyon işleminden 5 gün sonra 100 mg/l BOİ konsantrasyonları için görülen yaklaşık 200 nA pik yükseklikleri meydana gelmiştir. Biyosensörün aktivitesi 5. günden itibaren 80. güne kadar %2.5 standart sapma göstererek devam etmiştir. Fakat 90. günde sensör aktivitesi azalmış ve elde edilen pik yüksekliği 120 nA seviyesine düşmüştür. Bu durum poroz polimer diskin gözeneklerinin mikroorganizmalar tarafından tıkanması ve meydana gelen ölümler yüzünden immobilize mikroorganizmaların aktivitelerinin kaybolmasından kaynaklandığı söylenebilir.



Şekil 4.38. BOİ biyosensörünün 100 mg/l BOİ için elde edilen stabilitesi

4.8. Biyosensör ile Atıksu Ölçümleri

Geliştirdiğimiz mikrobiyal BOİ biyosensörü ile kalibrasyon çalışmaları yapıldıktan sonra gerçek atıksu denemeleri yapılarak atıksulara karşı nasıl bir tepki verdiği araştırılmıştır. Atıksu okumaları yapmak için ilk önce glikoz glutamik asit içeren BOİ çözültisi ile 5–100 mg/l aralığından kalibrasyon çalışması yapılmış daha sonra atıksu örnekleri okunmuştur. Kalibrasyon eğrisine göre atıksuların oluşturduğu sinyallere karşılık gelen BOİ₅ değerleri hesaplanarak ölçüm yapılmıştır. Ayrıca atıksuların BOİ₅ değerleri de geleneksel biyolojik oksijen ihtiyacı deneyi ile hesaplanarak BOİ_{sensör}/BOİ₅ değerleri birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Geleneksel BOİ₅ deneyi sonucuna göre elde edilen BOİ₅ değerleri ile KOİ değerleri Çizelge 3.2’de verilmiştir. Atıksu ölçümleri hem sürekli besleme yöntemi ile hem de enjeksiyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Sürekli besleme ile yapılan atıksu ölçümlerinde ise dinamik metot ve kinetik metoda göre elde edilen kalibrasyon eğrilerine göre ayrı ayrı hesaplanmış ve Çizelge 4.3’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Biyosensörde sürekli besleme yapılarak elde edilen BOİ değerleri

Atıksu Örneği	BOİ _{sensör} (mg/l)		BOİ ₅ (mg/l)	% Hata	
	Dinamik	Kinetik		Dinamik	Kinetik
1	312.6	308.5	330	5.27	6.52
2	8368	8263	9000	7.02	8.19
3	139.8	148.7	190	26.42	21.74

Sürekli besleme ile yapılan atıksu ölçümlerinde Çizelge 4.3'te görüldüğü üzere sensör ile yapılan ölçümlerde BOİ₅ değerlerine yakın değerler elde edilmiştir. Sadece 3 nolu atıksu örneğinde dinamik ve kinetik metoda göre ölçülen değerler yüksek hata oranları göstermiş diğer atıksularda ise bu oranlar %8'den daha az olmuştur.

Akım enjeksiyonu ile yapılan atıksu ölçümlerinde elde edilen değerler ise Çizelge 4.4'te verilmiştir. Akım enjeksiyonu yapılarak elde edilen değerlerde sürekli besleme ile yapılan değerlere göre hata oranları yükselmekle beraber yinede oldukça yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Akım enjeksiyonu çalışmalarında atıksuların reaktör içerisindeki mikroorganizmalar ile temas süresinin az olması ve enjeksiyon miktarının enjeksiyon lupu ile sınırlı olması atıksu ölçümlerinin sürekli besleme sonucu elde edilen değerlere göre daha az sinyaller meydana gelmektedir.

Çizelge 4.4. Biyosensörde enjeksiyon yapılarak elde edilen BOİ değerleri

Atıksu Örneği	BOİ _{sensör} (mg/l)	BOİ ₅ (mg/l)	% Hata
1	295.8	330	10.4
2	8179	9000	9.12
3	146.9	190	22.7

BOİ biyosensörü ile yapılan atıksu ölçümlerinde BOİ₅ değerleri ile aralarında meydana gelen bu hata oranları sensör ile yapılan kalibrasyon çalışmalarının glikoz-glutamik asit çözeltisi içeren stok çözelti ile yapılmasından kaynaklanmaktadır. Çünkü bu çözelti içerisinde organik madde olarak glikoz bulunmakta fakat atıksular

içerisinde organik madde türleri çok çeşitlilik göstermektedir. Dolayısıyla immobilize mikroorganizmaların atıksular içerisindeki organik maddeleri parçalayabilmesi için ilk önce bu tür organik maddelere adapte olması gerekmektedir. Bunun için atıksu ölçümlerinde kalibrasyon çalışmalarının ölçümü yapılacak atıksu ile yapılması bize daha iyi sonuçlar verecektir.

4.9. Dispersiyon Modelinin BOİ Biyosensörü için Uygulaması

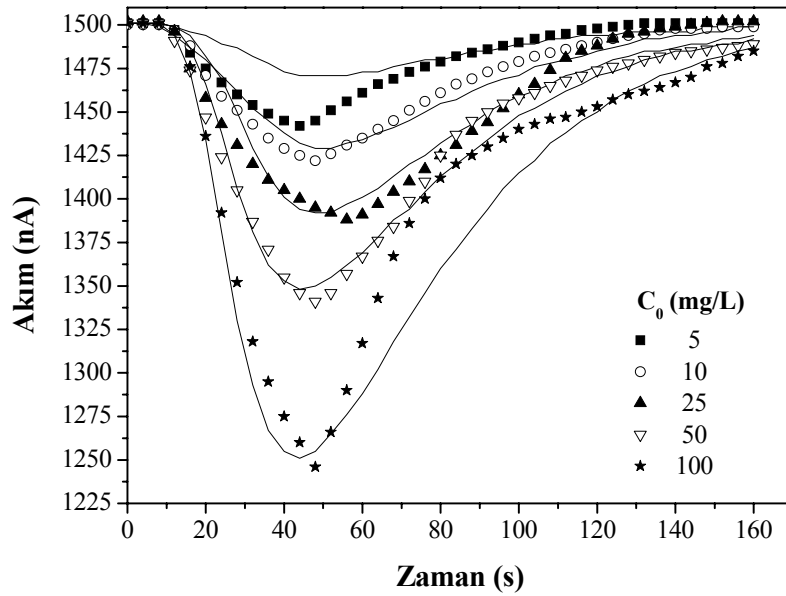
Mikrobiyal BOİ biyosensörü ile farklı debilerde yapılan akım enjeksiyonu çalışmaları için dispersiyon modeli geliştirilmiştir. Geliştirilen bu model için kullanılan MGP diskin yerleştirildiği reaktör bilgileri ve model sonucu elde edilen katsayılar Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Model çalışmasında kullanılan reaktör bilgileri ve model sonucu elde edilen katsayılar

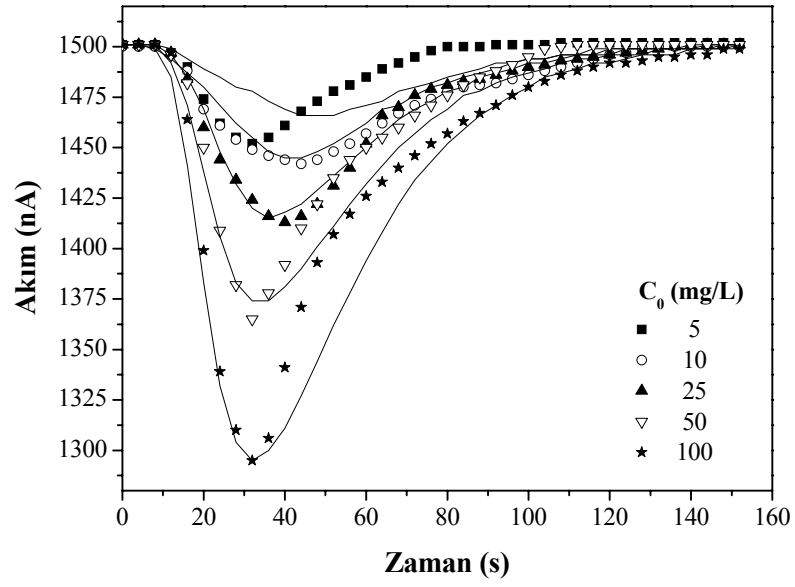
Debi (ml/dak)	0.4	0.6	0.8	1.0
u (mm/s)	0.033	0.050	0.066	0.083
D (mm ² /s)	0.027	0.040	0.053	0.066
$k_g * 10^{-4}$ (s ⁻¹)		0.30		
$k_o * 10^{-4}$ (s ⁻¹)		2.80		
Dispersivite (α) (mm)		0.80		
MGP Disk Çapı (mm)		16		
MGP Disk Yüksekliği (mm)		2		

