



Negatif elektrik yükü taşıyan *E. faecalis* bakterilerinin elektrik alan etkisi ile farklı gözenekli boyutlarda üretilen GS/Si yapılaraya yaklaştırılması sonucu iletkenlik ve kapasitans değişimleri

Changes in conductivity and capacitance as a result of the approach of *E. faecalis* bacteria carrying negative electrical charge to PS/Si structures produced in different porous sizes with the effect of electric field

Sevinç Güler^{1*} , Çiğdem Oruç² 

¹ İzmir Tınaztepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İzmir, TÜRKİYE

² Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, İstanbul, TÜRKİYE

Sorumlu Yazar / Corresponding Author*: sevinc7guler@gmail.com

Geliş Tarihi /Received: 27.02.2021

Kabul Tarihi / Accepted: 20.06.2021

Araştırma Makalesi/Research Article

DOI:10.21205/deufmd.2022247024

Atıf şekli/ How to cite: GÜLER,S.,ORUÇ,Ç.(2022). Negatif elektrik yükü taşıyan *E. faecalis* bakterilerinin elektrik alan etkisi ile farklı gözenekli boyutlarda üretilen GS/Si yapılaraya yaklaştırılması sonucu iletkenlik ve kapasitans değişimleri.DEUFMD, 24(70), 263-275.

Öz

Bakterilerin elektrik yükü taşıması, elektrik alanından etkilenebileceklerinin bir göstergesidir. Buna örnek olarak, negatif elektrik yükü taşıyan *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) bakterilerinin elektrik alan etkisi ile istenilen bir yöne doğru hareket ettirilebildiği tespit edildi. Çalışmada, gözenekli silisyum (GS) tabanlı sensör platformlarını elde etmek için n tipi tek kristal silisyum kullanılarak farklı parametrelerde uygulanan elektrokimyasal anodizasyon işlemi sonucu %60 gözeneklilik (7-15 µm gözenek boyutlarında) ve % 50 gözeneklilik (1-5 µm gözenek boyutlarında) olmak üzere iki farklı özellikte In/Si/GS/Ag yapılar elde edildi. Elde edilen bu GS tabanlı yapılar, negatif elektrik yükü bulunan *E. faecalis* bakterisi içeren sıvılara daldırılarak 0-5 kV/cm elektrik alan değerlerinin ileri yönde ve ters yönde uygulanması sonucu gözeneklere bakteri yaklaştırılması ve uzaklaştırılmasına farklı boyutlarda üretilmiş gözeneklerin etkisinin gösterilmesi amaçlandı. Gözenek boyutlarının ayarlanabilir olması nedeniyle bakterilerin farklı gözenek boyutlarına sahip yapılarıdaki elektriksel ölçümleri incelenerek, frekansa bağlı iletkenlik-frekans ve kapasitans-frekans değerleri tartışıldı.

Anahtar Kelimeler: Gözenekli silisyum, *E. faecalis*, Empedans spektroskopisi, Elektrik alan.

Abstract

The fact that bacteria carry an electric charge is an indication that they can be affected by the electric field.As an example, it has been determined that *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) bacteria carrying negative electrical charge can be moved in a desired direction by the effect of electric field.In this study, the porous silicon (PS) based sensor platform for obtaining the n-type single crystal electrochemical anodization process results apply to different parameters using silicon 60%

porosity (7-15µm in pore size) and 50% porosity (the 1-5 µmpore size) to In / Si / PS / Ag structures with two different properties were obtained. These PS-based structures obtained were immersed in fluids containing negative electric charge *E. faecalis* bacteria and 0-5 kV / cm electric field values were applied in forward and reverse direction to show the effect of pores produced in different sizes on the approach and removal of bacteria to the pores. Since the pore sizes are adjustable, the electrical measurements of bacteria in structures with different pore sizes were examined, and the frequency-dependent conductivity-frequency and capacitance-frequency values were discussed.

Keywords: Porous silicon, *E. faecalis*, Impedance spectroscopy, Electric field

1. Giriş

Gözenekli Silisyum (GS), geniş iç yüzey alanı, ayarlanabilir gözenek boyutu, gözenekliliği ve üretim kolaylığı nedeniyle biyosensör uygulamaları için umut verici bir materyal olarak kullanılmaktadır [1]. Hidroflorik asit (HF) içinde elektrokimyasal aşındırma yöntemi ile (anodizasyon) elde edilen gözenekli silisyum, HF konsantrasyonu, sıcaklık, iletkenlik tipi, ışınlama ve anodizasyon zamanı, akım yoğunluğu gibi etkenleri değiştirilerek incelendi [2]. Elektrolitte HF konsantrasyonu, akım yoğunluğu, silisyum katkı maddelerinin yoğunluğu, aydınlatma işlemi ve aşındırma süresi gibi parametrelere bağlı olarak birkaç nanometreden birkaç mikrometreye kadar değişen çeşitli gözenek boyutları elde edilebilir olduğu ve gözenek boyutuna bağlı olarak, GS 'nin, mikro gözenekli (≤ 2 nm), mezo gözenekli (2-50 nm) ve makro gözenekli (>50 nm) olmak üzere üç gruba ayrılabilir olduğu bildirildi [3]-[5]. HF oranı ve akım yoğunluğunun mezo gözenekli silisyumun gözenekliliğine ve yüzey alanına etkileri incelendi [6].

Gözenekli silisyum son zamanlarda biyosensör uygulamaları için potansiyel bir platform olarak araştırılmaktadır. GS, optik özellikleri sayesinde çok çeşitli biyosensörlerin geliştirilmesinde başarıyla kullanılmaktadır [7]. Gözenekli silisyum (GS), sensörler, biyosensörler ve özel tıbbi amaçlar için umut verici bir malzemedir [8]-[10]. Gözenekli silisyum, bakterilerin biriktirilebileceği büyük yüzey alanı avantajına sahip olması nedeniyle kullanılan bir malzemedir [11]. Gözenekli yapı içine bakteri depolanmasında bakterilerin özelliklerinin (*E. coli*, *Klebsiellaoxytoca* ve *Rhodococcusrhodochrous*) ve gözenek boyutlarının etkili olduğu [12] bildirildi. Gözenekli silisyumun biyosensör uygulaması, biyolojik kültürlerin biriktirilmesi için pasif platformlarda kullanımı da içerir [13], [14]. Uygulanan elektrik alanının cam substrat

üzerine bakteri birikiminin etkisinin varlığı [15] belirlendi. Gıda endüstrisinde *E. coli*'nin optik tespiti için spesifik antikör fonksiyonelleştirilmiş GS'ye dayalı bir biyosensör geliştirildi [16]. Algılama için empedans tabanlı bir sensör antikör konjuge kullanılarak küçük hacimlerde patojenik bakteriler bir algılama birimi olarak altın nanopartiküllerin varlığı [17] tespit edildi. Empedans spektroskopisi, yüksek hassasiyet ve yüzey bağlama olaylarını çözelti empedansından ayırma yeteneği gibi avantajlar sağlamaktadır [18], [19]. Aynı parametrelerde üretilen üç sensörü farklı *Salmonella typhimurium* konsantrasyonlarında 100 Hz ve 1 MHz frekans aralığında empedans spektroskopisi ölçümleri ile elektriksel olarak incelediler. Grafik sonuçlarından, 500 Hz'lik bir frekansta 150 k Ω ile 45 k Ω arasında değiştiği ve empedansta %75'lik bir azalma meydana geldiği görülmektedir. Bu nedenle, *S. typhimurium*'un neden olduğu empedanstaki değişime çift katmanlı kapasitans hakim olduğu yazarlar tarafından bildirildi [20]. Farklı kalınlıklarda gözenek boyutlarına sahip (3, 8 ve 12 µm) ve % 55 gözenekliliği olan üç farklı makro gözenekli silisyum elde edilerek silisyum tabanlı yapıların farklı *E. coli* konsantrasyonlarında 100 Hz ile 1 MHz frekans aralığında empedans spektroskopisi ile elektriksel ölçümleri alındı. Sabit bakteri konsantrasyonunda bakteri yerleşmeden önce gözenekli silisyum tabaka kalınlıklarının değerlerinin artmasıyla empedans değerlerinde bir artış gözlenirken, bakterilerin gözeneklere yerleşmesinden sonra üç farklı kalınlıktaki yapılar için empedans değerlerinde bir azalma meydana geldiği gösterildi [21]. Buna ek olarak, 2012 yılında yapılan çalışmaya göre, empedanstaki düşüş yüzdesinin daha düşük frekans aralığında daha fazla olduğu ve 1kHz'den sonra azaldığı gözlemlenildi [22]. Mikrosensör platformu kullanılarak 100 Hz ile 100 MHz frekans aralığında *S. mutans* ve *P.*

