

Katalaz Temelli PANI Biyosensörü ile Deltametrinin Belirlenmesi

Hatice PALÜZAR*¹, Hakkı Mevlüt ÖZCAN²

¹Trakya Üniversitesi, Arda Meslek Yüksek Okulu, Kimya ve Kimyasal İşleme Bölümü, 22030, Edirne

²Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 22030, Edirne

(Alınış / Received: 12.08.2016, Kabul / Accepted: 07.02.2017, Online Yayınlanma / Published Online: 23.02.2017)

Anahtar Kelimeler

Deltametrin,
Pestisit,
Katalaz,
Biyosensör

Özet: Pestisitler, tarım alanı başta olmak üzere ürünlerde istenmeyen organizmaların yok edilmesinde yüzyıllardan beri kullanılan kimyasallardır. Özellikle tarım sektöründeki kullanım artışından dolayı, pestisitler en önemli çevresel kirleticiler arasında yer almaktadır. Pestisitlerin dünyada yaygınlaşan kullanımları, bu maddelerin çevresel analizlerine gösterilen ilgiyi arttırmaktadır. Pestisit analizleri genellikle GC ve HPLC gibi yöntemler ile gerçekleştirilmektedir. Ancak bu metodlar genellikle bir takım ön işlemleri gerektirmektedir ve yerinde analizler için kullanımları uygun değildir. Enzim inhibisyonlarını temel alan biyosensör sistemleri ise bu amaca yönelik oldukça kullanışlı sistemlerdir. Bu nedenle bu çalışmada polianilin (PANI) iletken polimer kullanılarak deltametrin tayini için katalaz (CAT) inhibisyonu esaslı bir biyosensör geliştirildi. Geliştirilen biyosensörün optimizasyonu ve karakterizasyonuna ilişkin parametreler incelenerek, deltametrin varlığında lineer inhibisyon aralığı belirlendi. Deltametrin için biyosensörün standart sapma ve varyasyon katsayıları sırasıyla $\pm 0,0353$ ve % 2,33 olarak hesaplandı. Geliştirilen biyosensörün deltametrin tayin sınırı 0,5-2,5 μM olarak belirlendi. Çalışmanın son kısmında, CAT temelli PANI biyosensörü ile atık su örneklerinde deltametrin tayini gerçekleştirilerek, elde edilen sonuçlar spektrofotometre ile elde edilen verilerle kıyaslandı.

Catalase Immobilized PANI Biosensor for Detetion of Deltamethrine

Keywords

Deltamethrine,
Pesticide,
Catalase,
Biosensor

Abstract: Pesticides are chemicals that have been used for centuries in the destruction of unwanted organisms in products, especially in agriculture. Pesticides are among the most important environmental pollutants, especially due to the increased use in the agricultural sector. The widespread use of pesticides in the world, increases the interest for environmental analysis of these substances. Pesticide analyzes are usually carried out by methods such as GC and HPLC. However, these methods often require some pre-treatments and are not suitable for on-site analysis. Biosensor systems based on enzyme inhibition are quite useful systems for this purpose. For this reason, a biosensor based on catalase (CAT) inhibition was developed for deltamethrin using polyaniline (PANI) conductive polymer. By examining the parameters for the optimization and characterization of the developed biosensor, the linear inhibition interval in the presence of deltamethrin was determined. The standard deviation and variation coefficients of the biosensor were calculated as ± 0.0353 and 2.33%, respectively, for deltamethrin. Detection limit of deltamethrin in the developed biosensor was determined as 0.5-2.5 μM . In the last part of the study, the results obtained for determination of deltamethrine in waste water samples by using CAT-PANI biosensor were compared with spectrophotometer results.

1. Giriş

Pestisitler, zararlı organizmaları engellemek, kontrol altına almak ya da zararlarını azaltmak için kullanılan kimyasallardır. Pestisit deyimi, insektisit (böcek öldürücü), herbisit (yabani ot öldürücü), fungusit (küf

öldürücü), rodentisit (kemirgen öldürücü) vb. şeklinde sınıflandırılan kimyasal maddelerin tümünü kapsamaktadır [1]. Pestisitlerin çoğu hedef organizmaya spesifik etkinlik gösteremedikleri için hedef organizma dışındaki organizmalarda da çeşitli hastalıklara yol açar, hatta öldürücü olabilirler.

Birçok pestisit insanlar için de zararlıdır. İnsanların pestisit kalıntıları bulduran gıdaları tüketmesi yaygın hastalıklara ve rahatsızlıklara sebep olur. Pestisitlerin ve etken maddelerinin akut toksik etkileri vardır. Gıdalardaki pestisit kalıntılarının uzun süre alınmasıyla uzun vadede akciğer hastalıkları, kanser, beyinde ve periferik sinir sisteminde harabiyet, karaciğer, kalp, endokrin sistemi, üreme sistemi ve böbrek hastalıkları oluşmaktadır. Bunların yanı sıra teratojenik, mutajenik, hematolojik, metabolik ve alerjik etkileri olan pestisitler de bulunmaktadır. Pestisitlerin insanlarda neden oldukları bu etkilerin yanı sıra hayvanlar üzerinde de olumsuz etkileri mevcuttur. Örneğin kümes hayvanları ve kuşlarda yumurta kabuklarının incelmeye neden olduğu ayrıca doğada kuşların üreme ve çoğalmalarını engellediği bilinmektedir. Pestisitlerin bu olumsuz etkileri kimyasal yapı, uygulama ve kullanma sıklığı gibi faktörlere bağlıdır [2,3].