Çizelgeden görüldüğü üzere dispersiyon katsayısı akış hızına bağlı olarak belli bir oranda artmaktadır. Dispersiyon katsayısı, dispersivite (α) ve hıza bağlı olan bir parametre olduğundan ($D = \alpha V$) dispersiyon katsayısı disk içindeki hıza bağlı olarak artış göstermektedir. Model sonucu dispersivite 0.8 mm olarak bulunmuştur. 1. dereceden reaksiyon hızları ise glikoz için $0.3 * 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ve oksijen için ise glikozun parçalanma hızına göre yaklaşık 10 kat daha hızlı olmak suretiyle $2.8 * 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

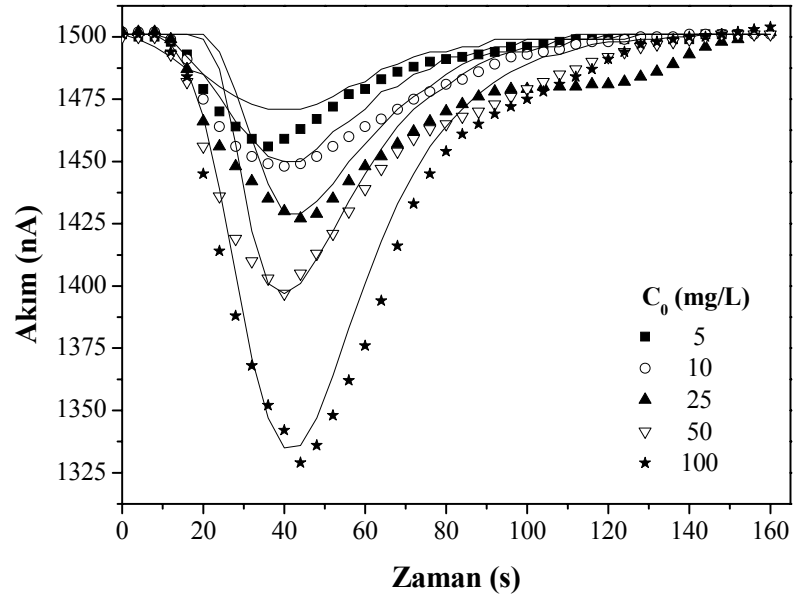
Enjeksiyon çalışmalarında 0.4, 0.6, 0.8 ve 1.0 mL/dak. debilerde farklı başlangıç konsantrasyonlarında elde edilen pikler ile dispersiyon modeli uygulanarak elde edilen pikler Şekil 4.39–4.42’de gösterilmiştir. Şekiller incelendiğinde düşük konsantrasyonlarda (5 mg/l) deney verileri ile model verilerinin pek uyuşmadığı, 10 mg/l’ den daha yüksek konsantrasyonlarda ise özellikle düşük debilerde deney verilerinin model ile uyumlu olduğu görülmektedir. Sensör sistemine içerisinde organik madde bulunmayan bir çözeltiyi enjeksiyon vanası ile beslediğimizde reaktör içerisinde herhangi bir reaksiyon meydana gelmediği halde oksijen konsantrasyonunda azalma meydana gelmektedir. Buna bağlı olarak her bir konsantrasyonda elde edilen piklerde tampon çözelti için elde edilen pik değeri kadar bir hata bulunmaktadır. Dolayısıyla özellikle düşük konsantrasyonlarda model bu hatayı çözümleyemediği için pik yükseklikleri elde edilen deney datalarından daha düşük çıkmaktadır.



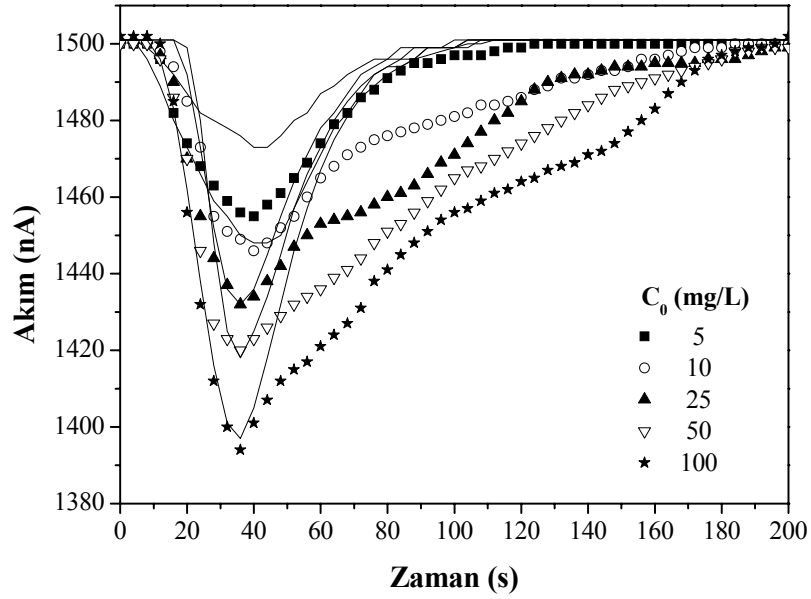
Şekil 4.39. 0.4 ml/dak. için farklı BOI_5 konsantrasyonları için elde edilen deneysel ve teorik pik yükseklikleri



Şekil 4.40. 0.6 ml/dak. için farklı BOI_5 konsantrasyonları için elde edilen deneysel ve teorik pik yükseklikleri



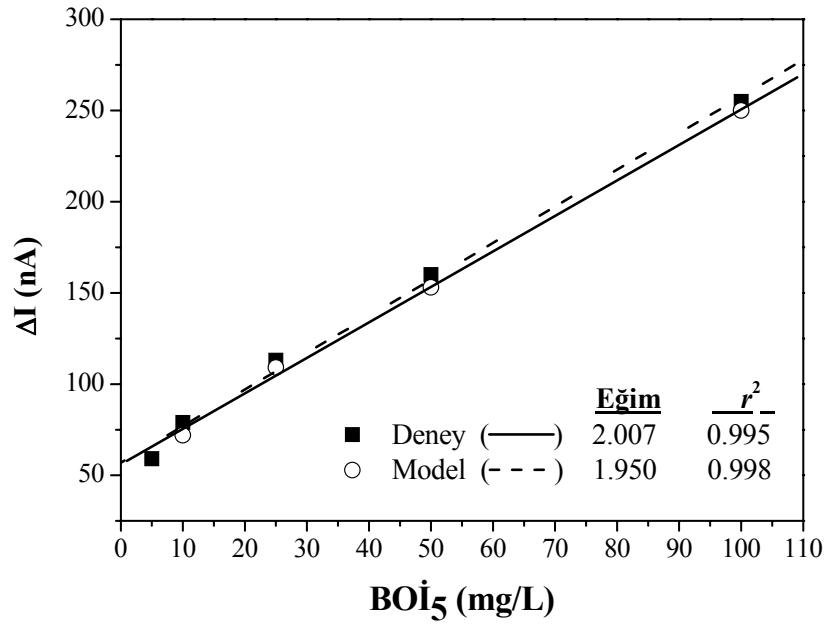
Şekil 4.41. 0.8 ml/dak. için farklı BOI_5 konsantrasyonları için elde edilen deneysel ve teorik pik yükseklikleri



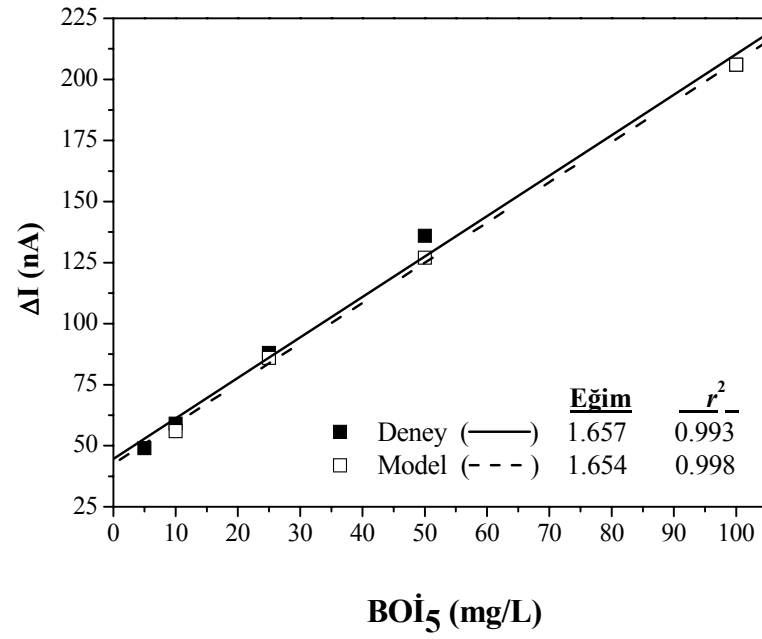
Şekil 4.42. 1.0 ml/dak. için farklı BOI_5 konsantrasyonları için elde edilen deneysel ve teorik pik yükseklikleri