aeruginosa konsantrasyonlarını tespit etmek için empedans ölçümleri incelendi [23]. Bakterilerin, kontrollü büyüme koşulları altında tek tip boyutlu çiftler ve tetrad kümeleri halinde birleştiğini gösterildi ve bu tetrad kümelerinin harici bir AC elektrik alanı varlığında kendi kendine birleşmesi incelendi. Buna dayanarak yazarlar bir dış uyaranla (AC alanı) harekete geçirilen bakteriyel tetradlardan elde edilen bu kendiliğinden birleştirilmiş yapıların, değiştirilebilir işlevlere sahip biyomateryallerin imalatında kullanım bulabileceğine gösterdi [24]. Yüksek yerel elektrik alan kuvveti oluşturabilen paketlenmiş silisyum boncuklar kullanan yeni bir bakteriyel inaktivasyon cihazı geliştirildi. Bu cihazın, mikroorganizmaları geleneksel elektroporasyon sistemlerine kıyasla çok daha düşük voltajda sürekli olarak etkisiz hale getirebildiği gözlemlendi [25]. Fenol atık suyunun arıtılması için MBR'de (EMBR) uygulanan uzun vadeli elektrik alanındaki mikrobiyal toplulukların membran zehirlenmesi ve kaymaları sistematik olarak araştırıldı [26]. Dielektroforez (DEP) altında *Bacillus subtilis* bakteri inci zinciri sırasıyla pozitif ve negatif dielektroforetik kuvvet altında oluşumunu inceleyerek AC / DC elektrik alanları ve parçacık izleme modülleri ile basit bir simülasyon aracılığıyla, bakterilerin DEP aracılığıyla iki elektrot arasındaki boşlukta inci zincir halinde kendi kendine organize olma mekanizmasının varlığı gözlemlendi [27].

Tarafımızdan, daha önce elektrik alan etkisi ile negatif elektrik yükü taşıyan *E. coli* bakterisi % 60 gözenekliliğe sahip GS esaslı platforma yönlendirilerek empedans spektroskopisi yöntemi ile incelemeler yapıldı. Uygulanan elektrik alan 0-10 kV/cm aralığında incelenerek frekansa bağlı empedans değerleri tartışıldı [28]. Bu çalışmamızdaki amacımız, dışarıdan uygulanan elektrik alan yardımı ile negatif elektrik yükü taşıyan *E. faecalis* bakterisini istenen yöne hareket ettirebildiğini göstermektir. Bu amaç için GS tabanlı sensör platformları kullanıldı. Farklı gözenek özelliklerinde hazırlanan GS platformları, *E. faecalis* bakterisini içeren sıvılar içerisine yerleştirilmiş, önce elektrik alan yokken sensörün elektronik tepkisi, iletkenlik ve kapasitansın frekansa bağlılığı şeklinde ölçüldü. Sonra aynı sisteme dışarıdan elektrik alan uygulanarak elektronik tepki olarak iletkenlik ve kapasitansın frekansa bağlılığı tespit edilip, karşılaştırmalar yapıldı. Ayrıca, deneyler

dışarıdan uygulanan elektrik alanın yönü tersine çevrilerek tekrarlanarak sonuçlar karşılaştırıldı. Tüm bu etkiler iki ayrı gözenek karakterine sahip platformlar için tekrarlandı ve incelendi.

2. Materyal ve Metot

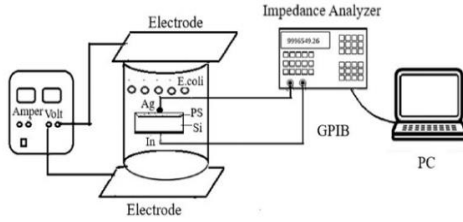
2.1. Elektrokimyasal anodizasyon yöntemi ile farklı gözenek boyutlarında GS/Si yapıların üretimi

Farklı boyutlardaki gözenekli silisyum yapıları elde etmek için (111) yönelimli ve 1.25×10^{-2} Ω .cm öz dirençli Antimon (Sb) katkılı n tipi tek kristal silisyum malzemeler elektrokimyasal anodizasyon işlemine tabii tutuldular. İstenilen kalitede bir GS/Si yapı oluşturabilmek için yarıiletkenin yüzeyini çok iyi temizlenerek yarıiletkenin birçok yüzey kusurunun ortadan kaldırılması hedeflendi. Bu ilk aşama GS/Si yapıların performansı da önemli ölçüde etkilenmiş olacaktır. Temizleme aşamasından sonra silisyum yarıiletkeni arka yüzeyi İndiyum (In) metali ile lehimlenmiş ve malzemeyi korumak için de aside dayanıklı balmumu ile kaplandı. Anodizasyon koşullarındaki parametrelerin değişimi ile gözenek boyutlarında değişiklik yapılabilinmektedir. Bu çalışmada iki farklı gözenek tipine ait yapılar kullanıldı. Gözenekli silisyumun elde edilmesi için yapılan elektrokimyasal anodizasyon işlemindeki numunelerin bir kısmı 15 mA/cm² sabit akım yoğunluğunda, HF:dH₂O oranı 1:3 olacak şekilde 40 dakika boyunca 50 W 12 V halojen lamba işlemine tabii tutulmuştur. Bu elektrokimyasal işlem sonucu elde edilen GS/Si yapılar, Örnek-1 olarak adlandırıldı. Numunelerin diğer kısmı ise 15 mA/cm² sabit akım yoğunluğunda, HF:dH₂O oranı 1:7 olacak şekilde 40 dakika boyunca 50 W 12 V halojen lamba işlemine tabii tutuldu. Bu parametrelerle elde edilen GS/Si yapılar ise Örnek-2 olarak adlandırıldı. Düzenekte kullanılacak olan malzemelerin HF asidi ile bir reaksiyon göstermemesi için elektrot olarak platin (Pt) tel kullanıldı. Elde edilen In/Si/GS yapılar sıvı gümüş boya ile In/Si/GS/Ag yapı haline getirildi [29]. GS örneklerini yüzey morfolojisini araştırmak için (JEOL 6510-LV JSM) taramalı elektron mikroskopisi (SEM) tekniği kullanıldı.