Pestisit kalıntılarının en önemli kaynağı gıdalardır. Bu nedenle 1960 yılında FAO ve WHO tarafından "pestisit kalıntıları kodex komitesi" kurulmuştur. Bu komitenin çalışmaları sonucunda, konuyla ilgili tanımlamalar yapılmış ve bilimsel araştırma verilerine dayanarak gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı değerleri (MRL) saptanmıştır [4]. MRL değeri, her bir pestisit için gıdalarla birlikte alınabilecek sağlık açısından risk taşımayan maksimum pestisit miktarını belirtmek için kullanılır. Dolayısıyla, bu değer üzerindeki pestisit kalıntıları içeren gıdalar insanlar ve hayvanlar için risk teşkil eder [5].

Pestisit analizleri genellikle gaz kromatografisi (GC) ve yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) gibi yöntemler ile gerçekleştirilmektedir. Ancak bu yöntemler genellikle bir takım ön işlemleri gerektirmektedir ve yerinde analizler için kullanımları uygun değildir. Biyosensörler kolay hazırlanması, düşük maliyetli olması ve yerinde analize imkan vermesi nedeniyle çevre kirleticilerin analizinde GC, HPLC ve LC/MS/MS gibi klasik metotlara alternatiflerdir. Özellikle enzim inhibisyonlarını temel alan biyosensör sistemleri bu amaca yönelik oldukça kullanışlı, ucuz, çabuk ve pratik sistemlerdir (6,7,8,9,10,11,12).

Deltametrin piretroit grubu bir insektisitir ve Trakya Bölgesinde tarımsal mücadelede yaygın olarak kullanılmaktadır. Diğer insektisit türlerinde olduğu gibi hedef organizmaların yanı sıra hedef olmayan canlılarda da toksik etkileri saptanmıştır (13). Ancak piretroit grubu bir pestisit olan deltametrin'in zararlı etkileri ve yarılanma süreleri ele alındığında organoklor, organofosfat ve karbamat sınıfı pestisitlere göre daha az toksik olması, uzun yıllar yasaklanmadan kullanılabilirliği olduğunu düşündürmektedir.

Bu amaç doğrultusunda, bu çalışmada PANI iletken polimer kullanılarak deltametrin tayini için CAT inhibisyonu esaslı bir biyosensör geliştirildi.

2. Materyal ve Metot

Deltametrin tayini için CAT inhibisyonu esaslı biyosensör geliştirmek amacıyla yaptığımız denemelerde kullanılan CAT (sığır karaciğerinden, liyofilize toz, $\geq 10,000$ ünite/mg protein), H₂O₂, anilin, glutaraldehit (GLT) (%25), deltametrin ve diğer tüm kimyasallar Sigma-Aldrich'ten temin edildi. Çalışmalar için Palm Sens Elektrokimyasal Biyosensör Arayüzü (Hollanda), CHI 112 Platin (Pt) Çalışma Elektrodu (A.B.D), CHI 115 Pt Tel Yardımcı Elektrot (A.B.D) ve CHI 111 Ag/AgCl Referans Elektrot (A.B.D) kullanıldı. Kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik safliktadır.

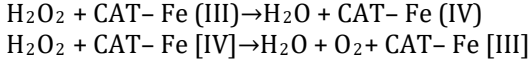
2.1. Biyosensörün hazırlanması

Biyoaktif tabakayı hazırlamadan önce, Pt elektrot yüzeyi, mikrofiber bez üzerinde gamma alümina tozu üzerine birkaç damla bidistile su damlatılıp, elektrot yüzeyinin bu bulamaç üzerinde gezdirilmesi ile mekanik olarak temizlendi. Pt elektrot bidistile suyla durulandıktan sonra adsorblanmış partikülleri uzaklaştırmak için sırasıyla onar dakika etanol ve bidistile su içerisinde sonikatörde bekletildi. Pt elektrodun yüzeyinin elektrokimyasal olarak temizlenmesi için 0,1 N HCl çözeltisi içerisinde +1,0V- -1,0V potansiyel aralığında 15 döngüsel voltammogram alındı.

Pt elektrodun anilin ile elektropolimerizasyonu için, 3'lü elektrot sistemi (Pt çalışma elektrodu, Ag/AgCl referans elektrodu, Pt yardımcı elektrot) kullanıldı. Anilin polimerizasyonu için Pt çalışma elektrodu 0,2 M anilin çözeltisine (0,1 M HCl içerisinde) daldırılarak -0,2 - +0,9 V potansiyel aralığında tarama hızı 0,05 Vs⁻¹ olacak şekilde 20 tarama yapıldı. Elektropolimerizasyonun tamamlanmasının ardından, PANI kaplanmış Pt elektrot (PtE-PANI) destile suyla yıkanarak bağlanmamış moleküller yüzeyden uzaklaştırıldı. Çalışma elektrodu yüzeyi bu aşamada PANI nedeniyle yeşil renk aldı. Sonra, PtE-PANI % 2,5'lik GLT (pH: 7,0, fosfat tamponunda) çözeltisinde oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Bekleme süresinin ardından elektrot distile suyla yıkandı ve azot gazı geçirilerek kurutuldu. Son olarak PANI-GLT kaplı çalışma elektroduna enzim immobilizasyonu için elektrot 20 mg/mL CAT içeren pH: 7, 50 mM fosfat tamponunda hazırlanmış 3 mL enzim çözeltisine daldırıldı ve 30 dk herhangi bir karıştırma uygulanmadan bekletildi. Bu sürenin sonunda elektrot yüzeyine bağlanmayan enzim moleküllerinin uzaklaştırılması amacıyla saf su ile yıkandı ve kullanım zamanına kadar +4 C da bekletildi.

2.2. CAT biyosensörünün çalışma ilkesi

CAT, H₂O₂'i su ve oksijene çok hızlı bir şekilde parçalayan oldukça aktif bir enzimdir.