Modelin yüksek debilerde (1.0 ml/dak.) deney dataları ile uyum sağlamadığı görülmektedir. Bu durum MGP diskin gözenekleri içerisine difüze olan organik maddelerin difüzyona bağlı olarak çok düşük hızlarda reaktörden uzaklaşması sonucu biyosensörde ölçülen akım değerlerinin ilk seviyelerine geri dönüşüm süresi model ile bulunan geri dönüşüm süresinden daha uzun olmaktadır. Dolayısıyla Şekil 4.42’de görüldüğü üzere model ile elde edilen grafikler 80 saniye içerisinde ilk seviyelerine gelirken deney verilerinde bu geri dönüşüm süresi 160 saniye olmaktadır. Daha önce Şekil 3.5’te verilen iz element enjeksiyon çalışması grafiğinde görüldüğü üzere enjeksiyonunun bitmesinden sonra deney dataları ile model dataları için elde edilen sinyallerin geri dönüşüm süreleri farklılık göstermektedir. Bu durum polimer disk içerisindeki gözeneklere difüze olan iz elementin gözeneklerden geri difüzyonunun daha uzun sürmesinden kaynaklanmaktadır. Polimer diskin çok gözenekli yapısından dolayı disk içerisine giren madde aynı hızda diskten uzaklaşmamakta dolayısıyla model sonucu bulunan geri dönüşüm eğimi deney datalarına göre daha dik olduğu düşünülmektedir.

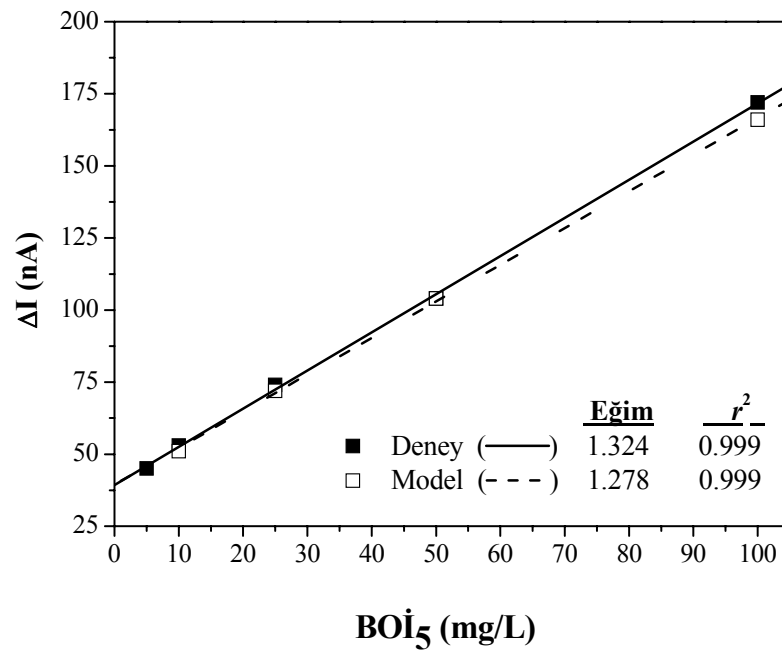
Model sonucu elde edilen pik yüksekliklerine bağlı olarak elde edilen kalibrasyon eğrisi grafikleri ise Şekil 4.43-4.46'da gösterilmiş ve deneysel verilerle elde edilen kalibrasyon eğrileri ile karşılaştırılmıştır. Kalibrasyon grafiği şekillerinden görüldüğü üzere deneysel olarak elde edilen eğim (hassasiyet) değerleri ile model sonucu elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında her bir debi için birbirine yakın değerler elde edildiği ve modele göre elde edilen r^2 değerlerinin de oldukça yüksek olduğu (>0.958) görülmektedir. Deneysel ve model çalışmalarına göre elde edilen eğimler reaktör içerisinde akış hızı arttıkça azalmaktadır. Bu durum aynı konsantrasyon beslemelerinde yüksek debilerde daha düşük sinyaller elde edildiğini göstermektedir.



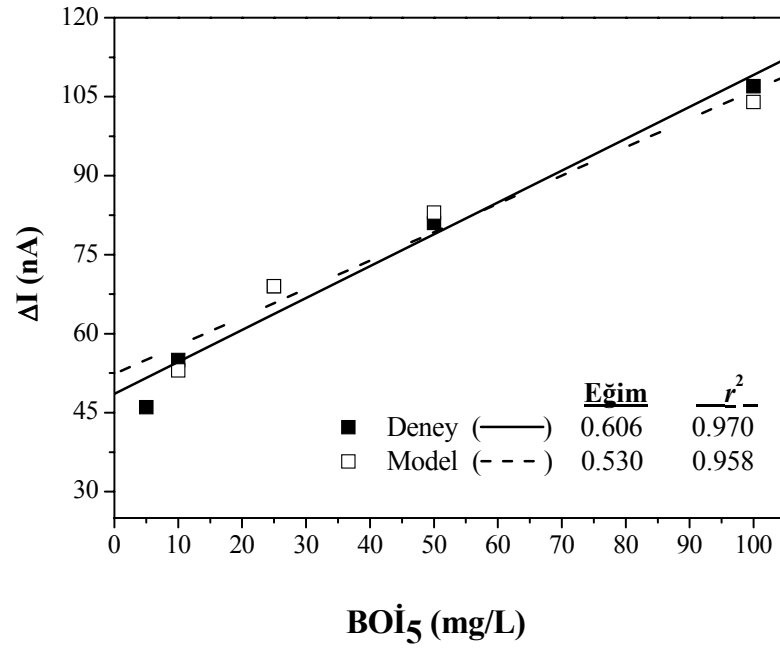
Şekil 4.43. 0.4 ml/dak. için elde edilen kalibrasyon eğrileri



Şekil 4.44. 0.6 ml/dak. için elde edilen kalibrasyon eğrileri



Şekil 4.45. 0.8 ml/dak. için elde edilen kalibrasyon eğrileri



Şekil 4.46. 1.0 ml/dak. için elde edilen kalibrasyon eğrileri

5. SONUÇ ve DEĞERLENDİRME

BOİ ölçümleri için geliştirilen mikrobiyal BOİ biyosensörü biyokatalistin (mikrobiyal/enzimatik) diyaliz ve Teflon membranlar arasına yerleştirilip çözünmüş oksijen probu üzerine yerleştirilmesi ile oluşturulan sensörlerden farklı olarak tasarlanmıştır. Literatürde yer alan BOİ biyosensörleri, biyolojik tanıma elemanı olarak kullanılan mikroorganizmaların poroz selüloz (diyaliz) membran ve gaz-geçirebilen (teflon) membran arasına hapsedilerek oluşturulmuş biyo-film tipi sensörlerdir. Atıksu örneği sensör sistemine enjekte edildiğinde organik maddeler diyaliz membrandan difüze olarak immobilize bakteriler tarafından sindirilirler ve bunun sonucu olarak bakteri solunum hızının ve oksijen tüketiminin artmasına sebep olurlar. Buna bağlı olarak daha az oksijen teflon membrandan difüze olacağından sensör sinyalinde azalma meydana gelmektedir. Substrat difüzyonu, biyofilm tipi sensör uygulamalarında prosesin işleyişini kontrol eden önemli parametrelerden biri olup mikroorganizma miktarının artması ile sensör sinyalinin arttığı fakat bu artışın biyofilm kalınlığına bağlı olarak sınırlı olduğu görülmüştür. Bu durumun organik maddenin membrandan ve mikroorganizma tabakasından sınırlı difüzyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Fakat bu yeni biyosensör sisteminde mikroorganizmaların mikro gözenekli polimer disk içerisine immobilizasyonu sonucu tek tabaka bir biyofilm oluşturmaları substrat difüzyonu problemini gidermektedir. Mikrobiyal BOİ biyosensör sistemlerinde diğer bir problemde immobilize mikroorganizmaların eriyip yok olması sonucu işletme süresinin kısıtlanması ve diyaliz membran yüzeyinin bakteriler tarafından kirlenmesi sonucu substrat geçişinin engellenmesidir. Geliştirilen biyosensör sisteminde ise MGP diskte mikroorganizmaların tutuklanması mikrobiyal aktivitenin daha uzun ömürlü olmasını ve daha iyi stabilite vermesini sağlamaktadır. Çünkü polimer disk içerisine immobilize olan mikroorganizmaların polimerin gözenekli yapısı sayesinde rejenerasyonu ve büyümesi süreklilik sağlamaktadır.