2.2. Biyolojik ve fiziksel deneyler

Bu çalışmada kullanılan bakteri suşu *E. faecalis*, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi,

Mikrobiyoloji Laboratuvarı tarafından temin edildi. Bakteriler 37 °C de Mueller-Hinton Agar' da (MHA) yetiştirildi. Biriktirme deneyi sırasında, sıvı ortam olarak 30 mM NaCl çözeltisi (serum fizyolojik % 9) kullanıldı. Deneyde kullanılan bakteriler Agar ile temas etmeden üst kısımdan alındı. 22-24 saat inkübasyon süresinden sonra test edilecek *E. faecalis* konsantrasyonları Shimadzu UV-1280 Multipurpose cihazı kullanılarak UV-VIS 600 nm dalga boyu spektrofotometresinde McFarland standartları baz alınarak hazırlanmıştır. Test edilecek örnekler için 2×10^7 cfu bakteri konsantrasyonu hazırlandı. GS numunelerinin bir petri kabındaki bakteri solüsyonuna daldırılmasından sonra, iki alüminyum (Al) metal paralel plaka kapasitör konfigürasyonuna yerleştirildi. İletkenlik ve kapasitans spektrumları, 5 Hz ila 100 kHz frekans aralığı için bir HP 4192A empedans analizörü kullanılarak gerçekleştirildi. İletkenlik ve kapasitans ölçümleri sırasında Al plakalarına 0-5 kV/cm arasında bir elektrik alanı uygulandı. Deney düzeneğinin şematik bir diyagramı (daha önce *E. coli* elektrik alan etkileşimini incelediğimiz sistem ile aynıdır) Şekil 1'de gösterilmektedir [28].

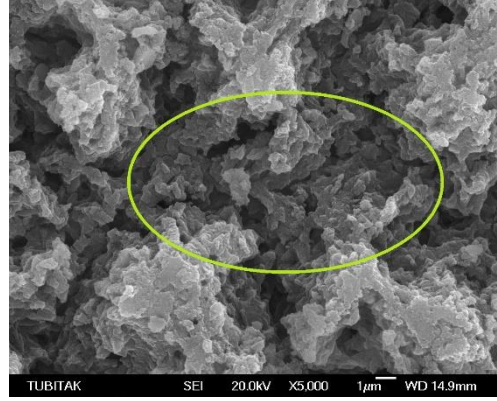


Şekil 1. Deney düzeneği şematik gösterimi [28].

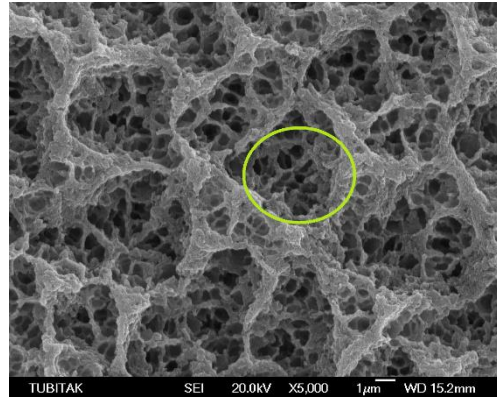
3. Bulgular

Elektrokimyasal aşındırma yönteminde kullanılan parametrelerin değiştirilmesi ile farklı boyutlarda gözenek elde edilebileceği bilinmektedir [30]. Elektrokimyasal aşındırma işlemi sonrası gravimetrik yöntem uygulanarak, Örnek-1 için; gözeneklilik % 60, Örnek-2 için ise; gözeneklilik % 50 olarak belirlendi. Ayrıca, yüzey morfolojisi için örnekler bir tarama elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelendi. Şekil 2.a ve 2.b' de, tipik bir GS örneğinin üstten görünüşü olan SEM görüntüleri gösterilmektedir. Örnek-1' in gözeneklerinin (çukurların) ortalama çapı 7-15 µm, ve Örnek-2' nin gözeneklerinin (çukurların)

ortalama çapı 1-5 µm olarak belirlendi. HF:dH₂O 1:7 oranının kullanılmasıyla çözelti derişik bir halden daha seyreltik bir hale getirildi. Çözeltide HF oranının artmasıyla dağlamalar azalmakta ve gözenek oluşumunda bir azalma meydana gelmektedir. Bu nedenle gözenek boyutlarında da bir küçülme meydana gelmektedir.



a.



b.

Şekil 2. (a) Örnek-1 ve (b) Örnek-2 GS tabanlı yapıların SEM görüntüleri

Bu çalışmanın temel amaçlarından biri, uygulanan elektrik alanın bakteriyel hücrelerin farklı boyutlara sahip makro gözenekli yapılar üzerine birikimi üzerindeki etkisini araştırmaktır. GS tabanlı cihazlar, sabit *E. faecalis* konsantrasyonu ile biriken bakteri miktarını tahmin etmek için elektriksel olarak karakterize edildi. Cihazların empedans spektroskopisi tekniği ile karakterizasyonu sırasında, elektrod-elektrolit arayüzünde

iletkenlik ve kapasitansın herhangi bir rastgele dalgalanmasını önlemek için In ohmik temas ve Ag üst temas arasına 250 mV genlik bir sinüs dalgası uygulandı.

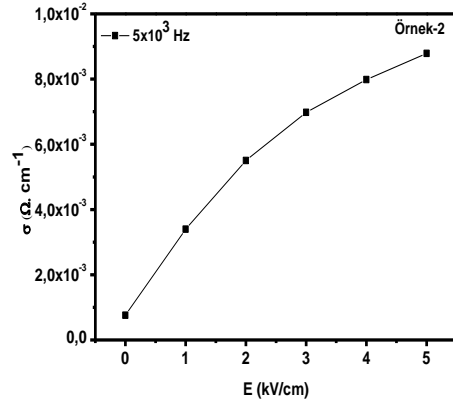
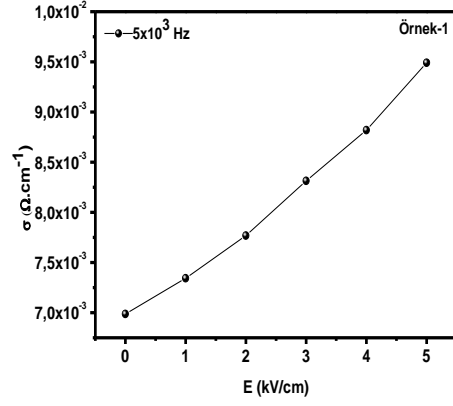
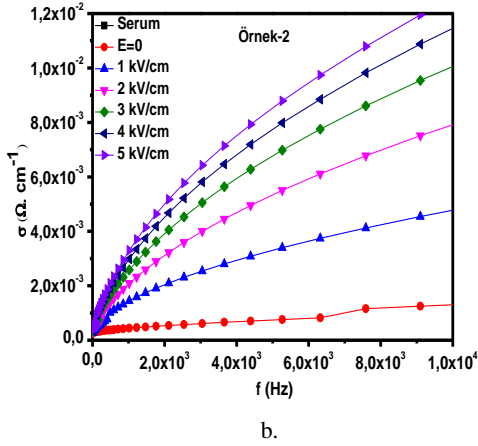
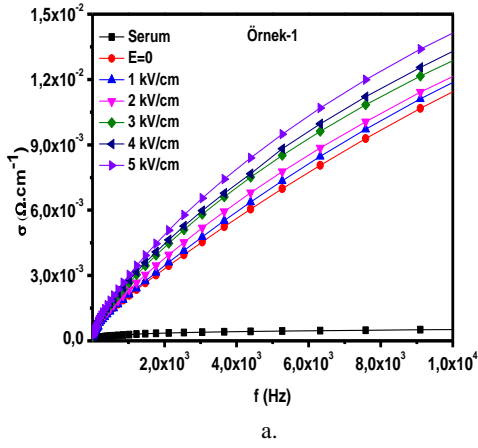
Çalışmada kullanılan GS tabanlı In/GS/Si/Ag sensör platformları deney ortamı için hazırlanan serum fizyolojik ve bakteri içeren sıvı içerisine sırasıyla daldırılarak ölçümler alındı. Besi yerinin kalabalık ve stresli olması nedeniyle bakteriler serum ile seyreltildi. Agarda üstten bakteriye temas edilmeden deneye hiçbir besi yeri eklenmediği için elektriksel değerlerde meydana gelen değişimlere bakteriler neden oldu.