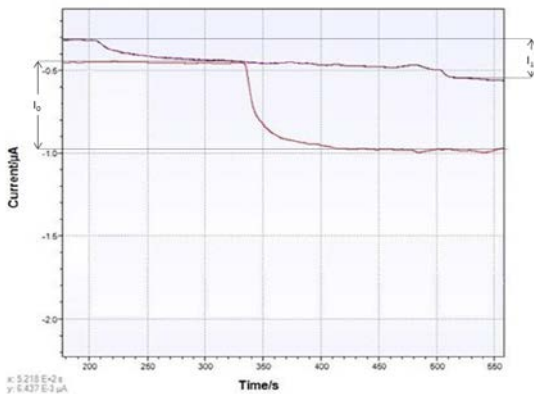
H₂O₂ tayini CAT enzimi varlığında oluşan enzimatik reaksiyon süresince oluşan O₂ molekülünün ölçülmesi esasına dayanmaktadır [5].

Amperometrik ölçümler Palm Sens Elektrokimyasal Biyosensör Arayüzü, modifiye edilmiş Pt Çalışma Elektrodu, Pt Karşıt Elektrot ve Ag/AgCl Referans Elektrot ile gerçekleştirildi. Ölçümler 30 °C'de manyetik karıştırıcıyla elektrokimyasal termostatik hücrede gerçekleştirildi. H₂O₂ stok çözeltisinden seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda kullanılarak ölçümler alındı. Ölçümler 15 mL 0,1 M pH:7,0 fosfat tamponu içerisinde gerçekleştirildi. H₂O₂'in bilinen konsantrasyonu substrat olarak eklendikten sonra akım değişimi sabitlenene kadar beklenip bu değer kaydedildi (I₀).

Son yıllarda pestisitlerin CAT enzimini inhibe ettiğini gösteren birçok çalışma rapor edilmiştir [6, 7, 8, 9]. Bu çalışmada da Deltametrinin CAT biyosensörünün aktivitesine etkisinin incelenmesi için 0.5-2.5 µM konsantrasyon aralığında olacak şekilde deltametrin reaksiyon hücresine ilave edildi ve CAT biyosensörü ölçüm almadan önce inhibisyon için bu ortamda 10 dk bekletildi. Daha sonra ortama farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ eklenerek ölçümler alındı (I₁). Substrat ilavesi ile elde edilen biyosensör cevabı (I₀) ve pestisit ilavesi ile elde edilen biyosensör cevabı (I₁) Şekil 1'de gösterildi. Elde edilen verilerden yararlanarak deltametrinin CAT biyosensörünü hangi ölçüde inhibe ettiği hesaplandı (% I) [14, 15].

$$\%I = \frac{I_0 - I_1}{I_0} * 100 \quad (1)$$

Bir ölçümden diğerine geçerken çalışma elektrodu 1 mM 2-Piridin aldoksim metil iyodür (2-PAM) çözeltisi içerisinde 15 dk bekletildi.



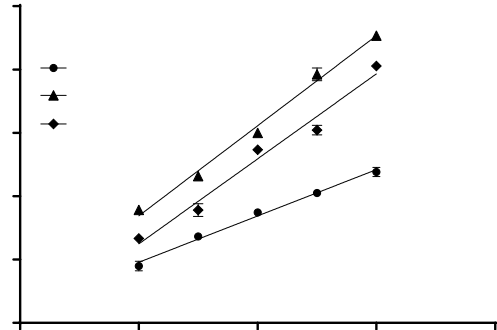
Şekil 1. Biyosensörün ölçüm grafiği. I₀: substrat ilavesi ile elde edilen biyosensör cevabı, I₁: pestisit ilavesi ile elde edilen biyosensör cevabı.

3. Bulgular

3.1. Biyoaktif tabakanın optimizasyonu

Biyoaktif tabakanın optimizasyonu çalışmalarında, enzim miktarı, anilin konsantrasyonu, GLT yüzdesi ve polimerizasyon için döngü sayısının optimum değerleri belirlendi.

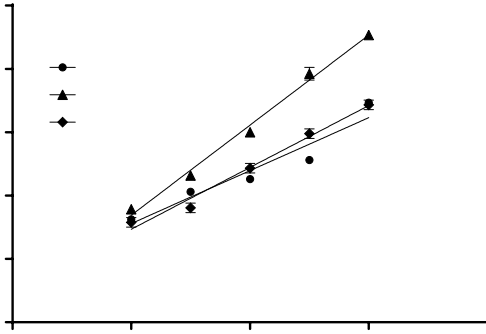
Enzim miktarının optimizasyonu için denemeler, 30°C'de ve fosfat tamponunda (pH:7,0; 50mM) gerçekleştirildi. Elektropolimerizasyon döngü sayısı (20 döngü) , GLT miktarı (% 2,5) ve anilin miktarı (0,2 M) sabit tutularak enzim miktarları 10; 20 ve 30mg/mL olarak değiştirildi. Yapılan denemelerde 50; 75; 100; 125 ve 150 µM lık H₂O₂ derişimleri için ölçümler alındı ve sonuçlar Şekil 2'de verildi. Elde edilen verilere göre, 30 mg/mL enzim kullanılması durumunda elektrot yüzeyindeki enzim tabakasının kalınlığı artmış ve difüzyon hızı düşmüştür. Bu yüzden 30mg/mL enzim kullanıldığında biyosensör cevaplarında düşüş gözlemlendi. 10mg/mL enzim kullanılması durumunda ise; yeteri kadar enzim bağlanamadığı için diğerlerine göre düşük biyosensör cevabı gözlemlendi. 20mg/mL ve 30mg/mL enzim kullanıldığında regresyon katsayıları yüksek grafikler elde edildi. 20 mg/mL enzim kullanılması durumunda elde edilen grafiğin biyosensör cevaplarının ve regresyon katsayısının daha yüksek olması nedeniyle en uygun enzim miktarı 20mg/mL olarak seçildi.



Şekil 2. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi. (●) 10 mg/mL enzim; (▲) 20 mg/mL enzim; (◆) 30 mg/mL enzim kullanılarak hazırlanan biyosensör.

