



**YÜZEY ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN
SPEKROSKOPİSİ (SERS) YAKLAŞIMI İLE ALT
SUŞ BAKTERİ TANISI**

Feyzanur CAN GÜLMÜŞ

Doç. Dr. Aslı YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

2024

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

YÜZEY ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ (SERS)
YAKLAŞIMI İLE ALT SUŞ BAKTERİ TANISI
(Sub-strain Bacteria Detection through Surface-enhanced Raman Spectroscopy (SERS)
Approach)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Feyzanur CAN GÜLMÜŞ

Danışman: Doç. Dr. Aslı YILMAZ
İkinci Danışman: Doç. Dr. Mehmet YILMAZ

Erzurum
Ağustos, 2024

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Feyzanur CAN GÜLMÜŞ tarafından hazırlanan “Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS) Yaklaşımı İle Alt Suş Bakteri Tanısı” başlıklı çalışması 29. / .08. / 2024 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Özkan AKSAKAL <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Doç. Dr. Aslı YILMAZ <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Ferhunde AYSİN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. İlyas İNCİ İzmir Demokrasi Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır
İkinci Tez Danışmanı	Doç. Dr. Mehmet YILMAZ <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

.... / / ..

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek lisans Tezi olarak Doç. Dr. Aslı YILMAZ danışmanlığında sunulan “Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS) Yaklaşımı ile Alt Suş Bakteri Tanısı” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	%10	30
Kuramsal Temeller	%4	30
Materyal ve Metot	%4	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	%8	20
Sonuçlar ve Öneriler	%0	20
Tezin Geneli	%6	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Feyzanur CAN GÜLMÜŞ	Doç. Dr. Aslı YILMAZ
29.8.2024	29.8.2024
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans yaptığım süre boyunca bana yol gösteren ve bana yardımcı olup, hiçbir konuda desteklerini esirgemeyen değerli danışman hocalarım Sayın Doç. Dr. Aslı YILMAZ'a ve Sayın Doç. Dr. Mehmet YILMAZ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı yürütmem için kapılarını açan Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) ailesine ve kütüphane arkadaşlarıma tek tek teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince desteklerini hiç esirgemeyen Nazlı ÖNCER' e ve manevi olarak beni asla yalnız bırakmayan varlığını hep hissettiren Dr. Öğr. Üyesi Hayrunnisa Mazlumoğlu'na teşekkür ederim.

Beni maddi manevi her anlamda destekleyen, hep yanımda olan, başta annem ve babam olmak üzere kardeşlerime, tez sürecinde hayatıma dahil olan ve bu süreçte bütün varlığıyla yanımda olan eşime teşekkür ederim. Son olarak tezimi, 21 Haziran 2023 tarihinde ani bir şekilde kaybettiğim en büyük destekçim, dayanağım olan canım anneme adıyorum.

Feyzanur CAN GÜLMÜŞ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YÜZEY ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ (SERS) YAKLAŞIMI İLE ALT SUŞ BAKTERİ TANISI

FEYZANUR CAN GÜLMÜŞ

Doç. Dr. Ash YILMAZ

İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mehmet YILMAZ

Amaç: Bu tez çalışmasında SERS platformu olarak GNA (gold nanorod array) üretilmesi ve farklı üç bakteri türünün (*S. aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*) 9 alt suşun tanısında veriminin belirlenmesi amaçlanmıştır. Alt suş ayrımı gerçekleştirildikten sonra yapılan analizler ile toplanan sinyallere karşılık gelen bantların bakteri suşlarının tanısına olan etkisi arasında bağlantı kurulması hedeflenmiştir.

Yöntem: SERS platformu olarak kullanılan GNA PVD tekniği kullanılarak üretilmiştir. Toplam 9 bakteri alt suşu uygun besiyeri ortamında kültürlenerek çoğaltılmıştır. Çoğaltılıp saf koloni elde edilen bakteri suşlarından alınan SERS sinyalleri ilk olarak ön işleme aşamalarından geçirilmiştir. Ön işleminden geçen geçen bakteri suşlarına ait sinyaller gözetimsiz (PCA, HCA) ve gözetimli (LDA, SVM ve SIMCA) analizlere tabi tutulmuştur. Bu analizlerin amacı tanıma hassasiyeti ve doğruluk açısından yüksek verimlilik elde etmektir. Bütün bu analizlere ek olarak bakteri suşlarının ayrımıyla ilişkili olan biyomolekülleri tespit edip, daha anlamlı bir boyut kazandırmak için one-way ANOVA analizi yapılmıştır.

Bulgular: GNA SERS substratı başarıyla sentezlenmiştir. Sentezlenen substrat ile bakteriler bir araya getirilmiştir. Bakterilerden alınan sinyaller sonucunda çalışılan *S. aureus*, *P. aeruginosa* başarılı bir şekilde ayrılırken *E. coli* için aynı durumdan söz edilmemektedir. Bu bakteri diğer iki bakteri kadar yüksek doğrulukla ayrılmadığı sonucuna varılmıştır ve böylece, bu bakterilere ait bantlar yorumlanarak elde edilen biyomoleküller içerik bakteri ayrımıyla ilişkilendirilmiştir.

Sonuçlar: Bakterilerin ayrımlarına ilişkin beş farklı analiz yapılmıştır. Bant değerleri yorumlanmıştır ve bu bantların biyomolekül karşılığı bakteri suşlarının ayrımıyla ilişkilendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: SERS, Etiketsiz tespit, Kemometrik analiz, Bakteriyel teşhis, Denetimli analiz, Denetimsiz analiz, one-way ANOVA

AĞUSTOS, 2024 , 87 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

SUB-STRAIN BACTERIA DETECTION THROUGH SURFACE-ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY (SERS) APPROACH

Feyzanur CAN GÜLMÜŞ

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ashi YILMAZ

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet YILMAZ

Method: In this thesis, GNA (gold nanorod array) SERS platform was produced and it was aimed to combine a total of 9 bacterial strains with three different sub-strains of bacteria (S.aureus, P.auroginosa, E.coli) with the SERS platform. With the SERS signals obtained from the combined bacterial strains, it was aimed to separate the three types of bacteria and their strains. After the separation was realized, it was aimed to establish a connection between the analysis performed and the effect of the bands corresponding to the collected signals on the separation of bacterial strains.

Findings: GNA SERS substrate was produced using PVD technique. A total of 9 bacterial strains, including three bacterial sub-strains, were cultured in appropriate medium. The SERS signals from the bacterial strains obtained from pure colonies were first preprocessed. Bacterial strains that passed this stage were subjected to unsupervised (PCA, HCA) and supervised (LDA, SVM, SIMCA) analyses. The aim of these analyses is to achieve precision, accuracy and high efficiency. In addition to all these analyses, one-way ANOVA analysis was performed to identify biomolecules associated with the discrimination of bacterial strains and to add a more meaningful dimension.

Conclusions: GNA SERS substrate was successfully synthesized. Bacteria were brought together on the synthesized substrate. As a result of the signals obtained from the combined bacteria, S. aureus and P. auroginosa were successfully separated, while the same was not true for E. coli. It was concluded that this bacterium was not separated with as high accuracy as the other two bacteria and thus, the bands of these bacteria were interpreted and the biomolecules obtained were correlated with the separation of the bacteria.

Keywords: SERS, Label-free detection, Chemometric analysis, Bacterial detection, Supervised analysis, Unsupervised analysis, one-way ANOVA

August, 2024, 87 pages

İÇİNDEKİLER

İçindekiler

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	iii
ETİK VE BİLDİRİM SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	ix
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	6
Bakteri Nedir ve Bakteri Tanısında Kullanılan Klasik Yöntemler Nelerdir?	6
Klasik Tanı Yöntemleri.....	6
Bakteriyel Suş Nedir ve Klasik Tanı Yöntemleri Nelerdir?	8
Bakteriyel Suş Gruplamasında Güncel Yaklaşımlar	10
<i>Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP)</i>	11
<i>Çoklu lokuslu değişken sayılı tandem tekrar analizi (MLVA)</i>	12
DNA Dizilimine Dayalı Yöntemler.....	13
<i>DNA hibridizasyonuna dayalı yöntemler</i>	16
Klasik Raman Spektroskopisi.....	17
<i>Tarihçesi ve Temel teorisi</i>	17
<i>Raman Spektroskopisi Temel Teorisi</i>	18
Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS)	20
SERS ile Yapılan Biyolojik Uygulamalar	23
<i>Etiketli Yöntem ile Bakteri Tanısı</i>	24
<i>Etiketsiz Yöntem ile Bakteri Tanısı</i>	27
SERS Verilerinin Ön İşlenmesi	29
<i>SERS Verilerinin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi</i>	30

<i>Gözetimsiz Kemometrik Analizler</i>	31
<i>Temel bileşen analizi (principal component analysis, PCA)</i>	31
<i>Gözetimli Kemometrik Analizler</i>	32
<i>Destek vektör makinesi (support vector machine, SVM)</i>	33
MATERYAL METOT	34
Kullanılan Deneysel Gereçler ve Bakteriler	34
Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler	35
Kullanılan cihazlar	36
GNA SERS Platformunun üretimi	36
Bakterilerin Çoğaltılması için Besiyeri Hazırlığı.....	37
SERS Sinyallerinin Alınması.....	39
SERS Sinyallerinin Kemometrik Yöntemler ile Analiz Edilmesi	39
Ön veri işleme	39
Kemometrik Analizler.....	39
<i>Gözetimsiz kemometrik analiz</i>	40
<i>Gözetimli kemometrik analiz</i>	40
ANOVA Analizi.....	40
ARAŞTIRMADA ELDE EDİLEN BULGULAR VE SONUÇ.....	42
GNA SERS Platformunun üretimi ile elde edilen bulgular	42
Farklı Üç Tür Bakteriden SERS Sinyallerinin Alınması.....	43
Üç Tür Bakteri ve Bu Bakterilerin Alt Suşlarından Elde Edilen SERS Verileri İle Kemometrik Analiz sonuçları.....	45
Gözetimsiz Kemometrik Analizler ve Sonuçları.....	46
Gözetimli Kemometrik Analizler ve Sonuçları	48
One - Way ANOVA Analizi	55
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	63
KAYNAKÇA	64
EKLER	74
EK- 1. Gözetimli Analizlere Ait Tablolar	74
ÖZ GEÇMİŞ.....	90

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Raman röportör molekülleri	25
Tablo 2. Kullanılan kimyasallar ve malzemeler	35
Tablo 3. Kullanılan cihazlar.....	36
Tablo 4. Staphylococcus aureus'un alt suşları için PC yükleme grafiklerinden elde edilen varyanslar ve bant atamaları.	58
Tablo 5. Pseudomonas auroginosa suşları için PC yükleme grafiklerinden elde edilen varyanslar ve bant atamaları.	60
Tablo 6. Escherichia coli suşları için PC yükleme grafiklerinden elde edilen ve bant atamaları.....	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Bakteri alt suşları için DNA bantlama temeline dayalı genotipleme yöntemleri.....	10
Şekil 2. Değişken sayıda ardışık tekrar eden (VNTR) lokusunun klasik şema gösterimi.....	12
Şekil 3. Bakteri suşları için DNA sekansına dayalı genotipleme yöntemleri	13
Şekil 4. MST'nin temel mantığını aktaran şema	15
Şekil 5. Bakteri suş ayırımı için DNA hibridizasyonuna dayalı genotipleme yöntemlerinin şeması.....	16
Şekil 6. Dr. Raman'ın güneş ışığı kullanarak yaptığı ilk deney.....	17
Şekil 7. Raman spektroskopisinin tarihsel gelişme süreci.	18
Şekil 8. Molekülün ışık ile uyarılması sonucu meydana gelen enerji değişimleri.....	19
Şekil 9. Yüzey güçlendirilmiş Raman saçılması gösterimi.....	21
Şekil 10. Lokalize yüzey plazmon rezonans uyarılması.	22
Şekil 11. kimyasal zenginleştirme (chemical enhancement, CHEM) mekanizması.....	23
Şekil 12. Biyolojik uygulamalar için Etiketli SERS yaklaşımı.....	24
Şekil 13. SERS etiketlerinin sentezi için çeşitli nanosubstrat gösterimi.	26
Şekil 14. Etiketsiz yöntem ile bakteri tanısı.	28
Şekil 15. SERS verilerinin ön işlem basamakları.	29
Şekil 16. SERS sinyalleri ile elde edilen verilerin kemometrik analizi gösterimi.	30
Şekil 17. Kemometrik analizin şematik gösterimi.	31
Şekil 18. 2D skor grafikleri.	32
Şekil 19. OAD işleminin şematik gösterimi.....	36
Şekil 20. Nutrient Agar ve Nutrient Broth hazırlanmış hali.....	38
Şekil 21. (a) Henüz kullanılmamış GNA SERS substratı, (b) GNA yüzey üzerindeki damlatılan ve kuruyan bakteriler.....	39
Şekil 22. PVD tekniği ve OAD yaklaşımı ile üretilen GNA yapılar için üretilmiş altın nanorod dizileri	42
Şekil 23. GNA SERS substratı için UV-vis absorpsiyon spektrumu	43
Şekil 24. S.aureus bakterisi 43300 alt suşuna ait haritalama verisi.....	44
Şekil 25. E.coli bakterisi 2521 alt suşuna ait haritalama verisi.....	44
Şekil 26. P.auroginosa bakterisi 10145 alt suşuna ait haritalama verisi.	45
Şekil 27. S.aureus bakterisi için toplanan SERS spektral verilerinin denetimsiz kemometrik analizi.	47

Şekil 28. <i>P.auroginosa</i> bakterisi için toplanan SERS spektral verilerinin denetimsiz kemometrik analizi.....	47
Şekil 29. <i>E.coli</i> bakterisi için toplanan SERS spektral verilerinin denetimsiz kemometrik analizi.	48
Şekil 30. <i>S.aureus</i> bakterisi için yapılan LDA grafiği.....	49
Şekil 31. <i>P.auroginosa</i> bakterisi için yapılan LDA grafiği.	49
Şekil 32. <i>E.coli</i> bakterisi için bakterisi için yapılan LDA grafiği.	50
Şekil 33. <i>S.aureus</i> bakteri suşları için yapılan SIMCA analizi.	51
Şekil 34. <i>P.auroginosa</i> bakteri suşları için yapılan SIMCA analizi.	52
Şekil 35. <i>E.coli</i> bakteri suşları için yapılan SIMCA analizi.....	53



KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ATCC	:	Amerikan Tip Kültür Koleksiyon (American Type Culture Collection)
CHEM	:	Kimyasal Zenginleştirme (Chemical Enhancement)
EF	:	Zenginleştirme Faktörü (Enhancement Factor)
EM	:	Elektromanyetik Zenginleştirme (Electromagnetic Enhancement)
GNA	:	Altın Nanoçubuk Yüzey (Gold Nanorod Array)
HOMO	:	En Yüksek Dolu Molekül Orbitali (Highest Occupied Molecular Orbital)
LUMO	:	En düşük Dolmamış Molekül Orbitali (Lowest Unoccupied Molecular Orbital)
HCA	:	Hiyerarşik Kümeleme Analizi (Hierarchical Cluster Analysis)
PCA	:	Temel Bileşen Analizi (Principal Component Analysis)
LDA	:	Lineer Diskriminant Analizi (Linear Discriminant Analysis)
SVM	:	Destek Vektör Makinesi (Support Vector Machine)
SIMCA	:	Sınıf Analjisiyle Yumuşak Bağımsız Modelleme (Soft Independent Modeling of Class Analogies)
PBS	:	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltilisi (Phosphate Buffer Saline)
OAD	:	Eğik Açık Birikimi (Oblique Angle Deposition)
PVD	:	Fiziksel Buhar Birikimi (Physical Vapor Deposition)
RS	:	Raman Spektroskopisi
SEM	:	Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy)
TEM	:	Geçirimli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscopy)
SERS	:	Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (Surface-enhanced Raman Spectroscopy)
SPR	:	Yüzey Plazmon Rezonansı (Surface Plasmon Resonance)

UV	:	Ultraviyole
MLVA	:	Çoklu lokuslu değişken sayılı tandem tekrar analizi
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
LSPR	:	Lokalize yüzey plazmon rezonansı
PFGE	:	Darbeli alan jel elektroforezi
RFLP	:	Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
REP-PCR	:	Tekrarlayan sıralamaya dayalı PCR
µg	:	Mikrogram
µL	:	Mikrolitre
cm²	:	Santimetre kare
mg	:	Miligram
mL	:	mililitre
nm	:	Nanometre
°C	:	Santigrat derece

GİRİŞ

Bakteriyel enfeksiyonlar dünya çapında ana sağlık sorunlarından biridir ve bakteriyel enfeksiyonların neden olduğu hastalıklar günümüzde endişe uyandırmaktadır (Reta et al., 2019). Bu enfeksiyonlar, hastalıkların çoğunu oluşturur. Dünya Sağlık Örgütü (World Healthy Organization, WHO) evrensel olarak kabul edilmiş patojen olan bakteri listesini yayınlamıştır. Bakterilerin neden olduğu enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için yoğun çalışmalara gerek duyulmaktadır. Bu bağlamda bakteriyel patojenlerin hızlı, spesifik tanımlanması onları biyolojik uygulamalarda kullanılabilir hale getirmektedir (Asokan et al., 2019). Ayrıca enfeksiyonların neden olduğu hastalıklarla mücadelede de en etkili tedavi yöntemleri hala araştırılmaktadır (Jubeh et al., 2020).

Enfeksiyon kaynağı olan bakteri türünün erken teşhisi etkili tedavi stratejisi geliştirilmesinde önemli bir adımdır. Bakteri kaynaklı hastalığın kontrol altına alınmasında üç temel aşamadan söz edilebilir. İlk aşamada bakteriyel enfeksiyonun ortadan kaldırılması veya kontrol altına alınması gerekir. İkinci aşamada ise konağın enfeksiyona karşı korunması sağlanmalıdır. Son olarak, bakteri tarafından enfekte olan kişilerin diğer insanlarla teması kontrol altına alınarak, bulaşma önlenmelidir. Tedavi kapsamında temel strateji doğru ve kontrollü antibiyotik kullanımıdır. Doğru ve kontrollü kullanılmayan antibiyotik, antimikrobiyal dirençli organizmaların gelişimine de yol açmaktadır (Asokan et al., 2019; Dubourg et al., 2018; Efrima & Bronk, 1998; Efrima & Zeiri, 2009).

Patojen kaynaklı hastalıkların tedavisinde ilk aşama patojenleri doğru ve hassas tespit etmektir. Bu bağlamda patojenleri tanımlamak için kesin bilgi sunan ve hassas prosedürlere ihtiyaç duyulmaktadır. (Efrima & Zeiri, 2009).

Bakterilerin tanımlanması için geleneksel mikrobiyolojik ve biyokimyasal yaklaşımlara dayanan birçok yöntem bulunmaktadır. Bakteriyel patojenlerin tanımlanmasında kullanılan en eski ve en yaygın metotlardan biri agar plakasında veya kültür besiyerinde bakterilerin büyütülmesidir. Bu yöntem morfolojik veya biyokimyasal yöntemler ile bakteri türünün belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Büyütme işlemi 24-48 saat sürmektedir. Ciddi klinik vakalarda belirtilen bu süreler oldukça yüksektir ve hastanın yaşamını kaybetmesine yol açabilmektedir. Ayrıca, bu uygulama üsreç içerisinde başta kontaminasyon olmak üzere farklı komplikasyonlara açıktır. Bundan dolayı bu yöntemleri destekleyici tanı sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Bayraktar, Banada, Hirleman, et al., 2006; Franco-Duarte, Luciačernáková, et al., 2019).

Bir diğ er tanı yöntemi olan PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), moleküler biyolojide patojenleri saptamak için kullanılan, hızlı, kullanımı basit ve bir teknik olup hassas yöntemdir (Nguyen et al., 2017; Yamamoto, 2002). Spesifik gen bölgelerine özel primerler belirlenerek bu bölgeler PCR tekniğıyle çoğaltılır ve gen bankasındaki mevcut dizilerle karşılaştırılarak tür tespiti yapılır.PCR'de primer tasarlamak için bazı  n sekans verilerine gerek duyulmaktadır (Fukumoto et al., 2015). Bu nedenle, PCR yalnızca bilinen bir patojen veya genin varlığını veya yokluğunu belirlemek için kullanılabilir. Ayrıca, eser miktarda DNA kontaminasyonu varlığında yanıltıcı sonuçlara yol açabilmekte ve bu nedenle doğıru tanı noktasında sapmalara neden olabilmektedir (Agne et al., 2009).

Başka bir tanı yöntemi ise, geleneksel biyokimyasal teşhis yöntemlerinden MALDI-TOF MS'nin değıştirilmesi temeline dayanmaktadır. Bu yöntem ile, bakteri tanısı birkaç dakika. Böylece hızlı tanı ile etkin tedavi için zaman kazanılmaktadır. Fakat bu yöntemde koloni çoğaltılması gerekmektedir (Patel, 2015). Analiz sonunda bakterilerden elde edilen spektrumlar, uygun veri tabanıyla karşılaştırılarak tanımlama yapılmaktadır. MALDI-TOF MS ile *Escherichia coli* ve *Shigella sp.* gibi benzer özellikteki bakterilerin ayırt edilmesi oldukça zordur. MALDI-TOF MS'nin metisiline dirençli ve metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* gibi bazı antibiyotiğıe dirençli fenotiplerini ayırt etmesi zordur, düşük  zg ll ğ e sahiptir ve kantitatif değıldirler (Dubourg et al., 2018; Innovation & Roux-Dalvai, 2019; Rentschler et al., 2021a).

Son yıllarda nanoteknolojik yaklaşımlar hastalık tedavisi, teşhisi, izlenmesi ve biyolojik sistemlerin kontrolünde önemli fırsatlar sunmakta ve sıklıkla kullanılmaktadır. Nanoteknolojik yaklaşımlar mikroorganizmaların tanısı için kullanılmaya başlanmış ve bu konuda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (McNamara & Tofail, 2017; Moein Moghimi et al., n.d.). Bu ilerlemeler kapsamında metalik ve organik olmak üzere farklı nanopartiküller tanıyıcı moleküller ile fonksiyonel hale getirilerek bakteri tanısı gerçekleştirilmektedir (Chao & Zhang, 2012).

Raman spektroskopisi, çeşitli numunelerin analizi için kullanılan saçılma temelli bir analiz yöntemidir. Temelde analit ile etkileşen ışının frekansında oluşan farklılığın ölçülmesi ile Raman spektrumu elde edilir. Elastik olmayan saçılmanın ölçülmesiyle hem nitel hem de nicel özellikte analizler yapılabilir. (Principles of Instrumental Analysis - Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - Google Kitaplar, n.d.). Bunlara ek olarak Raman spektroskopisi floresans foto ağıarma problemi oluşurmaz, herhangi bir örnek hazırlama

prosedürü gerektirmez (etiketleme yapılmadan kullanım) ve daha da önemlisi molekülün yapısına spesifik titreşimleri belirleyebildiğinden kimyasal içeriğin parmak izi (chemical fingerprinting) hassasiyetinde tanısına da olanak sağlar (Day et al., 2004; Kim et al., 2020).

Bakteriyel tanı uygulamalarında Raman spektroskopisi, bakteriyel enfeksiyonların tanımlanması için gelişmekte olan bir yöntemdir. Raman spektroskopisi bakteri hücrelerini ve antibiyotik direncini tanımlamak için hızlı, verimli ve minimal invaziv bir araç olarak işlev görebilir. Ayrıca yüksek verimli ve gerçek zamanlı uygulamalarda yüksek potansiyele de sahip olduğu bilinmektedir. Kapsamlı bir Raman spektrumu elde etmek için bir dakikanın altında yapılabilen bir prosedürün yeterli olduğu gösterilmektedir. Bu süre, küçük bakteri kümelerinin lokalizasyonunu, tek bir birey üzerinde hizalamayı ve kendiliğinden olan Raman saçılma sinyali toplamayı içerir (Strola et al., 2014). Bu teknik ile biyolojik örneklerin tanısı birçok avantaja sahip olsa da inelastik ışık saçılmasından kaynaklanan düşük seviyelerde sinyal şiddeti alınması gibi bazı kısıtlamalar da oluşturulabilmektedir. Uyarılan bir molekülden saçılan fotonunlardan sadece milyonda biri inelastik saçılma oluşturulabilmektedir. Bu durum klasik Raman spektroskopisinde hassasiyetin düşük olmasına neden olmaktadır. Bu hassasiyet sorununa çözüm olması amacıyla Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (Surface-enhanced Raman Spectroscopy, SERS) yaklaşımı geliştirilmiştir (Efrima & Bronk, 1998; Liu et al., 2017; Zhu et al., 2013).

1974'teki keşfinden bu yana, SERS yaklaşımı kimya, fizik, tıp ve biyoloji alanlarındaki farklı uygulamalarda sıklıkla kullanılmıştır (Fleischmann et al., 1974). Yeni SERS platformlarının gerçekleştirilmesi, algılama verimliliklerini artırmak ve etkili geliştirme mekanizmalarını anlamak için yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. SERS etkisini tanımlamak için iki temel mekanizma önerilmektedir. Bunlar elektromanyetik ve kimyasal zenginleştirme mekanizmalarıdır (Nie & Emory, 1997). Elektromanyetik zenginleştirme mekanizması, lokalize yüzey plazmon rezonanslarının (LSPR'ler) uyarılmasıyla ışık amplifikasyonundan kaynaklanmaktadır. Kimyasal zenginleştirme ise, analit molekülün en yüksek dolu moleküler orbitali (highest occupied molecular orbital, HOMO) ve en düşük dolmamış moleküler orbitali (lowest unoccupied molecular orbital, LUMO) ile metalin Fermi seviyesi arasında kullanılan lazerin enerjisine bağlı olarak olası yük transfer komplekslerinin ortaya çıkmasına bağlıdır. Bu uyarılma ya metalden moleküle ya da molekülden metale olabilir (Stiles et al., 2008).

SERS etkisi, metalik nanoyapıların, yüzey plazmonları adı verilen optik modlar aracılığıyla elektromanyetik enerjiyi yoğunlaştırma kabiliyetinden yararlanır. SERS ilk olarak elektrokimyasal olarak pürüzlendirilmiş bir gümüş elektrot üzerinde adsorbe edilmiş piridinden beklenmedik yüksek şiddette Raman sinyalinin alınması ile 1974 yılında gözlenmiştir

(Fleischmann et al., 1974). Sinyal artışı, başlangıçta artan yüzey alanına sahip daha fazla sayıda adsorbe edilmiş molekül ile ilişkilendirilmiştir. Ancak, daha sonra bu sinyal iyileştirmesi SERS etkisi ile açıklanmıştır (Jeanmaire & Van Duyne, 1977). SERS, yüksek duyarlılığı, özgüllüğü ve yüksek hızı nedeniyle çeşitli patojenik bakteri tanısında sıklıkla kullanılmıştır (Gao et al., 2017; Liu et al., 2017). SERS ile bakteri çalışmalarında, inorganik tuz tarafından indirgenen çeşitli şekillerde koloidal altın veya gümüş nanopartiküllerin süspansiyonları veya partikül kümeleri, bakteriyel hücrelerle basitçe karıştırılarak SERS etkisini oluşturmak için kullanılmıştır (Kahraman et al., 2011).

Bakteriler için tipik SERS tanı sistemlerinde genellikle iki strateji kullanılmaktadır; etiket tabanlı ve etiketsiz yöntem. Belirtilen her iki yaklaşımın göreceli avantajları vardır (K. Yuan et al., 2018). İlk yaklaşımda plazmonik metal yüzey Raman aktif bir molekül ile etiketlenerek tanı yapılmaktadır. Raman aktif molekülün yüzeye bağlanma zorluğu, molekülün yüzeyden aşınması, foto ağarma ve ek işlem gerektirmesi gibi kısıtlamalar bu yöntemin uygulanmasını sınırlamaktadır. Alternatif olarak ikinci yaklaşımda ise etiketsiz SERS sistemleri bakteri tanısı için önerilmiştir. Literatürde genel olarak, etiketsiz SERS platformları ile bakteri tanısında iki farklı yöntem kullanılmıştır. İlk yöntemde bakterilerin üzerlerinde altın ya da gümüş nanoyapılar biriktirilerek SERS sinyalleri alınmıştır. Gümüş nitrat ya da aurik asit, gümüş ve altın tuzları sodyum borhidrür gibi bir indirgeyici ajan varlığında bakteri yüzeyinde nanoyapılar halinde biriktirilmektedir. Efrima ve arkadaşları bu yöntemi *E. coli* ve *B. megaterium* bakterilerinin SERS ile tanısında kullanmıştır (Mosier-Boss, 2017). Kullanılan en yaygın yöntem, bakterileri bir sodyum borohidrit çözeltisine daldırmak olduğu bilinmektedir. Bakteriler daha sonra bir gümüş nitrat veya kloraurik asit (HAuCl_4) solüsyonunda yeniden süspanse edilmiştir. Bunun sonucunda bakterileri içine alan altın film kalınlığının $\sim 0,05 \mu\text{m}$ olduğu tahmin edilmiştir (Efrima & Zeiri, 2009). Bu yaklaşımda düşük SERS veriminden dolayı her iki bakteriden benzer Raman spektrumları alınmıştır. Holt ve arkadaşları tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise fotosentetik bakterilerden SERS spektrumları toplanmıştır (Sheldrick et al., 1989). Farklı bir metod kullanılarak bakteriler üzerinde harici bir kolloid hazırlanmıştır. Bir bakteri örneğine de gümüş nitrat çözeltisi eklenmiştir ve 5 dakika sonra, bakteri hücre duvarlarında adsorbe edilen gümüş iyonlarını azaltmak için bir hidroksilamin hidroklorür çözeltisi de eklenmiştir. Borohidrit preparasyonu, bakteri hücrelerini tamamen içine alan bir Ag/Au kaplaması oluştururken, altın nanopartiküllerin kümelerinin hücre duvarı ile temas halinde olduğu gözlenmiştir (H. Zhou et al., 2014).