Bu çalışmanın diğer amacı ise, günümüzde kullanılan bakteri sensörlerinin etkinliğini ve ölçüm hassasiyetini artırmak için bir yöntem sağlamaktır. Bu sensörlerde bakterilerin, sensör yüzeyi ile temas etmeleri yüzeyde bulunan antibadi veya aptemer ile bağlanabilmeleri çok önemlidir. Sensörlerin bakteri tespiti bu temasa bağlıdır. Dışarıdan uygulanan elektrik alan etkisi ile söz konusu bakteriler, sensör yüzeyine doğru hareket ettirilebilirler ve sensör yüzeyi ile etkileşimleri artar. Bu artış sensörlerin ölçüm aralığını ve hassasiyetini artırır. Bu çalışmada bakteri birikiminin farklı makro boyutlara sahip gözeneklerde birikmesi fikrini genişletmeyi amaçladık. Elektrik alanın cihazın iletkenlik ve kapasitans spektrumları üzerindeki etkisini görmek için elektrokimyasal işlem yoluyla farklı makro boyutlarda üretilen Örnek-1 ve Örnek-2 isimli GS tabanlı yapılar önce sadece serum fizyolojik içeren bir kabın içine yerleştirildi. Bu durumda GS ve alt kontak arasındaki iletkenlik-frekans değişimi ölçüldü. Ardından, 2×10^7 cfu' luk bir bakteri çözeltisine daldırıldı ve iletkenlik spektrumları 0-5 kV/cm arasında çeşitli elektrik alan değerleri altında alındı (Şekil 3.a, 3.b). *E.faecalis* bakterileri negatif yüklü oldukları için GS yüzeyi ile etkileşimlerinde iletkenlik değerlerinin artmasına neden oldu. Elektrik alan arttıkça daha fazla bakteri GS yüzeyi ile etkileşerek iletkenliği arttırdı. Bu sonuçlar, GS tabanlı sensör platformlarının serum ortamı ile bakteri ortamını ayırt edebildiğini ve buna ek olarak elektrik alan değerlerinin artmasıyla cihazın elektriksel parametrelerinde değişimlerin olduğunu belirtmektedir. Negatif yüklü *E. faecalis* bakterilerini GS yüzeyine doğru itmek için alt elektroda pozitif voltaj uygulandı. Bakteri konsantrasyonu sabit olmasına rağmen,

gözlemlenen iletkenlik spektrumlarındaki artma, uygulanan elektrik alanın etkisini açıkça gösterir ve araştırılan tüm frekans değerleri için uygulanan elektrik alanı ile GS platformun iletkenliği artar. Elektrik alanın varlığı iletkenlik değerlerinin artmasında daha etkindir. Şekil 3.a ve 3.b incelendiğinde her iki örnek içinde elektrik alanın artmasıyla iletkenlik değerlerinde bir artışa neden olduğu görüldü. Düşük frekans bölgesindeki iletkenlik değerlerinde yüksek frekans bölgesine göre daha az bir değişim görülmektedir. Örnek-1 ve Örnek-2 cihazları için benzer durum olan bu iletkenlik değerlerindeki artışın nedeninin, çift tabaka kapasitansının düşük frekans bölgesine hakim olması sonucu empedans (direnç) değerlerinde hızlı bir azalma meydana getirdiği ve buna bağlı olarak iletkenliği arttırdığı düşünülmektedir. Yüksek frekans bölgesinde ise alternatif akım (a.c.) sinyalinin değişimini takip edebilmek için yeterli zamanı bulunmadığından empedans değerlerinde çok az bir değişim olduğu görülmektedir. GS platformunun empedansının düşük frekans bölgesinde önemli ölçüde azalmasından, alternatif akım (a.c.) iletkenliğinin frekans ve tek gevşeme süreci ile arttığı sonucuna varılabilir [31]. Buna ek olarak, gözenek büyüklüğünün, gözeneklere yakalanabilecek türleri sınırlayan çökeltme uygulamaları için önemli bir faktör olduğu iyi bilinmektedir [32]. Bu gözlem, uygun şekilde yönlendirilmiş bir elektrik alanının, 15 mA.cm^{-2} lik sabit akım koşulları altında hazırlanan farklı makro gözenek boyutlarındaki GS tabanlı yapıların yüzeyinde bulunan gözeneklerine *E. faecalis* bakterilerinin birikmesini kolaylaştırabileceğini bir kez daha ortaya koymaktadır. [33] ve [34] artan elektrik alanı ile depolanan faj ve viryonların sayısının arttığını gözlemlediler.

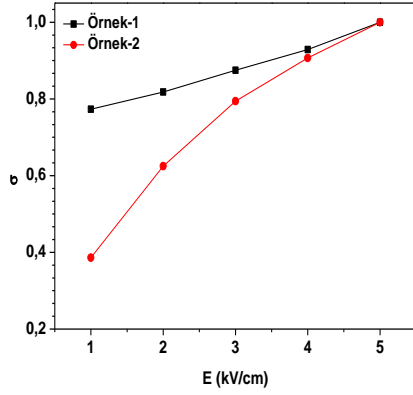
Sonuçların daha net anlaşılabilmesi için, Örnek-1 ve Örnek-2 cihazları için 5×10^3 Hz sabit frekansında 0 ila 5 kV/cm ileri yönde uygulanan elektrik alan değerlerindeki iletkenlik değişimleri incelendi (Şekil 3 (c,d)). Bu sonuca göre elektrik alan etkisi ile bakteriler farklı makro gözenekliliğe sahip yapılarıdaki GS yüzeyine daha çok yaklaşırlar ve negatif elektrik yükü taşıdıkları için iletkenlik değerlerinde bir artışa sebep olurlar. Örnek-1 GS tabanlı cihazın iletkenlik değer sonuçlarına göre elektrik alanın artmasıyla iletkenlik değerlerindeki artış Örnek-2 'ye göre daha az olduğu grafikten görülmektedir. Buna farklı

boyutlarda üretilen makro gözenekli yapıların neden olduğu düşünülmektedir. Şekil 3.e' de ise Örnek-1 ve Örnek-2' nin 5×10^3 Hz sabit frekansındaki iletkenliklerinin normalizasyonu verildi. Örnek-1'in gözenekleri daha büyük ve yüzey alanı aynı orantıda daha küçüktür. Elektrik alan etkisi, her iki örnekte de iletkenlikte artmaya neden olsa da, iletkenlik artış değeri; gözenekleri küçük ama yüzey alanı büyük olan Örnek-2' de daha fazladır. Yani Örnek-2'nin yüzey alanının büyük olması GS üzerinde daha fazla sayıda bakteri etkileşmesine neden olmuş, bu da iletkenlik değerlerinin daha fazla artmasını sağladı.