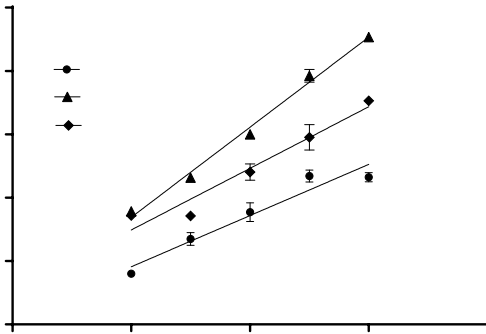
Anilin konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisini incelemek için elektropolimerizasyon döngü sayısı (20 döngü) , GLT miktarı (% 2,5) ve enzim konsantrasyonu (20 mg/mL) sabit tutularak 0,1 M; 0,2 M ve 0,3 M anilin kullanılmasıyla üç farklı biyosensör hazırlandı. Denemeler, 30°C'de ve fosfat tamponunda (pH:7,0; 50mM) gerçekleştirildi. Sonuçlar Şekil 3'de verildi.

Şekil 3'deki grafikten görüldüğü üzere, 0,1 M Anilin kullanılması durumunda yeterli polimer oluşumu sağlanmadığı için enzimin immobilizasyon yüzdesi düşmüş ve bu nedenle biyosensör cevabı düşük bulunmuş ve regresyon katsayısı düşük olan bir grafik elde edilmiştir. 0,3 M Anilin kullanılması durumunda ise anilinin oluşturduğu polimerdeki amino gruplarının fazla olması sonucunda bu gruplar kendi aralarında bağ yapmış ve enzimin bağlanabileceği amino grubu sayısı azalmış bu nedenle regresyon katsayısı yeterince iyi olmayan bir grafik elde edilmiş olabilir. Biyosensör cevaplarının yüksek olması ve doğrusallığın daha yüksek olmasından dolayı en uygun anilin miktarı 0,2 M olarak belirlendi.



Şekil 3. Anilin konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi. (●) 0,1 M Anilin; (▲) 0,2 M Anilin; (◆) 0,3 M Anilin kullanılarak hazırlanan biyosensör.

GLT miktarının optimizasyonu için denemeler, 30°C'de ve potasyum fosfat tamponunda (pH: 7,0; 50mM) gerçekleştirildi. Elektropolimerizasyon döngü sayısı (20 döngü), anilin konsantrasyonu (0,2 M), GLT'de bekletme süresi (30 dk) ve enzim miktarı (20 mg/mL) sabit tutularak GLT miktarları % 1, % 2,5 ve % 5 olarak değiştirildi.



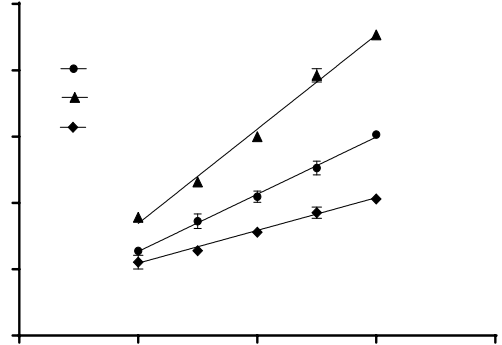
Şekil 4. GLT miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi. (◆) % 1'lik GLT kullanılarak hazırlanan biyosensör, (▲) %2,5'lik GLT kullanılarak hazırlanan biyosensör; (●) % 5'lik GLT kullanılarak hazırlanan biyosensör.

Şekil 4'de görüldüğü üzere, %5'lik GLT kullanıldığında aşırı çapraz bağlanma sonucu GLT in

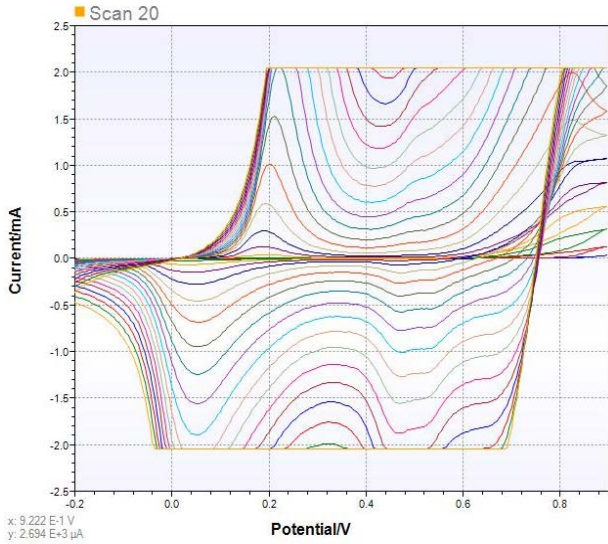
enzim yapısına zarar vermesinden dolayı biyosensör cevapları yeterince iyi olmayan bir grafik elde edilmiştir. % 1 ve %2,5'lik GLT kullanıldığında regresyon katsayıları yüksek olan grafikler elde edildi. %2,5'lik GLT için elde edilen grafiğin biyosensör cevaplarının ve regresyon katsayısının daha yüksek olması nedeniyle %2,5'lik GLT uygun görüldü.

Elektropolimerizasyonun döngü sayısının biyosensör cevabı üzerine etkisini incelemek için denemeler, 30 °C'de fosfat tamponunda (pH:7,0, 50 mM), anilin konsantrasyonu (0,2 M), GLT miktarı (%2,5), GLT'de bekletme süresi (30 dk) ve enzim miktarı (20 mg/mL) sabit tutularak döngü sayıları 10, 20 ve 30 döngü olarak değiştirilerek gerçekleştirildi.

Şekil 5' den görüldüğü üzere, 30 döngü ile gerçekleştirilen elektropolimerizasyon sonucu, regresyon katsayısı ve biyosensör cevapları düşük olan bir grafik elde edildi. 10 döngü ve 20 döngü ile gerçekleştirilen elektropolimerizasyonların ardından elde edilen grafiklerin doğrusallıkları iyi olmasına rağmen, biyosensör cevaplarının yüksek olması sebebiyle 20 döngü ile yapılan elektropolimerizasyon daha uygun görüldü. Şekli 6 da 20 döngüye ait voltogram verildi.