SERS yaklaşımı ile etiketsiz yöntemle bakteri teşhisi, bakterilerin tanımlanması ve özellikle türler arasındaki ayrımcılık elde edilmesi için kapsamlı bakteri parmak iz spektral verileri sunar. Bakterilerin karmaşık bileşimi nedeniyle, gelişmiş makine öğrenme yöntemleri teşhis için gereklidir. Bununla birlikte, literatürde bakterilerin tür düzeyinde tespit edilmesi için kullanılan makine öğrenme yöntemleri sıklıkla yüzeysel ve yetersizdir. Bu nedenle, tez kapsamında, ilk kez, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* için üçer alt şuş ayırımında etiketsiz bir SERS yaklaşımı için gelişmiş denetimsiz ve denetimli makine öğrenme analizlerini gerçekleştirdik. Önerilen SERS platformundan yüksek bir sinyal-gürültü oranı olan güçlü Raman sinyalleri topladıktan sonra, denetimsiz yöntemler, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* alt şuşları için temel bileşen skor değerleri %92, %70 ve %63 ile her bir türün konumunu üç farklı dalda ve farklı kümelerde etkili bir şekilde sınıflandırılması sağlanmıştır. Bununla birlikte, denetimli yöntemlerde ise *S. aureus* ve *P. aeruginosa* alt şuşları için %100 kategorizasyon doğruluğu, ancak *E. coli* alt şuşları için ise daha düşük bir doğruluk değeri elde edilmiştir. Çalışma kapsamında, gelişmiş makine öğrenme yöntemleri ile desteklenmiş SERS stratejisinin ideal bir biyosensör sistemi olarak bakteri tanısında kullanılabileceği görülmüştür.

KURAMSAL TEMELLER

Bakteri ve Bakteri Tanısında Kullanılan Klasik Yöntemler

Bakteriler, prokaryotlar grubuna dahil ve benzersizdir; genetik bilgilerini DNA molekülünde taşıyan organizmalardır. Bazı türler ayrıca plazmit içerirler. Hücre sitoplazması ribozom içerir ve hem bir hücre zarı hem de mikoplazma dışındaki tüm türlerde karmaşık bir hücre duvarı bulunmaktadır. Bazı bakterilerin hücre duvarının dışında ise, kapsül, kamçı veya pilileri olduğu bilinmektedir. Uygun koşullar altında, bazı bakteriler hızla bölünür ve çoğalır. Bu koşullar altında çoğalan bakterilerin yalnızca küçük bir yüzdesi enfeksiyona ve hastalığa neden olurken birçoğu enfeksiyona neden olmamaktadır. Bakteriler, 1882'de Hans Christian Gram tarafından geliştirilen Gram boyama adı verilen bir prosedür ile mikroskop altındaki görüntüsü ve hücre duvarlarının özelliklerine göre Gram-pozitif veya Gram negatif olarak sınıflandırılırlar. Gram-negatif bakteriler, lipopolisakkarit içeren bir dış zarla çevrili olan ince bir peptidoglikan hücre duvarı ile çevrilidir. Bu dış zarın temel işlevi ise belirli ilaçların ve antibiyotiklerin hücreye girmesini engelleyen bir geçirgenlik bariyeri görevi görmektir. Gram pozitif bakteriler ise gram negatif bakterilerden oldukça farklıdır. Peptidoglikan tabakasına ek olarak, bu bakteriler bir dış membrana sahiptir ve periplazmik boşlukta birçok toksin içerebilmektedir. Gram pozitif bakteriler genel olarak Gram negatiflerin bulundurduğu dış zarı bulundurmaz (Doron, 2020; Exner et al., 2017).

Tüm insan organları bakteriyel enfeksiyona karşı hassastır. Her bakteri türünün, diğerlerini değil, belirli organları enfekte etme eğilimi vardır. Örneğin, *S. aureus*, genellikle cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olur. Aynı zamanda kan dolaşımı yoluyla vücuda kolayca yayılır ve akciğerlerin, karının, kalp kapakçıklarının ve hemen hemen tüm diğer bölgelerin enfeksiyonuna neden olabilir. *E. coli*, enterit, idrar yolu enfeksiyonu, sepsis ve neonatal menenjit gibi diğer klinik enfeksiyonların önde gelen nedenidir. *P.aeruginosa* türüne bakılırsa, küçük cilt enfeksiyonları ve ameliyat sonrası yara enfeksiyonları gibi enfeksiyonlara neden olan potansiyel patojenik bakteri olduğu gözlemlenmiştir (Allocati et al., 2013; Doron, 2020; Michel-Briand & Baysse, 2002)

Bakteri tanısı için geleneksel mikrobiyolojik ve biyokimyasal yaklaşımlara dayanan birkaç yöntem bulunmaktadır. Bakteriyel patojenlerin tanımlanması, en eski ve günümüzde kullanılmaya devam eden metotlardan olduğu bilinmektedir. Bu metotlar genel olarak şöyle sıralanabilir;

Agar Plakasında Bakteri Kültürü Metodu

Agar plakasında veya kültür besiyerinde bakterilerin büyütülmesi, morfolojik veya biyokimyasal yöntemler ile bakteri türünün belirlenmesi temeline dayanmaktadır (Bayraktar, Banada, Jr., et al., 2006). Büyütme işlemi 18-24 saattir, ancak bu süre farklı bakteri türleri için 72 saate kadar değişebilir. Bu süre hayati önem taşıyan durumlarda dezavantajlıdır. Genellikle uzun süren numune toplama, seri seyreltme, seçici, uygun besiyerini belirleme ve istenilen düzeyde koloniler elde etmek için uygun inkübasyon süresini beklemek gereklidir. Bu durum zamandan tasarruf sağlayabileceğimiz analizler için uygun şartları barındırmamaktadır (Hameed et al., 2018). Böylece, kültüre bağlı biyoçeşitlilik ile ilgili çalışmalarda çeşitliliğin artışı ciddi bir sorun olmakla beraber maliyetli de bir yöntem olduğu için hızlı ön tarama yöntemleri kullanılmalıdır (Franco-Duarte, Černáková, et al., 2019).

PCR metodu

PCR, moleküler biyolojideki patojenleri tespit etmek için mevcut hızlı yöntemler arasında en duyarlı olanıdır. Mikrobiyal DNA'yı doğru bir şekilde ölçmek ve spesifik primerler kullanarak patojen türlerini belirlemede kullanılmaktadır (Priyanka et al., 2016; Yamamoto, 2002). PCR'nin birçok avantajı vardır, bu da bu yöntemi bakteri kültürüne dayanan yöntemlere ve immünolojik testlere göre en çok tercih edilen teknik haline getirir. Bahsedilen avantajları olarak; hızlı, çok hassas, spesifik, maliyetinin düşük olmasını sıralayabiliriz (Panwar et al., 2023). Bunların yanı sıra bilinen bir patojen veya genin varlığını veya yokluğunu belirlemek için kullanılabilmesiyle beraber hassas bir yöntemdir. Fakat PCR, eser miktarda DNA kontaminasyonunda bile yanıltıcı sonuçlara yol açabilir ve bu teknik çoğu durum için tatmin edici düzeyde değildir (Agne et al., 2009). Ayrıca DNA polimeraz tarafından çok düşük oranda olsa yanlış nükleotid yazılımı PCR sekansında hatalara neden olabilmektedir. Diğer bir sınırlama ise, PCR için kullanılan primerlerin, hedef DNA ile tamamen aynı olmayan ancak benzer olan dizilere spesifik olmayan bir şekilde bağlanabilmesidir (Garibyan & Avashia, 2013)

MALDI-TOF MS Metodu

MALDI-TOF MS, belirli mikroorganizma türleri için tanı süresini birkaç saatten birkaç dakikaya indirebilen bir yöntemdir. Bu özelliği ile bu yöntem zamandan tasarrufu açısından önemli fırsatlar sunmaktadır. MALDI-TOF MS doğrudan kolonilerin çoğuna herhangi bir hazırlık aşamasına gerek kalmadan tanımlanır ve dakikalar içinde doğru bilgiye ulaşılmasını sağlar. Bu sayede doğrudan koloni işleme ile kolay, hızlı ve ucuz yöntemlerden biri olarak karşımıza çıkar (Patel, 2015; Yoon & Jeong, 2021). Bahsedilen avantajların yanı sıra MALDI-TOF MS için bazı sınırlamalar mevcuttur. Örneğin, MALDI-TOF MS'nin *Escherichia*

coli ve *Shigella* gibi yakından ilişkili bakteri türlerini ayırt etmesi zordur. MALDI-TOF MS'nin metisiline dirençli ve metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* gibi bazı antibiyotik direnç fenotiplerini ayırt etmesi de zordur, düşük özgülüğe sahiptir ve kantitatif değildirler. Analizden öncesi 24 saatlik uzun bir bakteri kültürü aşaması gerektirmektedir (Innovation & Roux-Dalvai, 2019; Rentschler et al., 2021b) ve bu strateji yalnızca sınırlı sayıda molekülün test edilmesine izin vermektedir (Dubourg et al., 2018).

Bakteriyel Alt Suş ve Klasik Tanı Yöntemleri

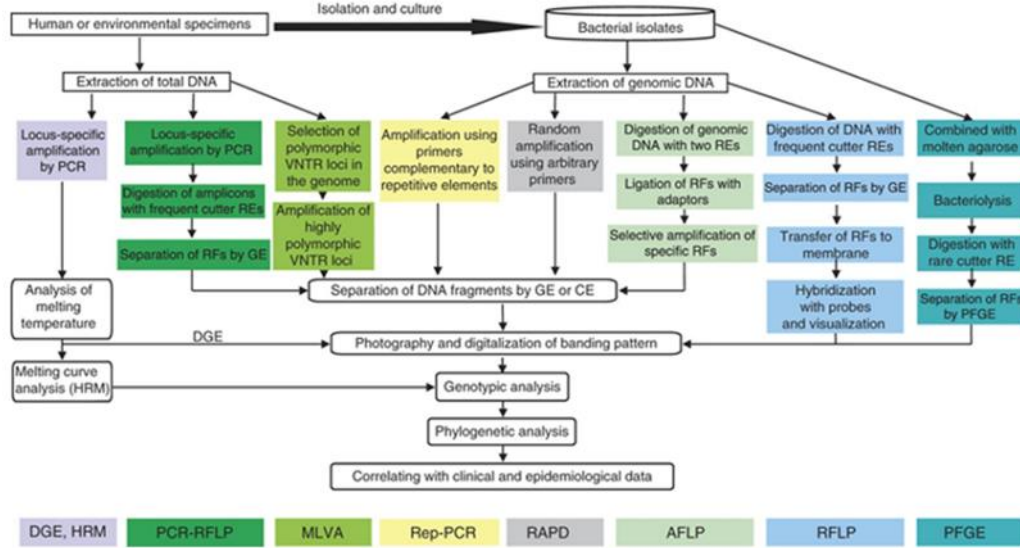
Genetik çeşitlilik; bakterilerdeki coğrafi dağılım, konakçı özgülüğü, patojenite, antibiyotik direnci ve virülans gibi fenotipik değişkenliği açıklayabilecek geniş bir yelpazeye sahiptir. Bakteriyel suşların insan sağlığı üzerindeki olası etkileriyle beraber neden oldukları hastalıkların da dünya çapında endişe uyandırmış olması bakterilerin suş düzeyinin tanımlanmasını oldukça önemli hale getirmiştir (Fournier et al., 2004). Bir dizi suşun ayrıntılı olarak karakterize edildiği ve bunların tek bir ana organizmadan türetilip türetilmediğinin tespit edildiği bakteriyel suş gruplaması, bakterileri suş düzeyinde tanımlamanın ve önemli fenotipik özelliklerle beraber genetik çeşitliliği de aydınlatmanın bir yoludur (Li et al., 2009).

Bakterilerin tür içi çeşitliliğinde üç temel genetik öncül vardır; yatay gen transferi, gen kaybı veya edinimi ve rekombinasyondur. Bu üç öncülün yoğunluğu, tür içi çeşitliliğin araştırılmasını oldukça karmaşık hale getirmektedir (Fraser-Liggett, 2005).

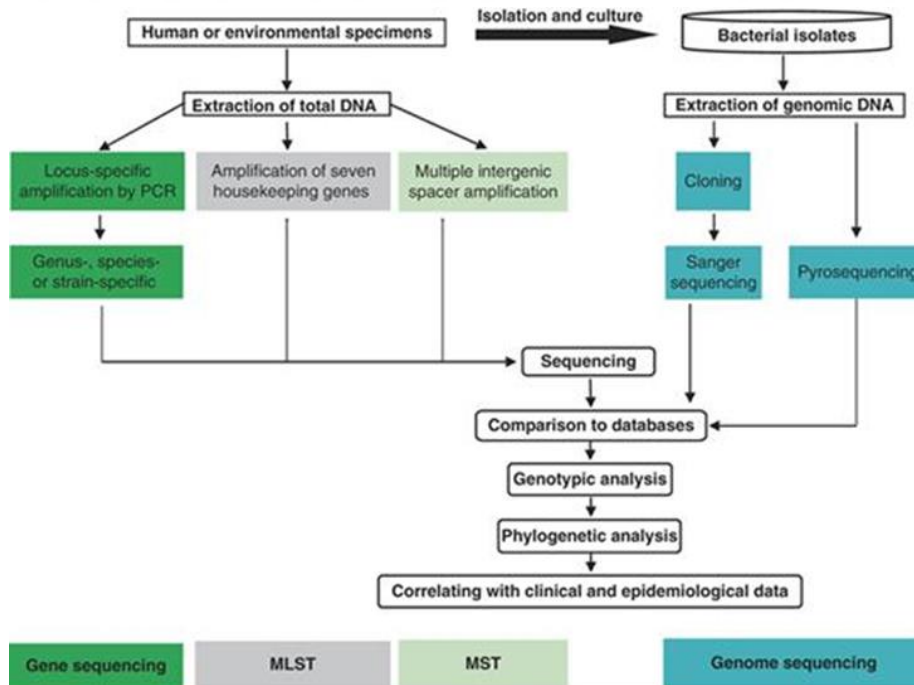
Teorik olarak fenotipleme ve genotipleme adı altında iki farklı gruplama vardır. Fenotipleme, kültür ortamlarındaki kolonilerin morfolojisi, biyokimyasal testler, öldürücü toksin duyarlılığı, patojenite ve antibiyotik duyarlılığı ile belirlenirken genotipleme ise, belirli bir suşun genetik profilinin bir parmak izi kadar benzersiz olduğu düşünülmektedir ve bu nedenle genotiplemeye DNA parmak izi adı da verilmektedir (Krawczyk et al., 2016).

Mevcut bakteriyel suş gruplandırma yöntemleri üç ana kategoriye ayrılabilir: DNA bantlama modeli, DNA dizilimi ve DNA hibridizasyonuna dayalı gruplama yöntemleridir. Bahsedilen kategoriden ilki olan DNA bantlama temeline dayalı gruplama yöntemi, genomik DNA'nın amplifikasyonu veya kısıtlama enzimleri (RE'ler) kullanılarak DNA'nın belirli bölgelerden kesilmesi ile oluşturulan DNA bantlarının (parçalarının) boyutundaki farklılıklara dayalı olarak incelenen suşların ayrımını yapar (Şekil 1). İkinci yöntem olan DNA dizilimine dayalı genotipleme yöntemi ise, orijinal nükleotid dizisini üretir ve bakteri suşlarını doğrudan DNA'larındaki polimorfizmlerden ayırt eder (2). Üçüncü yöntem olan DNA hibridizasyonuna

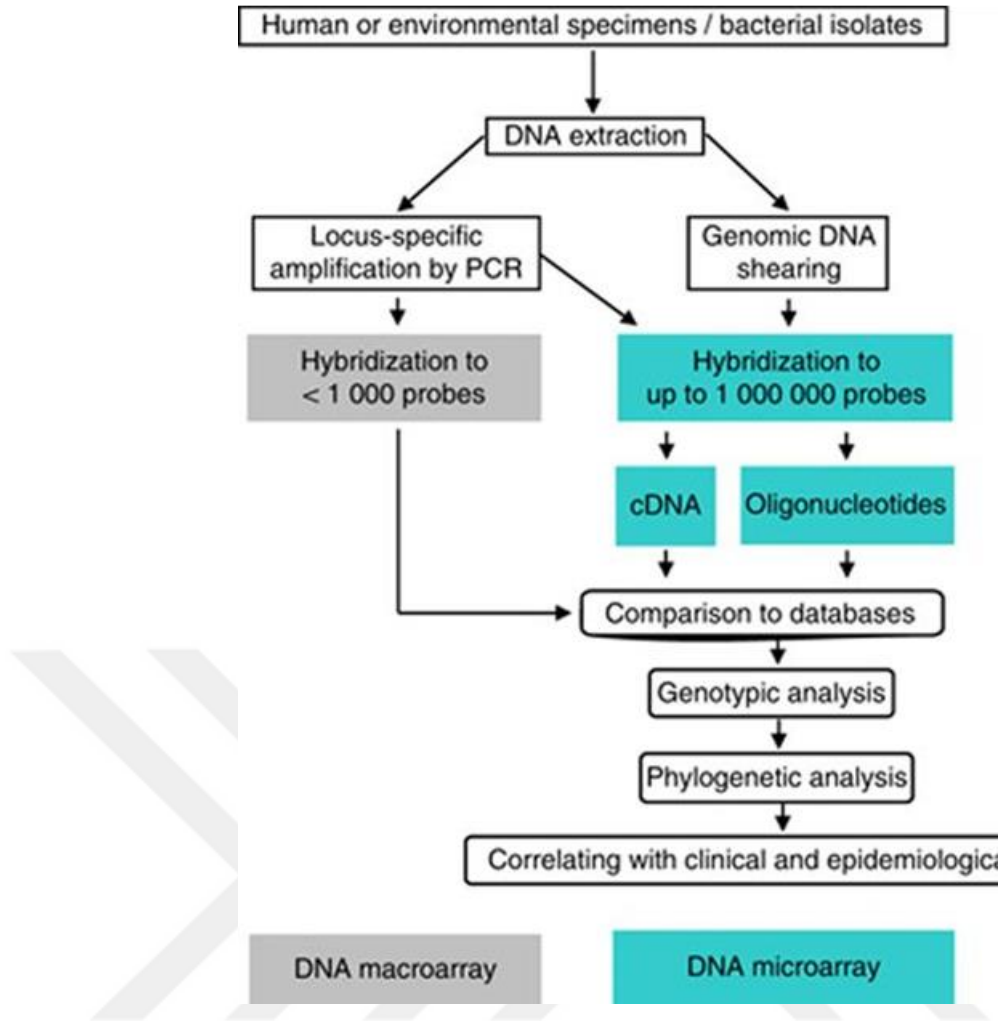
dayalı yöntem de temel olarak DNA makrodizi ve mikrodizi çalışmaları olarak bilinmektedir. Bu teknikte bakteri suşları, DNA'larının bilinen sekanslara sahip problemlere hibridizasyonu analiz edilerek ayırt edilir (c et al., 2016; Li et al., 2009) (3).



Şekil 1. Bakteri alt suşları için DNA bantlama temeline dayalı genotipleme yöntemleri(Li et al., 2009)' den Türkçe'ye çevrilmiştir.



Şekil 2. Bakteri suşları için DNA sekansına dayalı genotipleme yöntemleri(Li et al., 2009)'den Türkçe 'ye çevrilmiştir.



Şekil 3. Bakteri suş ayırımı için DNA hibridizasyonuna dayalı genotipleme yöntemlerinin şeması.(Li et al., 2009)’den Türkçe ’ye çevirilmiştir.

Bakteriyel Alt Suş Gruplamasında Güncel Yaklaşımlar

DNA Bantlama Temeline Dayalı Gruplama Yöntemleri

İncelenen suşlar, genomik DNA'nın çoğaltılması ya da restriksiyon enzimleri (RE) ile DNA'nın belirli bölgelerinden kesilmesiyle oluşan DNA bantlarının (fragmanlarının) büyüklüğündeki değişikliklere göre DNA bantlama tabanlı gruplama yöntemi kullanılarak ayırt edilmesinin mümkün olduğu gözlemlenmiştir (Krawczyk et al., 2016).

Darbeleri alan jel elektroforezi (PFGE)

Agaroz bazlı DNA elektroforezi moleküler biyolojide en sık kullanılan tekniklerden biridir. Pratik çözünürlük aralığı yaklaşık 50 kb'ye kadar olması DNA moleküllerini doğrudan genomik analiz yapılmasını sınırlaması bu yöntemin dar boğazıdır. 1983'te Schwartz ve Cantor bahsedilen sınırlamalara çözüm olarak PFGE'yi geliştirmişlerdir. (Herschleb et al., 2007) Böylece darbeleri alan jel elektroforezi (PFGE), moleküler gruplama yöntemlerinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Bu yöntemin temelinde 10 kb–10 Mb aralığında olan büyük DNA moleküllerini ayırmak için kullanılan bir elektroforetik teknik olması yatmaktadır (Schwartz & Cantor, 1984).

RE'ler, PFGE'de büyük DNA fragmanları oluşturmak için kullanılır ve bu yöntemin en önemli faktörlerinden biridir. Çünkü RE'ler kullanılarak DNA'nın belirli bölgelerden kesilmesi ile oluşturulan DNA bantlarının boyutundaki farklılıklara dayalı olarak incelenen suşların ayrımını yapması da bu yönteme özgüllük katarak klasik jel elektroforez yönteminden daha avantajlı hale getirmektedir (K. W. Chen et al., 2005; Krawczyk et al., 2016). Ancak bahsedilen yöntemin avantajların yanı sıra bazı sınırlamaları ve geliştirilmesi gereken yönlerinin olduğu açıktır (Lee et al., 2006). Bunlardan bazıları; analizin tamamlanması için gereken süredir. Prosedür adımları basit olsa da prosedürü tamamlamak için gereken süre 2-3 gün olabilir ve laboratuvar ortamında çok sayıda numuneyi analiz etme yeteneğini azaltabilir. Ek olarak, yüksek kaliteli DNA gerektirir, neredeyse aynı boyuttaki bantları ayırt etme konusunda çözünürlük gücünden yoksun olabilir (Krawczyk et al., 2016; Lee et al., 2006). Bu sınırlamalarla beraber geliştirilmesi ön görülen detay şöyledir; bakteri gruplamasına yönelik protokollerin standardizasyonunu ve ayrıca PFGE modellerinin küresel karşılaştırması için çevrimiçi veri tabanlarının geliştirilmesini gerektirir (Schwartz & Cantor, 1984)

Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP)

RFLP analizi, DNA sekansındaki varyasyonların tespiti için yaygın olarak kullanılan tekniklerden biridir ve tek nükleotid değişikliğinin tespiti için en basit yöntemdir. Bu yöntemde

Çalışılmak istenen türün varyant bölgesini içeren hedef bölgenin PCR amplifikasyonunu ve ardından RFLP modellerini görselleştirmek için restriksiyon endonükleaz enzimi ve jel elektroforezini temel almaktadır. İncelencek lokus gene spesifik primerlerle amplifiye edilir ve RFLP analizine tabi tutulur (Atoui & Khoury, 2017). DNA fragmanları bir agaroz veya küçük poliakrilamid jel üzerinde ayrılır, etidyum bromür boyamanın ardından görselleştirilir. Ayrıca bu yönteminde dar boğazından biri olan RE'lerin sıklıkla kesilmesiyle genomik DNA yüzlerce kısa fragmanı üretebilir, bu da agaroz jel elektroforezi kullanılarak fragmanların net bir şekilde ayrılmasını zorlaştırır (Krawczyk et al., 2016; Li et al., 2009).

Tekrarlayan sıralamaya dayalı PCR (REP-PCR)

Tekrarlayan sıralamaya dayalı PCR (rep-PCR), bakteriyel izolatları sınıflandırmak için temel olarak genomik parmak izine dayanır ve bu yöntem, genom boyunca dağılmış, kodlamayan intergenik tekrarlayan bölgelere hibridize olan primerleri kullanır. Bu zellik rep-PCR' a tekrarlanabilir avantajlar sunar (Hossain et al., 2022). DNA fragmanlarının tespiti ise, agaroz jel elektroforezi veya kapiler elektroforezi ile elde edilir (Sciacchitano, 1998).

Bu yöntemi avantajlı kılan belli başlı özelliklerinden bazıları şöyledir; düşük maliyet ve hızlılık, kullanım kolaylığıyla beraber fazla emek istememesi nedeniyle REP-PCR, bakteri suşlarının tiplendirilmesi için değerli bir yöntem olduğu savunulmaktadır. Avantajlarının yanı sıra bu yöntemin dezavantajlarından da bahsetmek mümkündür. Kısaca, REP-PCR'nin diğer PCR bazlı analizlere göre kısıtlama olarak görülen yönleri şöyledir; kontaminasyon potansiyeli, artefaktlar ve çoklu kontrol ihtiyacıdır (Li et al., 2009; Shutt et al., 2005).

Çoklu lokuslu değişken sayılı tandem tekrar analizi (MLVA)

Bu yöntem, art arda tekrarlayan DNA elemanlarına dayanmaktadır (Possomato-Vieira, Jos S. and Khalil & Modeling, 2017). Bu tekrarlar birbirine doğrudan bitişik olduğundan ve aynı lokustaki sayıları izolatlar arasında farklılık gösterdiğinde ise ilgili genomik bölgelere değişken sayılı tandem tekrar (VNTR) lokusları adı verilir. Uygulanması en basit MLVA testinde, özenle seçilmiş bir dizi VNTR lokusu multipleks PCR ile amplifiye edilir ve ampikonların analizi standart agaroz jel ile gerçekleştirilir (Possomato-Vieira, Jos S. and Khalil & Modeling, 2017; A. Sabat et al., 2003). MLVA, genom içindeki çoklu değişken sayılı tandem tekrar (VNTR) lokuslarındaki tandem tekrarların veya kopya birimlerinin sayısını belirler (4). MLVA'nın temel dar boğazı, evrensel bir yöntem olmamasıdır; bu, her patojenik tür için özel olarak tasarlanması gereken özel primeler ve tekrar birimlerinin tam sayı belirtecek kadar hassas olması gerektiği anlamına gelmektedir (Li et al., 2009; Possomato-Vieira, Jos S. and Khalil & Modeling, 2017; A. Sabat et al., 2003).



Şekil 4. Değişken sayıda ardışık tekrar eden (VNTR) lokusunun klasik şema gösterimi. (Possomato-Vieira, José S. and Khalil & Modeling, 2017)’den Türkçe ’ye çevirilmiştir

Denatüre edici jel elektroforezi (DGE)

Denatüre edici jel elektroforezinde temel mantık, aynı uzunluktaki PCR ampliconları poliakrilamid jellerde elektroforez ile ilgili sekansa bağlı olarak ayrılmasıdır. Bu analiz için 16S rRNA geni, yaygın olarak görülen hedef genidir. Çünkü bu gen tüm bakterilerde bulunur ve çalışılan suşlar hakkında önceden bilgi sahibi olunmadan kolayca çoğaltılabilir. Seçilen bantların sıralanabilmesi bu yöntemin ayrıcalıklarındandır ve çok sayıda mikroorganizma eş zamanlı olarak incelenebilir. Bu ayrıcalıklara ek olarak bu yöntem istatistiksel yöntemlerin uygulanabilmesi de yöntemin uygulanabilirliği bakımından avantaj sağlamaktadır. Bütün bu avantajların yanı sıra dezavantajına bakacak olursak o da şu şekilde ortaya çıkmaktadır; ayrıca elektroforez ekipmanı gerektirir ve her işlemde birden fazla jelin çalıştırılmasının da mümkün olmadığı ortaya çıkmaktadır (Fromin et al., 2002; Li et al., 2009).

Güçlendirilmiş parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP)

Çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP) yönteminde genomik DNA, iki kısıtlama enzimi ile kesilir ve çift sarmallı adaptörler, kısıtlama parçalarının yapışkan uçlarından birine spesifik olarak bağlanır. Bağlanılan bölgeler, 5' ucundaki adaptör dizilerinden oluşan primerlerle amplifiye edilir ve seçilen değişken sayıda 3' ucundaki nükleotid (genellikle 1-3 bp) ile genişletilir (Krawczyk et al., 2016; Li et al., 2009; A. J. Sabat et al., 2013).

AFLP tekniği, aynı zamanda çeşitli kaynaklardan DNA'nın genomik parmak izinin alınması için de oldukça uygun bir tekniktir ve kullanımı yaygındır. Literatürde sıkça bahsedildiği üzere AFLP, yüksek ayırım gücü ve tekrarlanabilirliği ile bakterilerin tür ve suş seviyelerinde sınıflandırılması için değerli bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır (Jarraud et al., 2002; Krawczyk et al., 2016).

DNA Dizilimine Dayalı Yöntemler

Sanger yöntemi

Sanger yönteminin temelde dideoksi dizilimi veya zincir sonlandırma DNA dizilimi olarak tanımlanmaktadır. Bu dizilimin amacı, artan zincir uzunluğuna göre DNA polimeraz sentez ürünlerinin poliakrilamid jellerin kullanılarak ayrılmasıdır. Sanger yöntemi, 1974 yılından bu yana en yaygın kullanılan DNA dizileme yöntemi haline gelmiştir. Ancak son zamanlarda, daha düşük maliyetle çok daha yüksek verim sunan yeni DNA dizileme yöntemlerinin geliştirilmesi Sanger yöntemini birkaç basamak geride bırakmaktadır. Bu yöntemlerden en dikkat çeken yöntem pirosekanslamadır (Hutchison, 2007; Li et al., 2009).

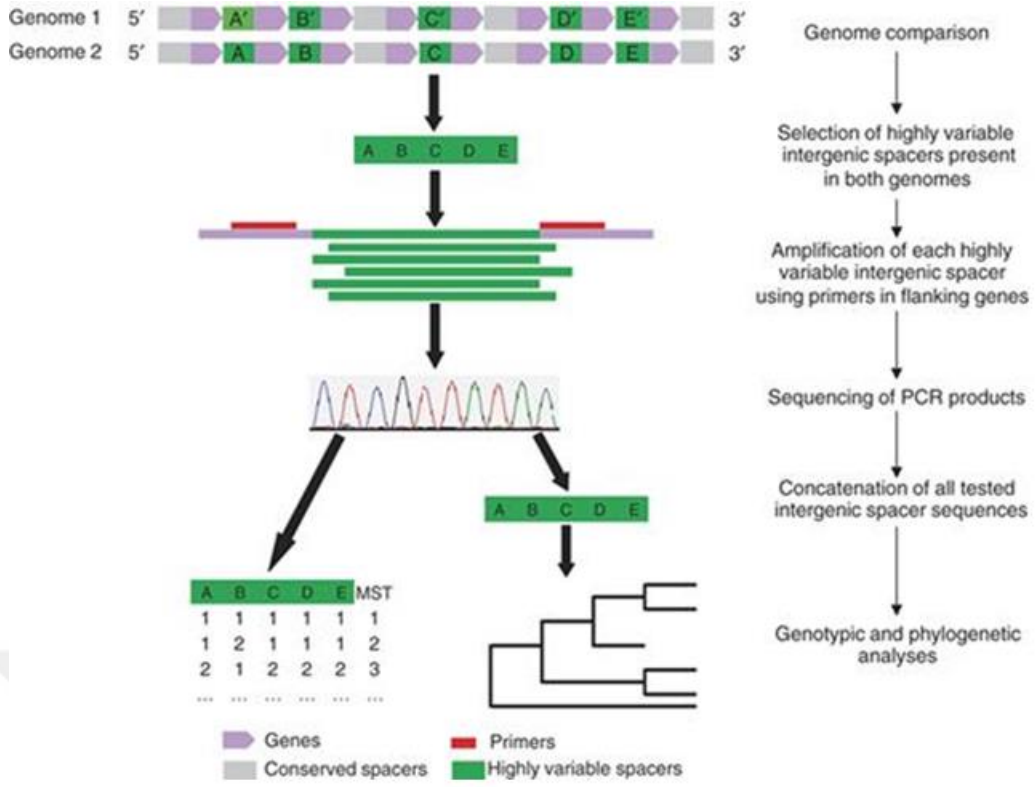
Geliştirilen ve dikkat çeken yöntemler ile kıyaslırsak Sanger yöntemi, pahalı olması ve genom dizilimleri gibi büyük dizilimler için klonlama aşaması gerektiriyor olması gibi dezavantajlara sahiptir. Hem maliyet hem de zaman konusunda bize istenilen imkanı sunmamaktadır (Hutchison, 2007).