Şekil 3. (c) Örnek-1 ve (d) Örnek-2 GS tabanlı yapıların 2×10^7 cfu *E. faecalis* konsantrasyonunda 0-5kV/cm ileri yönde uygulanan elektrik alan değerlerinde 5×10^3 Hz sabit frekansı için iletkenlik değişimi

Şekil 3. (a) Örnek-1 ve (b) Örnek-2 GS tabanlı yapıların 2×10^7 cfu *E. faecalis* konsantrasyonunda 0-5kV/cm ileri yönde uygulanan elektrik alan değerlerinde frekansa bağlı iletkenlik değişimi

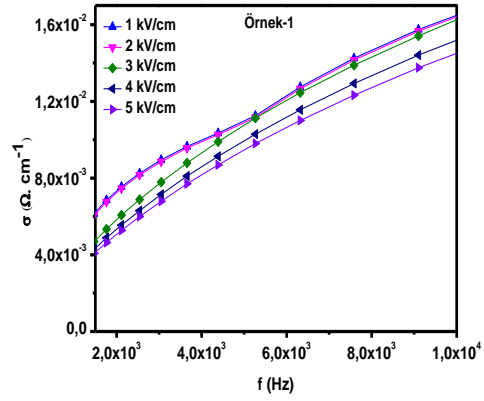


e.

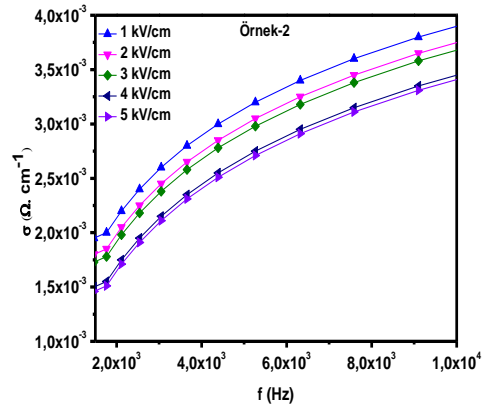
Şekil 3. (e) Örnek-1 ve Örnek-2 GS tabanlı yapıların 2×10^7 cfu *E. faecalis* konsantrasyonunda 0-5kV/cm ileri yönde uygulanan elektrik alan değerlerinde 5×10^3 Hz sabit frekansındaki normalizasyon grafiği

İletkenlik spektrumlarında gözlemlenen elektrik alanı bağımlılığının tersine çevrilebilirliğini kontrol etmek için, aynı ölçümler Örnek-1 ve Örnek-2 GS tabanlı cihazları üzerinde ve ters taraflı elektrik alanı altındaki 2×10^7 cfu *E. faecalis* bakteri konsantrasyonu için de gerçekleştirildi. Elektrik alanı tersine çevirebilmek için Şekil 1' de gösterilen üst plakaya pozitif voltaj uygulandı. Şekil 4.a ve 4.b' de verilen Örnek-1 ve Örnek-2 GS tabanlı cihazların ölçülen iletkenlik değerlerinin, uygulanan elektrik alanının artışıyla azalmakta olduğu gözlemlendi. Bu durum bize *E. faecalis*' in gözeneklerde birikmesinin, uygulanan elektrik alanının tersine çevrilmesiyle azaldığını göstermektedir. Bakterili sıvı içine GS yerleştirildiğinde bakterilerin bir kısmı doğal olarak yüzey ile bağ kurar. Sonra yüzeyden bakterileri uzaklaştırmak için o bağın kırılması gerekir. Ayrıca bakterinin kütlesi nedeni ile aşağıya doğru etkiyen yer çekimi kuvveti de vardır. Tüm bu etkilere rağmen ters yönde uygulanan elektrik alan yüzeyden bakteri uzaklaştırmayı başardı. Şekil 4.c ve 4.d' de sırasıyla Örnek-1 ve Örnek-2 GS tabanlı cihazların, ters yönde uygulanan 0-5 kV/cm elektrik alan değerlerindeki iletkenlik değişimleri, 5×10^3 Hz sabit frekans değerinde incelendi. Grafiklerden, ters yönde uygulanan elektrik alanının artmasıyla

hem Örnek-1 hem de Örnek-2' deki iletkenlik değerindeki azalmalar net olarak görülmektedir. Bu sonuç bize bakterilerin bir kısmının ters elektrik alan etkisi ile GS yüzeyinden uzaklaştırabildiğini kanıtlar. Şekil 4.e' de ise Örnek-1 ve Örnek-2' nin 5×10^3 Hz sabit frekansındaki normalizasyon grafiği verilmektedir. Örnek-1' in gözenekleri daha büyük ve yüzey alanı aynı orantıda daha küçüktür. Dolayısı ile Örnek-1 GS yüzeyi ile etkileşme içinde olan bakteri sayısı daha azdır. Diğer bir deyişle, Örnek-2 GS yüzeyinde etkileşimde daha çok bakteri var olduğu için ters elektrik alan etkisi ile yüzeyi terk eden bakteri sayısı da daha fazladır. Bu sebeple iletkenlik değeri daha hızlı azalır.

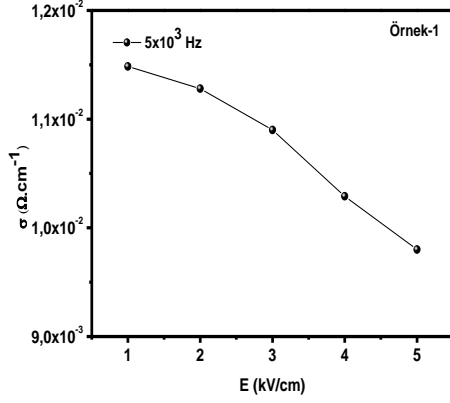


a.

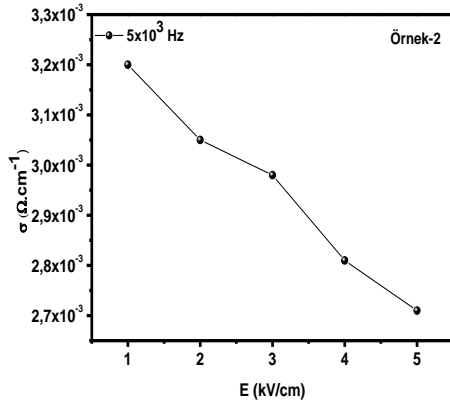


b.

Şekil 4. (a) Örnek-1 ve (b) Örnek-2 GS tabanlı yapıların 2×10^7 cfu*E.faecalis* konsantrasyonunda 0-5kV/cm ters yönde uygulanan elektrik alan değerlerinde frekansa bağlı iletkenlik değişimi

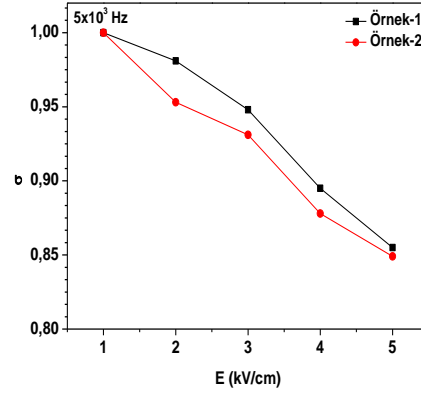


c.



d.