Ayrıca bu biyosensör sisteminde fenol parçalayan bakterilerden *Pseudomonas syringae* (AEK1), aromatik hidrokarbonları kolaylıkla sindirebilmeleri ve çok geniş spektrumda biyolojik olarak zor parçalanabilir türleri parçalama kabiliyetlerinin olmasından dolayı sensörün biyo-katalitik bölümü olarak seçilmişlerdir.

BOİ biyosensörü ile sürekli besleme yöntemi ve akım enjeksiyonu yöntemi ile yapılan çalışmalarda sürekli besleme tekniğinde optimum debi 1.0 ml/dak., akım enjeksiyonu çalışmasında ise 0.6 ml/dak olarak bulunmuştur. Biyosensörün ölçüm süresi sürekli besleme tekniğinde dinamik ölçüm yöntemi ile 10 dak. ölçüm 15 dak. geri dönüşüm olmak üzere toplam 25 dak. iken bu süre akım enjeksiyonu çalışmalarında en fazla 200 s. olarak bulunmuştur. Biyosensör sisteminde optimum pH ve sıcaklık değerleri ise sırasıyla 6.8 ve 22 °C olarak bulunmuştur. MGP disk kalınlığının ise 2 mm yüksekliği optimum disk yüksekliği olarak bulunmuştur.

Geliştirilen BOİ biyosensörünün performans özellikleri incelendiğinde ise ölçüm limiti, sürekli ölçüm tekniğinde 3.3 mg/l, akım enjeksiyonu tekniğinde ise 4.97 mg/l olarak hesaplanmıştır. BOİ biyosensörünün tekrarlanabilirliği sürekli ölçüm tekniği ve akım enjeksiyonu tekniklerine göre incelenmiş ve sırasıyla %3.60 ve %2.22 olarak bulunmuştur. Biyosensörün tekrar üretilebilirliği ise her iki ölçüm tekniğinde %10.2' den daha az sapma olduğu görülmüştür. Sensör stabilitesinin de oldukça iyi olduğu ve yaklaşık 3 ay stabilitesini koruyabildiği görülmüştür.

MGP disklerin reaktör içerisinde basınçtan dolayı sıkışarak buruştuğu SEM görüntülerinden görülmektedir. Polimer disklerin buruşmasından dolayı %90'lık olması beklenen porozitesi %10-15'ler seviyesine düşmektedir. Dolayısıyla hem mikroorganizmaların tutuklanıp üreyebilecekleri gözenekler bozulmakta hem de porozitenin azalmasından dolayı sıvı geçişi zor olmaktadır. Polimer disk üzerine çalışmalar yapılarak basınç altında sıkışarak buruşmasını azaltmak daha fazla mikroorganizmanın immobilize olmasını ve sensör sisteminden daha yüksek sinyaller alınmasını sağlayacaktır. Ayrıca sensör stabilitesi MGP diskin sıkışarak buruşması engellendiği takdirde daha uzun olabileceği düşünülmektedir. Çünkü buruşma olmaması durumunda polimer disk içerisindeki mikroorganizmaların yenilenmesinin daha kolay olabileceği ve gözeneklerin tıkanmasının engelleneceği düşünülmektedir.

Geliştirilen BOİ biyosensörü glikoz-glutamik asit çözeltisi kullanılarak yapılan kalibrasyon ile çeşitli atıksular için yapılan sürekli ve akım enjeksiyonlu okumalarda sadece evsel/endüstriyel atıksu karışımı için yapılan ölçüm dışında oldukça düşük hatalarda (<%10.4) sonuçlar vermiştir. Evsel ve endüstriyel atıksu karışımı için

ölçülen hata oranı ise en yüksek %26.4 olarak bulunmuştur. Bu atıksudaki BOI_5/KOI oranının 0.28 olduğu göz önüne alındığında atıksu içerisindeki çözünmüş organik madde miktarının az olduğu söylenebilir. Buna ilave olarak atıksu içerisindeki çözünmüş organiklerin inert organiklere göre az olması sebebiyle sensör sistemindeki immobilize mikroorganizmaların inert organikleri parçalayamamasından dolayı sensör ile ölçülen BOI değerinin gerçek BOI_5 değerinden çok fazla sapma gösterdiği söylenebilir. Ayrıca polimer içerisine sadece tek tür olarak *P. syringae* immobilizasyonunun olması ve bu mikroorganizma türünün atıksu içerisinde bulunan organik maddelerin tümünü parçalayamamasından dolayı da $BOI_{sensör}/BOI_5$ oranının yüksek olmasının bir sebebi olabilir. Dolayısıyla atıksu arıtma tesisleri için yapılan çalışmalarda ölçüm yapılacak arıtma tesisinde bulunan mikroorganizma türlerinin immobilizasyonu yapılarak ölçüm yapılırsa daha iyi sonuçlar elde edilebilmesi beklenmektedir.

Biyosensör için geliştirilen dispersiyon modelinin pik yükseklikleri bakımından deney dataları ile uyumlu olduğu görülmüş ve model verilerine göre pik yüksekliklerine bakılarak yapılan kalibrasyon çalışmalarında oldukça yüksek r^2 (0.958) değerleri elde edilmiştir. Fakat modelin zamana karşı çizilen piklerde MGP diskin gözenek yapısından ve disk kalınlığının çok küçük olmasından kaynaklanan uyumsuzluk görülmüştür. Bu durum MGP diskin geliştirilerek sensör sistemi içerisine en uygun bir şekilde yerleştirilmesi durumunda düzeltilebileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak BOI biyosensörünün daha iyi ölçümler yapması ve kullanım ömrünün daha uzun olması için özellikle mikroorganizmaların immobilize olduğu polimerin gözenek çapı, kalınlığı ve polimer yapısı gibi karakteristiklerinin geliştirilmesi için daha ileri araştırmalar yapılmalıdır. Bunun yanında biyosensörün biyo-aktif tabakası için kullanılan polimerden başka metal veya seramik gibi daha farklı malzemeler kullanılarak BOI biyosensörü geliştirilebilir.

6. REFERANSLAR

Akay, G., Flow-induced phase inversion in the intensive processing of concentrated emulsions. *Chem. Eng. Sci.*, 53 (2), 203-223, 1998.

Akay, G., Bhumgara, Z., Wakeman, R.J., Self-supported porous channel filtration modules: preparation, properties and performance. *Chem Eng Res Des* **73**, 782–797, (1995).

Akay, G., Erhan, E., Keskinler, B., Bioprocess intensification in flow-through monolithic microbioreactors with immobilized bacteria. *Biosens. & Bioelectron.*, 90, 180–190, (2005).

Akyılmaz, E., Dinçkaya, E., An amperometric microbial biosensor development based on *Candida tropicalis* yeast cells for sensitive determination of ethanol. *Biosens. Bioelectron.*, 20, 1263–1269, (2005).

An, L., Niu, H., Zeng, H., A new biosensor for rapid oxygen demand measurement. *Water Environ. Res.*, 70 (5), 1070–1073, (1998).

APHA, Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, Section 5210, eighteenth ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, DC, 5.1 – 5.6, (1992).

Arikawa, Y., Ikebukuro, K., Karube, I. in: Mulchandani, A., Rogers, K.R., (Eds.), *Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, 225, (1998).

Bajaj, M., Gallert, C., Winter, J., Biodegradation of high phenol containing synthetic wastewater by an aerobic fixed bed reactor, *Bioresour. Technol.*, 99 (17), 8376–8381, (2008).

Barkay, T., Gillman, M., Turner, R.R., Effects of dissolved organic carbon and salinity on bioavailability of mercury. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4267–4271, (1997).

Bartlett, P.N., Cooper, J.M., A review of the immobilization of enzymes in electro-polymerized films, *J. Electroanalytical Chem.*, 362, 1–12, (1993).

Bartlett, P.N., Tebbutt, P., Whitaker, R.G., Kinetic aspects of the use of modified electrodes and mediators in bioelectrochemistry, *Prog. React. Kinet.*, 16, 55–60, (1991).