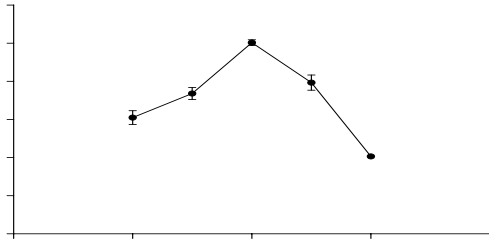
Şekil 5. Elektropolimerizasyon döngü sayısının biyosensör cevabı üzerine etkisi. (●) 10 döngü; (▲) 20 döngü; (◆) 30 döngü.



Şekil 6. Anilin elektropolimerizasyonunun sıklık voltamogramı.

3.2. Çalışma koşullarının optimizasyonu

Enzim veya proteinlerin elektrokatalitik aktiviteleri sıcaklık ve pH değerinden oldukça etkilenmektedir. Bu nedenle çalışma koşullarının optimizasyonunda, sıcaklığın biyosensör cevabı üzerine etkisini incelemek için, hazırlanan biyosensör ile farklı sıcaklık değerlerinde (20, 25, 30, 35 ve 40 °C) ölçümler alındı. Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi için ölçümler 50 mM fosfat tamponunda (pH:7,0) ve -0,3 V sabit potansiyelde, anilin konsantrasyonu 0,2 M, enzim miktarı 20mg/mL, elektropolimerizasyon döngü sayısı 20 ve glutaraldehit yüzdesi %2,5 olarak sabit tutularak 100 µM H₂O₂ varlığında gerçekleştirildi.

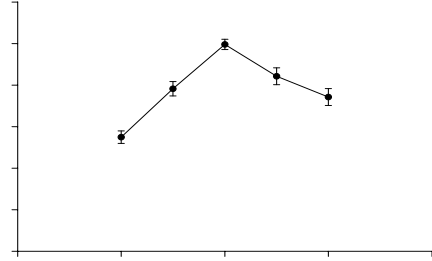


Şekil 7. Biyosensör cevabı üzerine sıcaklığın etkisi.

Şekil 7'de de görüldüğü gibi CAT için optimum sıcaklık 30 °C bulundu. Normalde CAT'ın çalışma aralığı 25-35 °C'dir [16]. Elde edilen sonuç enzimin serbest haldeki çalışma sıcaklığının immobilizasyon yöntemlerinden etkilenmediğinin göstergesidir.

Biyosensör cevabı üzerine pH'nin etkisinin incelenmesi için de farklı pH değerlerinde (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 ve 8) hazırlanan fosfat tamponları (50mM) kullanılarak ölçümler alındı. pH'nin biyosensör cevabı üzerine etkisini incelemek için ölçümler 50 mM fosfat tamponunda (pH:7,0) ve -0,3 V sabit potansiyelde gerçekleştirildi. Anilin konsantrasyonu 0,2 M, Enzim miktarı 20mg/mL, elektropolimerizasyon döngü sayısı 20 ve

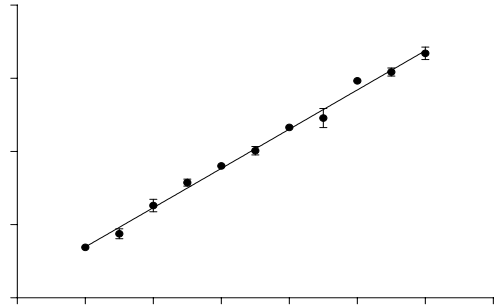
glutaraldehit yüzdesi %2,5 olarak sabit tutularak 100 µM H₂O₂ varlığında gerçekleştirildi. pH'nin biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendiğinde şekil 8'de görüldüğü gibi optimum pH: 7,0 bulundu. Bu sonuç CAT enziminin serbest haldeki optimum pH değeriyle uyumlu olduğundan immobilizasyon yönteminin enzimin optimum pH değerini fazla değiştirmedikinin göstergesidir.



Şekil 8. Biyosensör cevabı üzerine pH'nin etkisi.

3.3. Biyosensörün karakterizasyonu

CAT biyosensörünün çalışma koşullarının optimizasyonundan sonra optimum koşullarda H₂O₂ tayinine ilişkin doğrusal tayin aralığının belirlenmesi amacıyla ölçümler gerçekleştirilerek standart grafik elde edildi. 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 225; 250; 275 ve 300 µM'lık H₂O₂ konsantrasyonları kullanılarak doğrusal ölçüm aralığı saptandı. Sonuçlar Şekil 9'da verildi.



Şekil 9. H₂O₂ için doğrusal tayin aralığı.

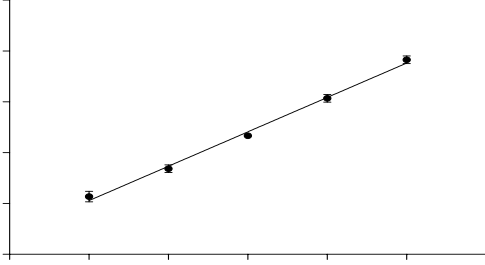
Doğrusal tayin aralığında bulunan 100 µM H₂O₂ için arka arkaya on ölçüm alındı. Ölçümlerden elde edilen sonuçlar kullanılarak biyosensöre ilişkin ortalama değer (\bar{X}), standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayısı (V.K) hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Tablo 1'de verildi.

Tablo1. Biyosensörün tekrarlanabilirliği.