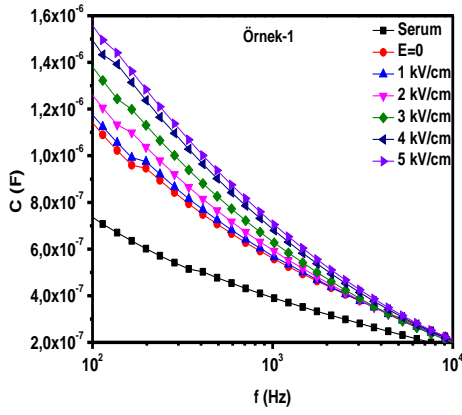
Şekil 4. (c) Örnek-1 ve (d) Örnek-2 GS tabanlı yapıların 2×10^7 cfu*E. faecalis* konsantrasyonunda 0-5kV/cm ters yönde uygulanan elektrik alan değerlerinde 5×10^3 Hz sabit frekansı için iletkenlik değişimi



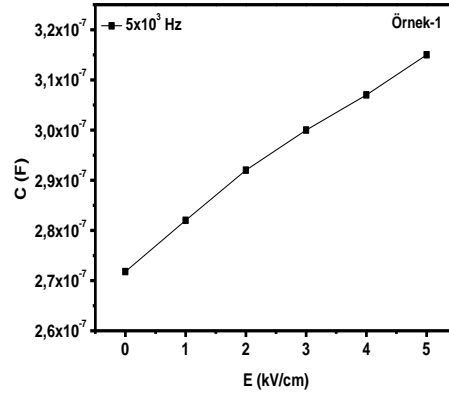
e.

Şekil 4. (e) Örnek-1 ve Örnek-2 GS tabanlı yapıların 2×10^7 cfu*E. faecalis* konsantrasyonunda 0-5kV/cm ters yönde uygulanan elektrik alan değerlerinde 5×10^3 Hz sabit frekansındaki normalizasyon grafiği

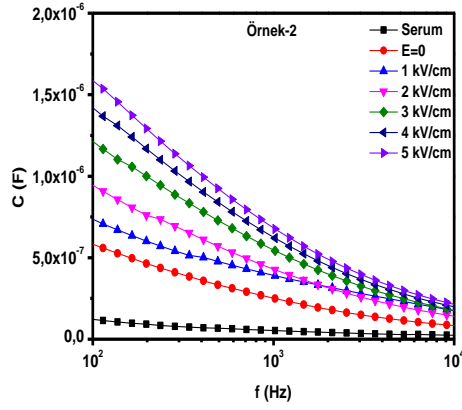
Aynı deneyler altında, 0-5 kV/cm ileri ve ters yönde elektrik alanının uygulaması ile farklı makro boyutlara sahip GS tabanlı Örnek-1 ve Örnek-2 cihazlarındaki gözenekler üzerine birikmiş bakteri hücre sayısının frekansa bağlı kapasitans değerleri üzerindeki etkisi araştırıldı. Şekil 5.a ve 5.b' de sırasıyla farklı makro boyutlarda üretilen Örnek-1 ve Örnek-2' ye ait frekansa bağlı kapasitans grafikleri yarı logaritmik olarak verilmektedir. İleri yönde uygulanan 0-5 kV/cm elektrik alanının artmasıyla her iki örnek için de tüm frekans değerleri için kapasitans değerlerinde bir artış meydana geldiği görülmektedir. Kapasite, GS yüzeyindeki yük birikimi ile orantılıdır. Elektrik alan yardımı ile negatif yüklü bakterilerin GS yüzeyinde birikmeleri sonucu kapasitansta artış gözlenir. Şekil 5.c ve 5.d' de ise her iki örnek için de 5×10^3 Hz sabit frekans değerindeki kapasitans değerleri incelendi. Elektrik alan değeri arttıkça kapasitansta da artış devam eder. Şekil 5.e' de ise bu kapasitans değerlerinin artışları her iki örnek için de normalizasyonu karşılaştırıldı. Grafikten elde edilen sonuçlara göre, daha büyük gözenek boyutlarına sahip Örnek-1' in gözenek boyutlarının büyük olmasına bağlı yüzey alanının daha az oluşu nedeniyle bakteri hücrelerini kapasite etme değeri Örnek-2' ye göre daha azdır.



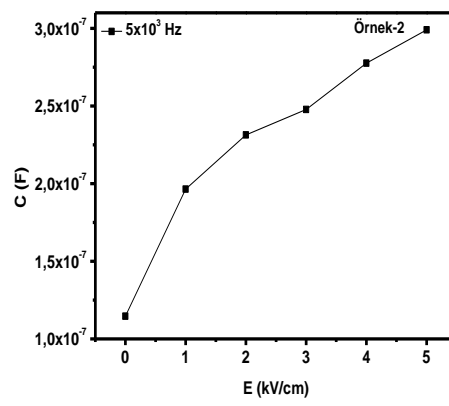
a.



c.



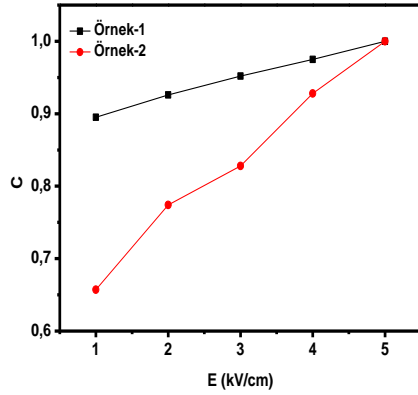
b.



d.

Şekil 5. (a) Örnek-1 ve (b) Örnek-2 GS tabanlı yapıların 2×10^7 cfu *E.faecalis* konsantrasyonunda 0-5kV/cm ileri yönde uygulanan elektrik alan değerlerinde frekansa bağlı kapasitans değişimi

Şekil 5. (c) Örnek-1 ve (d) Örnek-2 GS tabanlı yapıların 2×10^7 cfu *E.faecalis* konsantrasyonunda 0-5kV/cm ileri yönde uygulanan elektrik alan değerlerinde 5×10^3 Hz sabit frekansı için kapasitans değişimi

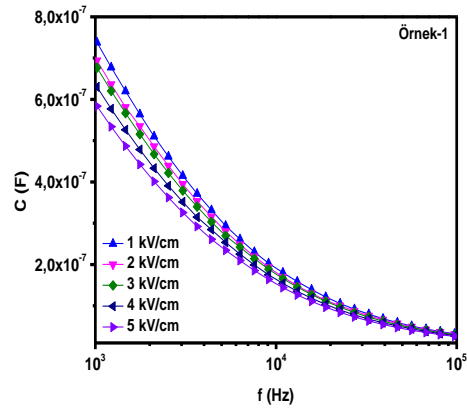


e.

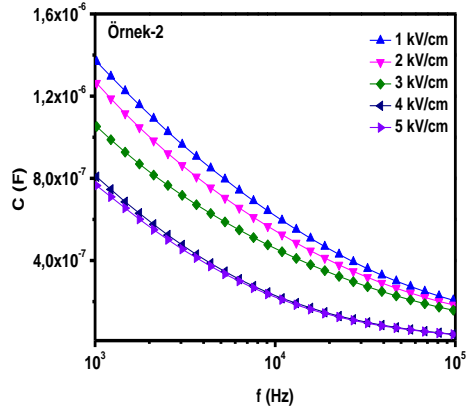
Şekil 5. (e) Örnek-1 ve Örnek-2 GS tabanlı yapıların 2×10^7 cfu *E. faecalis* konsantrasyonunda 0-5kV/cm ileri yönde uygulanan elektrik alan değerlerinde 5×10^3 Hz sabit frekansındaki kapasitans normalizasyon grafiği