Pyrosequencing

Pirosekanslama, DNA sentezi sırasında uzayan DNA zincirine nükleotidin dahil edilmesinin ardından salınan pirofosfatın gerçek zamanlı kantitatif tespitine dayanmaktadır. Bu yöntem Sanger yönteminin tersine elektroforetik olmayan bir sıralama yöntemidir. Genomik DNA fragmanları, agarozun yüzeyine hibridize edilir ve daha sonra emülsiyon PCR ile amplifiye edilir. Amplifiye edilen genomik DNA fragmanları herhangi bir klonlama aşaması olmadan sekanslanmaktadır. Böylece bakteri tanısı için hem maliyet hem de zamandan tasarruf sağlanmış olacaktır (Ahmadian et al., 2006; Drancourt et al., 2004).

Çok aralıklı yazma (MST)

Yeni bir genotipleme yöntemi olan MST, genotipleme belirteçleri olarak oldukça değişken genler arası ayırıcılar kullanmaktadır. Bu da MST yönteminin DNA dizilimine dayalı bir genotipleme yöntemi olduğunun göstergesi niteliğindedir (Drancourt et al., 2004; Li et al., 2009). MST'de genotipleme belirteçleri olarak kullanılan değişken belirteç olan intergenik aralayıcılar, bakterinin alt suşlarından hizalanmış genomları arasında veya yakın ilişkili türler arasında en fazla değişiklik gösteren kodlanmayan diziler olarak seçilmektedir. Bunlara ek olarak PCR bazlı bir teknik olması ve kültürü yapılmamış numunelerde doğrudan kullanılma potansiyeline sahip olması bu yöntemin temel avantajlarından biridir. (5).



Şekil5. MST'nin temel mantığını aktaran şema(Li et al., 2009)'den Türkçe 'ye çevrilmiştir.

DNA hibridizasyonuna dayalı yöntemler

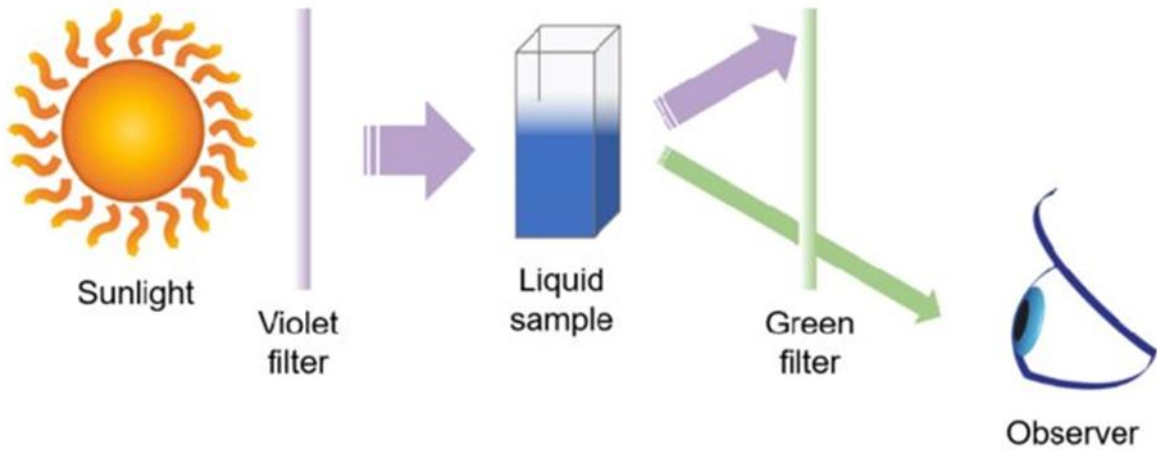
DNA hibridizasyonu, mutasyonları tespit etmek için yaygın olarak kullanılır. DNA hibridizasyonunda iki temel unsur olarak karşımıza problemler ve hedefler çıkmaktadır. Bunların ne olduklarına ve işlevlerine bakacak olursak problemler; bilinen dizinlerin DNA fragmanlarıdır. Hedefler ise, serbest nükleik asitlerdir. Bunun DNA hibridizasyonundaki işlevi ise nükleik asitlerin tamamlayıcılıklarına dayalı olarak floresan etiketli problemlerle hibridizasyon yoluyla kimliği ve miktarı tespit edebilmesidir (Li et al., 2009)(Şekil 3).

Genel olarak alt suş tiplendirmesinde; daha hızlı, maliyeti az, tekrarlanabilir ve bilgisayar destekli tasarım/analize olanak sağlayan sistemlere doğru yönelmenin olduğunu görmekteyiz. Bunun sonucunda da giderek biyoinformatikten daha fazla yararlanıldığı görülmektedir. Bu durum daha fonksiyonel çalışmayı desteklemektedir. Bütün bu avantajlar kullanılarak tiplendirme için yeni sistemler tasarlanabilmektedir (Şekil 3).

Klasik Raman Spektroskopisi

Tarihçesi ve Temel teorisi

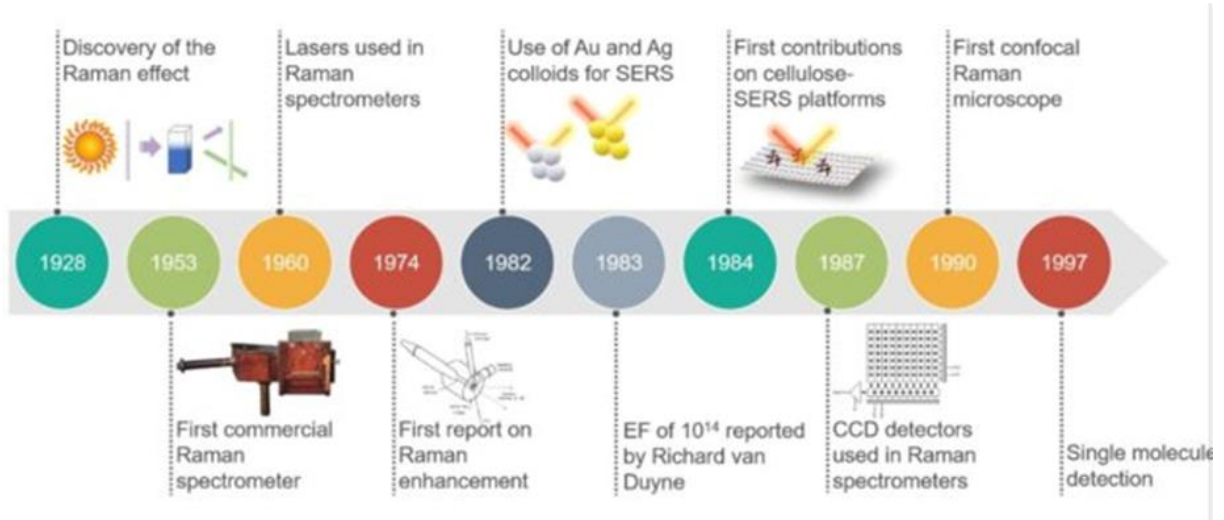
Raman saçılımı teorik olarak 1923 yılında Smekal tarafından ortaya konmuş ve 1928 yılında Raman ve Krishnan tarafından deneysel olarak gözlenmiştir. 1930 yılında ise Dr. Raman "ışığın saçılması konusundaki çalışmaları ve kendi adını taşıyan etkiyi keşfi" nedeniyle Nobel fizik ödülüne layık görülmüştür. Dr. Raman güneş ışığını kullanarak yaptığı ilk deneyi şu şekilde gerçekleştirmiştir. Güneş ışığı optik sistemlerle odaklanıp, ışık şiddeti artırılmış ve örnekten saçılan fotonlar filtrelerle ayrılarak çıplak gözle görünür hale getirilmiştir. Böylelikle inelastik saçılmanın varlığı göstermiştir (Şekil 6). Bu bulgular Raman etkisi veya Raman saçılması (inelastik saçılma) olarak adlandırılmıştır. Raman etkisinden kaynaklanan bu sinyallerin ölçülmesi ve analiz edilmesi ile Raman spektroskopisi geliştirilmiştir (Mitsutake et al., 2019).



Şekil 6. Dr. Raman'ın güneş ışığı kullanarak yaptığı ilk deneyin şematik gösterimi. (Marques et al., 2022)'den Türkçe 'ye çevrilmiştir.

Raman spektroskopisi ile ilgili çalışmalar 1960'lı yıllara kadar pek ilerleme kaydedememiştir. Bunun temel sebebi olarak hassas optik ve dedektör sistemlerinin olmayışı ve var olan sistemlerin de yüksek maliyetlerde olmasıdır. Bu durum Raman sisteminin gelişimine olumsuz katkıda bulunmuştur. İlerleyen dönemlerde teknolojinin gelişmesiyle beraber elektronik sistemler gelişmiş ve bununla beraber hassas, hızlı ve uygun maliyetli cihazlar geliştirilmiştir. Böylece Raman spektroskopisi birçok bilim insanının ulaşabileceği bir teknik haline gelmiştir. Ulaşılabilirliğin getirdiği en önemli avantaj ise geliştirilmeye açık hale gelmiş olmasıdır. Tarihsel sürece bakacak olursak, 1960 yılından sonrasında Raman

spektroskopisinin gelişimi lazerin icadı ile gelişmeye başlamış ve bu keşfinde eksik yönlerinin giderilmesine yönelik çalışmalar üzerinde durulmasıyla beraber SERS yaklaşımının keşfedildiği görülmektedir. Günümüzde hala yaygın şekilde kullanılan Raman spektroskopisi kayda değer bir ilerlemeyle beraber hemen hemen bütün bilimsel alanlarda kullanılmaktadır (Casadio et al., 2016; Marques et al., 2022; Orlando et al., 2021) (Şekil 7).

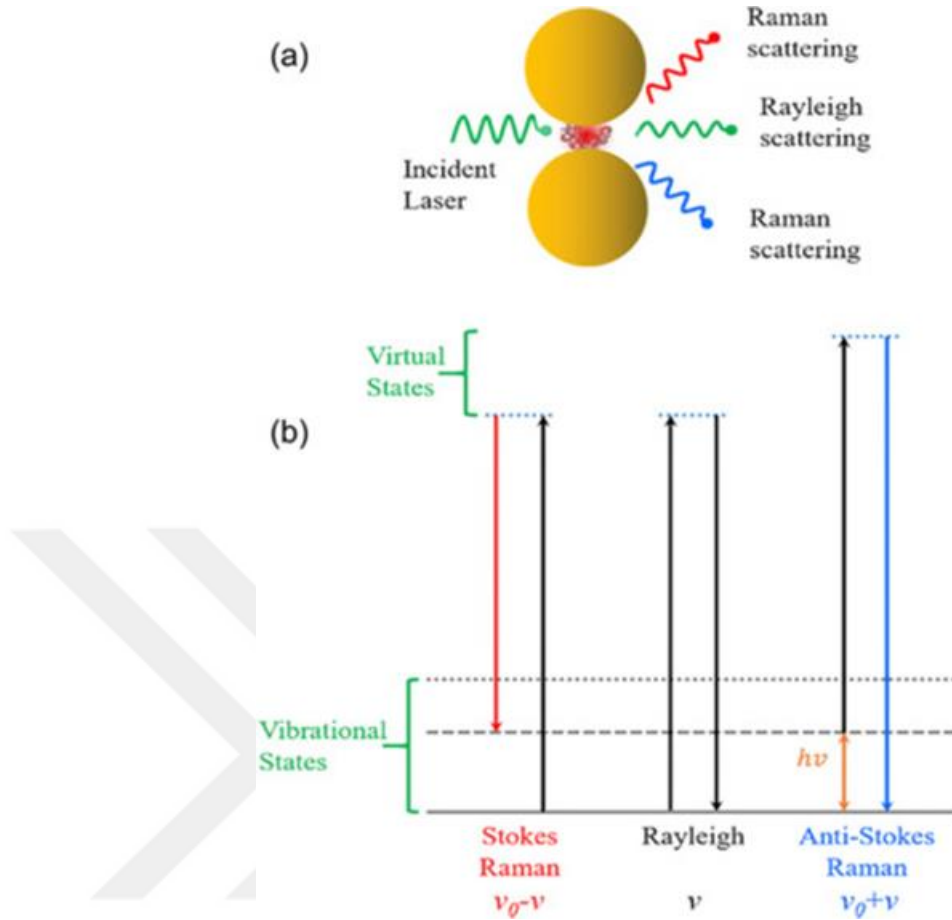


Şekil 7. Raman spektroskopisinin tarihsel gelişim süreci (Marques et al., 2022)’ den Türkçe ‘ye çevrilmiştir.

Raman Spektroskopisi Temel Teorisi

Raman spektroskopisi, çeşitli numunelerin analizi için çok yönlü bir saçılma yöntemidir. Saçılan radyasyonun çok küçük bir kısmının frekansı, tek renkli gelen radyasyonun frekansından farklıdır. Molekül tek bir dalga boyuna sahip (monokromatik) ışıkla uyarıldığında zaman iki tür saçılma gerçekleşir: Elastik ve Elastik olmayan saçılma (inelastik) (*Principles of Instrumental Analysis - Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - Google Kitaplar*, n.d.). Elastik saçılma, saçılan fotonun enerjisi ile gelen fotonun enerjisi eşleşiyorsa ve ilgili elektron başlangıçtaki enerji seviyesine geri dönüyorsa saçılma elastiktir. Bir başka deyişle Rayleigh saçılması olarak da adlandırılır. Elastik olmayan saçılma (inelastik) ise, saçılma sırasında fotonun enerji kaybı veya kazancı oluşur. Bu durum gelen ışığın enerjisi ile saçılan ışığın enerjisi arasındaki farka dayanmaktadır. Enerji fotondan moleküle aktarılırsa, saçılan fotonun enerjisi daha düşük ve dalga boyu daha uzun olur ve bu duruma Stokes saçılması denir. Bunun tersi meydana gelirse buna anti-Stokes saçılması denilmektedir. (Şekil 6) Saçılan fotonların bir kısmı enerji kazanır veya kaybeder bu enerji farkı ise “Raman

kayması (Raman shift)” olarak adlandırılmaktadır (Long et al., 2022; Mitsutake et al., 2019; Orlando et al., 2021) (Şekil 8).



Şekil 8. Molekülün ışık ile uyarılması sonucu meydana gelen enerji değişimleri.(Long et al., 2022)’den Türkçe ’ye çevrilmiştir.

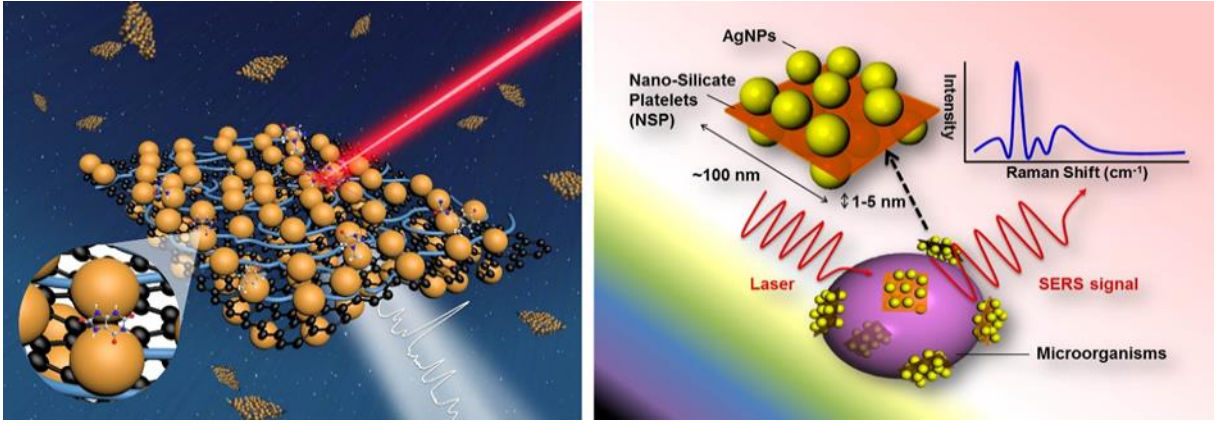
Raman spektrofotometresinde çoğunlukla lazer ışın kaynakları kullanılmaktadır. Bunlardan, Argon iyonu (488.0 ve 514.5 nm), kripton iyonu (530.9 ve 647.1 nm), He: Ne (632.8 nm), Nd: YAG (1064 nm ve 532 nm) ve diyot lazer (630 ve 780 nm) en çok kullanılanlardır. Lazerlerin uygulama alanlarında çeşitli farklılıklar gözlemlenebilir. Daha detaylı inceleyecek olursak; 244 nm biyolojik uygulamalar, 325 nm bant aralığı geniş olan yarı iletkenler, 488 nm ve 514nm oldukça geniş kapsamlıdır ve bu aralıkta biyolojik uygulamalar, katalizörler, yarı iletkenler, polimerler, mineraller, karbon temelli malzemeler, 633 nm korozyon, 785 nm polimerler, biyolojik uygulamalar, genel kullanımlar, 830nm biyolojik uygulamaların kullanımı için uygun koşulları sağlamaktadır (Casadio et al., 2016; Das & Agrawal, 2011).

Raman spektroskopisinin bize sunduğu çeşitli avantajlar vardır. Bunlardan bazıları şöyle özetlenebilir; çeşitli numunelerin analizi için çok yönlü bir saçılma yöntemidir. Saçılan

Radyasyonun küçük bir kısmının frekansı, tek renkli gelen radyasyonun frekansından farklıdır. Titreşen moleküllerle etkileşimi yoluyla gelen radyasyonun elastik olmayan saçılmasına dayanmakla beraber hem nitel hem de nicel amaçlar için kullanılabilir (Principles of Instrumental Analysis - Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - Google Kitaplar, n.d.). Bunlara ek olarak Raman spektroskopisi floresans foto ağarma problemi oluşturmaz, herhangi bir örnek hazırlama prosedürü gerektirmez (etiketleme yapılmadan kullanım) ve daha da önemlisi molekülün yapısına spesifik titreşimleri belirleyebildiğinden kimyasal içeriğin parmak izi (chemical fingerprinting) hassasiyetinde tanısına da olanak sağlar (Day et al., 2004; Kim et al., 2020). Bu avantajlara ek olarak Raman spektroskopisinin belli başlı darboğazları mevcuttur. Genel olarak; bu teknik ile biyolojik örneklerin tanısı birçok avantaja sahip olsa da inelastik ışık saçılmasından kaynaklanan düşük seviyelerde sinyal şiddeti alınması gibi bazı kısıtlamalar oluşturulabilmektedir. Uyarılan bir molekülden saçılan fotonlardan sadece milyonda biri inelastik saçılma oluşturulabilmektedir. Bu durum klasik Raman spektroskopisinde hassasiyetin düşük olmasına neden olmaktadır. Bu hassasiyet sorununa çözüm olması amacıyla Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (Surface-enhanced Raman Spectroscopy, SERS) yaklaşımı geliştirilmiştir (Efrima & Bronk, 1998; C. Wang et al., 2017; Zhu et al., 2013).

Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS)

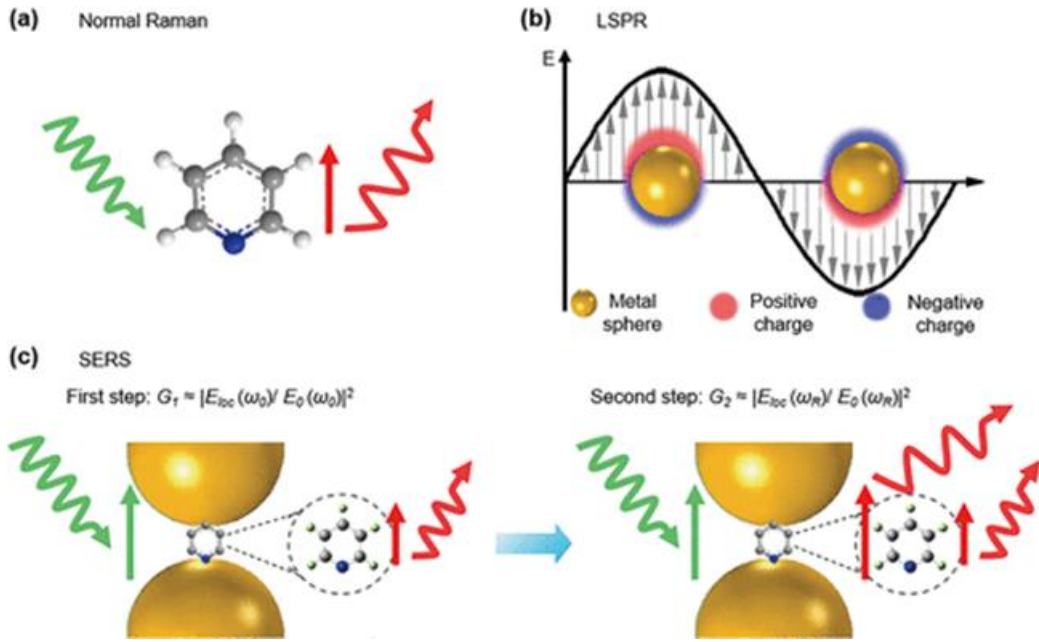
1970'lerin başından bu yana ilgi odağı olan ve geliştirilmekte olan SERS platformları kimya, fizik, tıp ve biyoloji alanlarındaki farklı uygulamalarda kullanılmaktadır. Ayrıca SERS, moleküler bilgiyi metalik nanoyapıların plazmonik özellikleriyle birleştirebilmektedir. Raman etkisi, doğası gereği zayıftır. Çünkü inelastik (esnek olamayan) ışık saçılımına dayanmaktadır. On milyon elde edilen fotondan sadece bir tanesi ($1/10^7$) Raman saçılmasını oluştururken, gerisi Rayleigh (elastik olan) saçılması özelliği göstermektedir. SERS plazmonik yapıdaki nanoparçacıkların kullanılarak (altın, gümüş, bakır) Raman sinyal şiddetinin artırılmasıyla örneklerin daha hızlı ve daha yüksek doğrulukta tespit edilmesini sağlamaktadır (Efrima & Bronk, 1998; Zhu et al., 2013) (Şekil 9).



Şekil 9. Yüzey zenginleştirilmiş Raman saçılması gösterimi.(Tahir et al., 2021)'den Türkçe' ye çevrilmiştir.

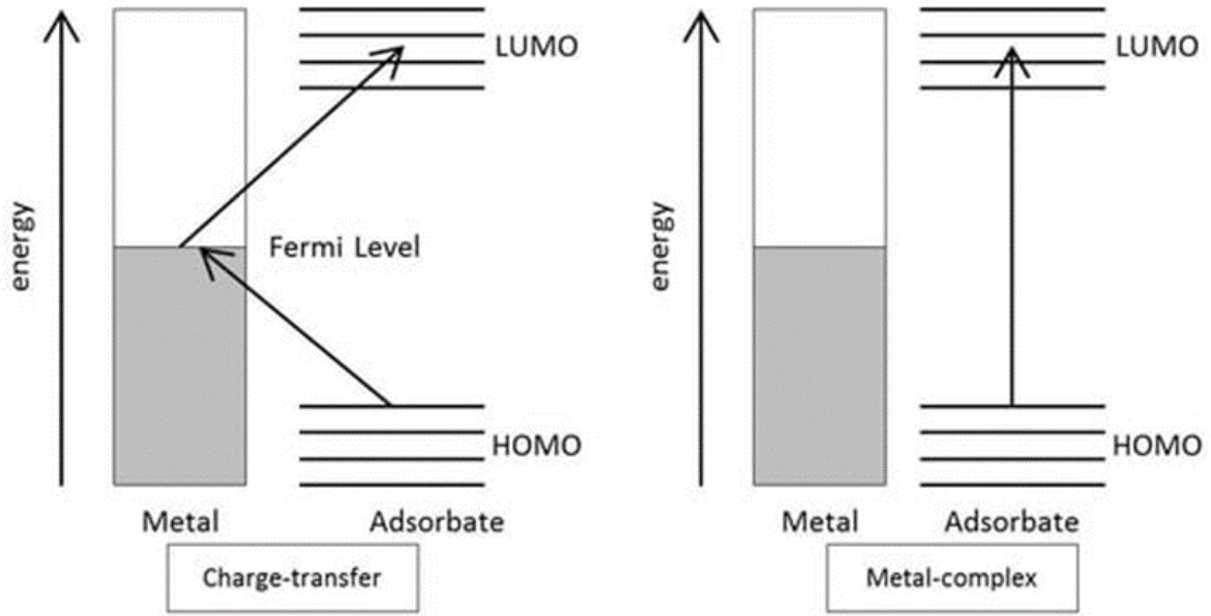
Yeni SERS platformlarının gerçekleştirilmesi, algılama verimliliklerini artırmak ve etkili zenginleştirme mekanizmalarını anlamak için oldukça önemlidir. SERS etkisi temel olarak iki mekanizma ile oluşmaktadır. Bunlar elektromanyetik (Electromagnetic enhancement, EM) ve kimyasal zenginleştirme (chemical enhancement, CHEM) mekanizmalarıdır (Nie & Emory, 1997).

Elektromanyetik zenginleştirme mekanizması (Şekil 10), plazmonik metal ve ışık molekül etkileşiminin birleşimi olarak karşımıza çıkmaktadır. Gelen lazer, arayüzlere (metal ve dielektrik) çarpar, elektromanyetik dalga ve metal nanoyapıların lokalize olmayan elektronlarda salınımlar oluşturur. Böylece gelen ışığın frekansı, metaldeki serbest elektronların doğal salınım frekansı ile eşleştiğinde, yüzey plazmon rezonansı (SPR) meydana gelir. LSPR ise, gelen ışığın emilimine veya saçılmasına yol açacaktır. Bu sistem ile elektronlar salınım yaparak elektromanyetik zenginleştirmeyi oluşturur ve zenginleştirme faktörünü 10^{12} kat artırdığı gözlemlenmektedir. (Kahraman et al., 2011; Mitsutake et al., 2019; Stiles et al., 2008; Zong et al., 2018) (Şekil 10).



Şekil 10. Lokalize yüzey plazmon rezonans uyarılması. a) Klasik Raman gösterimi b) Lokalize yüzey plazmon rezonansı, metalik nanopartikül yüzeyi üzerinde oluşan sıcak bölgelerin (hot-spot) gösterimi (LSPR) c) SERS’deki elektromanyetik zenginleştirme mekanizması (Zong et al., 2018)’den Türkçe’ye çevrilmiştir.

İkinci bir mekanizma olan kimyasal zenginleştirmede ise, analit molekülün en yüksek dolu moleküler orbitali (highest occupied molecular orbital, HOMO) ve en düşük dolmamış moleküler orbitali (lowest unoccupied molecular orbital, LUMO) ile metalin Fermi seviyesi arasında kullanılan lazerin enerjisine bağlı olarak olası yük transfer komplekslerinin ortaya çıkmasına bağlıdır (Şekil 11). Bu uyarılma ya metalden moleküle ya da molekülden metale olabilir (Stiles et al., 2008). Son zamanlarda bakteriyel SERS deneylerinde, inorganik tuz tarafından indüklenen çeşitli şekillerde koloidal altın veya gümüş nanopartiküllerin süspansiyonları veya partikül kümeleri, bakteriyel hücrelerle basitçe karıştırılarak SERS etkisini oluşturmak için kullanılmıştır (Kahraman et al., 2009).



Şekil 11. Kimyasal zenginleştirme (chemical enhancement, CHEM) mekanizması. Analit molekülün en yüksek dolu moleküler orbitali (highest occupied molecular orbital, HOMO) ve en düşük dolmamış moleküler orbitali (lowest unoccupied molecular orbital, LUMO) ile metalin Fermi seviyesi. (Chu et al., 2017)’den Türkçe’ye çevrilmiştir.