Barlık, N., “PHP Köpüklerinin su ve Atıksu Arıtımındaki Kullanım Potansiyeli” Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye (2006)

Bechor, O., Smulski, D.R., Van Dyk, T.K., LaRossa, R.A., Belkin, S., Recombinant microorganisms as environmental biosensors: Pollutants detection by *Escherichia coli* bearing fabA':lux fusions. *J. Biotechnol.*, 94, 125–132, (2002).

Biran, I., Babai, R., Levcov, K., Rishpon, J., Ron, E.Z., Online and in situ monitoring of environmental pollutants: electrochemical biosensing of cadmium. *Environ. Microbiol.*, 2, 285–290, (2000).

Brena, B.M., Batista-Viera, F., Immobilization of enzymes: A literature survey, *Methods in Biotechnology* 22, Immobilization of Enzymes and Cells, Second Edition, ed: Guisan J. M., Humana Pres, pp.15, (2006).

Cammann, K., Ross, B., Katerkamp, A., Reinbold, J., Gründig, B., Renneberg R., Chemical and Biochemical Sensors, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, (2001).

Casavant, N.C., Thompson, D., Beattle, G.A., Phillips, G.J., Halverson, L.J., Use of a site-specific recombination-based biosensor for detecting bioavailable toluene and related compounds on roots. *Environ. Microbiol.*, 5, 238–249, (2003).

Chan, C., Lehmann, M., Chan, K., Chan, P., Chan, C., Gruendig, B., Kunze, G., Renneberg, R., Designing an amperometric thick-film microbial BOD sensor. *Biosens. & Bioelectron.*, 15, 343–353, (2000).

Chan, C., Lehmann, M., Tag, K., Lung, M., Kunze, G., Riedel, K., Gruendig, B., Renneberg, R., Measurement of biodegradable substances using the salt-tolerant yeast *Arxula adeninivorans* for a microbial sensor immobilized with poly(carbamoyl) sulfonate (PCS): Part I. Construction and characterization of the microbial sensor, *Biosens. Bioelectron.*, 14 (3), 131–138, (1999).

Chang, I.S., Jang, J.K., Gil, G.C., Kim, M., Kim, H.J., Cho, B.W., Kim, B.H., Continuous determination of biochemical oxygen demand using microbial fuel cell type biosensor. *Biosensors & Bioelectron.*, 19, 607–613, (2004).

Chang, I.S., Moon, H., Jang, J.K., Kim, B.H., Improvement of a microbial fuel cell performance as a BOD sensor using respiratory inhibitors, *Biosensors & Bioelectron.*, 20, 1856–1859, (2005).

Chao, H.P., Lee, W.C., A bioelectrode for penicillin detection based on gluten-membrane-entrapped microbial cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 32, 9–14, (2000).

Chee, G.J., Nomura, Y., Ikebukuro, K., Karube, I., Development of photocatalytic biosensor for the evaluation of biochemical oxygen demand, *Biosens. Bioelectron.*, 21, 67–73, (2005).

Chee, G.J., Nomura, Y., Ikebukuro, K., Karube, I., Optical fiber biosensor for the determination of low biochemical oxygen demand. *Biosens. Bioelectron.*, 15, 371–376, (2000).

Chee, G.J., Nomura, Y., Karube, I., Biosensor for the estimation of low biochemical oxygen demand, *Anal. Chim. Acta.*, 379, 185–191, (1999).

Chen, D., Cao, Y., Liu, B., Kong, J., A BOD Biosensor based on a microorganism immobilized on an Al₂O₃ sol–gel matrix. *Anal. Bioanal. Chem.*, 372, 737–739, (2002).

Chen, H., Ye, T., Qiu, B., Chen, G., Chen, X., A novel approach based on ferricyanide-mediator immobilized in an ion-exchangeable biosensing film for the determination of biochemical oxygen demand. *Anal. Chim. Acta.*, 612, 75–82, (2008).

Chen, Z., Xi, F., Yang, S., Wu Qi., Lin, X., Development of a bienzyme system based on sugar–lectin biospecific interactions for amperometric determination of phenols and aromatic amines. *Sensor. Actuat. B.*, 130 (2), 900–907, 2008.

Chiyui, C., Lehmann, M., Chan, K., Chan, Puiyee C.C., Gruendig, B., Kunze, G., Renneberg, R., Designing an amperometric thick-film microbial BOD sensor. *Biosens. & Bioelectron.* 15, 343–353, (2000).

Christie, I.M., Vadgama P., Lloyd, S., Modification of electrode surfaces with oxidised phenols to confer selectivity to amperometric biosensors for glucose determination. *Anal. Chim. Acta.*, 274, 191–199, (1993).

Dai, Y. J., Lin, L., Li, P.W., Chen X., Wang, X.R., Wong, K.Y., Comparison of BOD Optical Fiber Biosensors Based on Different Microorganisms Immobilized in Ormosil Matrixes. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 84 (8), 607–617, (2004).

Danielsson, B., Mosbach, K., Biosensors: Fundamentals and Applications, Ed. A. P. F. Turner and G. S. Wilson, Oxford University Press, New York, chap. 29, (1987).

Diaz, A.F., Bargon, J., Handbook of Conducting Polymers, ed. Skotheim, T.A., Vol. 1, Marcel Dekker, New York, 81, (1986).

Elasri, M.O., Miller, R.V., Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2025–2031, (1999).

ElKaoutit, M., Rodriguez, I.N., Temsamani, K.R., Hernandez-Artiga, M.P., Milla, D.B., Hidalgo, J.L., A comparison of three amperometric phenoloxidase–

sonogel–carbon based biosensors for determination of polyphenols in beers, *Food Chem.*, 110 (4), 1019–1024, (2008).

Elme, A.R., Hammond, K., Sherrington, D.C., Porous materials and its preparation, European Patent 0 289 238 (1988).

Emr, S.A.; Yacynych, A.M., Use of polymer films in amperometric biosensors, *Electroanal.*, 7, 913–923, (1995).

Engasser, J.M., Horvath, C., Applied Biochemistry and Bioengineering, Vol. 1, Immobilised Enzyme Principles, Academic Press, New York, (1976).

Erhan, E., Yer, E., Akay, G., Keskinler, B., Keskinler, D., Phenol degradation in a fixed-bed bioreactor using micro-cellular polymer-immobilized *Pseudomonas syringae*, *J. Chem. Technol. Biotech.*, 79, 195–206 (2004).

Fortier, G., Brassard E., Belanger D., Optimization of a polypyrrole glucose oxidase biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, 5, 473–490 (1990).

Gaberlein, S., Spener, F., Zaborosch, C., Microbial and cytoplasmic membrane-based potentiometric biosensors for direct determination of organophosphorus insecticides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 652–658 (2000).

Gab-Joo, C., Nomura, Y., Ikebukuro, K., Karube, I., Optical fiber biosensor for the determination of low biochemical oxygen demand. *Biosens. Bioelectron.* 15, 371–376 (2000).

Gab-Joo, C., Nomura, Y., Karube, I., Biosensor for the estimation of low biochemical oxygen demand. *Anal. Chim. Acta.*, 379, 185–191 (1999).

Galindo, E., Bautisa, D., Garcia, J.L., Quintero, R., Microbial sensor for penicillins using a recombinant strain of *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 642–646 (1990).

Gründler P, Chemical Sensors: An Introduction for Scientists and Engineers (Springer-Verlag Berlin Heidelberg) (2007).

Han, T.S., Kim, Y.C., Sasaki, S., Yano, K., Ikebukuro, K., Kitayama, A., Nagamune, T., Karube, I., Microbial sensor for trichloroethylene determination. *Anal. Chim. Acta.*, 431, 225–230 (2001).

Han, T.S., Sasaki, S., Yano, K., Ikebukuro, K., Kitayama, A., Nagamune, T., Karube, I., Flow injection microbial trichloroethylene sensor. *Talanta*, 57, 271–276 (2002).

Heim S, Schnieder I, Binz D, Vogel A, Bilitewski U, Development of an automated microbial sensor system. *Biosens. Bioelectron.* 14, 187–193 (1999).

Hikuma, M., Suzuki, H., Yasuda, T., Karube, I., Suzuki, S., Amperometric estimation of BOD by using living immobilized yeast. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol* 8, 289–297 (1979).

Horsburgh, A.M., Mardlin, D.P., Turner, N.L., Henkler, R., Strachan, N., Glover, L.A., Paton, G.I., Killham, K., On-line microbial biosensing and fingerprinting of water pollutants. *Biosens. Bioelectron.*, 17, 495–501 (2002).

Hubaux, A., Vos, G., Decision and detection limits for calibration curves. *Anal. Chem.*, 42, 849–855, (1970).