Ters yönde uygulanan 0-5 kV/cm elektrik alan değerlerinin frekansa bağlı kapasitans değişimleri Şekil 6.a ve 6.b' de yarı logaritmik olarak verildi. Farklı gözenek boyutlarına sahip Örnek-1 ve Örnek-2 GS tabanlı yapıların *E. faecalis* bakteri konsantrasyonu içerisindeki kapasitans değerlerinin, artan elektrik alan değeri ile birlikte bir azalış gösterdiği belirlendi. Önceki deneylerle uyumlu biçimde, bakterili sıvı içine GS yerleştirildiğinde bakterilerin bir kısmı doğal olarak yüzey ile bağ kurar. Sonra yüzeyden bakterileri uzaklaştırmak için o bağın kırılması gerekir. Ayrıca bakterinin kütlesi nedeni ile aşağıya doğru etkiyen yer çekimi kuvveti de vardır. Yine de ters yönde uygulanan elektrik alan yüzeyden bakteri uzaklaştırmayı başardı. Ancak ters yönde uygulanan elektrik alanın kapasitans değerlerindeki değişimi, ileri yöndekine göre oldukça küçük olduğu görüldü. Şekil 6.c ve 6.d' de ise her iki örnek için de 5×10^3 Hz sabit frekans değerindeki zamana bağlı kapasitans değerleri incelendi. Grafikten elde edilen sonuçlara göre, ters yönde uygulanan elektrik alanının artmasıyla her iki örnekte de kapasitans değerlerinde azalma gözlemlendi. Bu sonuç da bize bakterilerin bir kısmının ters elektrik alan etkisi ile GS yüzeyinden uzaklaştırabildiğini kanıtlar. Şekil 6.e' de ise Örnek-1 ve Örnek-2' nin 5×10^3 Hz sabit

frekansındaki kapasitans değerlerinin normalizasyonu verilmektedir. Örnek-1'in gözenekleri daha büyük ve yüzey alanı aynı orantıda daha küçüktür. Dolayısı ile Örnek-1 GS yüzeyi ile etkileşme içinde olan bakteri sayısı daha azdır. Bu azlık empedans değerindeki değişim azlık oranını açıklar. Yani Örnek-2 GS yüzeyinde etkileşimde daha çok bakteri var olduğu için ters elektrik alan etkisi ile yüzeyi terk eden bakteri sayısı da daha fazladır. Bu sebeple kapasitans değeri azalma hızı daha fazladır.



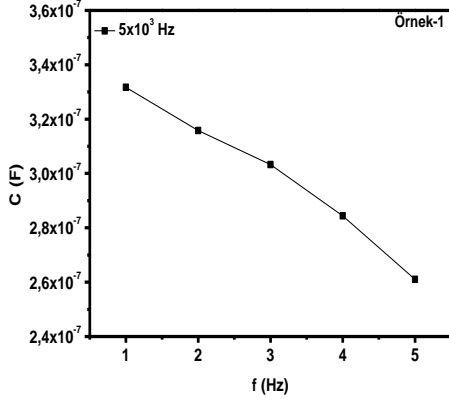
a.



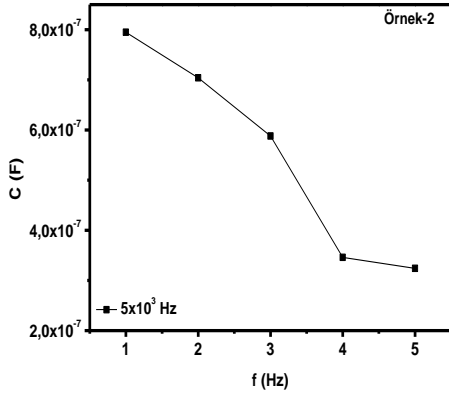
b.

Şekil 6. (a) Örnek-1 ve (b) Örnek-2 GS tabanlı yapıların 2×10^7 cfu *E. faecalis* konsantrasyonunda 0-5kV/cm ters yönde

uygulanan elektrik alan değerlerinde frekansa bağlı kapasitans değişimi

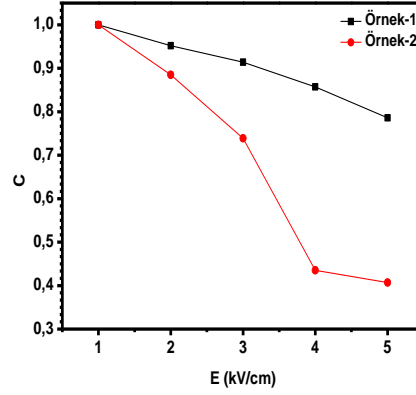


c.



d.

Şekil 6. (c) Örnek-1 ve (d) Örnek-2 GS tabanlı yapıların 2×10^7 cfu *E.faecalis* konsantrasyonunda 0-5kV/cm ters yönde uygulanan elektrik alan değerlerinde 5×10^3 Hz sabit frekansı için kapasitans değişimi



e.

Şekil 6. (e) Örnek-1 ve Örnek-2 GS tabanlı yapıların 2×10^7 cfu *E.*

faecalis konsantrasyonunda 0-5kV/cm ters yönde uygulanan elektrik alan değerlerinde 5×10^3 Hz sabit frekansındaki kapasitans normalizasyon grafiği

4. Tartışma ve Sonuç

Bakterilerin elektriksel yük taşıyor olmaları, elektrik alan yardımı ile hareketlerinin kontrol edilebileceği fikrini doğurdu. Elektrik alan ile kontrol edilecek olan bu hareket kabiliyetini, bakteri-sensör yüzey etkileşiminin artırılmasında kullanmak istedik. Bu amaçla, farklı makro gözenek boyutlarında GS tabanlı iki farklı sensör platformu üretilerek, bu platformlarda elektrik alan yardımı ile bakteri hücreleri biriktirildi. Farklı anodizasyon koşulları altında hazırlanan bu iki platform için ileri ve ters yönde elektrik alan uygulanması ile sabit bakteri hücre konsantrasyonundaki sıvıda iletkenlik-frekans ve kapasitans-frekans spektrumları üzerine etkisi kaydedildi. Sonuçlara göre, sabit bakteri konsantrasyonlu sıvıda incelenen Örnek-1 ve Örnek-2 cihazlarının her ikisi içinde iletkenlik ve kapasitans değerlerinin, ileri yönde elektrik alanının artırılmasıyla arttığı gösterildi. Öte yandan, ters elektrik alanının cihazın iletkenlik ve kapasitansında azalmaya neden olduğu görüldü. Farklı makro boyutlarında üretilen bu iki cihaz karşılaştırıldığında ise; Örnek-2 GS tabanlı (gözenekleri daha küçük ve yüzey alanı daha büyük) sensör platformunun, iletkenlik ve kapasitans değerlerinin, elektrik alanının

artmasıyla daha çok artış gösterdiği tespit edildi. 1-5 µm gözenek boyutlarına sahip bu cihazın yüzey alanının daha büyük olması nedeniyle elektriksel iletkenliğinin daha iyi ve daha çok bakteri ile etkileşimde olduğu sonucuna varıldı.

Teşekkür

Bu çalışma Yıldız Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje no. 2015-01-01-KAP03). Yazarlar ayrıca, *E. faecalis* bakterisi hücrelerini temin ettikleri için Prof. Dr. F. Köksal Çakırlar' a (İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı) teşekkür eder. Ayrıca yazarlar cihaz kullanımı için Yıldız Teknik Üniversitesi Prof.Dr.Ahmet Altındal'a teşekkür eder.