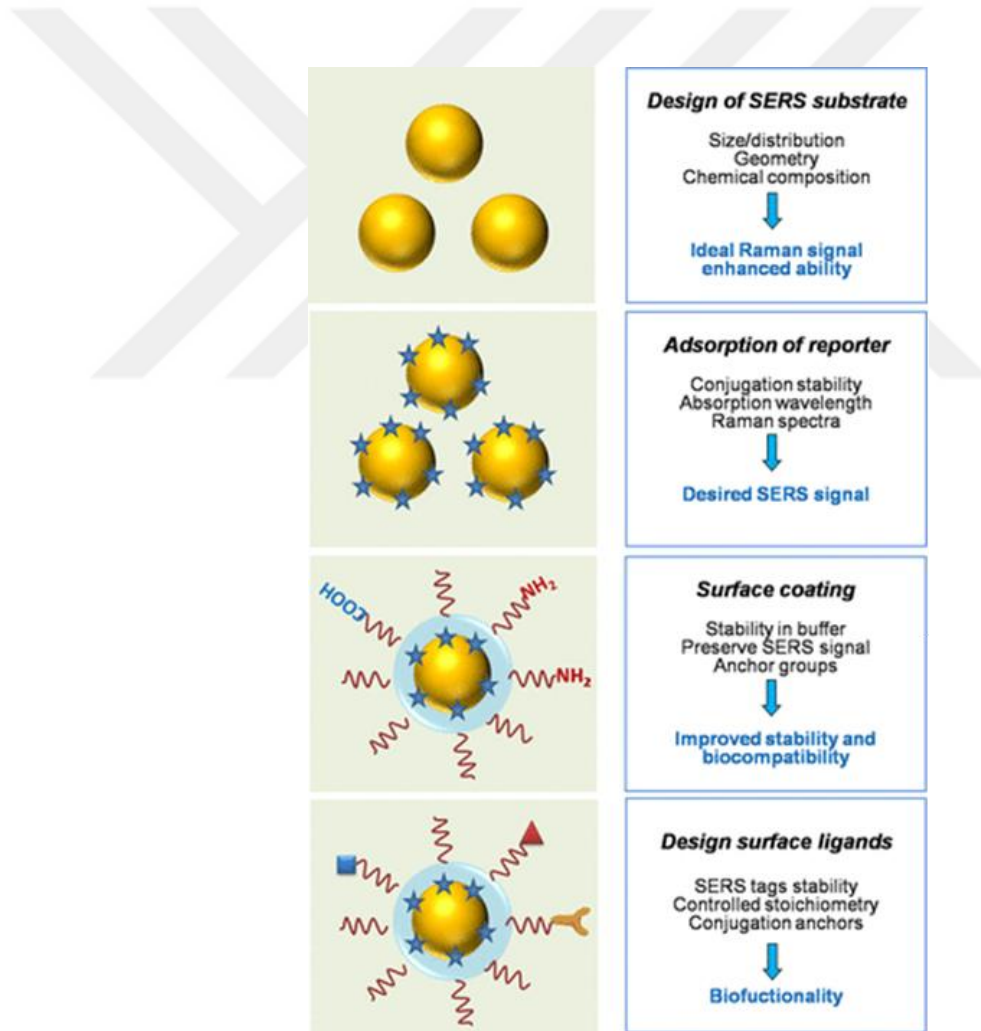
Genel olarak SERS substrat malzemeleri olarak altın, gümüş ve bakır gibi soy metallerin benzersiz yüzey plazmon rezonansı (SPR) etkisinden faydalanılır. Bahsi geçen soy metallerden en yaygın kullanılanı altın ve gümüştür. Ayrıca bu elementlerin antimikrobiyal özellikte olmaları bakteri çalışmaları için ayırt edici özellik taşımaktadır. Fakat gümüş nanopartiküller plazmon rezonans oluşturarak güçlü SERS sinyallerini geliştirir. Gümüş nanopartiküller yüksek toksisite oluşturmaları ve kolay denatüre olması açısından oldukça hassastır ve bu özellikleri dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Altın nanopartiküller ise, düşük toksisite, biyouyumlu olması, kararlı, inert olması gibi birçok avantajından dolayı biyomedikal alanda yüksek öneme sahiptir ve en fazla kullanılan SERS substrat malzemesidir (Mosier-Boss, 2017; K. Yuan et al., 2022).

SERS ve Biyolojik Uygulamalar

Bakteriyel antibiyotik direncinin artması, toplumda endişeye neden olmaktadır ve bu sorun, evrensel açıdan hayati öneme sahiptir. Bakteriyel ve viral enfeksiyonlara neden olan etkenlerin daha hızlı ve yüksek hassasiyetle belirlenmesi SERS sistemleri kullanılarak yapılabilmektedir. Bakteriler için tipik SERS tanısı genellikle iki yöntemle yapılabilmektedir: etiket tabanlı ve etiketsiz yöntem. Her iki yöntem ilerleyen kısımlarda anlatılacaktır (P. Yuan et al., 2018).

Etiketli SERS Yöntemi ile Bakteri Tanısı

Etiketli SERS yaklaşımında, Raman raportör molekülleri kullanılarak dolaylı etkileşim ile biyoanalitlerin titreşimsel spektroskopik parmak izlerinin tanımlanması amaçlanmaktadır. Bu yöntemin temel şemasında dört ayrı adım bulunmaktadır. İlk aşamada, SERS sinyallerini artırmak için genellikle altın veya gümüşten yapılmış nano yapıları bir metalik substrat üretilir. Genellikle toksik olmaması, biyouyumlu olması, kararlı ve inert özelliğe sahip altın (Au) nano yapıları substrat tercih edilmektedir. İkinci aşamada, stabiliteyi ve biyouyumluluğu arttırmak için uygun bir koruyucu tercihi sisteme eklenir. Üçüncü kısımda, SERS parmak izi ile etiketi algılamayı sağlamak için bir Raman raportör molekül metal yüzeye bağlanır. Son aşamada ise olan biyokonjugasyonlar kullanılarak hedefe özgü tanıya olanak sağlayarak tanı molekülleri sisteme entegre edilir. (Tahir et al., 2021) (Şekil 12).



Şekil 12. Biyolojik uygulamalar için etiketli SERS yaklaşımı.(Y. Wang et al., 2013)’den Türkçe’ ye çevrilmiştir.

Etiketli SERS yöntemi, etiketsiz SERS yöntemine göre hassaslık ve tekrarlanabilirlik açısından avantajlıdır. Bu tespitte kullanılan Raman röportör moleküller yardımıyla farklı türlerde tanı yapılabilir (X. Zhou et al., 2020a). Raman röportör molekülleri ise, karakteristik bir özellik olan parmak izi özelliğini sağlayabilen metal nano bazlı malzeme veya sinyal moleküllerinden oluşmaktadır. Yaygın olarak kullanılan sinyal molekülleri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Raman röportör molekülleri (X. Zhou et al., 2020b)’ den Türkçe’ ye çevrilmiştir.

Raman Röportör Molekülleri

4-merkaptobenzoik asit benzen-4

4-ditiol

mezo-tetrafenil porfirin

rodamin 6G

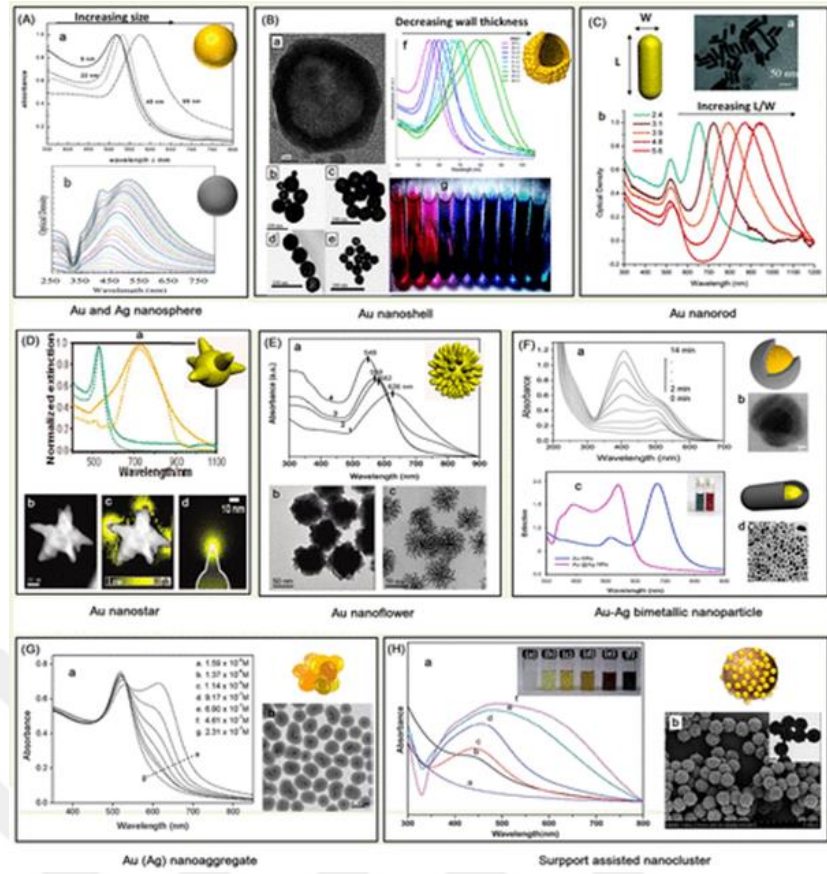
Malahit yeşili

5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoik) (DTNB)

Metilen mavisi

Kristal viyole

Etiketli SERS sistemleri, patojenlerin, mikroorganizmaların, biyomoleküllerin, in vivo görüntüleme gibi birçok alanda spesifik tespitinde başarıyla uygulanmış ve spesifik SERS etiketleri de geliştirilmiştir (H. Chen et al., 2020). Etiketli sistem için bir diğer önemli faktör ise nano substratlardır. Nano substratlar sinyal yükseltici olarak işlev görür ve şekil olarak bakacak olursak, küre, boş Au kabuk, Au çubuk, yıldız şekilli, gümüş kabuk kaplama, boncuklar gibi farklı morfolojilerde olabilmektedir (Şekil 13).



Şekil 13. Etiketli SERS sistemlerinde kullanılan çeşitli nanosubstratlar. a) Au/Ag küre modeli b) Au boş kabuk modeli c) çubuk modeli d) yıldız modeli e) nano çiçek modeli f) Altın gümüş iler kaplama g) Au nanoagregat gömülü boncukları h) kompozit mikroküreler. (Y. Wang et al., 2013)'den Türkçe' ye çevrilmiştir.

Madiyar ve ark., SERS etiketi üretebilmek için QSY21 Raman raportör moleküllerini demir oksit ile kaplanmış altın, çekirdek-kabuk, nano-oval parçacıklar kullanmıştır. SERS etiketinin Raman sinyalini arttırmak ve elektromanyetik zenginleştirme etkisini elde etmek için *Escherichia coli* suşunu *DHA5*'e bağlamışlar ve elde edilen bu kombinasyon ile hızlı bir tanı sistemi geliştirmişlerdir (Madiyar et al., 2015). Zhang ve ark., tarafından yapılan çalışmada hedef bakteri olarak *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* türleri seçilmiştir. Seçilen bakterilerin izolasyonu için prob olarak antimikrobiyal peptit işlevli manyetik nanoparçacıklar ve SERS etiketleri olarak 4-merkapt fenil borik asit ile modifiye edilmiş altın kaplama gümüş grafen oksit nanokompozitleri kullanılması uygun görülmüştür. Bütün bu aşamalar sonucunda izolasyon gerçekleştirilmiş ve bakterilerin tür tespiti başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bakteriyel izolasyon için prob olarak *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* izole edildikten sonra bu bakteri türlerinin tespiti başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Alınan başarılı sonuçlar patojenlerin SERS ile çoklu tespiti alanındaki

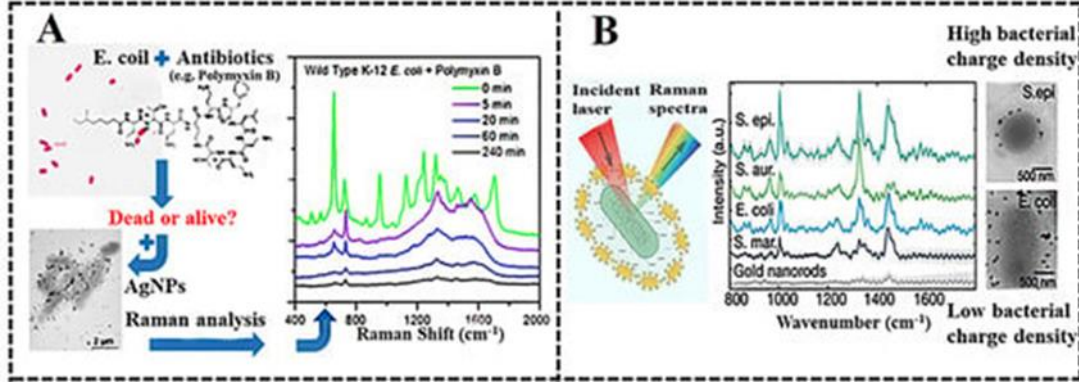
çalışmalara ve potansiyel uygulamalara ışık tutmuştur (Zhang et al., 2018). Pang ve ark., tarafından bakteri hücrelerinin aptamer ve antibiyotik molekülleri tarafından tanımlanmasına dayanan manyetik destekli bir SERS biyosensör sistemi önerilmiştir. Aptamer $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ manyetik nanopartikül üzerinde biriktirilmiştir. Patojenik bakterin hassas tespiti için etiket olarak vankomisin kullanılmıştır. Aptamer- vankomisin ikili tanıma yeteneği sayesinde kısa zamanda hedef ayırma ulaşılmıştır. Bu sayede basit ve hassas bir sensör sistemi oluşturulmuştur (Pang et al., 2019).

Etiketli SERS sistemlerinde plazmonik metal yüzey Raman aktif bir molekül ile etiketlenerek tanı yapılmaktadır. Raman aktif molekülünü yüzeye bağlama zorluğu, molekülün yüzeyden aşınması, foto ağarma ve ek işlem gerektirmesi gibi kısıtlamalar bu yöntemin uygulanmasını sınırlandıran faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır (Mosier-Boss, 2017).

Etiketsiz SERS Yöntemi ile Bakteri Tanısı

Etiketsiz yöntem, her bakteriyel patojenin kendine özgü bir SERS spektrumuna sahip olması nedeniyle, etikete ihtiyaç duymaksızın bakteriyel patojenleri tespit edebilmesi temeline dayanmaktadır (Usman et al., 2023) (Şekil 14). Literatürde genel olarak, etiketsiz SERS platformları ile bakteri tanısında iki farklı yöntem kullanılmıştır. İlk yöntemde bakterilerin üzerlerinde altın ya da gümüş nanoyapılar biriktirilerek SERS sinyalleri alınmıştır. Gümüş nitrat ya da aurik asit, gümüş ve altın tuzları sodyum borhidrit gibi bir indirgeyici ajan varlığında bakteri yüzeyinde nanoyapılar halinde biriktirilmektedir. Efrima ve arkadaşları bu yöntemi *E. coli* ve *B. megaterium* bakterilerinin SERS ile tanısında kullanmıştır (Mosier-Boss, 2017). Kullanılan en yaygın yöntemin, bakterileri bir sodyum borohidrit çözeltisine daldırmak olduğu bilinmektedir. Bakteriler daha sonra bir gümüş nitrat veya kloraurik asit (HAuCl_4) solüsyonunda yeniden süspanse edilmiştir. Bunun sonucunda bakterileri içine alan altın film kalınlığının $\sim 0,05 \mu\text{m}$ olduğu belirlenmiştir (Efrima & Zeiri, 2009). Bu durumda düşük SERS veriminden dolayı her iki bakteriden benzer SERS spektrumları alınmıştır. Holt ve arkadaşları tarafından benzer şekilde yapılan çalışmada ise fotosentetik bakterilerden SERS spektrumları toplanmıştır (Sheldrick et al., 1989). Farklı bir metod kullanılarak bakteriler üzerinde harici bir kolloid hazırlanmıştır. Bir bakteri örneğine de gümüş nitrat çözeltisi eklenmiştir ve 5 dakika sonra, bakteri hücre duvarlarında adsorbe edilen gümüş iyonlarını azaltmak için bir hidroksilamin hidroklorür çözeltisi eklenmiştir. Borohidrit preparasyonu, bakteri hücrelerini tamamen içine alan bir Ag/Au kaplaması oluştururken, altın nanopartiküllerin kümelerinin hücre duvarı ile temas halinde olduğu gözlenmiştir (H. Zhou et al., 2014). Zhou ve ark., 633 nm'lik uyarma dalga boyunda *Escherichia coli*'nin SERS sinyallerini hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit etmek ve SERS haritalamasını kullanarak canlı ve ölü bakteriler arasında ayırım

yapılmak istemiştir (Şekil 14a). Bu ayırım için SERS substratı olarak AgNP kullanılmıştır. Bu yöntem sonucunda, *Escherichia coli*'nin hastalık etmeni olan suşları ve antibiyotiğe direnç kazanmış bakteri suşları SERS yöntemi ile başarılı bir şekilde ayırt edildiği gözlemlenmiştir (Usman et al., 2023). Tadesse ve ark., beş farklı boyutta altın nanoçubuklar sentezleyip, SERS yaklaşımını kullanarak dört ayrı bakterinin ayırımı yapmıştır (Tadesse et al., 2020) (Şekil 14b).

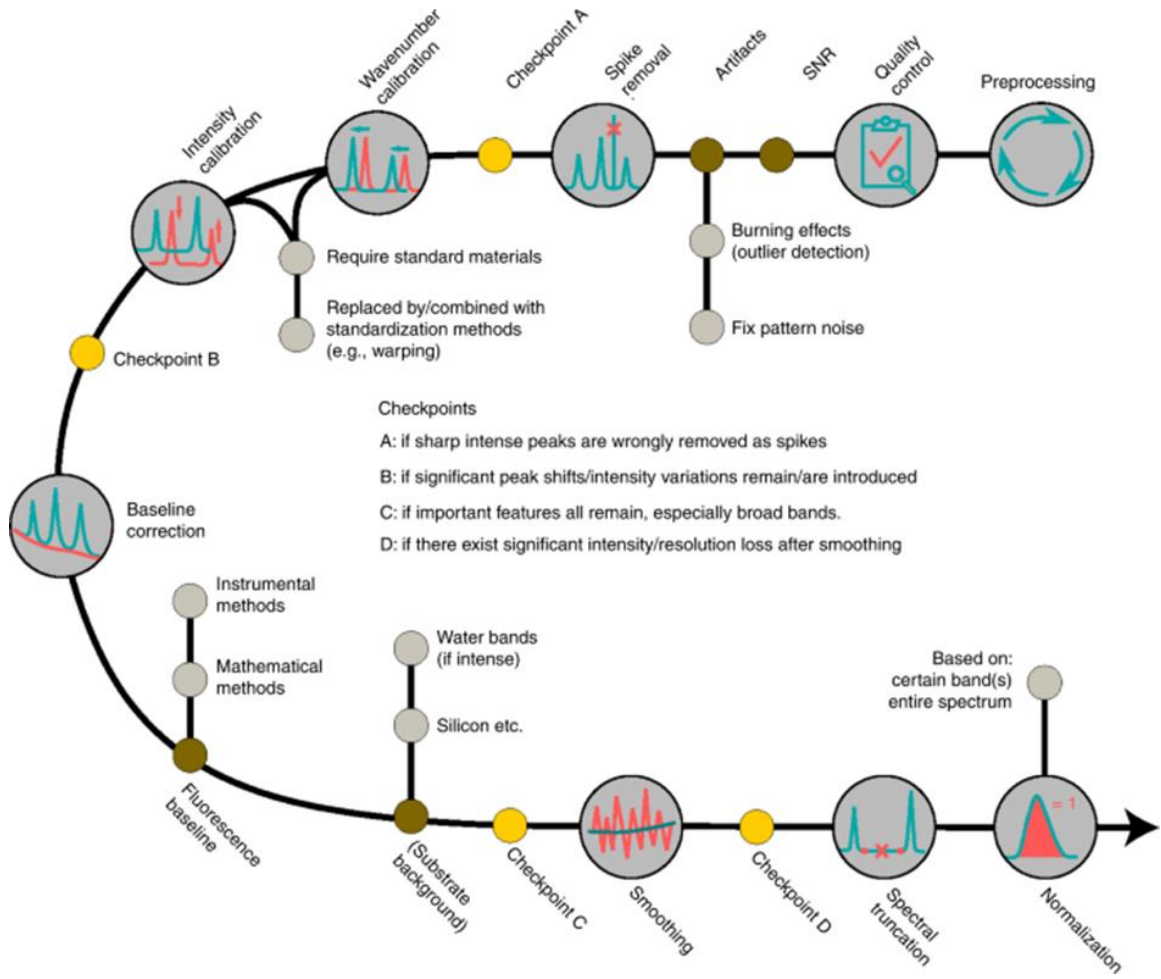


Şekil 14. Etiketsiz yöntem ile bakteri tanısı. a) SERS sinyalleri ile canlı ve ölü bakteri tespiti. b) Altın nanorod parçacıkları kullanılarak dört farklı bakterinin SERS tespiti.(Tadesse et al., 2020)’den Türkçe’ ye çevrilmiştir.

Norouz Dizaji ve ark. yaptıkları çalışmada, SERS platformu olarak altın nanorod dizileri (GNA'lar) ve kolloidal altın nanopartiküllerin (AuNP'ler) bir kombinasyonu ile vankomisine dirençli bakteri türü olan gram pozitif bakterileri spesifik olarak tespit etmeye çalışmışlardır. Yaptıkları bu çalışmadan oldukça başarılı sonuçlar almışlardır. Alınan bu sonuçların doğruluğunu da kemometrik analizler ile desteklemişlerdir (Norouz Dizaji et al., 2021). Biyomimetik gibi doğadan elde edilen malzemelerin (midye kabuğu, taro yaprağı, ağustos böceğinin kanatları vb.) homojen üç boyutlu nano yapıları, SERS substratlarının hazırlanmasında kullanılmıştır. Yuan ve ark., doğal midye kabuğunu kullanarak SERS substratı geliştirmişlerdir. Metalik nanopartiküllerin doğal malzemelerin 3D yapılarıyla kombinasyonu ile tekrarlanabilir ve yüksek verimli SERS sinyalleri elde edilmiştir. Bu çalışma sonucunda, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* ayırımı için başarıyla uygulanabilir hale geldiği gözlemlenmiştir (K. Yuan et al., 2018).

SERS Verilerinin Ön İşlenmesi

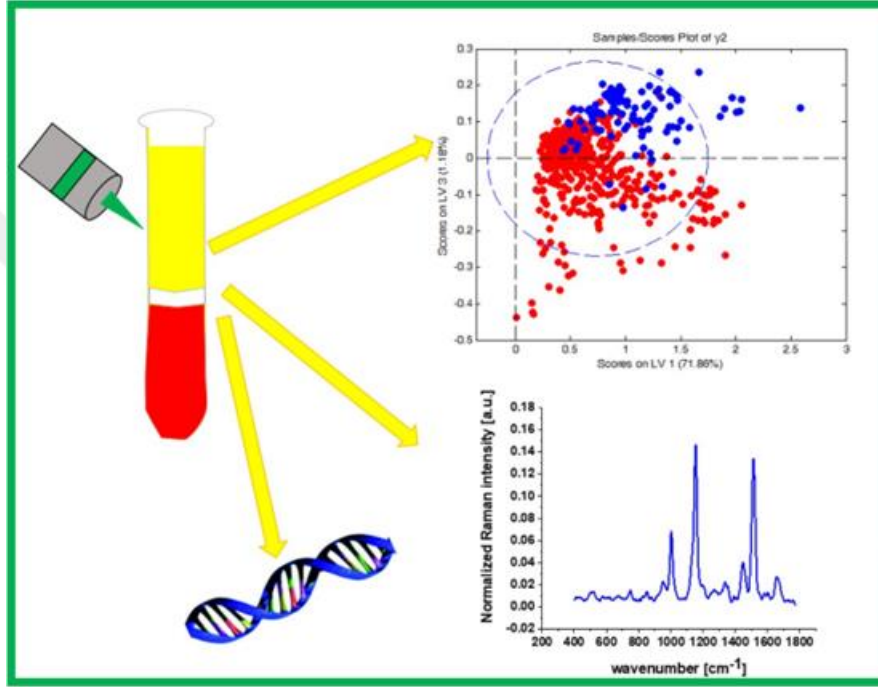
Raman spektrumlarının analizi, ölçülen spektrumların işlenmesi ile başlamaktadır. Elde edilen Raman spektrumlarının ön işlemeye tabi tutulmadan ham veriler ile yapılan işlemler, işlenmiş verilere kıyasla anlaşılması zor ve güvenilir analiz yapılması açısından da dezavantaj oluşturmaktadır. Bu nedenle verilerin ön bir işleme tabi tutulması gerekmektedir. Ön işlemenin sunduğu avantaj ise boyutu düşürerek çok fazla sayıdaki verinin sebep olduğu kompleks yapıyı ortadan kaldırmaktır. Verilerin ön işleme basamakları, taban düzeltmesi (baseline correction), düzgünleştirme (smooth) ve normalizasyon (normalization) aşamalarından oluşmaktadır (Ryabchykov et al., 2019) (Şekil 15).



Şekil 15. SERS verilerinin ön işleme basamakları. (Guo et al., 2021)'den Türkçe' ye çevrilmiştir.

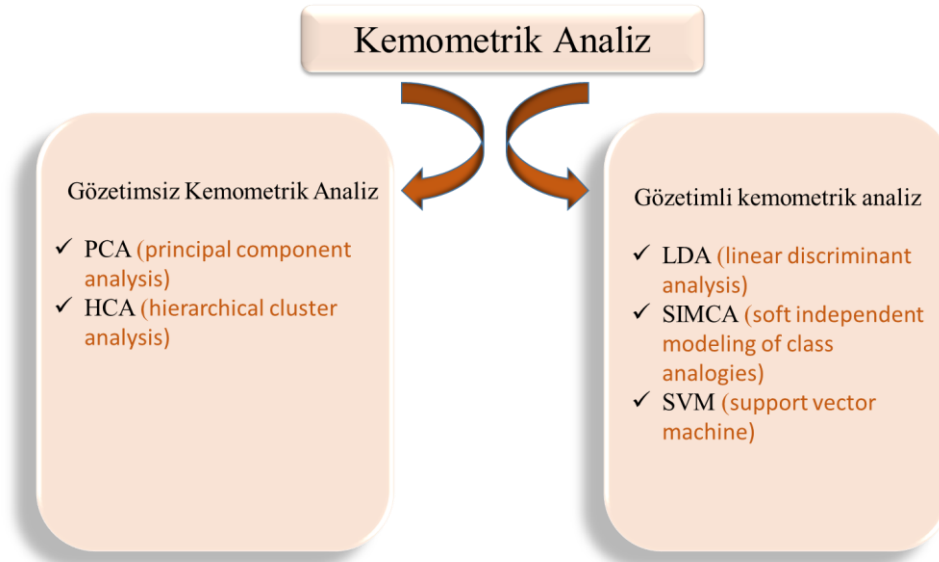
SERS Verilerinin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Kemometri, optimal koşullarda ölçüm için gerekli olan prosedürleri ve deneyleri tasarlamak veya seçmek ve verileri analiz edecek maksimum kimyasal bilgiyi sağlamak için elde edilen verileri görselleştiren matematiksel, kimyasal ve istatistiksel bir yöntemdir (Şekil 16). Bu ölçüm yöntemleri, çok değişkenli veri analizlerine (multivariate data analysis, MVA) dayanır ve tek bir spektrum yerine tüm SERS spektrumların kullanılmasına olanak sağlar(Kowalski, 2008).



Şekil 16. SERS sinyalleri ile elde edilen verilerin kemometrik analizi gösterimi.(Kopec et al., 2022)' den Türkçe' ye çevrilmiştir.

Kompleks ve karmaşık SERS verilerinin boyutu düşürülerek daha anlaşılır ve yorumlanabilir hale getirilmektedir (Ryabchykov et al., 2019). Bu yorumlanabilir hale gelen SERS verileri iki yaklaşım ile kategorize edilebilir (Şekil 17).



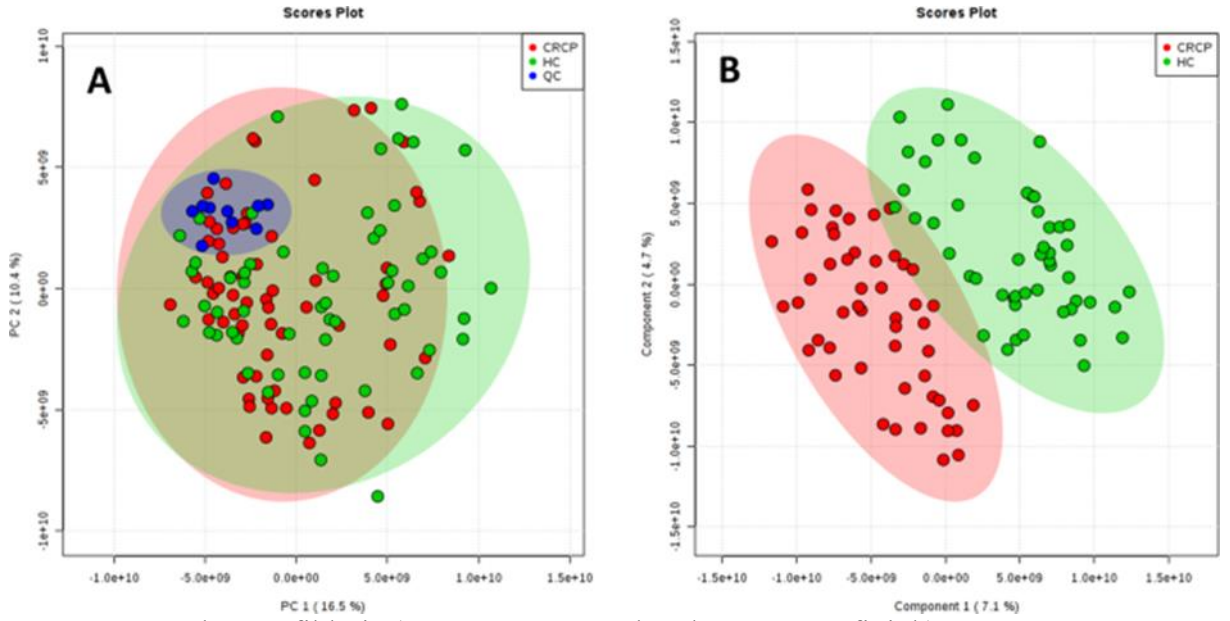
Şekil 17. Kemometrik analizin şematik gösterimi.

Gözetimsiz Kemometrik Analizler

Gözetimsiz kemometrik analiz, benzer örneklerin önceden başka bir bilgi kullanılmadan yeniden gruplandırılmasını amaçlayan sınıflandırma veya kümeleme yöntemleri olarak adlandırılan ve çok çeşitli bilgiler içeren kalitatif yöntemlerdir. Bu analizde en çok kullanılan yöntemler PCA (principal component analysis) ve, HCA (hierarchical cluster analysis) analizleridir (Zhu et al., 2013).

Temel bileşen analizi (principal component analysis, PCA)

PCA, az sayıda faktör kullanarak veri setindeki varyasyonu yani örnekleri karakterize etmek için kullanılan matematiksel bir araçtır. PCA, veri setlerinin boyutunun düşürülmesinde en çok kullanılan yöntemlerdir. Verilerin anlamlı varsayılabilmesi için 1'den yüksek değere sahip olmalıdır. Bu veriyle PC sayısı da tanımlanabilmektedir. Grafikleri yorumlamada temel kavramlar şöyledir, x-y-z eksenlerine score plots (puan grafiği) adı verilir. Puan grafiği 2D ya da 3D şeklinde olabilmektedir. Bu grafiklerden alınan skor değerleri ise büyükten küçüğe doğru sıralanmaktadır (Granato et al., 2018) (Şekil 18).