Hyun, C.K., Tamiya, E., Takeuchi, T., Karube, I., A Novel BOD sensor based on bacterial luminescence. *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 1107–1111 (1993).

Ikebukuro, K., Honda, K.M., Nakanishi, K., Nomura, Y., Masuda, Y., Yokoyama, K., Yamauchi, Y., Karube, I., Flow-type cyanide sensor using an immobilized microorganism. *Electroanal.*, 8, 876–879 (1996).

Ikeda, T., Kato, K., Maeda, M., Tatsumi, H., Kano, K., Matsushita, K., Electrocatalytic properties of *Acetobacter acetii* cells immobilized on electrodes for

the quinone mediated oxidation of ethanol. *J. Electroanal. Chem.*, 430, 197–204 (1997).

IUPAC, 'Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-II,' *Spectrochim.Acta*, Part B, 33, 242 (1978).

Jameison, F., Sanchez, R.I., Dong, L., Leland, J.K., Yost D., Martin. M.T., Electrochemiluminescence-based quantitation of classical clinical chemistry analytes *Anal. Chem.*, 68, 1298–1302 (1996).

Jia, F., Shan, C., Li, F., Niu, L., Carbon nanotube/gold nanoparticles/polyethylenimine-functionalized ionic liquid thin film composites for glucose biosensing. *Biosens. Bioelectron.*, 24 (4), 945–950 (2008).

Jia, J., Tang, M., Chen, X., Qi, L., Dong, S., Co-immobilized microbial biosensor for BOD estimation based on sol-gel derived composite material. *Biosens. Bioelectron.*, 18, 1023–1029 (2003).

Joyner, D.C., Lindow, S.E., Heterogeneity of iron bioavailability on plants assessed with a whole-cell GFP-based bacterial biosensor. *Microbiology*, 146, 2435–2445 (2000).

Karube, I., Matsunaga, T., Mitsuda, S., Suzuki, S., A microbial electrode BOD sensors. *Biotechnol. Bioeng.*, 19 (10), 1535–1547 (1977).

Karube, I., Matsunaga, T., Tsuru, S., Suzuki, S., Biochemical fuel cell utilizing immobilized cells of *Clostridium butyricum*. *Biosens. Bioelectron.*, 19, 1727–1733 (1977a).

Karube, I., Yokoyama K., Sode, K., Tamiya, E., Microbial BOD sensor utilizing thermophilic bacteria. *Anal. Lett.*, 22, 791–801 (1989).

Kim, M., Kwon, H., Biochemical oxygen demand sensor using *Serratia marcescens*, *Biosens. Bioelectron.*, 14, 1–7 (1999).

Kim, M.N., Park, K.H., *Klebsiella* BOD sensor, *Sens. Acutators B* 80, 9–14 (2001).

Kochana, J., Nowak, P., Jarosz-Wilkolazka, A., Bieron, M., Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. *Microchemical Journal*, 89 (2), 171–174 (2008).

Konig, A., Reul, T., Harmeling, C., Spener, F., Knoll, M., Zaborosch, C., Multimicrobial sensor using microstructured three-dimensional electrodes based on silicon technology. *Anal. Chem.*, 72, 2022–2028 (2000).

Kulys, J., Kadziauskiene, K. Yeast BOD sensor. *Biotechnol. Bioeng.*, 22 (1), 221–226 (1980).

Kwok, N.Y., Dong, S., Lo, W., Wong, K.Y., An optical biosensor for multi-sample determination of biochemical oxygen demand (BOD), *Sens. Acutators B* 110 (2), 289–298 (2005).

Lambrechts, M., Sansen, W., Biosensors: microelectrochemical devices. Bristol, Philadelphia and New York: Institute of Physics Publishing, p. 21–58. (1992).

Lee, J.I., Karube, I., Reactor type sensor for cyanide using an immobilized microorganism. *Electroanal.*, 8, 1117–1120 (1996).

Lehmann, M., Chan, C.Y., Lo, A., Lung, M., Tag, K., Kunze, G., Riedel, K., Gruendig, B., Renneberg, R., Measurement of biodegradable substances using the salt-tolerant yeast *Arxula adenivorans* for a microbial sensor immobilized with poly(carbamoyl) sulfonate (PCS). Part II: application of the novel biosensor to real samples from coastal and island regions. *Biosens Bioelectron.*, 14, 295–302 (1999).

Lehmann, M., Riedel, K., Adler, K., Kunze, G., Amperometric measurement of copper ions with a deputy substrate using a novel *Saccharomyces cerevisiae* sensor. *Biosens. Bioelectron.*, 15, 211–219 (2000).

Lei, Y., Chen W., Mulchandani, A., Microbial biosensors, *Anal. Chim. Acta.*, 568, 200–210 (2006).

Lei, Y., Mulchandani, P., Chen, W., Mulchandani, A., Direct determination of p-nitrophenyl substituent organophosphorus nerve agents using a recombinant pseudomonas putida JS444-modified clark oxygen electrode. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 524–527 (2005).

Lei, Y., Mulchandani, P., Chen, W., Wang, J., A. Mulchandani, *Arthrobacter sp.* JS443-based whole cell amperometric biosensor for p-Nitrophenol. *Eletroanal.*, 16, 2030–2034 (2004).

Lei, Y., Mulchandani, P., Chen, W., Wang, J., Mulchandani, A., A microbial biosensor for p-Nitrophenol using *Arthrobacter Sp.* *Eletroanal.*, 15, 1160–1164 (2003).

Li, F., Tan, T.C., Lee, Y.K., Effects of pre-conditioning and microbial composition on the sensing efficacy of a BOD biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, 9, 197–205 (1994).

Li, X.M, Ruan F.C, Ng W.Y, Wong K.Y., Scanning optical sensor for the measurement of dissolved oxygen and BOD, *Sens. Acutators B* 21, 143–149 (1994).

Li, Y.R., Chu, J., Study of BOD microbial sensors for waste water treatment control, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 28 (29), 855–863 (1991).

Lin, L., Xiao, L.L., Huang, S., Zhao L., Cui, J.S., Wang, X.H., Chen, X., Novel BOD optical fiber biosensor based on co-immobilized microorganisms in ormosils matrix, *Biosens. Bioelectron.*, 21, 1703–1709 (2006).

Liu J., Mattiasson, B., Microbial BOD sensors for wastewater analysis, *Water Res.*, 36, 3786–3802 (2002).

Liu, J., Bjornsson, L., Mattiasson, B., Immobilised activated sludge based biosensor for biochemical oxygen demand measurement, *Biosens. Bioelectron.*, 14, 883–893 (2000).

Liu, J., Olsson, G., Mattiasson, B., Short-term BOD (BOD_{st}) as a parameter for on-line monitoring of biological treatment process Part I. A novel design of BOD biosensor for easy renewal of bio-receptor, *Biosens. Bioelectron.*, 20, 562–570 (2004).

Marty, J.L., Olive, D., Asano, Y., Measurement of BOD: correlation between 5-day BOD and commercial BOD biosensor values, *Environ. Technol.*, 18, 333–337 (1997).

Mascini, M., Memoli, A., Olana, F., Microbial sensor for alcohol, *Enzyme Microb. Tech.*, 11, 297–301 (1989).

Matsubara, Y., Japanese patent: apparatus for determining BOD in wastewaters. Jpn. Kokai Tokkyo Koho Patent written in Japanese with English abstract. No. JP 10002896 (1998).

Mattiasson, B., Larsson, P.O., Mosbach, K., The microbe thermistor. *Nature*, 268 (5620), 519–520 (1977).

Mercier, A., Deleuze, H., Mondain, O., Mondain-Monval, O., Preparation and functionalization of (vinyl) polystyrene polyHIPE. Short routes to binding functional groups through a dimethylene spacer, *Reactive & Functional Polymers*, 46, 67–79, (2000).

Mitsubishi Electric Corp, Japan. Japanese patent: BOD measuring apparatus. Jpn. Kokai Tokyo Koho Patent written in Japanese with English abstract. No. JP 58221158 (1983).

Mocak, J., Bond, A.M., Mitchell, S., Scollary, G., A statistical overview of standard and new procedures for determining the limits of detection and

quantification: Application to voltammetric and stripping techniques. *Pure & Appl. Chern.*, 69 (2), 297–328 (1997).

Mulchandani, A., Chauhan, S., Kaneva, I., Mulchandani, P., Chen, W., A potentiometric microbial biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents. *Electroanal.*, 10, 733–737 (1998a).

Mulchandani, A., Mulchandani, P., Kaneva, I., Chen, W., Biosensor for Direct Determination of Organophosphate Nerve Agents Using Recombinant *Escherichia coli* with Surface-Expressed Organophosphorus Hydrolase. 1. Potentiometric Microbial Electrode, *Anal. Chem.*, 70, 4140–4145 (1998).