Kaynakça

- [1] A. Jane, R. Dronov, A. Hodges, and N. H. Voelcker, "Porous silicon biosensors on the advance," *Trends in Biotechnology*, 2009, doi: 10.1016/j.tibtech.2008.12.004.
- [2] R. L. Smith and S. D. Collins, "Porous silicon formation mechanisms," *J. Appl. Phys.*, 1992, doi: 10.1063/1.350839.
- [3] A. Julbe and J. D. F. Ramsay, "Chapter 4 Methods for the characterisation of porous structure in membrane materials," *Membr. Sci. Technol.*, 1996, doi: 10.1016/S0927-5193(96)80007-6.
- [4] K. Kobayashi, F. A. Harraz, S. Izuo, T. Sakka, and Y. H. Ogata, "Macropore growth in a prepatterned p-type silicon wafer," *Phys. Status Solidi Appl. Mater. Sci.*, 2007, doi: 10.1002/pssa.200674325.
- [5] A. Uhlir, "Electrolytic Shaping of Germanium and Silicon," *Bell Syst. Tech. J.*, 1956, doi: 10.1002/j.1538-7305.1956.tb02385.x.
- [6] P. M. Z. Hasan, V. K. Sajith, M. Shahnawaze Ansari, J. Iqbal, and A. Alshahrie, "Influence of HF concentration and current density on characteristic morphological features of mesoporous silicon," *Microporous Mesoporous Mater.*, 2017, doi: 10.1016/j.micromeso.2017.04.059.
- [7] I. Rea *et al.*, "Fabrication and characterization of a porous silicon based microarray for label-free optical monitoring of biomolecular interactions," *J. Appl. Phys.*, 2010, doi: 10.1063/1.3273410.
- [8] T. J. Barnes, K. L. Jarvis, and C. A. Prestidge, "Recent advances in porous silicon technology for drug delivery," *Therapeutic Delivery*. 2013, doi: 10.4155/tde.13.52.
- [9] B. Gupta, Y. Zhu, B. Guan, P. J. Reece, and J. J. Gooding, "Functionalised porous silicon as a biosensor: Emphasis on monitoring cells in vivo and in vitro," *Analyst*. 2013, doi: 10.1039/c3an00081h.
- [10] R. J. Martin-Palma, "Biomedical applications of nanostructured porous silicon: a review," *J. Nanophotonics*, 2010, doi: 10.1117/1.3496303.
- [11] S. M. Yoo and S. Y. Lee, "Optical Biosensors for the Detection of Pathogenic Microorganisms," *Trends in Biotechnology*. 2016, doi: 10.1016/j.tibtech.2015.09.012.
- [12] H. Bai, N. Cochet, A. Pauss, and E. Lamy, "Bacteria cell properties and grain size impact on bacteria transport and deposition in porous media," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2016, doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.12.016.
- [13] S. B. T. De-Leon, R. Oren, M. E. Spira, N. Korbakov, S. Yitzchaik, and A. Sa'ar, "Porous silicon substrates for neurons culturing and bio-photonics sensing," in *Physica Status Solidi (A) Applications and Materials Science*, 2005, doi: 10.1002/pssa.200461136.
- [14] E. Punzón-Quijorna *et al.*, "Nanostructured porous silicon micropatterns as a tool for substrate-conditioned cell research," *Nanoscale Res. Lett.*, 2012, doi: 10.1186/1556-276X-7-396.
- [15] A. T. Poortinga, R. Bos, and H. J. Busscher, "Lack of effect of an externally applied electric field on bacterial adhesion to glass," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2001, doi: 10.1016/S0927-7765(00)00184-3.
- [16] N. Massad-Ivanir *et al.*, "Porous Silicon-Based Biosensors: Towards Real-Time Optical Detection of Target Bacteria in the Food Industry," *Sci. Rep.*, 2016, doi: 10.1038/srep38099.
- [17] N. Pal, S. Sharma, and S. Gupta, "Sensitive and rapid detection of pathogenic bacteria in small volumes using impedance spectroscopy technique," *Biosens. Bioelectron.*, 2016, doi: 10.1016/j.bios.2015.09.037.
- [18] A. Bogomolova *et al.*, "Challenges of electrochemical impedance spectroscopy in protein biosensing," *Anal. Chem.*, 2009, doi: 10.1021/ac9002358.
- [19] H. J. Schütt and E. Gerdes, "Space-charge relaxation in ionically conducting oxide glasses. I. Model and frequency response," *J. Non. Cryst. Solids*, 1992, doi: 10.1016/S0022-3093(05)80377-1.
- [20] R. D. Das, C. RoyChaudhuri, S. Maji, S. Das, and H. Saha, "Macroporous silicon based simple and efficient trapping platform for electrical detection of Salmonella typhimurium pathogens," *Biosens. Bioelectron.*, 2009, doi: 10.1016/j.bios.2009.04.014.
- [21] R. D. Das, A. Dey, S. Das, and C. Roychaudhuri, "Interdigitated electrode-less high-performance macroporous silicon structure as impedance biosensor for bacteria detection," *IEEE Sens. J.*, 2011, doi: 10.1109/JSEN.2010.2087746.
- [22] R. D. Das, N. Mondal, S. Das, and C. Roychaudhuri, "Optimized electrode geometry for an improved impedance based macroporous silicon bacteria detector," *IEEE Sens. J.*, 2012, doi: 10.1109/JSEN.2011.2175724.
- [23] P. B. Lillehoj, C. W. Kaplan, J. He, W. Shi, and C. M. Ho, "Rapid, Electrical Impedance Detection of Bacterial Pathogens Using Immobilized Antimicrobial Peptides," *J. Lab. Autom.*, 2014, doi: 10.1177/2211068213495207.
- [24] K. Samantaray, S. R. Mishra, G. Purohit, and P. S.

- Mohanty, "AC Electric Field Mediated Assembly of Bacterial Tetrads," *ACS Omega*, 2020, doi: 10.1021/acsomega.9b04124.
- [25] S. Pudasaini, A. T. K. Perera, S. S. U. Ahmed, Y. B. Chong, S. H. Ng, and C. Yang, "An electroporation device with microbead-enhanced electric field for bacterial inactivation," *Inventions*, 2020, doi: 10.3390/inventions5010002.
- [26] B. Jiang *et al.*, "Impacts of long-term electric field applied on the membrane fouling mitigation and shifts of microbial communities in EMBR for treating phenol wastewater," *Sci. Total Environ.*, 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137139.
- [27] T. F. Kong, P. Y. Tan, B. Z. Tay, X. Shen, and Marcos, "Bacteria and cancer cell pearl chain under dielectrophoresis," *Electrophoresis*, 2021, doi: 10.1002/elps.202000277.
- [28] S. Güler, Ç. Oruç, and A. Altındal, "Electric field assisted deposition of E. coli bacteria into the pores of porous silicon," *J. Microbiol. Methods*, 2019, doi: 10.1016/j.mimet.2019.04.018.
- [29] C. Oruc and S. Guler, "Effect of Au, Ag and Cu thin films' thickness on the electrical parameters of metal-porous silicon direct hydrogen fuel cell," *Int. J. Hydrogen Energy*, 2014, doi: 10.1016/j.ijhydene.2014.10.017.
- [30] Ç. ORUÇ, S. GÜLER, and H. M. LUŞ, "Metal-Gözenekli Silisyum Direk Hidrojen Pili Üretim Parametrelerinin Geliştirilmesi," *Gazi Üniversitesi Fen Bilim. Derg. Part C Tasarım ve Teknol.*, 2018, doi: 10.29109/gujsc.383081.
- [31] M. Merve Yüzüak, S. Altun, A. Altındal, and Z. Odabaş, "Dielectric properties and electronic absorption: A comparison of novel azo- and oxo-bridged phthalocyanines," *Dalt. Trans.*, 2014, doi: 10.1039/c4dt02998d.
- [32] F. A. Harraz, "Porous silicon chemical sensors and biosensors: A review," *Sensors Actuators, B Chem.*, 2014, doi: 10.1016/j.snb.2014.06.048.
- [33] H. Anany, W. Chen, R. Pelton, and M. W. Griffiths, "Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes," *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, doi: 10.1128/AEM.05493-11.
- [34] J. H. Han *et al.*, "Capture and detection of T7 bacteriophages on a nanostructured interface," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, doi: 10.1021/am500655r.