Şekil 18. 2D skor grafikleri. a) Henüz ayrımın olmadığı PCA grafiği. b) Ayrımın gerçekleştiği skor grafiği.(Martín-Blázquez et al., 2019)'den Türkçe 'ye çevrilmiştir.

Hiyerarşik kümeleme analizi (hierarchical cluster analysis, HCA)

Hiyerarşik kümeleme analizi, örnek kümelerini art arda birleştiren veya ayıran bir yöntemdir. Sınıflandırmada, örnek başına bir sınıf dikkate alınır. Daha sonra o sınıfa dahil birçok sınıf oluşturuluncaya kadar art arda yeniden gruplandırılır. Sonuç olarak, dendogram denilen bir ağaç elde edilir. Bu ağacın dallarının uzun veya kısa olması gruplar arasındaki mesafeyi temsil etmektedir (Kowalski, 2008).

Gözetimli Kemometrik Analizler

Gözetimli kemometrik analiz, örnek bilgilerinin kullanılarak sınıflandırmanın yapıldığı nicel (kantitatif) bir yöntemdir (Berrueta et al., 2007).

Doğrusal diskriminant analizi (linear discriminant analysis, LDA)

LDA, sınıflar arası varyans oranını maksimuma çıkaran ve sınıf içi varyans oranını minimuma indiren ve doğrusal diskriminant fonksiyonlarının belirlenmesine dayanan bir yöntemdir. Bu özelliğinden dolayı sıklıkla kullanılan tekniktir.

LDA ile PCA'nın ortak özellikleri vardır. Fakat PCA, daha düşük boyuttaki veriler arasında maksimum yapıyı korurken, LDA, verilen sınıflar arasında maksimum ayrımı sağlayan bir yön seçer (Berrueta et al., 2007)(Lavine, 2006).

Sınıf analojisiyle yumuşak bağımsız modelleme (soft independent modeling of class analogies, SIMCA)

SIMCA'da her kategori PCA kullanılarak bağımsız olarak modellenir ve farklı sayıda temel bileşenle tanımlanmaktadır. Set içindeki her sınıf için temel bileşenlerin sayısı çapraz doğrulama ile belirlenebilmektedir.

SIMCA'nın sınıf mesafesini, modelleme ve ayırım yapabilme yeteneği belirlemektedir. Sınıf mesafesi, geometrik mesafe olarak hesaplanabilme özelliğine sahiptir. SIMCA sonuçları grafiksel olarak görselleştirilebilmektedir. Böylece, set üzerinde gerçekleştirilen PCA puanlarının ve yüklemelerin bir grafiği, aykırı değerler, alt gruplar ve sınıf içi yapı hakkında anlamlı bilgi edinmemizi sağlamaktadır (Berrueta et al., 2007)(Lavine, 2006).

Destek vektör makinesi (support vector machine, SVM)

Destek vektör makinesi (SVM), istatistiksel öğrenme temeline dayanan denetimli bir öğrenme tekniğidir. Sınıflandırma durumunda, SVM, veri eğitim set vektörlerinin bağımsız olarak bir vektörden iki sınıfın 'optimal' sınırını elde etme temeline dayanan bir yöntemdir. SVM' nin amacı, yalnızca eğitim setinin değil aynı zamanda bilinmeyen örnekleri de sınıflandırarak her iki sınıfı tam olarak ayıran 'optimum' hiper düzlem sınırı bulmaktır (Berrueta et al., 2007)(Lavine, 2006).

MATERYAL METOT

Kullanılan Deneysel Gereçler ve Bakteriler

Kullanılan Bakteriler

S. aureus (ATCC 43300), *S. aureus* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 6538), *E.coli* (ATCC K4), *E.coli* (ATCC 29922), *E.coli* (ATCC 2523), *P. aureginosa* (ATCC 10145) *P. aureginosa* (ATCC 27853) ve *P. aureginosa* (ATCC 9027) dahil olmak üzere çeşitli alt suş bakteri türleri kullanılmıştır. Bu bakterilerin genel olarak özelliklerine bakacak olursak: Gram negatif olan *E. coli* bakterisi, insanlarda ve hayvanlarda görülen birçok yaygın bakteriyel enfeksiyonun en sık görülen nedenlerinden biridir *E. coli*, enterit, idrar yolu enfeksiyonu, sepsisemi ve neonatal menenjit gibi diğer klinik enfeksiyonların önde gelen nedenidir. Çalışma kapsamında bu bakterinin tercih edilmesinin temel nedenlerinden bazıları şunlardır; kolay işlenebilirliği, tam genom dizisinin bulunması ve hem aerobik hem de anaerobik koşullarda büyüme yeteneği gibi kendine özgü özellikleridir (Allocati et al., 2013). Gram pozitif bakteri olan *S. Aureus* ise, insanlardaki doğal yaşam alanı deri ve nazofarenkstir (geniz). Deri ve yumuşak dokular, endovasküler bölgeler ve iç organları içeren çok çeşitli enfeksiyonlara neden olabilir. Hastane kaynaklı olarak başlıca hastalarda enfeksiyon bölgeleri cerrahi yaralar ve yerleşik tıbbi cihazlar olarak karşımıza çıkmaktadır (Mondino, 1997). Son olarak Gram negatif olan *P.auroginosa* ise, toprak, tatlı su ve deniz ortamlarında yaygın olarak bulunmaktadır. Aynı zamanda insanlarda hastalık etmeni bir tür patojen olması açısından da dikkat çekmektedir (Michel-Briand & Baysse, 2002). *P. aeruginosa* suşlarının farklı antimikrobiyal ajanlara karşı yüksek dirençli olduğu bilinmektedir. Bu durum yüksek ekonomik yük ile daha uzun süre ve daha ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Gıdalarda ise, etin aerobik koşullar da depolanması, *P. aeruginosa*'nın farklı sıcaklıklarda bile gelişim göstermesine ve çoğalmasına neden olmaktadır. Düşük sıcaklıkta aerobik olarak depolanan süt, balık ve ette kolayca büyüdüğü gözlenmiştir.

Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler

Tablo 2. Kullanılan kimyasallar ve malzemeler

Kimyasal	Kullanım Gerekçesi
Nutrient Agar/Merck	Bakteri çoğalması, tek koloni eldesi
Nutrient Broth/Merck	Bakteri çoğalması
Öze	Mikrobiyoloji çalışmaları
Kapaklı otoklavlanabilir Şişe	Mikrobiyoloji çalışmaları, steril solusyonların hazırlanması
Erlen mayer	Mikrobiyoloji çalışmaları, AuNP' lerin hazırlanması
15' lik falkon tüpleri	Mikrobiyoloji çalışmaları, AuNP' lerin hazırlanması, stok solusyonların hazırlanması
50' lik falkon tüpleri	Mikrobiyoloji çalışmaları, AuNP' lerin hazırlanması, stok solusyonların hazırlanması
2 ml' lik ependorf tüpleri	Mikrobiyoloji çalışmaları, AuNP' lerin hazırlanması, saflaştırma çalışmaları
Teknik etanol	Mikrobiyoloji çalışmaları
Saf Altın (%99.9) /	Yüzeylerin hazırlanması

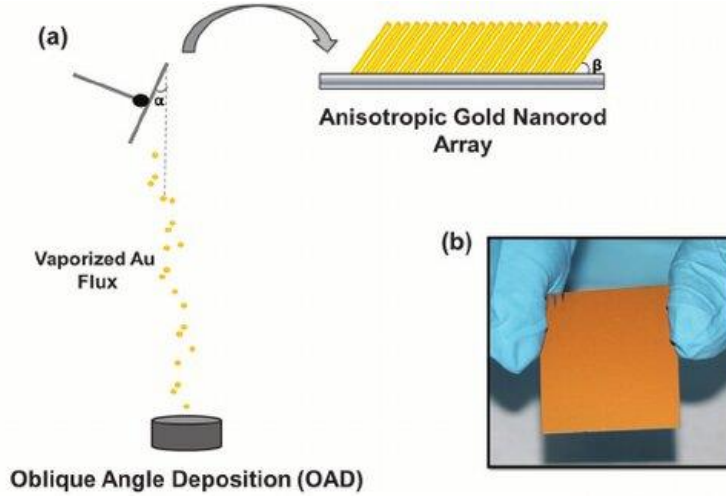
Kullanılan cihazlar

Tablo 3. Kullanılan cihazlar

Cihaz	Devamı
Buzdolabı (+4 °C ve -20 °C)	SEM (Taramalı elektron mikroskobu)
Steril Kabin	Raman Spektroskopisi (WITec alpha300 R)
Distile Su Üretme Cihazı	PVD Kaplama Cihazı
Etüv	Hassas Terazı
Otoklav Cihazı	UV-Vis Cihazı
Santrifüj	Hassas terazı
vorteks	İnkübatör

GNA SERS Platformunun Üretimi

BK7 cam yüzeyler $2.5 \times 2.5 \text{ cm}^2$ ebatında kesilmiştir. Yeterince sabunlu su ile sonike edilen cam yüzeyler 10'ar dakika süre ile sırasıyla deiyonize su, aseton ve etanol ile sonikasyon eşliğinde temizlenmiştir. Kirlilikleri ortadan kaldırmak amacıyla yapılan tüm bu işlemler titizlikle sürdürülmüştür. Buradaki küçük bir kirliliğin bile zenginleştirme faktörünü etkileyeceği ve Raman sinyallerinin ölçümü sırasında yüksek gürültü dediğimiz anlamsız spektrumlara sebep olacağı unutulmamalıdır. Cam yüzeyler kaplama işlemine kadar etanol çözeltisi içinde bekletilmiştir. Yüzeyler etanolden çıkartılmış ve kuruması için N_2 gazına maruz bırakılmıştır. Cam slaytlar üzerindeki organik kirleticilerden uzaklaştırmak için 30 dakika boyunca 100 W oksijen plazması eşliğinde bekletilmiştir. Plazma sisteminden alınan cam yüzeylerin, üzerlerinin tekrar kirlenmesini engellemek amacıyla hızlı bir şekilde altın kaplama aparatına yerleştirilmiş ve altın yüzeyler PVD tekniğiyle üretilmiştir (Şekil 19). Bu teknikte tungsten pota, %99,9 saflıktaki altının eritilerek buhar fazına geçişi için gereklidir. Cam slaytlara buhar fazına geçen altın atomlarını biriktirmek için eğik açı biriktirme (OAD) metodu kullanılmıştır. Bu metod aynı zamanda anizotropik yapıda üç boyutlu (3D) altın nanoçubukların oluşumunu da sağlamıştır. Burada biriktirme açısını ayarlamak için basit ve ev yapımı bir ekipman kullanılmıştır. Kaplama 10° biriktirme açısı (α), buhar basıncı 10^{-6} Torr, biriktirme hızı 0.1 Å/s koşullarında yapılmıştır (Norouz Dizaji et al., 2021; Yılmaz, 2019; Yılmaz et al., 2014).



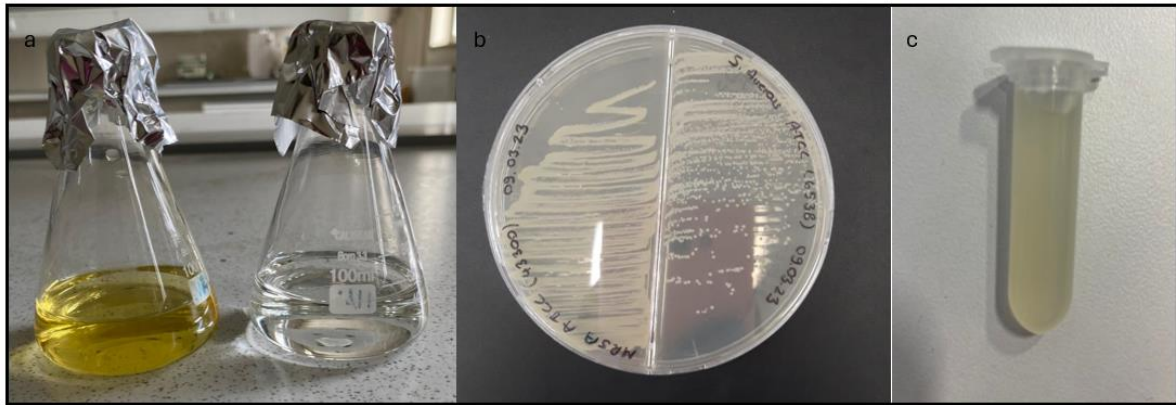
Şekil 19.(a) OAD işleminin şematik gösterimi, (b) altın biriktirildikten sonra bir yüzeyin optik görüntüsü (Yılmaz et al., 2014).

Bakterilerin Çoğaltılması için Besiyeri Hazırlığı

Stok bakterilerimizi çözdürmeden önce bakterilerin uygun koşullarda gelişimini sağlamak için besiyeri ortamı hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler Şekil 20’de özetlenmiştir. Bakterilerimizin kültürlenmesi için hazırladığımız besin suyumuz şu şekildedir:

- ✓ Bir gün öncesinden -80 °C’de olan bakterilerimiz için Nutrient Agar ile katı besiyeri hazırlayarak önceden otoklavlanmış petrilere ekim yapılmıştır.
- ✓ 4 g Nutrient Agar tartılarak, uygun bir erlen içerisine alındı ve distile su ile total hacme tamamlanmıştır.
- ✓ Homojen hale geçen karışımımızın ağzı sıkı olmayacak şekilde alüminyum folyo ile kapatılarak otoklav bant yardımıyla sabitlenip otoklavlanmıştır.
- ✓ Otoklav sonrasında steril kabinimizin içine önceden otoklavlanmış petri kapları, besiyeri, pipet ucu ve geri kalan öze, bek alevi, alkol, pipeti yerleştirildikten sonra kabinimizi çalıştırıp ortam sterilize hale getirilmiştir.
- ✓ Otoklavlanan besiyeri petrilere eşit şekilde dökülerek katılaşması için bekletilmiştir.
- ✓ Katılaştıran besiyerlerine çözünen bakterilerimiz vorteksenerek 100 µl alarak dağıtılmıştır.
- ✓ Etrafı parafilm ile sarılan petriler 37 °C, 24 saat sürede inkübasyona bırakılmıştır.
- ✓ Gelişimini tamamlayan katı besiyerinde bulunan stok bakterilerimiz daha sonra sıvı besiyerine alınarak tek koloni halinde elde edilmiştir.
- ✓ Sıvı besiyeri hazırlamak için 1,25 g Nutrient Broth tartılmıştır.
- ✓ Tartılan Nutrient Broth uygun bir erlen içerisine alınmıştır.

- ✓ Erlen içerisinde alınan Nutrient Broth total hacme distile su ile tamamlanmıştır.
- ✓ Homojen oluncaya kadar çalkalayıcıda karıştırılmıştır.
- ✓ Homojen hale geçen karışımımızın ağzını sıkı olmayacak şekilde alüminyum folyo ile kapatılarak otoklav bant yardımıyla sabitlenip otoklavlanmıştır.
- ✓ Otoklav sonrasında steril kabinimizin içine önceden otoklavlanmış 15'lik falkon, besiyeri, pipet ucu ve geri kalan öze, bek alevi, alkol, pipeti yerleştirdikten sonra kabinimizi çalıştırıp ortamı sterilize hale getirilmiştir.
- ✓ Çalışmaya hazır hale gelen kabin içerisinde 9 ayrı bakteri için etiketleme yapılarak besiyerleri falkonlara eşit hacimde paylaştırılmıştır.
- ✓ Besiyerleri paylaştırıldıktan sonra bir gün öncesinden katı besiyerine aldığımız gelişimini tamamlayan bakterilerimizden tek kolonileri kontrollü bir şekilde toplanarak sıvı besiyerine alınıp, vortekslendikten sonra 37 °C, 16 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- ✓ Logaritmik büyüme aşamasındaki bakteri örnekleri, bakteri üremesi sırasında oluşan metabolitleri ve safsızlıkları uzaklaştırmak için 4000 rpm'de 5 dak santrifüjleme yoluyla saflaştırılıp, üç kez steril izotonik salin tamponu ile yıkanmıştır.
- ✓ Bakterilerin son konsantrasyonu, bir UV-vis spektrofotometre kullanılarak 0.5 McFarland'a ayarlanmıştır.

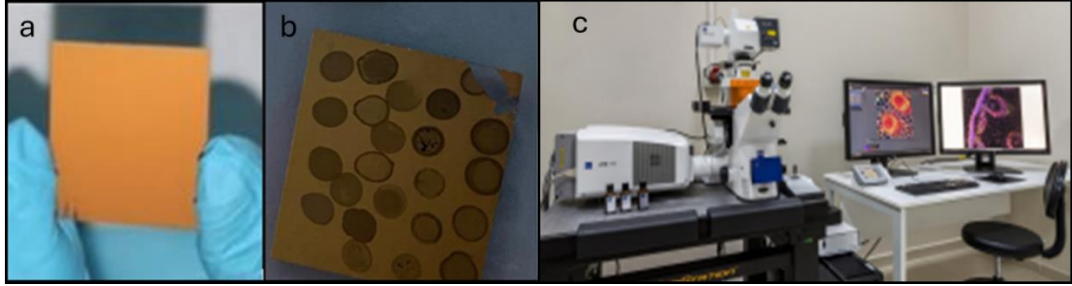


Şekil 20.(a) Nutrient Agar ve Nutrient Broth hazırlanmış hali, (b) Katı besiyerine ekimi yapılmış koloni bakteri (c) Sıvı besiyerine alınmış bakteri örneği.

SERS Sinyallerinin Alınması

Tez çalışmasının bu aşamasında ise herhangi bir işlem uygulanmamış bakteriler GNA yüzey üzerine 5 µl olarak damlatılıp ve kabin içerisinde kuruyuncaya kadar bekletilmiştir (Şekil 21). Her bir sistemde Raman spektraları WITech alfa 300R Mikro Raman Mikroskopi sistemi kullanılarak belirtilen deneysel koşullarda elde edilmiştir: 785 nm lazer kaynağı, ×50 objektif, 20 s uygulama süresi, 1 µm spot boyutu ve 10 mW lazer gücü ve 200–2000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığı. Böylelikle farklı sistemlerden alınan sinyaller karşılaştırılarak planlanan SERS etkisinin

mertebesi belirlenmiştir. Elde edilen spektrallara OriginPro 2019 yazılımı kullanılarak temel düzeltme (baseline correction) işlemi uygulanmıştır. Spektrallardan yüksek sinyal şiddetinde ve yüksek sinyal-gürültü (en az 10) özelliğinde olanlar seçilerek analizlenmiştir.



Şekil 21. (a) Henüz kullanılmamış GNA SERS substratı, (b) GNA yüzey üzerindeki damlatılan ve kuruyan bakterilerin son hali, DAYTAM, Atatürk Üniversite WITech alfa 300R Mikro Raman Mikroskopi sistemi (c) (Yilmaz et al., 2014).

SERS Sinyallerinin Kemometrik Yöntemler ile Analiz Edilmesi

Ön veri işleme

Kemometrik analizlerden önce, elde edilen spektrumlar ön işleme aşamalarından geçirilmiştir. Verilerin ön işleme basamakları, taban düzeltmesi (baseline correction), düzgünleştirme (smooth) ve normalizasyon (normalization) aşamalarından oluşmaktadır. Bu aşamalar da kullanılan program ise OPUS 5.5 (OPUS, Bruker Optics, Ettlingen, Almanya) dir.

Kemometrik Analizler

Kemometri, optimal koşullarda ölçüm için gerekli olan prosedürleri ve deneyleri tasarlamak veya seçmek verileri analiz ederek maksimum kimyasal bilgiyi sağlamak için kullanılan matematiksel, kimyasal ve istatistiksel bir yöntemdir(Kopec et al., 2022).

Kompleks ve karmaşık SERS verilerinin boyutu düşürülerek daha anlaşılır ve yorumlanabilir hale getirilmektedir (Ryabchikov et al., 2019).

Gözetimsiz kemometrik analiz

Farklı bakterilerin alt suş tayini temeline dayanan bu tez kapsamında SERS tespini sağlamak ve elde edilen verilerin doğruluğunu, güvenilirliğini artırmaya yönelik ilk önce PCA ve daha sonra HCA analizi Unscrambler 10.4 programı ile gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde kullanılan 13 spektral veri ön veri işleme aşamasından geçirilerek elde edilen işlenmiş veriler üzerinden 200-2000 cm^{-1} arasında alınmıştır.

PCA grafikleri yorumlamada temel kavramlar şöyledir, x-y-z eksenlerine score plots (puan grafiği) adı verilir. Puan grafiği 2D ya da 3D şeklindedir. Bu grafiklerden alınan skor değerleri ise büyükten küçüğe doğru sıralanmaktadır (Granato et al., 2018). HCA ile dendrogram

denilen bir ağaç elde edilir ve bu ağacın dallarının uzun veya kısa olması örnekler arasındaki mesafeyi temsil etmektedir (Kowalski, 2008).

Gözetimli kemometrik analiz

PCA' dan elde edilen veriler *P.auroginosa*, *E.coli* ve, *S.aureus* bakterileri arasındaki ayırım yapılabilmektedir. İlk olarak her bakteri grubundan seçilen iki spektrum çıkarılarak kör test olarak belirlenmiştir. Sonraki aşamada ise, LDA, SIMCA ve SVM sınıflandırma algoritmaları ardışık bir şekilde kullanılmıştır. Bu analizler de Unscrambler 10.4 programı kullanılarak yapılmıştır. LDA analizinde, elimizde hazır olarak bulunan PCA eğitim seti her örnek için rastgele bir set oluşturulmuş ve bu sete göre analiz gerçekleştirilmiştir. SVM ise iki sınıfı kesin olarak ayıran optimum sınırı belirleyerek hem eğitim setini hem de bilinmeyen örnekleri doğru bir şekilde kategorize etmiştir. Son olarak SIMCA'da ise her kategori PCA kullanılarak bağımsız olarak modellenmiş ve farklı sayıda temel bileşenle tanımlanmıştır. Set içindeki her sınıf için temel bileşenlerin sayısı çapraz doğrulama ile belirlenebilmektedir. Bu analiz 5 kez tekrar edilmiş, ortalama doğruluk değeri elde edilmiştir. Elde edilen veriler ise tablolar halinde tek tek gösterilmiştir.

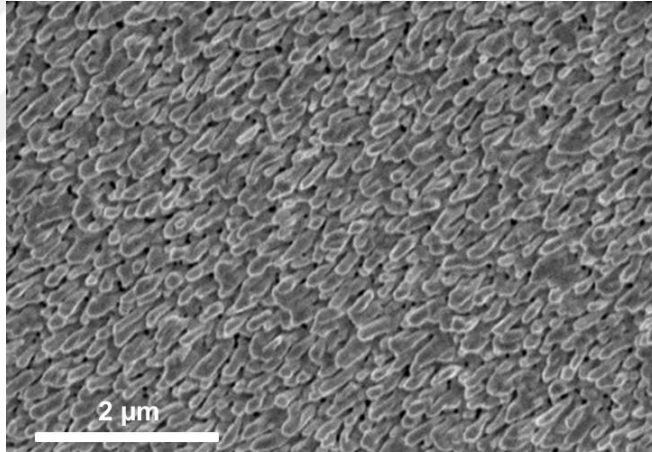
ANOVA Analizi

PC yükleme (loading) grafiklerine, pikin hangi noktada olduğunu belirlemek amacıyla OriginPro 2022 programı kullanılarak pik tayini yapılmıştır. Bant tayini ile noktasal atama yapılabilmekte ve biyomoleküler düzeyde analiz mümkün olmaktadır. Her bir bakteri için elde edilen toplam 13 spektrumun ortalaması OPUS 5.5 programı kullanılarak elde edilmiştir. Bu spektrum değerleri için aynı aşamalar takip edilerek pik tayini değerleri elde edilmiştir. Elde edilen verilere göre, atamalara karşılık gelen biyomoleküller sıkı bir literatür taraması ile bir sonuca ulaştırılmıştır. Bu sonuçlar elde edilen verilerin yorumlanmasını mümkün kılmıştır.

ARAŞTIRMADA ELDE EDİLEN BULGULAR VE SONUÇ

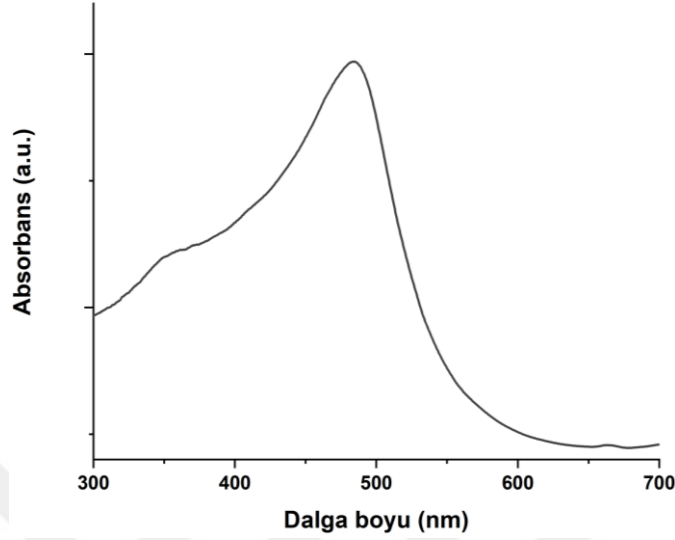
GNA SERS Platformunun üretimi ile ilgili elde edilen bulgular

Tez kapsamında GNA platformu OAD yolu ile PVD cihazı kullanılarak üretilmiştir. Elde edilen sistem için örnek bir SEM görüntüsü Şekil 22’de verilmiştir. Buradan Au nanoyapıların anizotropik kolon şeklinde 3D morfolojide üretildiği açıkça görülmektedir. Bu platform 1D ve 2D yapılara göre SERS aktivitesinde yüksel özgülükte avantajlar sunmaktadır. Bu avantajlar ise, 3D yapı ile yüksek yüzey alanı ile analit molekülü arasında etkileşimin artırılması ve nano-anten etkileri (nano-antenna effect), uç-fokuslanma (tip-focusing) gibi etkenlerle elektriksel alanın artırılması şeklinde özetlenebilir (Yılmaz et al., 2014). Yüksek elektriksel alan elektromanyetik zenginleştirme yoluyla yüksek SERS aktivitesinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır.



Şekil 22. PVD tekniği ve OAD yaklaşımı ile üretilen GNA yapılar için SEM görüntüsü.

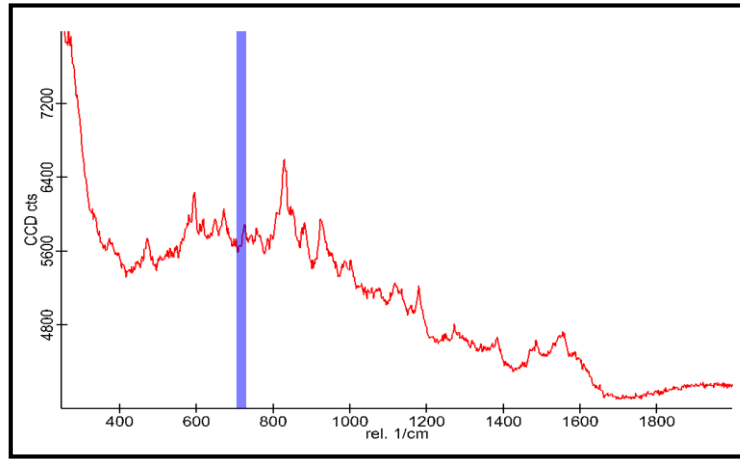
GNA ince filmlerinin plazmonik özelliklerini değerlendirmek için SEM görüntüleriyle birlikte UV- vis absorpsiyon spektroskopisi kullanılarak ölçüm alınmıştır. Spektrum, GNA sistemlerinin 400 ila 600 nm arasında geniş bir absorpsiyon zirvesi sergilediğini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak , GNA filmleri plazmonik özelliğine bağlı olarak optik karakter göstermektedir (Yılmaz et al., 2015).



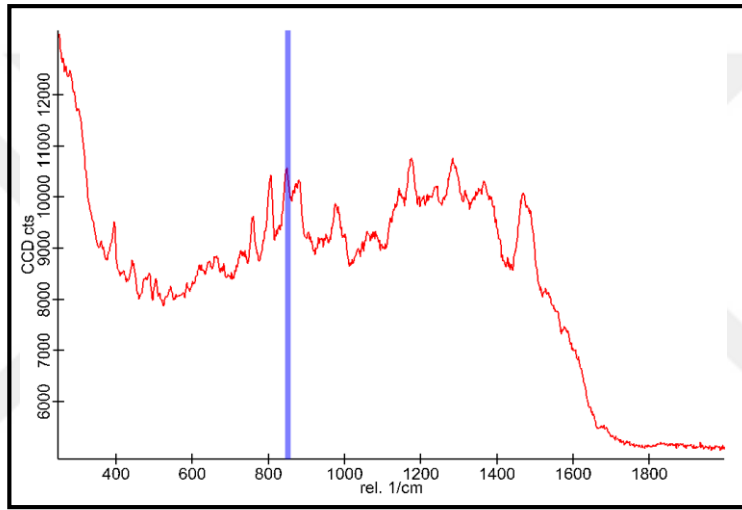
Şekil 23. GNA platformu için UV-vis absorpsiyon spektrumu.

Farklı Bakteri Suşlarından SERS Sinyallerinin Alınması

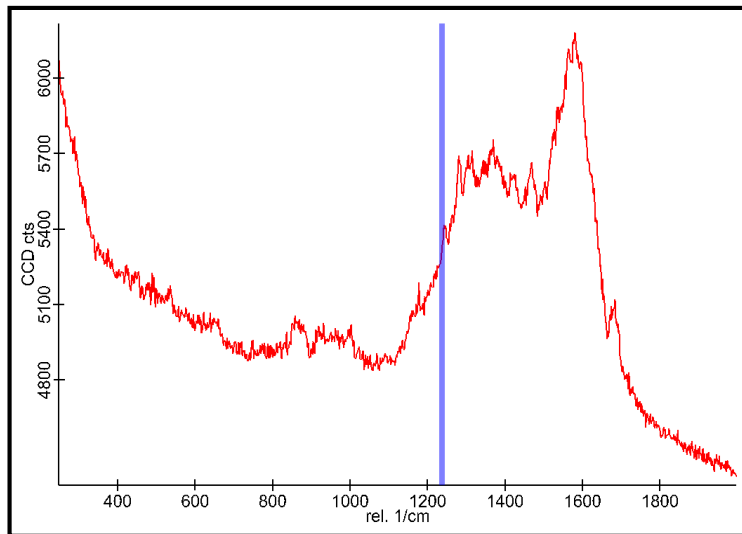
Farklı bakteri türleri arasında doğru bir ayırım yapmak için, çok tutarlı ve güçlü bir sinyal- gürültü oranına sahip bir SERS spektrum veri setinin eldesi oldukça önemlidir. Bu bölümde, haritalama işlemi yapılmadan önce dalga boyu ve lazer gücü gibi parametreler optimize edilmiştir. Böylece her bir bakteri türü ve alt suşları için haritalama yapılmıştır. Bakterilerin bulunduğu bölüm seçilmiştir ve x-y yönünde haritalama tekniği ile taranmıştır. Taranan her bir bölge için 30 x 30 (900) spektrum elde edilmiştir. Kullanılan substrat üzerinden istenilen bakteri gruplar 10X ile bulunmuştur. Bulunan bakteri toplulukları daha sonra 50X ile tek tek belirlenerek istenilen Raman sinyalleri toplanmıştır. Örnek olarak *S.aureus* 43300, *E.coli* 2521 ve *P.auroginosa* 10145 suşlarına ait örnek bir SERS spektrumu sırasıyla Şekil 24, 25 ve 26'da verilmiştir. Benzer kalitede sinyaller diğer bakteri suşları için de elde edilmiştir.