Mulchandani, A., Rogers, K.R., Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols, Humana Press, Totowa, NJ (1998).

Mulchandani, P., Carlos, M.H., Lei, Y., Chen, W., Mulchandani, A., Amperometric microbial biosensor for *p*-nitrophenol using *Moraxella* sp. modified carbon paste electrode. *Biosens. Bioelectron.*, 21, 523–527 (2005).

Mulchandani, P., Chen, W., Mulchandani, A., Wang, J., Chen, L., Amperometric microbial biosensor for direct determination of organophosphate pesticides using recombinant microorganism with surface expressed organophosphorus hydrolase. *Biosens. Bioelectron.*, 16, 433–437 (2001).

Mulchandani, P., Lei, Y., Chen, W., Wang, J., Mulchandani, A., Microbial biosensor for *p*-nitrophenol using *Moraxella* sp. *Anal. Chim. Acta.*, 470, 79–86 (2002).

Murakami, Y., Kikuchi, T., Yamamura, A., Sakaguchi, T., Yokoyama, K., Ito, Y., Takiue, M., Uchida, H., Katsube, T., Tamiya, E., An organic pollution sensor based on surface photovoltage. *Sens Actuators B* 53, 163–172 (1998).

Nakanishi, K., Ikebukuro, K., Karube, I., Determination of cyanide using a microbial sensor. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 60, 97–106 (1996).

Nakanishi, K., Muguruma, H., Karube, I., A novel method of immobilizing antibodies on a quartz crystal microbalance using plasma-polymerized films for immunosensors, *Anal. Chem.*, 68 (10), 1695–1700 (1996).

Ohki, A., Shinohara, K., Ito, O., Naka, K., Maeda, S., Sato, T., Akano, H., Kato, N., Kawamura, Y., A BOD sensor using *Klebsiella oxytoca* AS1, *J. Int. Environ. Anal. Chem.*, 56, 261–269 (1994).

Okochi, M., Mima, K., Miyata, M., Shinozaki, Y., Haraguchi, S., Fujisawa, M., Kaneko, M., Masukata, T., Matsunaga, T., Development of an automated water toxicity biosensor using *Thiobacillus ferrooxidans* for monitoring cyanides in natural water for a water filtering plant, *Biotechnol. Bioeng.*, 87, 905–911 (2004).

Patel, H., Li, X., Karan, H.I., Amperometric glucose sensors based on ferrocene containing polymeric electron transfer systems—a preliminary report. *Biosens. Bioelectron.*, 18 (8), 1073–1076 (2003).

Pei, Q., Qian, R., Electrode potentials of electronically conducting polymer polypyrrole, *Electrochim. Acta.*, 37, 1075–1081 (1992).

Pirt, S.J., Principles of microbe, cell cultivation. London: Blackwell Scientific Publications, 199–210 (1975).

Praet, E., Reuter, V., Gaillard, T., Vassel, J.L., Bioreactors and biomembranes for biochemical oxygen demand estimation. *Trends Anal. Chem.* 14, 371–379 (1995).

Preininger, C., Klimant, I., Wolfbeis, O.S., Optical fiber sensor for biological oxygen demand. *Anal. Chem.* 66(11), 1841–1846 (1994).

Qian, Z., Tan, T.C., Response characteristics of a dead-cell BOD sensor. *Water Res.*, 32(3), 801–808 (1998).

Rajasekar, S., Rajasekar, R., Narasimhan, K.C., Acetobacter peroxydans based electrochemical biosensor for hydrogen peroxide. *Bull. Electrochem.*, 16, 25–28 (2000).

Rasmussen, L.D., Sorensen, S.J., Turner, R.R., Barkay, T., Application of a *mer-lux* biosensor for estimating bioavailable mercury in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 639–646 (2000).

Rastogi, S., Kumar, A., Mehra, N.K., Makhijani, S.D., Manoharan, A., Gangal, V., Kumar, R., Development and characterization of a novel immobilized microbial membrane for rapid determination of biochemical oxygen demand load in industrial waste-waters. *Biosens. Bioelectron.*, 18, 23–29 (2003).

Rastogi, S., Rathee, P., Saxena, T.K., Mehra, N.K., Kumar, R., BOD analysis of industrial effluents: 5 days to 5 min. *Curr. Appl. Phys.*, 3, 191–194 (2003).

Reshetilov, A.N., Trotsenko, J.A., Morozova, N.O., Iliasov P.V., Ashin, V.V., Characteristics of Gluconobacter oxydans B-1280 and Pichia methanolica MN4 cell based biosensors for detection of ethanol, *Process Biochem.*, 36, 1015–1020 (2001).

Reynolds, E.R., Yacynych, A.M., Direct sensing platinum ultramicrobiosensors for glucose. *Biosens. Bioelectron.*, 9, 283–293 (1994).

Riedel, K., Application of biosensors to environmental samples. In: Ramsay G, editor. Commercial biosensors: applications to clinical, bioprocess, and environmental samples. New York: Wolpert Polymers, Inc Wiley-Interscience, 267–294 (1998).

Riedel, K., Lange, K.P., Stein, H.J., Kuhn, M., Ott, P., Scheller, F., A microbial sensor for BOD. *Water Res.*, 24(7), 883–887 (1990).

Riedel, K., Lehmann, M., Tag, K., Renneberg, R., Kunze, G., *Arxula adenivorans* based sensor for the estimation of BOD, *Anal. Lett.*, 31, 1–12 (1998).

Riedel, K., Renneberg, R., Kuhn, M., Scheller, F., A fast estimation of biochemical oxygen demand using microbial sensors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 316–318 (1988).

Roda, A., Pasini, P., Mirasoli, M., Guardigli, M., Russo, C., Musiani, M., Baraldini, M., Sensitive determination of urinary mercury (II) by a bioluminescent transgenic bacteria-based biosensor. *Anal. Lett.*, 34, 29–41 (2001).

Rosen, R., Davidov, Y., Larossa, R.A., Belkin, S., Microbial sensors of ultraviolet radiation based on *recA*::*lux* fusions. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 89, 151–160 (2000).

Rotariu, L., Bala, C., Magearu, V., New potentiometric microbial biosensor for ethanol determination in alcoholic beverages. *Anal. Chim. Acta*, 513, 119–123 (2004).

Rotariu, L., Bala, C., Magearu, V., Yeast cells sucrose biosensor based on a potentiometric oxygen electrode. *Anal. Chim. Acta*, 458, 215–222 (2002).

Rotariu, L., Bala, C., New type of ethanol microbial biosensor based on a highly sensitive amperometric oxygen electrode and yeast cells. *Anal. Lett.*, 36, 2459–2471 (2003).

Sakai, Y., Abe, N., Takeuchi, S., Takashashi, F., BOD sensor using magnetic activated sludge. *J. Ferment. Bioeng.*, 80 (3), 300–303 (1995).

Sangeetha, S., Sugandhi, G., Murugesan, M., Madhav, V.M., Berchmans, S., Rajasekar, R., Rajasekar, S., Jeyakumar, D., Rao, G.P., *Torulopsis candida* based sensor for the estimation of biochemical oxygen demand and its evaluation. *Electroanal.*, 8, 698–701 (1996).

Schreiter, P.P.Y., Gillor, O., Post, A., Belkin, S., Schmid, R.D., Bachmann, T.T., Monitoring of phosphorus bioavailability in water by an immobilized luminescent cyanobacterial reporter strain. *Biosens. Bioelectron.*, 16, 811–818 (2001).

Simonian, A.L., Rainina, E.I., Wild, J.R., in: Mulchandani, A., Rogers, K.R. (Eds.), *Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, 237 (1998).

Sohn, M.J., Lee, J.W., Chung, C., Ihn, G.S., Hong, D., Rapid estimation of biochemical oxygen demand using a microbial multi-staged bioreactor. *Anal. Chim. Acta.* 313, 221–228 (1995).

Spanjers, H., Klapwijk, A., Continuous estimation of short term oxygen demand from respiration measurements. *Water Sci. Technol.*, 24 (7), 29–32 (1991).

Spanjers, H., Olsson, G., Klapwijk, A., Determining influent short-term biochemical oxygen demand by combined respirometry and estimation. *Water Sci Technol.*, 28 (11–12), 401–414 (1993).

Spanjers, H., Vanrolleghem, P., Olsson, G., Dold, P., Respirometry in control of the activated sludge process. *Water Sci. Technol.*, 34 (3–4), 117–126 (1996).