Substrat	(\bar{X}), (µM)	(S.S) (µM)	(V.K) (%)	Doğrusal aralık (µM)	Tayin limiti (µM)
100 µM H ₂ O ₂ (n=10)	92,46	± 2,32	2,51	50-300	25

Geliştirilen biyosensörün optimizasyon çalışmalarından sonra deltametrin'in farklı konsantrasyonlarında (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 ve 2,5 µM)

ölçümler alınarak % inhibisyon değerleri hesaplandı ve deltametrin için doğrusal kalibrasyon grafiği elde edildi. Ölçümler optimum koşullarda hazırlanan biyosensör ile 30°C'de fosfat tamponunda (pH: 7,0; 50 mM) 100 µM H₂O₂ için gerçekleştirildi. Deltametrin için doğrusal kalibrasyon grafiği Şekil 10'da verildi.



Şekil 10. Deltametrin için doğrusal kalibrasyon grafiği. Doğrusal tayin sınırlarının ortasında bulunan 1,5 µM deltametrin ile inhibe edilen CAT biyosensörü kullanılarak, 100 µM H₂O₂ varlığında arka arkaya sekiz ölçüm alındı. Ölçümlerden elde edilen sonuçlar kullanılarak biyosensöre ilişkin ortalama değer (\bar{X}), standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayısı (V.K) hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Tablo 2'de verildi.

Tablo 2. Deltametrin tayini için hazırlanan biyosensörün tekrarlanabilirliği.

Inhibitör	(\bar{X}), (µM)	(S.S) (µM)	(V.K) (%)	Doğrusal aralık (µM)	Tayin limiti (µM)
1,5 µM Deltametrin (n=8)	1,517	±0,0353	2,33	0,5-2,5	0,35

\bar{X} =1,517 µM, standart sapma (S.D.) ± 0,0353, varyasyon katsayısı (C.V.) % 2,33 olarak belirlendi. Varyasyon katsayısının % 5'in altında hesaplanması geliştirilen bu biyosensörün kullanılabilirliğini göstermektedir.

Geliştirilen biyosensör, depo karalılığının incelenmesi için -4 °C'de depolandı. 20 gün boyunca her gün 100 µM H₂O₂ ve 1,5 µM deltametrin varlığında ölçümler gerçekleştirildi. Elde edilen ölçümler sonucunda, 6 gün geçmesine rağmen aktivitede sadece %15,2'lik bir düşüş görülürken 20 günün sonunda aktivitede %58,4'lük bir düşüş kaydedildi.

3.4. Hazırlanan biyosensörle atık su örneklerinde deltametrin tayini

Deltametrin tayini için geliştirilen biyosensörle atık sularında bulunan deltametrinin ölçülmesi amacıyla Meriç nehrinden su numunesi alındı. Standart ekleme metoduyla su numunesinde deltametrin tayini yapıldı [17, 18]. Su numunesine, ilk önce oluşabilecek girişimleri engellemek amacıyla pestisit ekstraksiyonu yapıldı. Pestisitlerin ekstraksiyonu için supelco katı-faz ekstraksiyon aparatı kullanılarak negatif basınç altında pestisitler suda C₁₈'e (octadecylsilica) adsorbe edilerek ayrıldı [19].

Böylece su numunesinde pestisitler dışında inhibisyona sebep olabilecek bir kimyasal bırakılmadı. Geliştirilen biyosensörle su numunesinde arka arkaya 5 ölçüm alındı ve elde edilen değerler Tablo 3'te verildi.

Tablo 3. Atık su örneklerinin analiz sonuçları (n=5)

Eklene Deltametrin (µM)	Biyosensörle ölçülen (µM)	Spektrofotometre ile ölçülen (µM)
1,0	0,987±0,0278	1,012±0,0126
1,5	1,517±0,0353	1,507±0,0246
2,0	2,121±0,0427	2,076±0,0175

4. Tartışma ve Sonuç

Günümüzde pestisit tayini için kullanılan GC, HPLC ve LC/MS/MS gibi yöntemlerin pahalı sistemler olmaları, uzun analiz sürelerine sahip olmaları ve yetmişmiş eleman ihtiyacı göstermeleri nedeniyle, son yıllarda bu amaç için biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi oldukça önem kazanmıştır.

Literatürde pestisit tayini için enzim kaynağı olarak asetil kolinesteraz'ın kullanıldığı biyosensörlere sıkça rastlanmaktadır (6,8,10) ancak bu enzimin pahalı olması nedeniyle alternatif enzim kaynaklarının bulunması önem kazanmıştır. Bu nedenle çalışmamızda pestisit tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesinde alternatif enzim olarak CAT enzimi önerildi. CAT enzimi oldukça hızlı katalitik aktiviteye sahip ve kolay temin edilebilen bir enzimdir. Daha önceki literatür çalışmalarında pestisitlerin CAT aktivitesi üzerine etkileri rapor edilmiştir (20, 21, 22, 23).

Tablo 4. Pestisit tayinine yönelik geliştirilen bazı biyosensörlerin karakteristikleri

Hedef Analit	Sensör tipi	Elektroaktif materyal	Lineer aralık [derişim]	Ref.
Chloropyrifos	Enzim sensörü (Kolin esteraaz)	ZnS NPs	1.5×10 ⁻⁹ - 4×10 ⁻⁸ M	[24]
Paraoxon	Enzim sensörü (Kolin esteraaz)	CoPc-Prussian blue	7.3×10 ⁻⁹ - 1.8×10 ⁻⁸ M	[25]
Dichlorvos	Enzim sensörü (Kolin esteraaz)	CoPc	2×10 ⁻¹⁰ - 10 ⁻⁸ M	[26]
Carbaryl	Enzim sensörü (Kolin esteraaz)	QDs	5×10 ⁻⁹ - 2.5×10 ⁻⁷ M	[27]
Methyl parathion	Enzim sensörü (Hidrolaz)	AuNPs - MWCN-QDs	1.9×10 ⁻⁸ - 7.6×10 ⁻⁷ M	[28]
Paraoxon	Enzim sensörü (Hidrolaz)	SWCNT	5×10 ⁻⁷ - 8.5×10 ⁻⁶ M	[29]
Dichlorvos	Enzim sensörü (Tirozinaz)	1,2-naphthoquinone-4-sulfonate (NQS)	< 8×10 ⁻⁶ M	[30]