Şekil 24. *S.aureus* 43300 alt suşuna ait GNA yüzeyler üzerinden alınan örnek bir SERS spektrumu.



Şekil 25. *E. coli* 2521 alt suşuna ait GNA yüzeyler üzerinden alınan örnek bir SERS spektrumu.



Şekil 26. *P.auroginosa* 10145 alt suşuna ait GNA yüzeyler üzerinden alınan örnek bir SERS spektrumu.

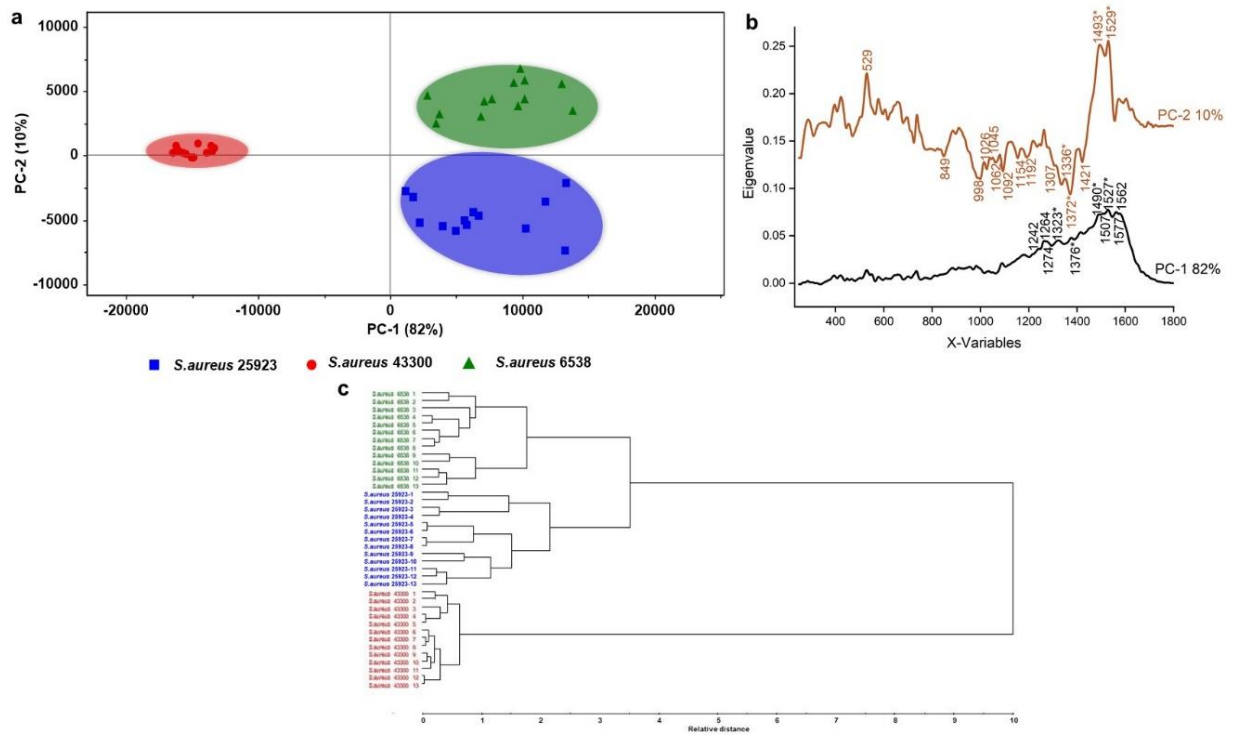
Bakterilerin Alt Suşlarından Elde Edilen SERS Verileri ve Kemometrik Analizler

Bu tez çalışmasında yapılacak olan kemometrik analiz için, haritalanan bakterilerin ortalama spektrumları alınmıştır. Alınan spektrumlar her bir bakterinin alt suşu için ön işlem aşamalarından geçmiştir. Bu aşamadan geçen bakterilerden sinyal şiddeti en yüksek olan 12 adet spektrum seçilmiştir. Tez kapsamında elde olan üç bakterinin alt suşları arasındaki ayırım yapmanın ne derece mümkün olduğu ve bu ayırımın doğruluğunun desteklenmesi için gözetimli ve gözetimsiz analizler uygulanmıştır.

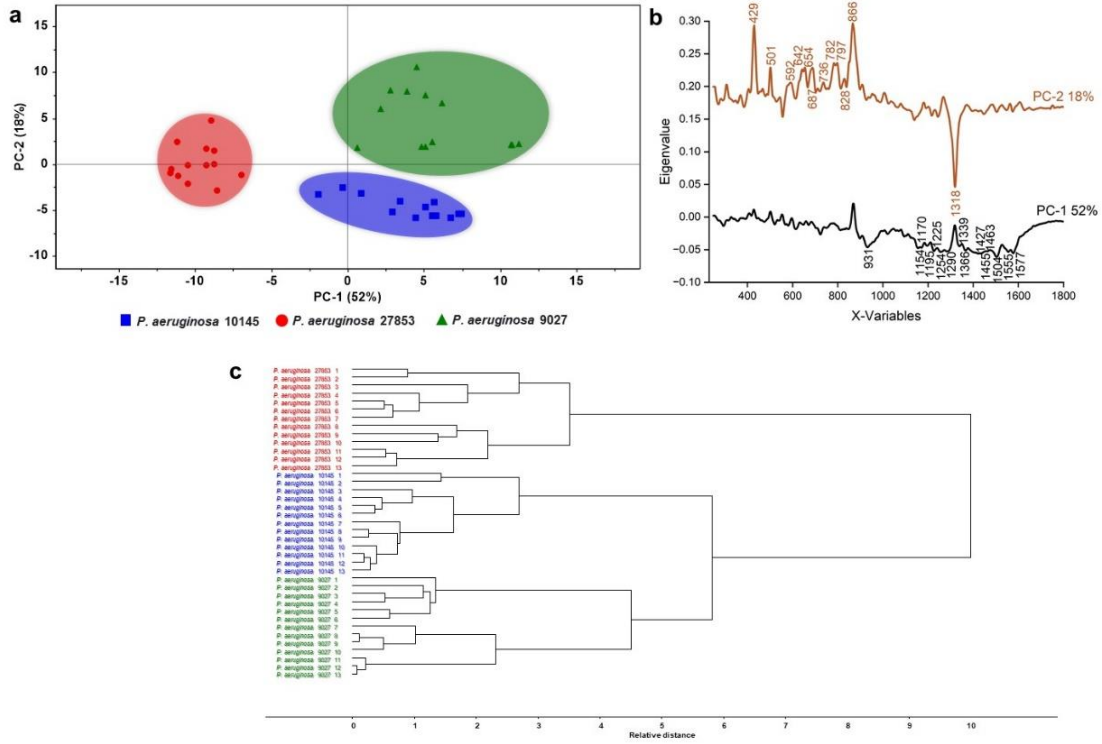
Gözetimsiz Kemometrik Analizler

Veriler ile değişkenler arasındaki ilişkiyi kurmak için genellikle gözetimsiz kemometrik analizler kullanılır. Makine öğrenme teknikleri veri kümeleri arasındaki ilişkileri, benzerlikleri veya farklılıkları belirlemek için sıklıkla gözetimsiz korelasyonları sıklıkla kullanılır. Son zamanlarda SERS tabanlı bakteri tanımlaması üzerine yapılan çalışmalarda, SERS spektrum varyasyonlarının incelenmesiyle PCA ve HCA'nın çeşitli mikroorganizmaları başarıyla tanımlayabileceği gösterilmiştir. Gözetimsiz analizlerde en fazla kullanılan PCA' dır. Bunun nedeni, PCA'nın spektral veri setini düşürerek benzersiz spektral belirteçlerin tanımlanmasına olanak sağlamasıdır (Norouz Dizaji et al., 2021). Böylece ön işleme basamaklarından geçmiş her bir bakteri ve o bakterinin alt suşuna bu analiz uygulanmıştır. PCA analizinde birbirine benzeyen ya da benzerlik gösterenler bir grupta farklılaşanlar ise ayrı gruplarda yer almaktadır. Bu ayırımın olduğu gruplarda PCA skor grafiği, PC1 ve PC2 için PCA yükleme grafikleri ve *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* suşları için HCA dendrogramı sırasıyla Şekil 27, 28 ve 29'da gösterilmiştir. Üzerinde çalışılan bakterilerin 3D skor grafikleri Şekil 27a-28a-29a' da gösterilmiştir. Bu grafikler ile PC1, PC2 tam çapraz doğrulama (full cross-validation) metodu kullanılarak elde edilmiştir. PC'ler temel bileşenler arasındaki farklılığı göstermektedir. PC1 en belirgin değişken grubu temsil ederken PC2 en değişken ikinci grubu temsil etmektedir. Şekil 27a-28a' da görüldüğü üzere tüm bakteriler birbirinden yüksek varyasyon ile ayrılmaktadır. Fakat Şekil 29a (*E. coli*)'a bakılacak olursa varyasyon oranının diğerlerine göre daha düşük olduğu görülmektedir. Yani ayırımın yeteri düzeyde olmadığını göstermektedir. *S.aureus* için PC1+PC2 skor toplamının %92, *P.aeruginosa* için %70 ve *E.coli* için ise % 63 varyasyon değeri elde edilmiştir. Bu varyasyon değeri suşları kategorize etmek için yeterli olduğu sonucunu vermektedir. Yükleme grafikleri ve HCA grafikleri de Şekil 27-28-29 b-c'de verilmiştir. PCA sonucunda elde edilen sonuçların doğruluğunu artırmak için de HCA yapılmıştır. Ayırımın doğruluğunu ifade eden dendrogram grafiği elde edilmiştir (Şekil 27c-28c-

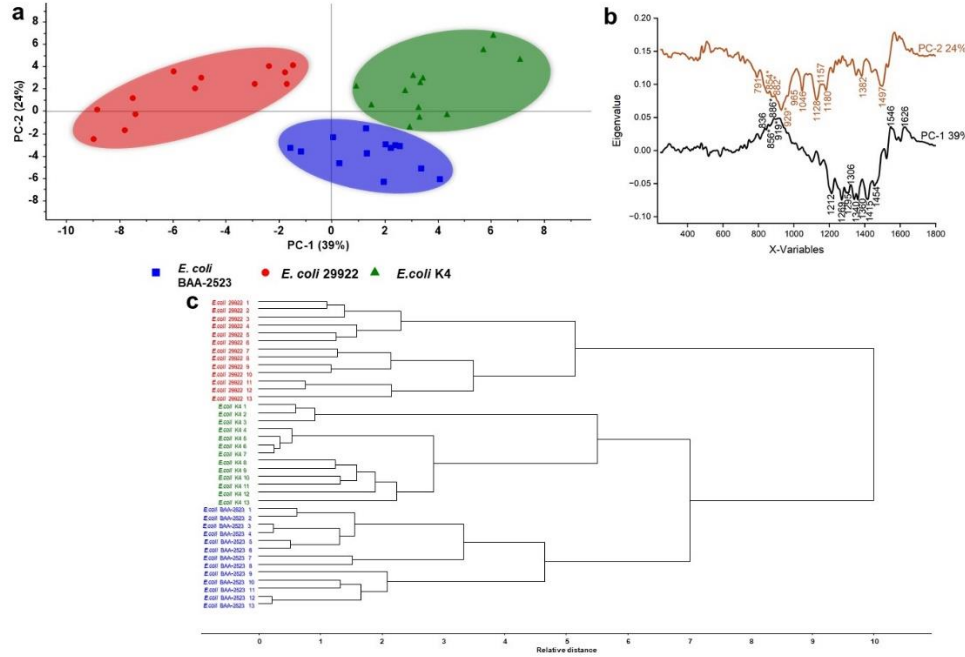
29c). Bu dendrogram haritasına göre üç ayrı grup bakteri suşunun kümeler halinde yüksek özgüllükle ayrıldığını göstermektedir. Yani dendrogram grafiğinin aynı dalında olan ve bakteri suşlarıyla benzerlik göstermektedir ve bu da grafikte birbirine daha yakın konumlandırılmıştır. Aralarındaki mesafenin az olduğu görülmektedir. Farklı bakteri suşları daha uzakta konumlandırılmıştır ve aralarındaki mesafenin daha fazla olduğu göze çarpmaktadır. Böylece bakteriler suşlarıyla beraber değiştikçe dendrogram grafindeki uzaklık ve kümelenmede mesafeler ortaya çıktığı görülmektedir.



Şekil 27. *S. aureus* için toplanan SERS spektral verilerinin denetimsiz kemometrik analizi. (a) PCA skor grafiği (b) PC1 ve PC2 için PCA yükleme grafiği (c) HCA dendrogram grafiği gösterimi.



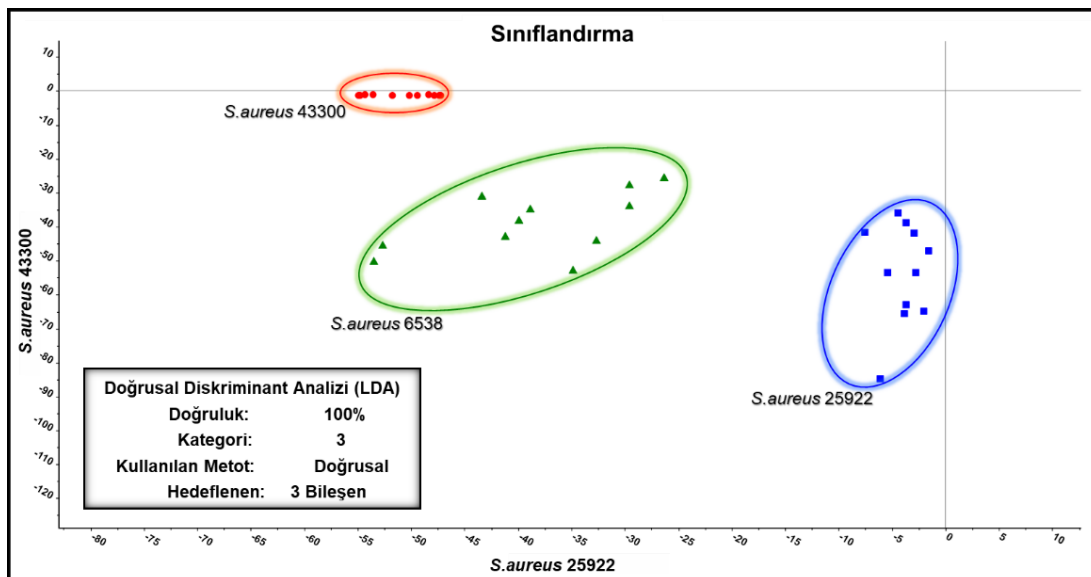
Şekil 28. *P.aeruginosa* için toplanan SERS spektral verilerinin denetimsiz kemometrik analizi. (a) PCA skor grafiği (b) PC1 ve PC2 için PCA yükleme grafiği (c) HCA dendrogram grafiği gösterimi.



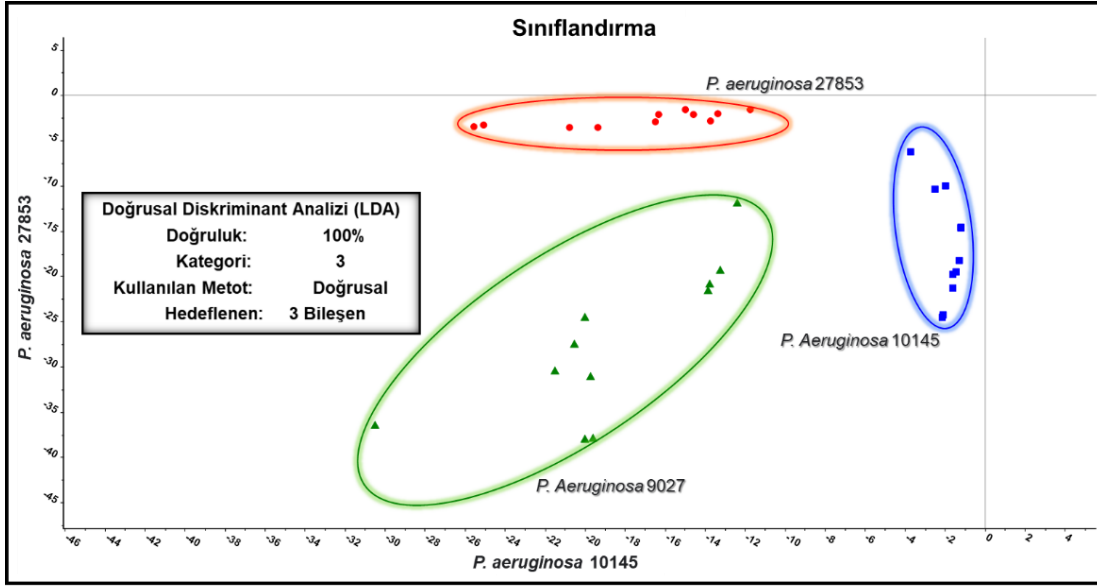
Şekil 29. *E.coli* için toplanan SERS spektral verilerinin denetimsiz kemometrik analizi. (a) PCA skor grafiği (b) PC1 ve PC2 için PCA yükleme grafiği (c) HCA dendrogram grafiği gösterimi.

Gözetimli Kemometrik Analizler

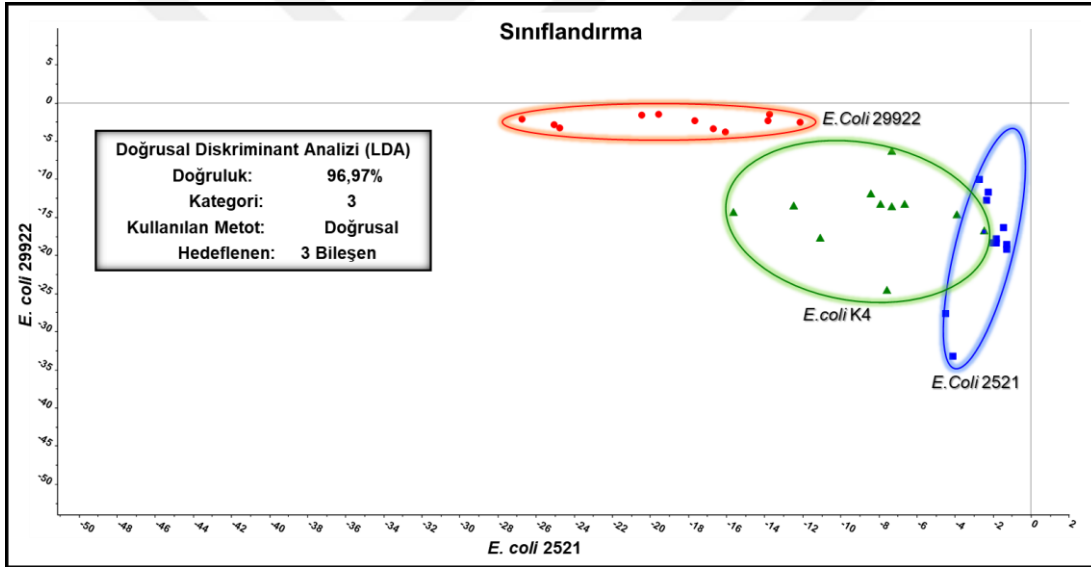
Gözetimsiz kemometrik analizlerden elde edilen bulgular baz alınarak örnek grupları arasındaki PCA ve HCA'dan elde edilen bulgulara göre sınıflandırmayı tespit etmek ve doğruluğunu kontrol etmek için doğrusal ve doğrusal olmayan gözetimli kemometrik analiz yöntemleri kullanılmıştır. Elde edilen bu veriler kullanılarak her örnek grubu bakterisi için eğitim setleri ile eğitim modelleri oluşturulmaktadır. Test setleri rastgele seçilen test seti verileri, hangi sınıfta yer aldığı sınıflandırma modelleri kullanılarak belirlenmiştir. Gözetimli analizler, daha hassas ve kesin sonuç vermektedir. Böylece Şekil 30-31-32' her bir bakteri için oluşturulan 12 spektruma sahip eğitim seti (toplam 36 spektrum) ve LDA grafikleri gösterilmektedir. LDA, sınıflar arası ayrımı göstermektedir. *S.aureus* ve *P.auroginosa* suşları için %100'lük bir sınıflama doğruluğu elde edilmiştir (Şekil 30-31). Ancak, *E.coli* suşları için aynı durum söz konusu değildir. Bu bakteri suşu için elde edilen doğrulama oranı % 96,97'dir. Bu da diğer iki bakteri suşuna göre düşük oranda bir ayrım olduğunun göstergesidir. Tablo Ek 1-3'de özetlenen eğitim veri kümelerinin tahmini ve öngörülen matris tablosu ile doğrulanmıştır. Tüm *S.aureus* ve *P.auroginosa* kendi bulundukları gruplar içerisinde doğru bir şekilde kategorize edilirken (Ek Tablo 1-2) bazı *E.coli* suşları kategorize edilememiştir (Ek1 Tablo 3). Bu durumda elde edilen veriler LDA analizinin hassasiyet ve doğrulunu da destekler niteliktedir. Fakat bu yöntemin güvenilirliğini kanıtlamak amacıyla SVM ve SIMCA analizlerine de başvurulmuştur. Ayrıca bakteri suşları için tüm doğrulama test örneklerinin sınıflandırma tablosu Ek Tablo 4-6 'da verilmiş ve ilgili sınıflara dahil edildiği gösterilmiştir.



Şekil 30. *S.aureus* için elde edilen LDA grafiği.



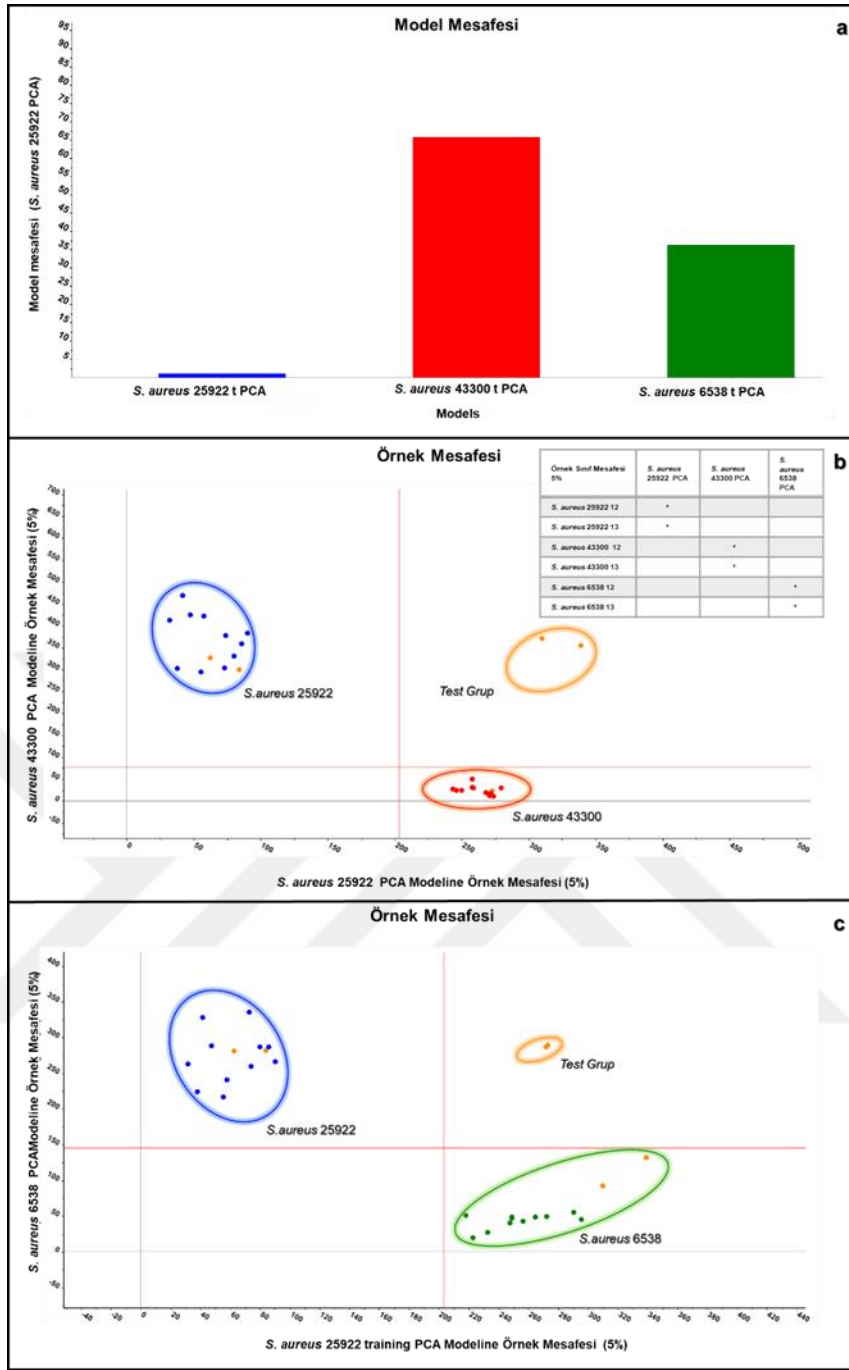
Şekil 31. *P.auroginosa* için elde edilen LDA grafiği.



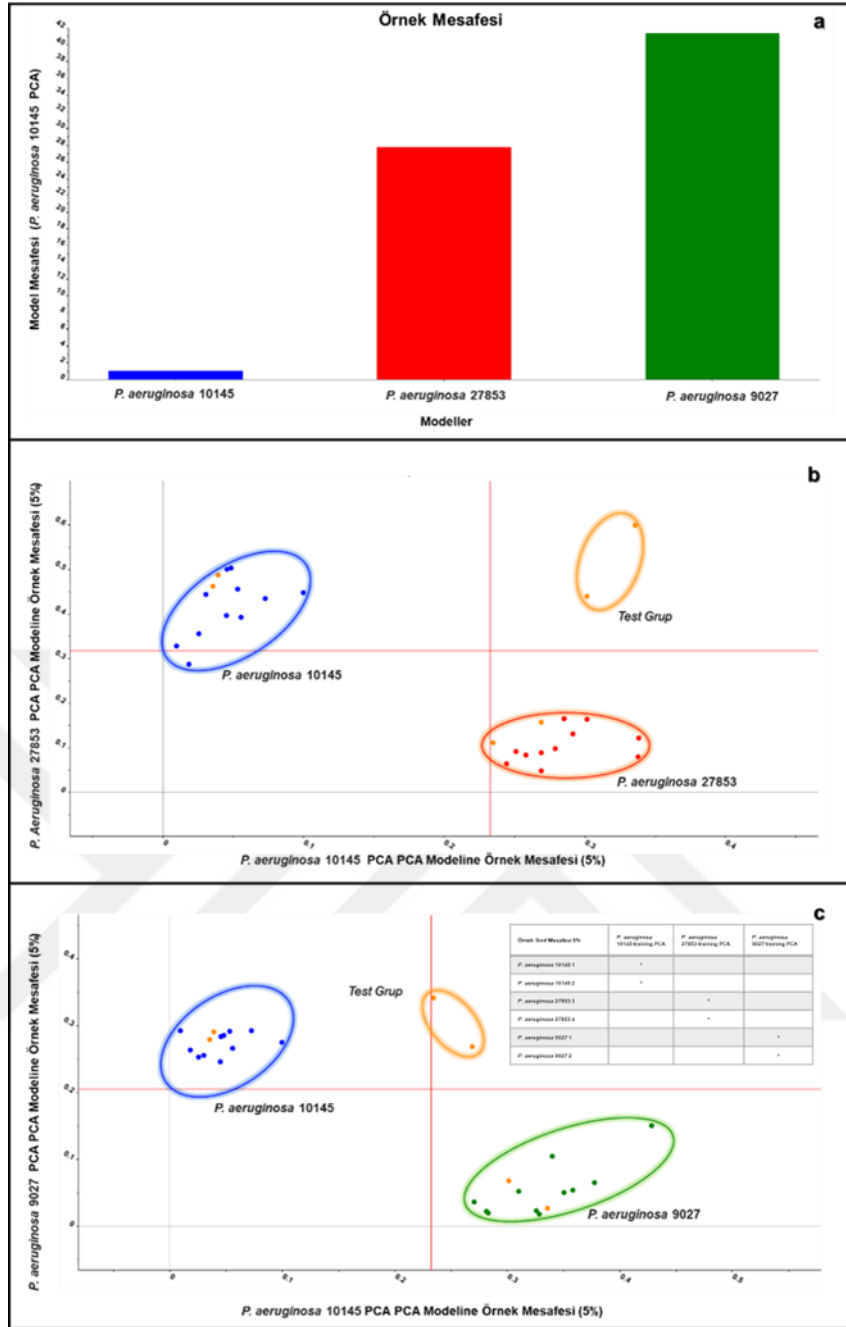
Şekil 32. *E.coli* için bakterisi için elde edilen LDA grafiği.