Strand, S.E., Carlson, D.A., Rapid BOD measurement for municipal wastewater samples using a biofilm electrode. *J. Water Pollut. Control Fed.* 56, 464–467 (1984).

Su, Y.C., Huang, J.H., Liu, M.L., A new biosensor for rapid BOD estimation by using immobilized growing cell beads. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B* 10 (2), 105–112 (1986).

Subrahmanyam, S., Kodandapani, N., Shanmugam, K., Moovarkumuthalvan, K., Jeyakumar, D., Subramanian, T.V., Development of a sensor for acetic acid based on *Fusarium solani*. *Electroanal.* 13, 1275–1278 (2001).

Tag, K., Kwong, A.W.K., Lehmann, M., Chan, C., Renneberg, R., Riedel, K., Kunze, G., Fast detection of high molecular weight substances in wastewater based on an enzymatic hydrolysis combined with the *Arxula* BOD sensor system, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 75, 1080–1082 (2000).

Tag, K., Lehmann, M., Chan, C., Renneberg, R., Riedel, K., Kunze, G., Measurement of biodegradable substances with a mycelia-sensor based on the salt tolerant yeast *Arxula adeninivorans* LS3. *Sensor Actuat. B* 67, 142–148 (2000a).

Tag, K., Riedel, K., Bauer, H.J., Hanke, G., Baronian, K.H.R., Kunze, G., Amperometric detection of Cu^{2+} by yeast biosensors using flow injection analysis (FIA), *Sensor Actuat. B* 122 (2) 403–409 (2007).

Tan, T.C., Li, F., Neoh, K.G., Lee, Y.K., Microbial membrane-modified dissolved oxygen probe for rapid biochemical oxygen demand measurement, *Sensor Actuat. B* 8 167–172 (1992).

Tan, T.C., Li, F., Neoh, K.G., Measurement of BOD by initial rate of response of a microbial sensor. *Sensor Actuat. B* 10 137–142 (1993).

Tan, T.C., Lim, E.W.C., Thermally killed cells of complex microbial culture for biosensor measurement of BOD of wastewater. *Sensor Actuat. B* 107 546–551 (2005).

Tan, T.C., Qian, Z.R. Dead *Bacillus subtilis* cells for sensing biochemical oxygen demand of waters and waste water. *Sens. Acutators B* 40, 65–70 (1997).

Tan, T.C., Wu, C., BOD sensors using multi-species living or thermally killed cells of a BODSEED microbial culture, *Sensor Actuat. B* 54 252–260 (1999).

Taranova, L.A., Semenchuk, I., Manolov, T., Iliasov, P., Reshetilov, A., Bacteria-degraders as the base of an amperometric biosensor for detection of anionic surfactants. *Biosens. Bioelectron.* 17, 635–640 (2002).

Tauber, M., Rosen, R., Belkin, S., Whole-cell biodetection of halogenated organic acids. *Talanta* 55, 959–964 (2001).

Tibazarwa, C., Corbisier, P., Mench, M., Bossus, A., Solda, P., Mergeay, M., Wyns, L., Van Der Lelie, D., A microbial biosensor to predict bioavailable nickel in soil and its transfer to plants. *Environ. Pollut.*, 113, 19–26 (2001).

Tiensing, T., Strachan, N., Paton, G.I., Evaluation of interactive toxicity of chlorophenols in water and soil using *lux*-marked biosensors. *J. Environ. Monitor.*, 4, 482–489 (2002).

Timur, S., Seta, L.D., Pazarlıoğlu, N., Pilloton, R., Telefoncu, A., Screen printed graphite biosensors based on bacterial cells. *Process Biochem.*, 39, 1325–1329 (2004).

Tkac, J., Gemeiner, P., Svitel, J., Benikovsky, T., Sturdik, E., Vala, V., Petrus, L., Hrabarova, E., Determination of total sugars in lignocellulose hydrolysate by a mediated *Gluconobacter oxydans* biosensor. *Anal. Chim. Acta*, 420, 1–7 (2000).

Tkac, J., Vostiar, I., Gorton, L., Gemeiner, P., Sturdik, E., Improved selectivity of microbial biosensor using membrane coating. Application to the analysis of ethanol during fermentation. *Biosens. Bioelectron.*, 18, 1125–1134 (2003).

Tom Petersen, A., Hosbond, C., Nybroe, O., Identification of copper-induced genes in *Pseudomonas fluorescens* and use of a reporter strain to monitor bioavailable copper in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 38, 59–67 (2001).

Tran, M.C., Biosensors, Chapman and Hall and Masson, Paris (1993).

Trosok, S.P., Driscoll, B.T., Luong, J.H.T., Mediated microbial biosensor using a novel yeast strain for wastewater BOD measurement. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 550–554 (2001).

Turner, A.P.F., Karube, I., Wilson G.S. (Eds.), Biosensors: Fundamentals and Applications, Mir Publishers, Moscow (1992).

Vaiopoulou, E., Melidis, P., Kampragou, E., Aivasidis, A., On-line load monitoring of wastewaters with a respirographic microbial sensor. *Biosens. Bioelectron.*, 21 (2), 365–371 (2005).

Verma, N., Singh, M., A disposable microbial based biosensor for quality control in milk. *Biosens. Bioelectron.*, 18, 1219–1224 (2003).

Vogel, A., Binz, D., German patent: method and apparatus for determination of BOD of wastewaters. Ger. Offen. Patent written in German with English abstract. No. DE19547657 (1997).

Wang, J., Chen, Q., Enzyme microelectrode array strips for glucose and lactate, *Anal. Chem.*, 66, 1007–1011 (1994).

Wells, M., Gosch, M., Rigler, R., Harms, H., Lasser, T., van de Meer, J.R., Ultrasensitive reporter protein detection in genetically engineered bacteria. *Anal. Chem.*, 77, 2683–2689 (2005).

Werlen, C., Jaspers, M.C.M., Van de Meer, J.R., Measurement of biologically available naphthalene in gas and aqueous phases by use of a *pseudomonas putida* biosensor. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 43–51 (2004).

Witkowski, M., Freund, S. and Brajter-Toth A., Effect of Electrode Substrate on the Morphology and Selectivity of Overoxidized Polypyrrole Films, *Anal. Chem.*, 63 (6), 622–626 (1991).

Wu, L., Lei, J., Zhang, X., Ju H., Biofunctional nanocomposite of carbon nanofiber with water-soluble porphyrin for highly sensitive ethanol biosensing. *Biosens. Bioelectron.*, 24 (4), 644-649. 2008.

Yang, Z., Sasaki, S., Karube, I., Suzuki, H., Fabrication of oxygen electrode arrays and their incorporation into electrodes for measuring biochemical oxygen demand, *Anal. Chim. Acta*, 357, 41–49 (1997).

Yang, Z., Suzuki, H., Sasaki, S., Karube, I., Disposable sensor for biochemical oxygen demand. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 46 (1), 10–14 (1996).

Yang, Z., Suzuki, H., Sasaki, S., McNiven, S., Karube, I., Comparison of the dynamic transient and steady-state measuring methods in a batch type BOD sensing system, *Sensors Actuat. B* 45, 217–222 (1997).

Yoshida, N., Hoashi, J., Morita, T., McNiven, S.J., Nakanura, H., Karube, I., Improvement of a mediator-type biochemical oxygen demand sensor for on-site measurement. *J. Biotechnol.*, 88, 269–275 (2001).

Yoshida, N., McNiven, S.J., Yoshida, A., Morita, T., Nakamura, H., Karube, I., A compact optical system for multi-determination of biochemical oxygen demand using disposable strips. *Field Anal. Chem. Technol.*, 5, 222–227 (2001a).

Yoshida, N., Yano, K., Morita, T., McNiven, S.J., Nakanura, H., Karube, I., A mediator-type biosensor as a new approach to biochemical oxygen demand estimation. *Analyst*, 125, 2280–2284 (2000).

ÖZGEÇMİŞ

Serdar KARA 1977 yılında Gebze’de doğdu. İlköğretimini Tuzla İlkokulu’nda ortaokul ve liseyi Kadıköy Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 1996 yılında Uludağ Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü’nde başladığı üniversite eğitimini 2000 yılında Bölüm 3. olarak tamamladı. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çevre Mühendisliği Bölümü’nde 2000 yılında başladığı Yüksek Lisans eğitimini 2003 yılında tamamlamış ve aynı yıl Çevre Mühendisliği Bölümü’nde Doktora eğitimine başlamıştır. 2000 senesinde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladığı GYTE Çevre Mühendisliği Bölümü’nde halen görevine devam etmektedir. Serdar Kara evli ve 2 çocuk babasıdır.