Carbofuran	Enzim sensörü (Tirozinaz)	CoPc	2.3×10^{-8} - 4.07×10^{-7} M	[31]
Deltametrin	İmpedimetrik sensör	PAH/PAZO	10^{-10} - 10^{-6} M	[32]
Deltametrin	Affinite sensörü	Fe ₃ O ₄ MNPs	0.01-1 ng/mL	[33]
Deltametrin	Affinite sensörü	CdTe QDs	0.053-46 µg/mL	[34]
Deltametrin	Enzim sensörü (Katalaz)	PANI-GLT	0,5-2,5 x 10 ⁻⁶ M	Bu çalışma

Sonuç olarak, alternatif enzim olarak CAT'in pestisit tayini için kullanılabilirliğinin incelendiği bu çalışmada PANI iletken polimer kullanılarak deltametrin tayini için CAT inhibisyonu esaslı bir biyosensör geliştirildi. Yapılan literatür çalışmaları sonucunda pestisit tayinine yönelik geliştirilen biyosensörlerin karakteristikleri Tablo 4'te rapor edilmiştir. Tablo 4 incelendiğinde, deltametrin tayinine yönelik az sayıda biyosensör çalışmasına rastlanmış olması ve bu çalışmalar arasında enzim temelli bir biyosensörün olmaması yapmış olduğumuz çalışmanın önemini de arttırmaktadır.

Geliştirilen biyosensörün optimizasyonu ve karakterizasyonuna ilişkin parametreler incelendi. Biyoaktif tabakanın optimizasyonu çalışmalarında optimum enzim miktarı, GLT miktarı, anilin miktarı ve döngü sayısı incelendi ve optimum sonuçlar sırasıyla 20mg/mL; % 2,5; 0,2 M ve 20 döngü olarak bulundu. Biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu için optimum sıcaklık ve optimum pH incelendi ve sonuçlar sırasıyla 30 °C ve pH: 7,0 (50 mM, fosfat tamponu) olduğu tespit edildi.

Böylece, deltametrin tayini için CAT inhibisyonu esaslı iyi analitiksel özelliklere sahip, tekrarlanabilir, uygun tayin sınırına sahip ve hızlı sonuç verebilen (30 sn) bir biyosensör geliştirildi. Aynı zamanda hazırlanan biyosensörün H₂O₂ tayini içinde kullanılabilceği gösterildi.

Kaynakça

- [1] Kaygısız, H. 2003. Tarımda İlaçlı Mücadelenin Temel Prensipleri, Hasad Yay., 127s.
- [2] Gold, L.S., Manley, N.B., Slone, T.H., Ward, J.M. 2001. Compendium of Chemical Carcinogens by Target Organ: Results of Chronic Bioassays in Rats, Mice, Hamsters, Dogs and Monkeys. Toxicol Pathol, 29 (2001), 639-652.
- [3] Farag, A.T., Eweidah, M.G., Tayel, S.M., El-Sebae, A.H. 2000. Developmental Toxicity of Acephate by Gavage in Mice. Reprod Toxicol, 14 (2000), 241-245.
- [4] Akman, Y., Ketenoğlu, O., Kurt, L., Düzenli, S., Güney, K., Kurt, F. 2004. Çevre Kirliliği (Çevre Biyolojisi). Palme Yayıncılık, Ankara, 312 s.

- [5] Keikotlhaile, B. M., Spanoghe, P. 2011. Pesticide Residues in Fruits and Vegetables. Pesticides - Formulations, Effects, Fate. Published by InTech (2011), Croatia, 243s.
- [6] Luque de Castro, M. D., Herrera, M.C. 2003. Enzyme_ Inhibition-Based Biosensors and Biosensing Systems: Questionable Analytical Devices. Biosensors and Bioelectronics, 18 (2003), 279-294.
- [7] Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vöros, J., Reimhult, E. 2008. Electrochemical Biosensors—Sensor Principles and Architectures. Sensors, 8 (2008), 1400-1458.
- [8] Liu, B., Yang, Y.-H., Wu, Z.-Y., Wang, H., Shen, G.-L., Yu, R.-Q. 2005. A Potentiometric Acetylcholinesterase Biosensor Based on Plasma-Polymerized Film. Sensors and Actuators B, 104 (2005), 186-190.
- [9] Tsai, H. C., Doong, R. A. 2005. Simultaneous Determination of Ph, Urea, Acetylcholine and Heavy Metals Using Array-Based Enzymatic Optical Biosensor. Biosensors and Bioelectronics. 20 (2005), 1796-1804.
- [10] La Rosa, C., Pariente, F., Hernandez, L., Lorenzo, E. 1994. Determination of Organophosphorus and Carbamic Pesticides with an Acetylcholinesterase Amperometric Biosensor Using 4-Aminophenyl Acetate as Substrate. Analytica Chimica Acta, 295 (1994), 273-282.
- [11] Kim, G. Y., Shim, J., Kang, M. S., Moon, S. H. 2008. Optimized Coverage of Gold Nanoparticles at Tyrosinase Electrode for Measurement of a Pesticide in Various Water Samples. Journal of Hazardous Materials, 156 (2008), 141-147.
- [12] Wang, B., Zhang, J., Cheng, G., Dong, S. 2000. Amperometric enzyme electrode for the determination of hydrogen peroxide based on sol-gel/hydrogel composite film. Analytica Chimica Acta, 407 (2000), 111-118.
- [13] Rehman, H., Aziz, A.T., Shalini, S., Abbas, Z.K., Mohan, A., Ansari, A.A. 2014. Systematic review on pyrethroid toxicity with special reference to deltamethrin. Journal of Entomology and Zoology Studies, 2 (2014), 60-70.
- [14] Özcan, H., Aydın, T. 2014. A new PANI biosensor based on catalase for cyanide determination. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. (2014), Early Online: 1-8.
- [15] Gulla, K.C., Gouda, M.D., Thakur, M.S., Karanth, N.G. 2002. Reactivation of immobilized acetylcholinesterase in an amperometric biosensor for organophosphorus pesticide. Biochimica et Biophysica Acta. 1597(2002), 133-139.
- [16] Alptekin, Ö., Tükel, S.S., Yıldırım, D. 2008. Immobilization and characterization of bovine