İkinci olarak denetimli makine öğrenimlerinde SIMCA ile devam edilmiştir. SIMCA, yüksek varyasyona sahip olmakla beraber *S.aureus*, *P.auroginosa* ve *E.coli* suşlarının birbirlerine olan uzaklığını ve bu bakteri suşlarının kendi aralarındaki benzerliği göstermektedir. LDA'nın aksine bu yaklaşım, bakteri suşları arasındaki ayrışmadan ziyade bakteri suşları arasındaki benzerlikler ve farklılıklara odaklanmaktadır. Modeller arasındaki en önemli fark, suş gruplarının birbirinden anlamlı bir şekilde ayrılmasıdır. Elde edilmiş olan PCA sonuçlarına göre oluşturulan her bakteri suşunun PCA eğitim modeli Şekil 33'te gösterilmiştir. Şekil 33a grafiğinde *S.aureus* 43300 ve *S.aureus* 6538 PCA modellerinin *S.aureus* 25922 modeline olan uzaklığını göstermektedir. Y ekseninde bulunan model mesafe yüzde değerinin 3'ten büyük olması bakteri suşlarının birbirinden iyi ayrıldığını göstermektedir. İlk grafiğimiz

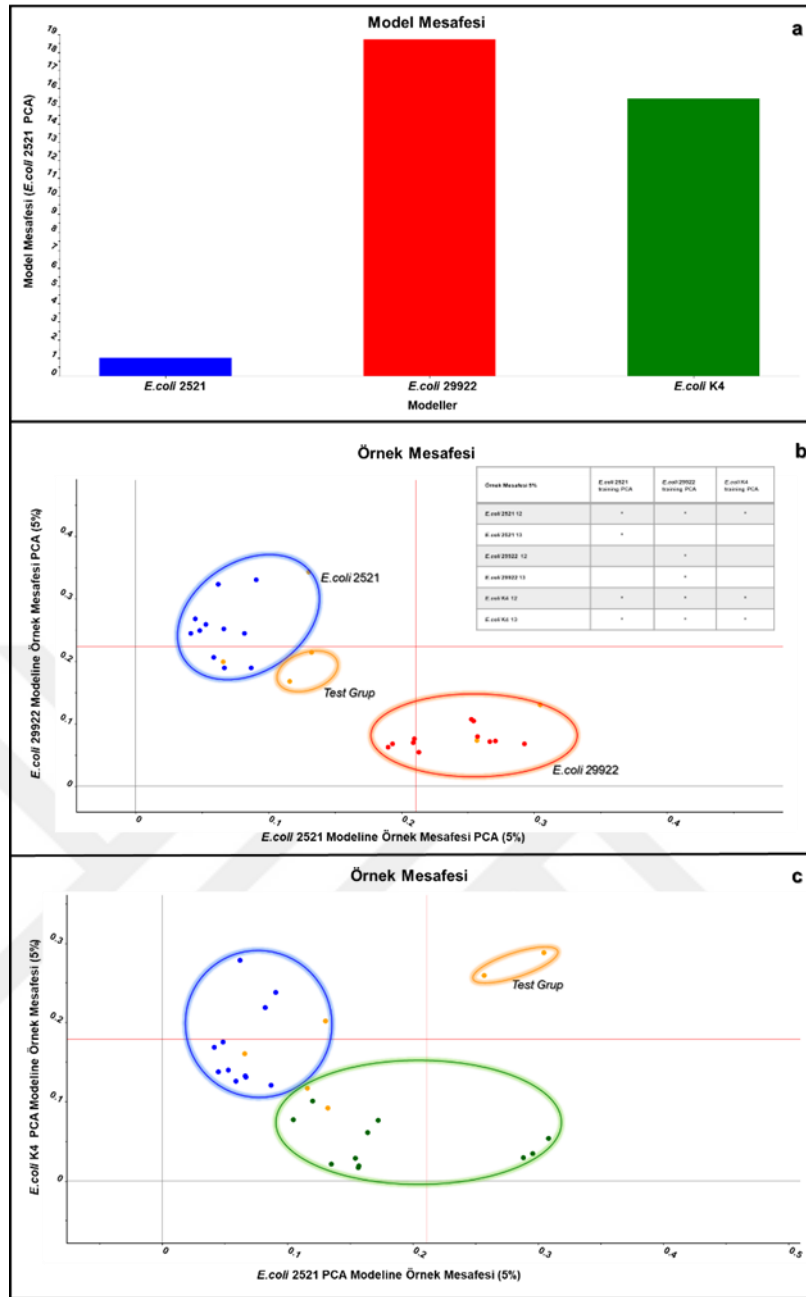
sonucu ayrımın başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Diğer grafiklere bakıldığı zaman (Şekil 33b-33c) ise, test örnekleri (grafikte sarı ile gruplandırılmış alan) rastgele seçilmiştir. Elde edilen %5 örnek-sınıf üyeliği değeri ise ayrımın başarılı olduğunu göstermektedir. Bu da %100 doğrulukla ayrımın yapıldığını göstermektedir. Kısaca Şekil 34-35 için de aynı şeyleri ifade etmek mümkündür. Şekil 34' te de *P.auroginosa* alt suşları için test örnekleri rastgele seçilmiştir ve sarı renk ile gösterilmiştir. Bu bakteri suşumuzda da ayrımın başarılı olduğu ve elde edilen değer %5 olması ayrımın kaliteli ve başarılı olduğunu ortaya koyan %100 doğruluk değeri ile gösterilmiştir. Bu sınıflar için %5 örnek-sınıf üyeliği analizi (Şekil 33b-34b iç kısımlarında yer alan tablo) tüm test sınıflarının ilgili sınıflara ayrımının başarılı olduğunu göstermektedir. Şekil 35' te de *E.coli* alt suşlarının örnek-sınıf analizlerine bakıldığı zaman tüm bakteri suşu gruplarındaki uyumsuzluk ortaya çıkmıştır. Bunun nedeni olarak ilk iki PC skorunun diğer bakteri suşlarına nispeten daha düşük olmasına ve PCA' da gözlemlenen zayıf varyans değerine dayandırılmaktadır (Şekil 29). PCA ve HCA gibi gözetimsiz analizler üç tür bakteri suşları için ikna edici sonuçlar verse de gözetimli analizler *E. coli* suşlarında karışıklık olduğunu ortaya koymaktadır. Böylece elde edilen verilere göre modeller arasındaki mesafe (Ek Tablo 13-15) ve eğitim setinin uzaklık matrisi (Ek Tablo 16-18) tüm test örneklerinin kendi sınıflarında sınıflandırıldığını göstermektedir.



Şekil 33. *S.aureus* suşları için yapılan SIMCA analizi. *S.aureus* 43300 ve *S.aureus* 6538'in PCA modellerinde (a) *S.aureus* 25923'ün PCA Model mesafesine olan uzaklığı (b) *S.aureus* 43300 – *S.aureus* 25923 (c) *S.aureus* 6538 gruplarının test örnekleriyle Cooman grafiği. Grafiğin iç kısmında doğrulama test örneklerinin sınıflandırma tablosu gösterilmektedir.



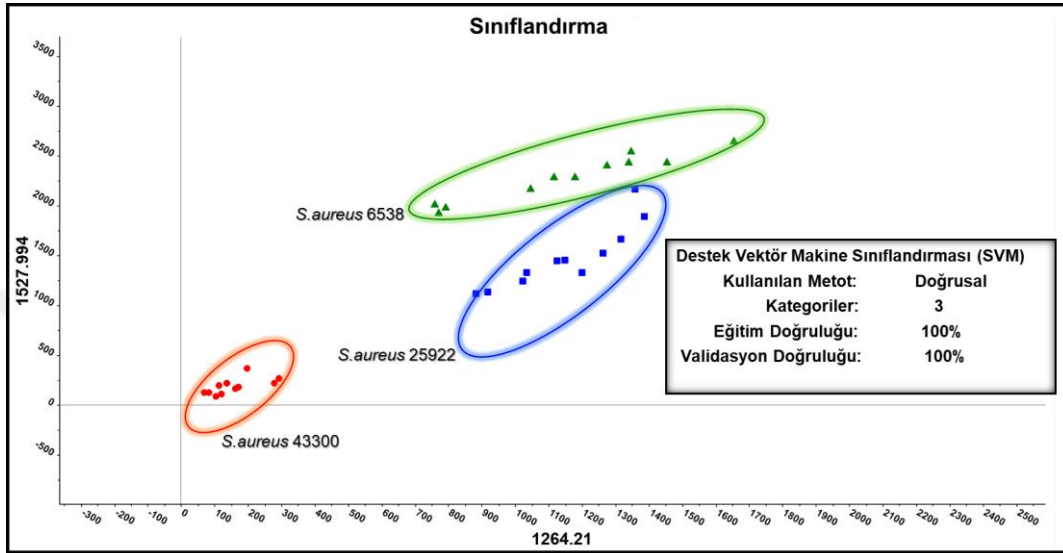
Şekil 34. *P.aeruginosa* suşları için yapılan SIMCA analizi. *P.aeruginosa* 27853 ve *P.aeruginosa* 9027'in PCA modellerinde (a) *P.aeruginosa* 10145'in PCA Model mesafesine olan uzaklığı (b) *P.aeruginosa* 27853 – *P.aeruginosa* 10145 (c) *P.aeruginosa* 9027 gruplarının test örnekleriyle Cooman grafiği. Grafiğin iç kısmında doğrulama test örneklerinin sınıflandırma tablosu gösterilmektedir.



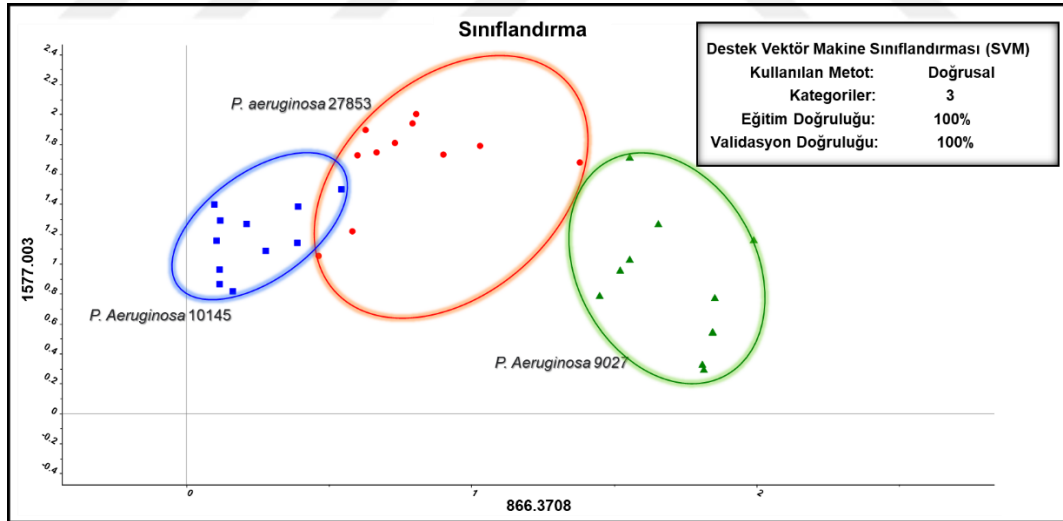
Şekil 35. *E.coli* suşları için yapılan SIMCA analizi. *E.coli* 29922 ve *E.coli* K4'in PCA modellerinde (a) *E.coli* BAA-2523'ün PCA Model mesafesine olan uzaklığı (b) *E.coli* 29922 – *E.coli* BAA-2523 (c)ve *E.coli* K4- *E.coli* BAA-2523 gruplarının test örnekleriyle Cooman grafiği. Grafiğin iç kısmında doğrulama test örneklerinin sınıflandırma tablosu gösterilmektedir.

Son denetimli makine öğrenim analizi olan SVM, iki spektral aralıkta gerçekleştirilmiştir. Yükleme grafiğinde en iyi varyansa sahip spektral noktalar incelenmiştir. Bu spektral noktalardaki SVM sınıflandırma modeli her bir bakteri suşu için şu şekildedir; *S. aureus* için 1264-1527 cm^{-1} , *P.auroginosa* için, 866-1577 cm^{-1} ve *E.coli* için 919-1626 cm^{-1} şeklindedir. Doğruluk, eğitim veri setleri için önerilen tahmin matris tabloları ile doğrulanmıştır. (EK Tablo 7-9). Ayrıca doğrulama test örnekleri ise (EK Tablo 10-12) ilgili sınıflarda olduğu verisini bize sunmaktadır. *E.coli* için farklılaşmanın, yapılan LDA ve SVM

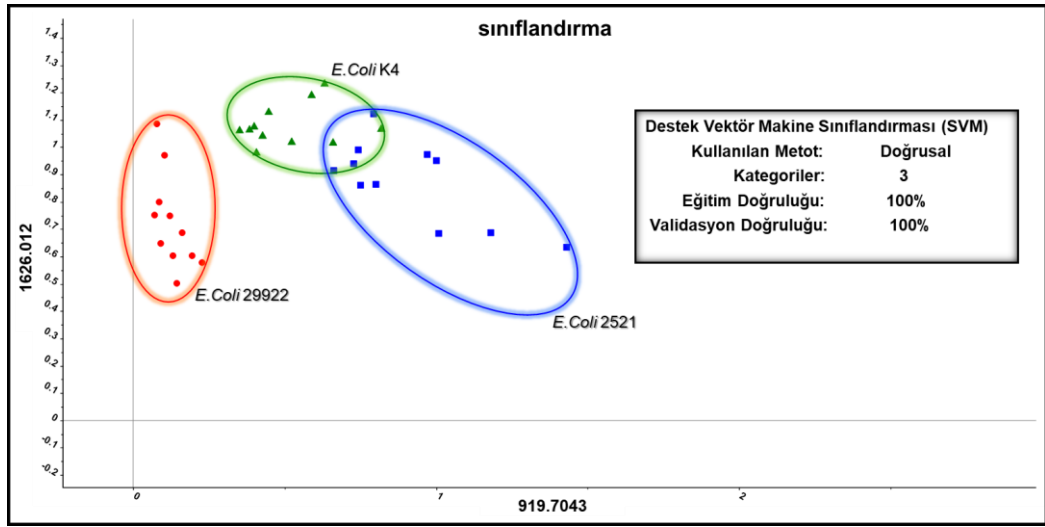
analizlerinin nasıl gerçekleştiği ile doğrudan ilişkilidir. Çünkü LDA analizi, spektral verilerin tamamını kullanırken, SVM analizinde ilk olarak yapılan PCA analizindeki yüksek varyansa sahip bantlar kullanılmıştır. Bu durumda bize LDA analizinin, SVM analizine göre daha özgün bir ayrım yaptığı verisini sunmaktadır. Bu incelemede, spektral aralıklar, yükleme spektrumlarındaki (Şekil 39a- 41a) ayrımın en yoğun olduğu bant bilgileri ile de eşleşmektedir.



Şekil 36. *S.aureus* suşları için SVM sınıflandırma grafiği.



Şekil 37. *P.auroginosa* suşları için SVM sınıflandırma grafiği.



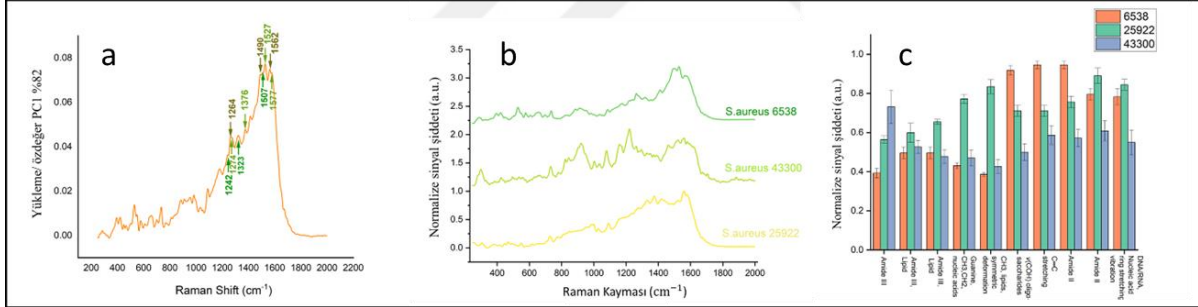
Şekil 38. *E.coli* suşları için SVM sınıflandırma grafiği.

One- Way ANOVA Analizi

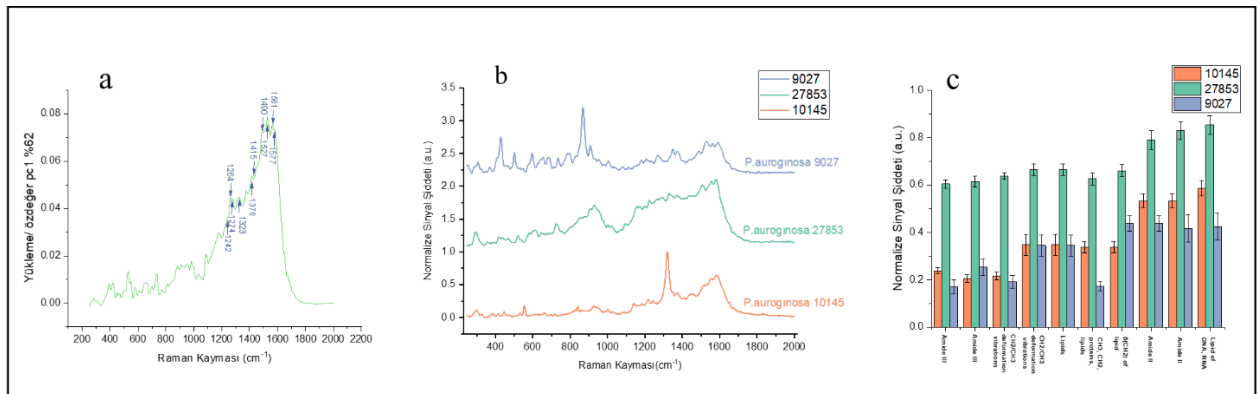
Anova, bir örneklemdaki grup ortalamalarının birbirinden nasıl farklılaştığını incelemek için kullanılan istatistiksel bir yöntemdir. Bu tez çalışmasında analizin temel amacı, suşlarına göre ayrılan bakterilerin biyokimyasal değişikliklerini saptayarak bu ayrımın nelerle ilişkili olduğunu açıklığa kavuşturmadır. Analizin ilk aşamasında, PC yükleme grafiklerinin hangi noktada olduğunu OriginPro 2022 programı kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 39a-41a). Buradan elde edilen piklerin hangi biyomolekölü temsil ettiği Tablo 4-6'da gösterilmiştir. Bu tablolarda toplam PC1 değerleri de gösterilmektedir. Çalışılan bantlardaki bakteri suşlarından alınan ortalama spektrumların konumları belirtilmiştir (Şekil 39b-41b). Her bir bakteri suşuna ait ortalaması alınan spektrumlar kullanılarak ise one-away ANOVA analizi yapılmıştır (Şekil 39c-41c).

PC yükleme grafiği bantlarının PC'ler üzerindeki etkisini değerlendirmek için bant konumu ve bu bantlar için bant atamasını gerçekleştirilmiştir (Tablo 4-6). Tez kapsamında her bir suşun protein bileşiminde varyasyonların varlığını gösterilmiştir. Böylece hücre duvarı ve zarındaki küçük farklılıklar bile Raman bandında görülebilir. Gram pozitif bakterilerde kalın bir peptidoglikan tabası oluşturan hücre duvarı, beta-laktam antibiyotiklerin hedeflediği bir yapıdır ve antibiyotik direnci kazandıran suşlarda yapısal farklılıklara sebebiyet vermektedir (Rohde, 2019). Bant profilleri biyomoleküllerde ve hücresel bileşenlerde meydana gelen değişiklikler nedeniyle değişmektedir (Tablo 4-6). Gram negatif bakterilerin (*E.coli* ve

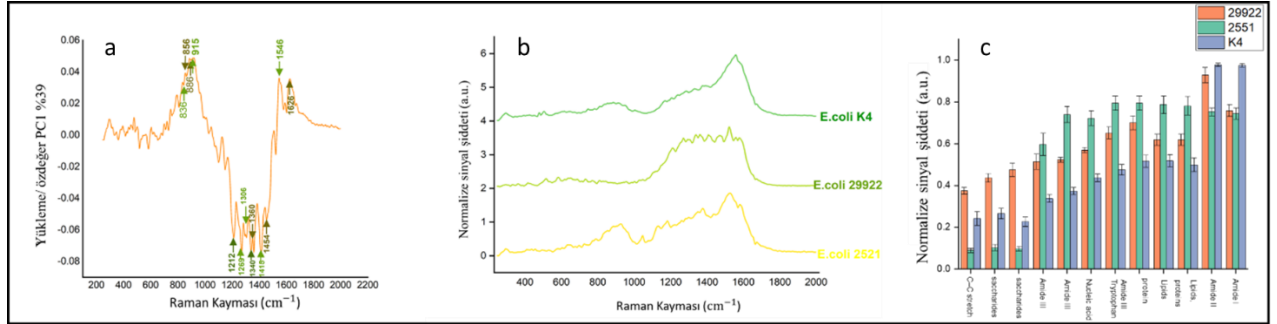
P.auroginosa) suşlarında hücre duvarı yapısı Gram pozitif bakteri (*S.aureus*) suşlarından oldukça farklıdır. Bu bakterilerin peptidoglikan tabakasının yanı sıra periplazmik boşlukta toksin içerebilmektedir (Gan et al., 2008; Wientjes et al., 1991). Bundan dolayı, bu örneklerden elde edilen SERS bant profilleri oldukça farklıdır (Tablo 4). Fırsatçı bir patojen olan ve aynı zamanda da antibiyotiğe dirençli olan *P.auroginosa* dış hücre duvarı yapısında dış membran vezikülleri (OVM'ler) olduğu bilinmektedir (Asokan et al., 2019; Suh et al., 2024). OMV'ler, patogeneze, antibiyotik direncinin transferi ve hücre içi algılama moleküllerinin paketlenmesi yoluyla sinyallemeye sorumludur (Choi et al., 2011) (Tablo 5). Tüm suşlar arasında en belirgin değişim *E.coli* 29922 için olduğu görülmüştür. Bu suş, diğer iki suşta bulunan nükleik asitler, proteinler, karbonhidratlarla ilgili kimyasal yapılardan yoksun olduğu saptanmıştır (Tablo 4-5). Bu kimyasal yapılar, sitozin, urasil (halka gerilmesi) (nükleik asitler), tirozin, glikozidik bağın C-O-C gerilmesi (sakkaritler), $\nu(\text{C-N})$, $\nu(\text{C-N})$, phe/prolinden -HC-H düzlem içi deformasyon, Karbonhidratlar C-C, C-O, -C-OH, olarak karşımıza çıkmaktadır ve bu bakteride görülmemiştir. Diğer suşlardan farklı olarak biyokimyasal içerikteki çeşitliliğin sebebi biyofilm üretimi olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca *E.coli* BAA 2325 suşu karpabenemaz üretir ve ertapeneme de dirençlidir (Madkour et al., 2017) (Tablo 6).



Şekil 39. *S.aureus* suşları için tepe noktası atamaları, atamalara karşılık gelen biyomoleküller. (a) PC1 yükleme grafiği (b) her bir bakteri suşu için alınan Raman spektrumları (c) biyomoleküllere karşılık gelen atamalar için yapılan one- way ANOVA



Şekil 40. *P.auroginosa* suşları için tepe noktası atamaları, atamalara karşılık gelen biyomoleküller. (a) PC1 yükleme grafiği (b) her bir bakteri suşu için alınan Raman spektrumları (c) biyomoleküllere karşılık gelen atamalar için yapılan one- way ANOVA



Şekil 41. *E.coli* suşları için tepe noktası atamaları, atamalara karşılık gelen biyomoleküller. (a) PC1 yükleme grafiği (b) her bir bakteri suşu için alınan Raman spektrumları (c) biyomoleküllere karşılık gelen atamalar için yapılan one- way ANOVA.

Tablo 4. *Staphylococcus aureus*'un alt suşları (25923, 43300 ve 6538) için PC yükleme grafiklerinden elde edilen PC-1'den toplanan varyanslar ve bant atamaları.

PC Yüklemeleri (cm ⁻¹) PC-1	Varyans (%)	Biyomolekül	Referans
1242	91.68	Amid III (protein)	(Kahraman et al., 2009; Norouz Dizaji et al., 2021)
1264	96.08	Amid III (protein)	(Kahraman et al., 2009; Norouz Dizaji et al., 2021)
1323	91.6	CH ₃ /CH ₂ titreşim modları-adenin (nükleik asitler)	(Galli et al., 2015; R. Wang & Luo, 2022)
1376	83.8	CH deformasyon proteinler veya vs(-COO ⁻) deformasyon	(Colniță et al., 2017; Kahraman et al., 2009)
1490	89.29	Amid II (protein) ve Lipid	(Kahraman et al., 2009; Norouz Dizaji et al., 2021; Picciolini et al., 2015)
1507	84.43	Amid II (protein)	(Kahraman et al., 2009; Norouz Dizaji et al., 2021; Picciolini et al., 2015)
1527	92.65	Amid II (protein) ve Lipid	(Kahraman et al., 2009; Norouz Dizaji et al., 2021; Picciolini et al., 2015)

1562	96.03	Triptofan; ekzopolisakkaritler	(de Siqueira e Oliveira et al., 2012; Harz et al., 2005; Paret et al., 2010)
1577	95.5	Amid I (protein)	(Ciobotă et al., 2010; Harz et al., 2005)

Tablo 5. *Pseudomonas auroginosa* suşları (27853, 10145 ve 9027) için PC yükleme grafiklerinden elde edilen PC-1'den toplanan varyanslar ve bant atamaları.

PC Yükleme (cm ⁻¹)	Varyans (%)	Biyomolekül	Referans
1154	72.72	v(C-C) proteinler veya lipidlerde iskelet ve v(C-N) v(C-C)	(Andrei et al., 2021)
1170	7523	v(C-C) proteinler veya lipidlerde iskelet ve v(C-N) v(C-C)	(Andrei et al., 2021)
1195	60.33	L-Triptofan	(Paret et al., 2010; Snežžana Miljanić, Leo Frkanec, Tomislav Biljan, 2007)
1225	90.44	Amid III (protein)	(Ciobotă et al., 2010; Colniță et al., 2017; Harz et al., 2005; Tahir et al., 2021)
1254	89.66	Amid III (protein)	(Laucks et al., 2005; Paret et al., 2010; Snežžana Miljanić, Leo Frkanec, Tomislav Biljan, 2007; Tahir et al., 2021)
1290	91.23	Lipidler	(Colniță et al., 2017; Snežžana Miljanić, Leo Frkanec, Tomislav Biljan, 2007)
1339	78.40	C-H band (protein)	(Harz et al., 2005; Laucks et al., 2005)
1366	76.53	C-H band (protein)	(Ciobotă et al., 2010; Harz et al., 2005; Laucks et al., 2005)
1427	89.68	Lipidler	(Colniță et al., 2017; Laucks et al., 2005; Snežžana Miljanić, Leo Frkanec, Tomislav Biljan, 2007; Tahir et al., 2021)
1455	91.12	Lipidler	(Snežžana Miljanić, Leo Frkanec, Tomislav Biljan, 2007; Tahir et al., 2021)

1463	91.26	Lipidler	(Snežana Miljanić, Leo Frkanec, Tomislav Biljan, 2007; Tahir et al., 2021)
1504	85.57	$\nu(\text{COH})$ oligosakkarit	(Ciobotă et al., 2010; de Siqueira e Oliveira et al., 2012; Norouz Dizaji et al., 2021)
1555	71.95	Amid II (protein)	Harz et al., 2005; Tahir et al., 2021; R. Wang & Luo, 2022)
1577	68.82	Amid II (protein)	(Harz et al., 2005; Tahir et al., 2021; R. Wang & Luo, 2022)

Tablo 6. *Escherichia coli* suşları (BAA-2523, 29922 ve K4) için PC yükleme grafiklerinden elde edilen PC-1'den toplanan varyanslar ve bant atamaları.

PC Yüklemeleri (cm^{-1}) PC-1	Varyans(%)	Biyomolekül	Referans
856	66.31	$\nu(\text{C}-\text{C})$	(de Siqueira e Oliveira et al., 2012; Kahraman et al., 2009; Paret et al., 2010)
886	65.41	C–O–C glikozidik gerilme bağlantı (sakkarit)	(Kahraman et al., 2009; R. Wang & Luo, 2022)
919	63.71	$\nu(\text{C}-\text{N})$	(Ciobotă et al., 2010; de Siqueira e Oliveira et al., 2012; Kahraman et al., 2009; Norouz Dizaji et al., 2021; R. Wang & Luo, 2022)
1212	73.82	Amid III (protein)	(Ciobotă et al., 2010; Kahraman et al., 2009; Norouz Dizaji et al., 2021; R. Wang & Luo, 2022)
1269	89.18	C–N / N–H gerilme (amid III)	(Chao & Zhang, 2012; de Siqueira e Oliveira et al., 2012; Kahraman et al., 2009; Norouz Dizaji et al., 2021)
1295	84.89	=CH (lipid) veya amid III (protein)	(Kahraman et al., 2009; Laucks et al., 2005)

1306	84.75	=CH (lipid) veya amid III (protein)	(Kahraman et al., 2009; Laucks et al., 2005)
1340	83.84	Yağ asitlerinden ve protein deformasyonundan CH ₂ ve CH ₃ ; N-H gerilmesi (amid III); C-C gerilmesi; A G(halka solunumu)	(de Siqueira e Oliveira et al., 2012; Kahraman et al., 2009; Picciolini et al., 2015; R. Wang & Luo, 2022)
1360	80.14	C-H band protein	(de Siqueira e Oliveira et al., 2012; Kahraman et al., 2009)
1454	50.02	CH ₂ and CH ₃ deformasyon lipid ve proteinler	(Ciobotă et al., 2010; de Siqueira e Oliveira et al., 2012; Kahraman et al., 2009; Norouz Dizaji et al., 2021; Picciolini et al., 2015)
1546	44.05	Amid II	(Norouz Dizaji et al., 2021; R. Wang & Luo, 2022)
1626	49.28	Amid I	(Ciobotă et al., 2010; Kahraman et al., 2009; Norouz Dizaji et al., 2021; R. Wang & Luo, 2022)

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez kapsamında elde edilen bulgular şu şekilde özetlenebilir,

- Bakteriler besi suyu içinde inkübasyona bırakılarak saf koloni elde edilmiştir.
- GNA etiketsiz SERS platformu PVD tekniği kullanılarak üretilmiştir.
- Elimizde hali hazırda bulunan bakteriler ile SERS platformu kombinlemiştir.
- SERS platformu ile kombinlenen bakterilerden spektrumlar toplanmıştır.
- Bu spektrumlardan sinyal şiddeti yüksek olanlar toplanmıştır.
- Bu spektrumlardan, hassas, güvenilir bir sonuç alabilmek için bazı analizler uygulanmıştır.
- Yapılan analizler sonucunda elimizde olan üç bakteri alt suşlarından başarıyla ayrılmıştır. Fakat *E.coli* için istenilen düzeyde bir ayırma ulaşılmamıştır. İki bakteri ve alt suşları için %100 ayırım elde edilmiştir.
- Bakteri suşlarının ayırımında piklere karşılık gelen biyomoleküller tanı edilmiştir ve bu biyomoleküllere karşılık gelen bantlara atamalar yapılarak yapılan analiz daha anlamlı hale getirilmiştir.