- liver catalase on eggshell. *J. Serb. Chem. Soc.* 73 (2008), 609–618.
- [17] Luzi-Thafeni, L., Silwana, B., Iwuoha, E., Somerset, V. 2015. Graphene-Polyaniline Biosensor for Carbamate Pesticide Determination in Fruit Samples. *Nanotechnology and Nanomaterials*. Book edited by Toonika Rincken. Published by Intech (2015), Chapter 15.
- [18] Gan, N., Yang, X., Xie, D., Wu, Y., Wen, W. 2010. A Disposable Organophosphorus Pesticides Enzyme Biosensor Based on Magnetic Composite Nano-Particles Modified Screen Printed Carbon Electrode. *Sensors (Basel)*. 10 (2010), 625–638.
- [19] Aslan, Ş. 2001. İçme Sularından Adsorpsiyon ile Pestisit Giderimi, 3. Kentsel Altyapı Ulusal Sempozyumu, TMMOB İnşaat Mühendisliği Odası, Eskişehir. (2001), 309-322.
- [20] Karadağ, H., Ozhan, F. 2015. Effect of cyprodinil and fludioxonil pesticides on bovine liver catalase activity. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 29 (2015), 40-44.
- [21] Sharma, P., Singh, R., Jan, M. 2014. Dose-Dependent Effect of Deltamethrin in Testis, Liver, and Kidney of Wistar Rats. *Toxicol Int.* 21 (2014), 131-139.
- [22] Dubey, N., Raina, R., Khan, A.M. 2012. Toxic Effects Of Deltamethrin And Fluoride On Antioxidant Parameters In Rats. *Research report Fluoride*. 45 (2012), 242-246.
- [23] Yarsan, E., Bilgili, A., Kanbur, M., Celik, S. 2002. Effects of deltamethrin on lipid peroxidation in mice. *Vet Hum Toxicol.* 44 (2002), 73-75.
- [24] Istamboulie, G., Sikora, T., Jubete, E., Ochoteco, E., Marty, J. L., Noguer, T., Screen-Printed Poly(3,4-Ethyl-enedioxythiophene) (PEDOT): A New Electrochemical Mediator for Acetylcholinesterase-Based Biosensors, *Talanta*, 82 (2010), 957-961.
- [25] Arduini, F., Ricci, F., Tuta, C. S., Moscone, D., Amine, A., Paleschi, G., Detection of Carbamic and Organophosphorous Pesticides in Water Samples Using a Cholinesterase Biosensor Based on Prussian Blue-Modified Screen-Printed Electrode, *Analytica Chimica Acta*, 580 (2006), 155-162.
- [26] Valdes-Ramirez, G., Cortina, M., Ramirez-Silva, M. T., Marty, J. L., Acetylcholinesterase-Based Biosensors for Quantification of Carbofuran, Methylparaoxon, and Dichlorvos in 5% Acetonitrile, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392 (2008), 699-707.
- [27] Du, D., Chen, S., Song, D., Li, H., Chen, X., Development of Acetylcholinesterase Biosensor Based on CdTe Quantum Dots/Gold Nanoparticles Modified Chitosan Microspheres Interface, *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (2008), 475-479.
- [28] Du, D., Chen, W., Zhang, W., Liu, D., Li, H., Lin, Y., Covalent Coupling of Organophosphorus Hydrolase Loaded Quantum Dots to Carbon Nanotube. Au Nanocomposite for Enhanced Detection of Methyl Parathion, *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (2010), 1370-1375.
- [29] Pedrosa, V. A., Paliwal, S., Balasubramanian, S., Nepal, D., Davis, V., Wild, J., Ramanculov, E., Simonian, A., Enhanced Stability of Enzyme Organophosphate Hydrolase Interfaced on the Carbon Nanotubes, *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 77 (2010), 69-74.
- [30] Vidal, J. C., Esteban, S., Gil, J., Castillo, J. R., A Comparative Study of Immobilization Methods of a Tyrosinase Enzyme on Electrodes and Their Application to the Detection of Dichlorvos Organophosphorus Insecticide," *Talanta*, 68 (2006), 791-799.
- [31] de Albuquerque, Y. D., Ferreira, L.F., Amperometric Biosensing of Carbamate and Organophosphate Pesticides Utilizing Screen-Printed Tyrosinase-Modified Electrodes, *Analytica Chimica Acta*, 596 (2007), 210-221.
- [32] Abegão, L.M.G., Ribeiro, J.H.F., Ribeiro, P.A., Raposo, M., Nano-Molar Deltamethrin Sensor Based on Electrical Impedance of PAH/PAZO Layer-by-Layer Sensing Films, *Sensors*, 13 (2013), 10167-10176.
- [33] Liu, X., Li, L., Liu, Y.Q., Shi, X.B., Li, W.J., Yang, Y., Mao, L.G., Ultrasensitive detection of deltamethrin by immune magnetic nanoparticles separation coupled with surface plasmon resonance sensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 59 (2014), 328-334.
- [34] Shenguang, G., Congcong, Z., Feng, Y., Mei, Y., Jinghua, Y., Layer-by-layer self-assembly CdTe quantum dots and molecularly imprinted polymers modified chemiluminescence sensor for deltamethrin detection, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 156 (2011), 222-227.