Sonuç olarak, çalışılan *E.coli*, *S.aureus* ve *P.auroginosa* bakterilerinin alt suşlarını GNA etiketsiz SERS platformunun üzerinden sinyalleri alarak çalışmanın özgüllüğünü ve hassasiyetini artıracak birtakım analizler uyguladık. Bu analizler gözetimli ve gözetimsiz kemometrik analizlerdir. Bu analizlerden gözetimsiz analiz olan PCA ve HCA analizinden *S. aureus* için %92, *P. auroginosa* için %70 ve *E.coli* için de %63'lük PC skor değerleri elde edilmiştir. Bu sonuca göre *P. auroginosa* ve *S. aureus* kendi içinde ve aralarında başarılı bir şekilde ayrıldığı sonucuna varılmıştır. Fakat *E. coli* için aynı verileri elde etmek mümkün olmamıştır. Böylece denetimli ve denetimsiz analizlerin SERS sistemi ile kombinlemesi, SERS yaklaşımının bakteri tespiti için ideal bir biyosensör sistemi olduğunu ortaya koymaktadır.

KAYNAKÇA

- Agne, M., Valones, A., Rafael, ;, Guimarães, L., Lucas, ;, Cavalcanti Brandão, A., Paulo, ;, Eleutério De Souza, R., De Albuquerque, A., Carvalho, T., & Crovela, S. (2009). PRINCIPLES AND APPLICATIONS OF POLYMERASE CHAIN REACTION IN MEDICAL DIAGNOSTIC FIELDS: A REVIEW. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 1–11.
- Ahmadian, A., Ehn, M., & Hober, S. (2006). Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta*, 363(1–2), 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.04.038>
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). Escherichia coli in Europe: An overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6235–6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
- Andrei, C. C., Moraillon, A., Larquet, E., Potara, M., Astilean, S., Jakab, E., Bouckaert, J., Rosselle, L., Skandrani, N., Boukherroub, R., Ozanam, F., Szunerits, S., & Gouget-Laemmel, A. C. (2021). SERS characterization of aggregated and isolated bacteria deposited on silver-based substrates. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(5), 1417–1428. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03106-5>
- Asokan, G. V., Ramadhan, T., Ahmed, E., & Sanad, H. (2019). WHO global priority pathogens list: A bibliometric analysis of medline-pubmed for knowledge mobilization to infection prevention and control practices in Bahrain. *Oman Medical Journal*, 34(3), 184–193. <https://doi.org/10.5001/omj.2019.37>
- Atoui, A., & Khoury, A. El. (2017). PCR-RFLP for aspergillus species. *Methods in Molecular Biology*, 1542, 313–320. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_20
- Bayraktar, B., Banada, P. P., Hirleman, E. D., Bhunia, A. K., Robinson, J. P., & Rajwa, B. (2006). Feature extraction from light-scatter patterns of Listeria colonies for identification and classification. *Journal of Biomedical Optics*, 11(3), 034006. <https://doi.org/10.1117/1.2203987>
- Bayraktar, B., Banada, P. P., Jr., E. D. H., Bhunia, A. K., Robinson, J. P., & Rajwa, B. P. (2006). Feature extraction from light-scatter patterns of Listeria colonies for identification and classification. *https://Doi.Org/10.1117/1.2203987*, 11(3), 034006. <https://doi.org/10.1117/1.2203987>
- Berrueta, L. A., Alonso-Salces, R. M., & Héberger, K. (2007). Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1158(1–2), 196–214. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.024>
- Casadio, F., Daher, C., & Bellot-Gurlet, L. (2016). Raman Spectroscopy of cultural heritage Materials: Overview of Applications and New Frontiers in Instrumentation, Sampling Modalities, and Data Processing. *Topics in Current Chemistry*, 374(5).

- Chao, Y., & Zhang, T. (2012). Surface-enhanced Raman scattering (SERS) revealing chemical variation during biofilm formation: From initial attachment to mature biofilm. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(5), 1465–1475. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6225-y>
- Chen, H., Park, S. G., Choi, N., Moon, J. Il, Dang, H., Das, A., Lee, S., Kim, D. G., Chen, L., & Choo, J. (2020). SERS imaging-based aptasensor for ultrasensitive and reproducible detection of influenza virus A. *Biosensors and Bioelectronics*, 167(June), 112496. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112496>
- Chen, K. W., Lo, H. J., Lin, Y. H., & Li, S. Y. (2005). Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. *Journal of Medical Microbiology*, 54(3), 249–258. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45829-0>
- Choi, D. S., Kim, D. K., Choi, S. J., Lee, J., Choi, J. P., Rho, S., Park, S. H., Kim, Y. K., Hwang, D., & Gho, Y. S. (2011). Proteomic analysis of outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomics*, 11(16), 3424–3429. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000212>
- Chu, H. O., Song, S., Li, C., & Gibson, D. (2017). Surface enhanced Raman scattering substrates made by oblique angle deposition: Methods and applications. *Coatings*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/coatings7020026>
- Ciobotă, V., Burkhardt, E. M., Schumacher, W., Rösch, P., Küsel, K., & Popp, J. (2010). The influence of intracellular storage material on bacterial identification by means of Raman spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(7), 2929–2937. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3895-1>
- Colniță, A., Dina, N. E., Leopold, N., Vodnar, D. C., Bogdan, D., Porav, S. A., & David, L. (2017). Characterization and discrimination of gram-positive bacteria using raman spectroscopy with the aid of principal component analysis. *Nanomaterials*, 7(9), 28–31. <https://doi.org/10.3390/nano7090248>
- Das, R. S., & Agrawal, Y. K. (2011). Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. *Vibrational Spectroscopy*, 57(2), 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2011.08.003>
- Day, J. S., Edwards, H. G. M., Dobrowski, S. A., & Voice, A. M. (2004). The detection of drugs of abuse in fingerprints using Raman spectroscopy II: Cyanoacrylate-fumed fingerprints. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 60(8–9), 1725–1730. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2003.09.013>
- de Siqueira e Oliveira, F. S., Giana, H. E., & Silveira, L. (2012). Discrimination of selected species of pathogenic bacteria using near-infrared Raman spectroscopy and principal components analysis. *Journal of Biomedical Optics*, 17(10), 107004. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.17.10.107004>
- Doron, S. (2020). Bacterial Infections : Overview. *Bacteriology Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands*, 3(January), 273–279.
- Drancourt, M., Roux, V., Dang, L. V., Tran-Hung, L., Castex, D., Chenal-Francisque, V.,

- Ogata, H., Fournier, P. E., Crubézy, E., & Raoult, D. (2004). Genotyping, orientalis-like *Yersinia pestis*, and plague pandemics. *Emerging Infectious Diseases*, 10(9), 1585–1592. <https://doi.org/10.3201/eid1009.030933>
- Dubourg, G., Lamy, B., & Ruimy, R. (2018). Rapid phenotypic methods to improve the diagnosis of bacterial bloodstream infections: meeting the challenge to reduce the time to result. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(9), 935–943. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.03.031>
- Efrima, S., & Bronk, B. V. (1998). *Silver Colloids Impregnating or Coating Bacteria*. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Efrima, S., & Zeiri, L. (2009). Understanding SERS of bacteria. *Journal of Raman Spectroscopy*, 40(3), 277–288. <https://doi.org/10.1002/jrs.2121>
- Exner, M., Bhattacharya, S., Christiansen, B., Gebel, J., Goroncy-Bermes, P., Hartemann, P., Heeg, P., Ilschner, C., Kramer, A., Larson, E., Merckens, W., Mielke, M., Oltmanns, P., Ross, B., Rotter, M., Schmithausen, Maria, R., Sonntag, Hans-Günther, & Trautmann, M. (2017). Antibiotic resistance : What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria ? Antibiotikaresistenz : Was ist so besonders an den Gram-negativen. *GMS Hygiene and Infection Control*, 12, 1–24. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5388835/>
- Fleischmann, M., Hendra, P. J., & McQuillan, A. J. (1974). Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*, 26(2), 163–166. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(74\)85388-1](https://doi.org/10.1016/0009-2614(74)85388-1)
- Fournier, P. E., Zhu, Y., Ogata, H., & Raoult, D. (2004). Use of highly variable intergenic spacer sequences for multispacer typing of *Rickettsia conorii* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5757–5766. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5757-5766.2004>
- Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., Kaushik, K. S., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka-Stępień, K., Leszczewicz, M., Tintino, S. R., de Souza, V. C. A., Sharifi-Rad, J., Coutinho, H. D. M., Martins, N., & Rodrigues, C. F. (2019). Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. *Microorganisms*, 7(5), 130. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>
- Franco-Duarte, R., Luciačernáková, L. L., Kadam, S., Kaushik, K. S., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka-Stępień, K., Leszczewicz, M., Relison Tintino, S., Cintia, V., De Souza, A., Sharifi-Rad, J., Douglas, H., Coutinho, M., Martins, N., & Rodrigues, C. F. (2019). *microorganisms Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms-From Past to Present*. 7, 130. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>
- Fraser-Liggett, C. M. (2005). Insights on biology and evolution from microbial genome sequencing. *Genome Research*, 15(12), 1603–1610. <https://doi.org/10.1101/gr.3724205>
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M., & Rossi, P. (2002). Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*, 4(11), 634–643. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00358.x>
- Fukumoto, H., Sato, Y., Hasegawa, H., Saeki, H., & Katano, H. (2015). Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Int J Clin Exp Pathol*,

- Galli, R., Tamosaityte, S., Koch, M., Sitoci-Ficici, K. H., Later, R., Uckermann, O., Beiermeister, R., Gelinsky, M., Schackert, G., Kirsch, M., Koch, E., & Steiner, G. (2015). Raman-based imaging uncovers the effects of alginate hydrogel implants in spinal cord injury. *Optics InfoBase Conference Papers, June*. <https://doi.org/10.1117/12.2183165>
- Gan, L., Chen, S., & Jensen, G. J. (2008). Molecular organization of Gram-negative peptidoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), 18953–18957. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808035105>
- Gao, W., Li, B., Yao, R., Li, Z., Wang, X., Dong, X., Qu, H., Li, Q., Li, N., Chi, H., Zhou, B., & Xia, Z. (2017). *Intuitive Label-Free SERS Detection of Bacteria Using Aptamer-Based in Situ Silver Nanoparticles Synthesis*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01813>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction(PCR). *J Invest Dermatol.*, 133(3), 20382.
- Granato, D., Santos, J. S., Escher, G. B., Ferreira, B. L., & Maggio, R. M. (2018). Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 72(December 2017), 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.12.006>
- Guo, S., Popp, J., & Bocklitz, T. (2021). Chemometric analysis in Raman spectroscopy from experimental design to machine learning–based modeling. *Nature Protocols* 2021 16:12, 16(12), 5426–5459. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00620-3>
- Hameed, S., Xie, L., & Ying, Y. (2018). Conventional and emerging detection techniques for pathogenic bacteria in food science: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 81(December 2017), 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.020>
- Harz, M., Rösch, P., Peschke, K. D., Ronneberger, O., Burkhardt, H., & Popp, J. (2005). Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus *Staphylococcus* and dependence on their cultivation conditions. *Analyst*, 130(11), 1543–1550. <https://doi.org/10.1039/b507715j>
- Herschleb, J., Ananiev, G., & Schwartz, D. C. (2007). Pulsed-field gel electrophoresis. *Nature Protocols*, 2(3), 677–684. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.94>
- Hossain, M. M., Masud, M. M., Hossain, M. I., Haque, M. M., Uddin, M. S., Alam, M. Z., & Islam, M. R. (2022). Rep-PCR Analyses Reveal Genetic Variation of *Ralstonia solanacearum* Causing Wilt of Solanaceous Vegetables in Bangladesh. *Current Microbiology*, 79(8), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02932-3>
- Hutchison, C. A. (2007). DNA sequencing: Bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Research*, 35(18), 6227–6237. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm688>
- Innovation, T., & Roux-Dalvai, R. (2019). Fast and Accurate Bacterial Species Identification in Urine Specimens Using LC-MS/MS Mass Spectrometry and Machine Learning In Brief. *Molecular and Cellular Proteomics*, 18, 2492–2505. <https://doi.org/10.1074/mcp.TIR119.001559>
- Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne,

- J., & Vandenesch, F. (2002). Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infection and Immunity*, 70(2), 631–641. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.631-641.2002>
- Jeanmaire, D. L., & Van Duyne, R. P. (1977). Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 84(1), 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(77\)80224-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(77)80224-6)
- Jubeh, B., Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches. *Molecules*, 25(12), 1–22. <https://doi.org/10.3390/molecules25122888>
- Kahraman, M., Keseroğlu, K., & Çulha, M. (2011). On sample preparation for surface-enhanced Raman scattering (SERS) of bacteria and the source of spectral features of the spectra. *Applied Spectroscopy*, 65(5), 500–506. <https://doi.org/10.1366/10-06184>
- Kahraman, M., Zamaleeva, A. I., Fakhrullin, R. F., & Culha, M. (2009). Layer-by-layer coating of bacteria with noble metal nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(8), 2559–2567. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3159-0>
- Kim, N., Thomas, M. R., Bergholt, M. S., Pence, I. J., Seong, H., Charchar, P., Todorova, N., Nagelkerke, A., Belessiotis-Richards, A., Payne, D. J., Gelmi, A., Yarovsky, I., & Stevens, M. M. (2020). Surface enhanced Raman scattering artificial nose for high dimensionality fingerprinting. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13615-2>
- Kopec, M., Romanowska-Pietrasiak, B., Abramczyk, H., Abramczyk, H., & Pl, H. A. L. (2022). The application of Raman spectroscopy and chemometric methods for analysis healthy blood and blood with BRCA mutation. *MedRxiv*, 2022.02.21.22271291. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.02.21.22271291v1%0Ahttps://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.02.21.22271291v1.abstract>
- Kowalski, B. L. (2008). *Chemoinformatics — multivariate mathematical – statistical methods*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-51980-1.50009-4>
- Krawczyk, B., Kur, J., Stojowska-Swedrzyńska, K., & Śpibida, M. (2016). Principles and applications of ligation mediated PCR methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Acta Biochimica Polonica*, 63(1), 39–52. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1192
- Laucks, M. L., Sengupta, A., Junge, K., Davis, E. J., & Swanson, B. D. (2005). Comparison of psychro-active arctic marine bacteria and common mesophilic bacteria using surface-enhanced raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 59(10), 1222–1228. <https://doi.org/10.1366/000370205774430891>
- Lavine, B. K. (2006). Pattern recognition. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36(3–4), 153–161. <https://doi.org/10.1080/10408340600969411>
- Lee, M. shiunn, Lee, Y. S., & Chiou, C. S. (2006). The suitable restriction enzymes for pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Bordetella pertussis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 56(2), 217–219. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.03.017>

- Li, W., Raoult, D., & Fournier, P. E. (2009). Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(5), 892–916. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00182.x>
- Liu, H.-B., Du, X.-J., Zang, Y.-X., Li, P., & Wang, S. (2017). *SERS-Based Lateral Flow Strip Biosensor for Simultaneous Detection of Listeria monocytogenes and Salmonella enterica Serotype Enteritidis*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03957>
- Long, L., Ju, W., Yang, H. Y., & Li, Z. (2022). Dimensional Design for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *ACS Materials Au*. <https://doi.org/10.1021/acsmaterialsau.2c00005>
- Madiyar, F. R., Bhana, S., Swisher, L. Z., Culbertson, C. T., Huang, X., & Li, J. (2015). Integration of a nanostructured dielectrophoretic device and a surface-enhanced Raman probe for highly sensitive rapid bacteria detection. *Nanoscale*, 7(8), 3726–3736. <https://doi.org/10.1039/c4nr07183b>
- Madkour, L. A., Soliman, M. S., Hassan, D. M., Soliman, N. S., & ElMahdy, Y. A. (2017). Detection of carbapenemase-producers: Evaluating the performance of the carbapenem inactivation method and Carba NP test versus multiplex PCR. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 9(2010), 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.12.015>
- Marques, A. C., Águas, H., Martins, R., Costa-Silva, B., Sales, M. G., & Fortunato, E. (2022). Surface-enhanced Raman scattering paper-based analytical devices. In *Paper-based Analytical Devices for Chemical Analysis and Diagnostics* (Issue February 2023). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820534-1.00001-3>
- Martín-Blázquez, A., Díaz, C., González-Flores, E., Franco-Rivas, D., Jiménez-Luna, C., Melguizo, C., Prados, J., Genilloud, O., Vicente, F., Caba, O., & Pérez del Palacio, J. (2019). Untargeted LC-HRMS-based metabolomics to identify novel biomarkers of metastatic colorectal cancer. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55952-8>
- McNamara, K., & Tofail, S. A. M. (2017). Nanoparticles in biomedical applications. *Advances in Physics: X*, 2(1), 54–88. <https://doi.org/10.1080/23746149.2016.1254570>
- Michel-Briand, Y., & Baysse, C. (2002). The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 84(5–6), 499–510. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01422-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01422-0)
- Mitsutake, H., Poppi, R. J., & Breitkreitz, M. C. (2019). Raman imaging spectroscopy: History, fundamentals and current scenario of the technique. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(11), 2243–2258. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190116>
- Moein Moghimi, S., Christy Hunter, A., & Murray, J. C. (n.d.). *Nanomedicine: current status and future prospects*. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2747rev>
- Mondino, B. J. (1997). *Staphylococcus aureus*. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 38(4). <https://doi.org/10.29309/tpmj/2013.20.01.587>
- Mosier-Boss, P. A. (2017). *Review on SERS of Bacteria*. <https://doi.org/10.3390/bios7040051>
- Nguyen, T. T., Trinh, K. T. L., Yoon, W. J., Lee, N. Y., & Ju, H. (2017). Integration of a microfluidic polymerase chain reaction device and surface plasmon resonance fiber sensor into an inline all-in-one platform for pathogenic bacteria detection. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 242, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2016.10.137>

- Nie, S., & Emory, S. R. (1997). Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Science*, 275(5303), 1102–1106. <https://doi.org/10.1126/science.275.5303.1102>
- Norouz Dizaji, A., Simsek Ozek, N., Aysin, F., Calis, A., Yilmaz, A., & Yilmaz, M. (2021). Combining vancomycin-modified gold nanorod arrays and colloidal nanoparticles as a sandwich model for the discrimination of Gram-positive bacteria and their detection: Via surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). *Analyst*, 146(11), 3642–3653. <https://doi.org/10.1039/d1an00321f>
- Orlando, A., Franceschini, F., Muscas, C., Pidkova, S., Bartoli, M., Rovere, M., & Tagliaferro, A. (2021). klasik raman mekanizma. *Chemosensors*, 9(9), 1–28. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9090262>
- Pang, Y., Wan, N., Shi, L., Wang, C., Sun, Z., Xiao, R., & Wang, S. (2019). Dual-recognition surface-enhanced Raman scattering(SERS)biosensor for pathogenic bacteria detection by using vancomycin-SERS tags and aptamer-Fe₃O₄@Au. *Analytica Chimica Acta*, 1077, 288–296. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.059>
- Panwar, S., Duggirala, K. S., Yadav, P., Debnath, N., Yadav, A. K., & Kumar, A. (2023). Advanced diagnostic methods for identification of bacterial foodborne pathogens: contemporary and upcoming challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*, 43(7), 982–1000. <https://doi.org/10.1080/07388551.2022.2095253>
- Paret, M. L., Sharma, S. K., Green, L. M., & Alvarez, A. M. (2010). Biochemical characterization of Gram-positive and Gram-negative plant-associated bacteria with micro-Raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 64(4), 433–441. <https://doi.org/10.1366/000370210791114293>
- Patel, R. (2015). MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clinical Chemistry*, 61(1), 100–111. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221770>
- Picciolini, S., Castagnetti, N., Vanna, R., Mehn, D., Bedoni, M., Gramatica, F., Villani, M., Calestani, D., Pavesi, M., Lazzarini, L., Zappettini, A., & Morasso, C. (2015). Branched gold nanoparticles on ZnO 3D architecture as biomedical SERS sensors. *RSC Advances*, 5(113), 93644–93651. <https://doi.org/10.1039/c5ra13280k>
- Possomato-Vieira, José S. and Khalil, R. A. K., & Modeling, O. 2. 0. E. S. E. and S. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(12), 139–148.
- Principles of Instrumental Analysis - Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - Google Kitaplar.* (n.d.). Retrieved November 23, 2022, from https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=D13EDQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=DLInAxLsam&sig=ZtojQO6P2rH9DYogVC7HxZge7po&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Priyanka, B., Patil, R. K., & Dwarakanath, S. (2016). A review on detection methods used for foodborne pathogens. *Indian Journal of Medical Research*, 144(September), 327–338. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.198677>
- Rentschler, S., Kaiser, L., & Deigner, H.-P. (2021a). *The detection of drugs of abuse in fingerprints using Raman spectroscopy I: Latent fingerprints.* <https://doi.org/10.3390/ijms22010456>

- Rentschler, S., Kaiser, L., & Deigner, H. P. (2021b). Emerging options for the diagnosis of bacterial infections and the characterization of antimicrobial resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 1–29. <https://doi.org/10.3390/ijms22010456>
- Reta, A., Bitew Kifilie, A., & Mengist, A. (2019). Bacterial Infections and Their Antibiotic Resistance Pattern in Ethiopia: A Systematic Review. *Advances in Preventive Medicine*, 2019(Cdc), 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/4380309>
- Rohde, M. (2019). *The Gram-Positive Bacterial Cell Wall*. 1, 1–21. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018>.Correspondence
- Ryabchykov, O., Guo, S., & Bocklitz, T. (2019). Analyzing Raman spectroscopic data. *Physical Sciences Reviews*, 4(2), 1–16. <https://doi.org/10.1515/psr-2017-0043>
- Sabat, A. J., Budimir, A., Nashev, D., Sá-Leão, R., van Dijl, J. M., Laurent, F., Grundmann, H., & Friedrich, A. W. (2013). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Eurosurveillance*, 18(4), 1–15. <https://doi.org/10.2807/ese.18.04.20380-en>
- Sabat, A., Krzyszton-Russjan, J., Strzalka, W., Filipek, R., Kosowska, K., Hryniewicz, W., Travis, J., & Potempa, J. (2003). New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1801–1804. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1801-1804.2003>
- Schwartz, D. C., & Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37(1), 67–75. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90301-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90301-5)
- Sciacchitano, C. J. (1998). DNA fingerprinting of *Listeria monocytogenes* using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) motifs-polymerase chain reaction/capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 19(1), 66–70. <https://doi.org/10.1002/elps.1150190112>
- Sheldrick,), Shelx, G. M., Holt, R. E., & Cotton, T. M. (1989).) 66 (2) C(6)-1156 (6) 1909 (3). *J. Am. Chem. Soc*, 111(5), 2091. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Shutt, C. K., Pounder, J. I., Page, S. R., Schaecher, B. J., & Woods, G. L. (2005). Clinical evaluation of the DiversiLab microbial typing system using repetitive-sequence-based PCR for characterization of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), 1187–1192. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1187-1192.2005>
- Snežžana Miljanić, Leo Frkanec, Tomislav Biljan, 3 Zlatko Meić Mladen Žinić. (2007). Recent Advances in linear and nonlinear Raman spectroscopy I. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38(April), 1538–1553. <https://doi.org/10.1002/jrs>
- Stiles, P. L., Dieringer, J. A., Shah, N. C., & Van Duyne, R. P. (2008). Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Anchem.1.031207.112814>, 1(1), 601–626. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ANCHEM.1.031207.112814>
- Strola, S. A., Baritau, J.-C., Schultz, E., Simon, A. C., Allier, C., Espagnon, I., Jary, D., & Dinten, J.-M. (2014). Single bacteria identification by Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 19(11), 111610. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.19.11.111610>
- Suh, J. W., Kang, J. S., Kim, J. Y., Kim, S. B., Yoon, Y. K., & Sohn, J. W. (2024).

Characterization of the Outer Membrane Vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* Exhibiting Growth Inhibition against *Acinetobacter baumannii*. *Biomedicines*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/biomedicines12030556>

- Tadesse, L. F., Ho, C. S., Chen, D. H., Arami, H., Banaei, N., Gambhir, S. S., Jeffrey, S. S., Saleh, A. A. E., & Dionne, J. (2020). Plasmonic and Electrostatic Interactions Enable Uniformly Enhanced Liquid Bacterial Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Nano Letters*, 20(10), 7655–7661. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c03189>
- Tahir, M. A., Dina, N. E., Cheng, H., Valev, V. K., & Zhang, L. (2021). Surface-enhanced Raman spectroscopy for bioanalysis and diagnosis. *Nanoscale*, 13(27), 11593–11634. <https://doi.org/10.1039/d1nr00708d>
- Usman, M., Tang, J. W., Li, F., Lai, J. X., Liu, Q. H., Liu, W., & Wang, L. (2023). Recent advances in surface enhanced Raman spectroscopy for bacterial pathogen identifications. *Journal of Advanced Research*, 51, 91–107. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.11.010>
- Wang, C., Madiyar, F., Yu, C., & Li, J. (2017). Detection of extremely low concentration waterborne pathogen using a multiplexing self-referencing SERS microfluidic biosensor. *Journal of Biological Engineering*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13036-017-0051-x>
- Wang, R., & Luo, J. (2022). Ag NP-filter paper based SERS sensor coupled with multivariate analysis for rapid identification of bacteria. *RSC Advances*, 13(1), 499–505. <https://doi.org/10.1039/d2ra05715h>
- Wang, Y., Yan, B., & Chen, L. (2013). SERS Tags: Novel optical nanoprobe for bioanalysis. *Chemical Reviews*, 113(3), 1391–1428. <https://doi.org/10.1021/cr300120g>
- Wientjes, F. B., Woldringh, C. L., & Nanninga, N. (1991). Amount of peptidoglycan in cell walls of gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 173(23), 7684–7691. <https://doi.org/10.1128/jb.173.23.7684-7691.1991>
- Yamamoto, Y. (2002). PCR in diagnosis of infection: Detection of bacteria in cerebrospinal fluids. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(3), 508–514. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.3.508-514.2002/FORMAT/EPUB>
- Yilmaz, M. (2019). Silver-nanoparticle-decorated gold nanorod arrays via bioinspired polydopamine coating as surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) platforms. *Coatings*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/COATINGS9030198>
- Yilmaz, M., Ozdemir, M., Erdogan, H., Tamer, U., Sen, U., Facchetti, A., Usta, H., Demirel, G., Yilmaz, M., Erdogan, H., Demirel, G., Ozdemir, M., Usta, H., Tamer, U., Sen, U., & Facchetti, A. (2015). Micro-/Nanostructured Highly Crystalline Organic Semiconductor Films for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Applications. *Advanced Functional Materials*, 25(35), 5669–5676. <https://doi.org/10.1002/ADFM.201502151>
- Yilmaz, M., Senlik, E., Biskin, E., Yavuz, M. S., Tamer, U., & Demirel, G. (2014). Combining 3-D plasmonic gold nanorod arrays with colloidal nanoparticles as a versatile concept for reliable, sensitive, and selective molecular detection by SERS. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(12), 5563–5570. <https://doi.org/10.1039/c3cp55087g>
- Yoon, E. J., & Jeong, S. H. (2021). Maldi-tof mass spectrometry technology as a tool for the rapid diagnosis of antimicrobial resistance in bacteria. *Antibiotics*, 10(8), 1–13.

<https://doi.org/10.3390/antibiotics10080982>

- Yuan, K., Jurado-Sánchez, B., & Escarpa, A. (2022). Nanomaterials meet surface-enhanced Raman scattering towards enhanced clinical diagnosis: a review. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 1–29. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01711-3>
- Yuan, K., Zheng, J., Yang, D., Jurado, B., Sánchez, S., Liu, X., Guo, X., Liu, C., Dina, N. E., Jian, J., Bao, Z., Hu, Z., Liang, Z., Zhou, H., & Jiang, Z. (2018). *Self-Assembly of Au@Ag Nanoparticles on Mussel Shell To Form Large-Scale 3D Supercrystals as Natural SERS Substrates for the Detection of Pathogenic Bacteria*. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00023>
- Yuan, P., Ding, X., Yang, Y. Y., & Xu, Q. H. (2018). Metal Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Bacterial Infection. *Advanced Healthcare Materials*, 7(13). <https://doi.org/10.1002/ADHM.201701392>
- Zhang, C., Wang, C., Xiao, R., Tang, L., Huang, J., Wu, D., Liu, S., Wang, Y., Zhang, D., Wang, S., & Chen, X. (2018). Sensitive and specific detection of clinical bacteria: Via vancomycin-modified Fe₃O₄@Au nanoparticles and aptamer-functionalized SERS tags. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(22), 3751–3761. <https://doi.org/10.1039/c8tb00504d>
- Zhou, H., Yang, D., Ivleva, N. P., Mircescu, N. E., Niessner, R., & Haisch, C. (2014). SERS Detection of Bacteria in Water by in Situ Coating with Ag Nanoparticles. *Anal. Chem*, 86, 1525–1533. <https://doi.org/10.1021/ac402935p>
- Zhou, X., Hu, Z., Yang, D., Xie, S., Jiang, Z., Niessner, R., Haisch, C., Zhou, H., & Sun, P. (2020a). *Bacteria Detection: From Powerful SERS to Its Advanced Compatible Techniques*. 2001739, 1–23. <https://doi.org/10.1002/advs.202001739>
- Zhou, X., Hu, Z., Yang, D., Xie, S., Jiang, Z., Niessner, R., Haisch, C., Zhou, H., & Sun, P. (2020b). Bacteria Detection: From Powerful SERS to Its Advanced Compatible Techniques. *Advanced Science*, 7(23), 1–23. <https://doi.org/10.1002/advs.202001739>
- Zhu, J., Zhou, J., Guo, J., Cai, W., Liu, B., Wang, Z., & Sun, Z. (2013). Surface-enhanced Raman spectroscopy investigation on human breast cancer cells. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-37/FIGURES/4>
- Zong, C., Xu, M., Xu, L. J., Wei, T., Ma, X., Zheng, X. S., Hu, R., & Ren, B. (2018). Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Bioanalysis: Reliability and Challenges. *Chemical Reviews*, 118(10), 4946–4980. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00668>

ÖZ GEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı/ Soyadı:

Feyzanur CAN GÜLMÜŞ

Eğitim Bilgileri :

Lisans:

Yüksel Lisans:

