

PESTİSİT ANALİZLERİNDE ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLERİN KULLANIMI

Elif Burcu BAHADIR¹, Süreyya MERİÇ PAGANO²

¹Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi, Tekirdağ

²Namık Kemal Üniversitesi, Çorlu Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Çorlu, Tekirdağ

ÖZET

Pestisitler, tarımsal, endüstriyel, evsel ve savaş amaçlarıyla sık olarak kullanılan kimyasallardır. Tarımda kullanılmasındaki artıştan dolayı, pestisitler en önemli çevresel kirleticiler arasında yer almaktadır. Pestisitler amperometrik, potansiyometrik, konduktometrik transduser ve alan etkili transistörler kullanılarak tespit edilebilir. Pestisit tayini için geliştirilen biyosensörlerde; enzim, antibadi, hücre ve DNA teknikleri kullanılmıştır. Pestisitlerin enzimatik tespiti, seçilen enzimin aktivitesinin inhibisyonuna dayalıdır. Enzimlerin dışında canlı mikroorganizmalar (alg, bakteri, maya ve funguslar) biyosensörler için biyokatalitik element olarak kullanılabilir. Ayrıca pestisit analizlerinde, guanin oksidasyonuna dayalı DNA biyosensörleri de kullanılmaktadır. Biyosensörler, pestisitlerin ölçüldüğü HPLC/DAD, LC/MS/MS ve GC/MS gibi ileri kimyasal analiz teknikleri ile karşılaştırıldığında hassas bulunmuşlardır. Bu çalışma, günümüze dek pestisit analizlerinde biyosensör kullanımı ile ilgili bilimsel literatürü irdelemekte ve daha önce yapılan metodları karşılaştırmaktadır.

Anahtar kelimeler: Biyosensör, Pestisit Analizi, Su Kalitesi İzleme, Su Kirliliği Kontrol Yönetmeliği

APPLICATION OF ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS IN PESTICIDE ANALYSIS

ABSTRACT

Pesticides are agents widely used for agricultural, industrial, household and warfare purposes. Because of their increasing use in agriculture, pesticides are among the most important environmental pollutants. Pesticides can be detected by using amperometric, potentiometric, conductometric transducer and field effect transistor. Enzyme, antibody, cell and DNA techniques have been used in biosensors which were developed for pesticide analysis. The enzymatic detection of pesticides are based on inhibition of enzymatic activity of selected enzymes. Apart from enzymes, living microorganisms (alg, bacteria, yeast and fungus) can be used as a biocatalytic element for biosensors. DNA biosensors based on guanin oxidation are also used in pesticide analysis. Biosensors, when compared with advanced analytical techniques such as HPLC/DAD, LC/MS/MS and GC/MS have been found more sensitive. This study examines the literature regarding the use of biosensors in pesticide analysis and compares the previously used methods.

Keywords: Biosensors, Pesticide Analysis, Water Quality Monitoring, Water Pollution Control Regulations

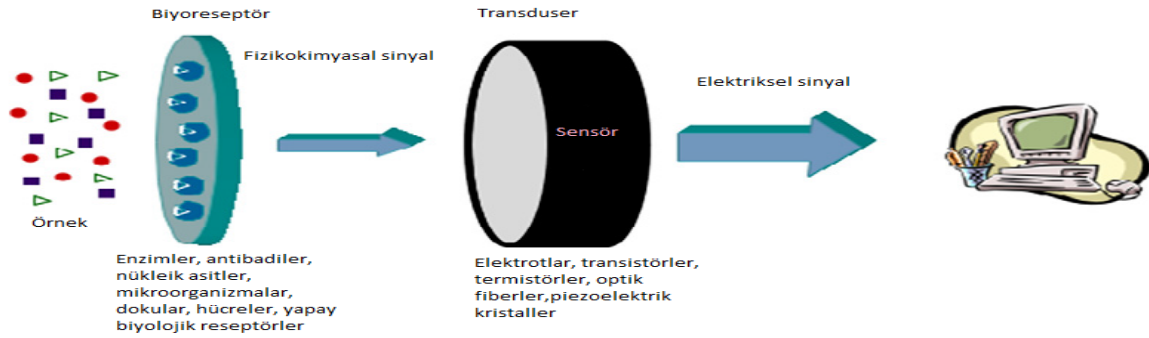
1. GİRİŞ

Pestisit, tarımsal mücadele amacı ile kullanılan tüm ilaçların ortak adıdır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından yapılan tanım şu şekildedir; “insan veya hayvanlarda oluşabilecek hastalıkları taşıyıcı; gıdaların, tarımsal ürünlerin, ahşap ve ahşap ürünlerinin veya hayvan yemlerinin üretimi, işlenmesi, taşınması, depolanması ve/veya pazarlanması sırasında bu uygulamaları olumsuz etkileyecek her türlü zararlının önlenmesi, yok edilmesi veya kontrol altına alınması amacıyla veya hayvanlar üzerinde veya vücutlarında bulunabilecek zararlıların kontrol altına alınması amacıyla kullanılan maddelerdir[1]. Pestisit deyimi, insektisit (böcek öldürücü), herbisit (yabani ot öldürücü), fungusit (küf öldürücü), rodentisit (kemirgen öldürücü) vb. şeklinde sınıflandırılan kimyasal maddelerin tümünü kapsamaktadır [2].

Dünyada tarım ilacı üretimi 3 milyon ton, yıllık satış tutarı ise 25-30 milyar \$ arasında değişmektedir. Dünya pestisit pazarında tonaj olarak yılda %1 civarında bir büyüme beklenmektedir. Herbisitler tarım ilaçları içinde % 47'lik bir payla birinci sırayı almaktadır. Bunu %29 ile insektisitler izlemekte, fungusitlerin ise % 19'luk bir payı bulunmaktadır. Herbisitler ve insektisitler, kullanımın %70'den fazla bir bölümünü kapsamaktadır. Diğer pestisit grupları ise %5'lik bir paya sahiptir. Parasal olarak değerlendirildiğinde tüketimin %31'ini insektisitler, %26'sını herbisitler, %20'sini de fungusitler oluşturmaktadır [3]. Türkiye'de tarım ilacı tüketimi ortalama 33.000 tondur. Bu miktarın %47'sini insektisitler, %24'ünü herbisitler, %16'sını fungusitler, %13'ünü de diğer gruplar oluşturmaktadır. Bu pestisitlerin yıllık satış tutarı da yaklaşık 230-250 milyon dolardır [3].

Gıdalardaki pestisit kalıntılarının uzun süre alınmasıyla uzun vadede akciğer hastalıkları, kanser, beyinde ve periferik sinir sisteminde harabiyet, karaciğer, kalp, endokrin, üreme sistemi ve böbrek hastalıkları oluşmaktadır. Bunların yanı sıra teratojenik, mutajenik, hematolojik, metabolik ve alerjik etkileri olan pestisitler de vardır. Pestisitlerin insanlarda yaptıkları bu etkilerin yanı sıra hayvanlar üzerinde de olumsuz etkileri mevcuttur. Pestisitlerin kümes hayvanları ve kuşlarda yumurta kabuklarının incelmeye neden olduğu ayrıca doğada kuşların üreme ve çoğalmalarını engellediği bilinmektedir. Pestisitlerin bu olumsuz etkileri kimyasal yapı, uygulama ve kullanma sıklığı gibi faktörlere bağlıdır [4,5]. Pestisitlerin su ortamında toksisitesi, aynı anda her yerde bulunması ve sürekliliği çevrede Avrupa Birliği'ni farklı çevresel sulardaki pestisit konsantrasyonunun sınırlandırılmasına yöneltmiştir. İnsanların tükettiği suyun kalitesi Direktif 98/83/EC ile tek pestisitler için 0,5 µg/l olarak sınırlandırılmıştır [6]. Ayrıca pestisitlerin aktif maddelerinin, parçalanma ya da reaksiyon ürünlerinin kaynak ve içme/kullanma sularında olabilecek maksimum limit değeri her bir pestisit için 0,1 µg/l, toplam pestisit için 0,5 µg/l'dir. Yüzeysel ve yer altı sularında aldrin, dieldrin, heptaklor ve heptaklor epoksit bulunması halinde ise limit değeri 0,03 µg/l'dir [7].

Biyosensörler, pestisitlerin tespiti için oldukça kullanışlıdır ve uzun zamandır araştırma alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır [8, 9, 10]. Biyosensörler (biyoalgılayıcılar), bünyesinde biyolojik bir duyarıcı bulunan ve bir fizikokimyasal çevirici ile birleştirilmiş analitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Biyosensörler biyolojik sistemlerle birleştirilmiş sensör sistemleridir. İki kısımdan oluşur; birinci kısım biyokomponentler (reseptör), ikinci kısım fiziksel komponentlerdir (transduser) (Şekil 1). Biyolojik algılayıcı eleman hedef analit ile seçici olarak etkileşimde bulunan biyokatalistler (enzim, mikroorganizma, doku malzemeleri) veya biyoligantlar (antikor, nükleik asit, lektin) olabilmektedir. Transduser ise hedef analit ile biyolojik algılayıcı arasındaki etkileşime bağlı olarak ortaya çıkan fiziksel cevabı ölçülebilir bir sinyale dönüştürmektedir. Analit ile biyoreseptör arasında oluşan kimyasal reaksiyon renk değişimi, ışımaya, ısı oluşumu, bir osilatörün frekansındaki değişim veya iletkenlik özelliğindeki değişim gibi bir sinyal üretmektedir [11].



Şekil 1. Biyosensörlerin şematik gösterimi [12, 13]

Bu derlemenin amacı önemli bir çevre kirleticisi olan pestisitlerin elektrokimyasal olarak tespit edilmesini irdelemektir. Derlemenin kapsamı elektrokimyasal biyosensörlerin dizaynı için gerekli biyoreseptörlerin tipleri ve elektrokimyasal ölçüm metodlarını içermektedir.

2. PESTİSİT ANALİZ METODLARI

Pestisit analiz metodları genel olarak 4 grup altında aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır.

2.1. Amperometri

Amperometri genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak tanımlanır. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş görür. Kalibrasyondan sonra, akım yoğunluklarından ilgili türlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde yararlanır. İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılması durumunda potansiyometrik sensörlerden en büyük fark, ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir [14].

Amperometrik immunosensörler, sabit elektriksel potansiyelde elektrot yüzeyinde elektroaktif türlerin özellikle antijen-antibadının yükseltgenip indirgenmesiyle konsantrasyona bağlı akımı ölçerler. Akım direk olarak antijen-antibadi bağlanması ile orantılıdır [8].

2.2. Potansiyometri

Potansiyometri bilindiği gibi en genel anlamda çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas alır. Elektrot potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit konsantrasyonunu tanımlar. Elde edilen sinyal Nerst Kanunu uyarınca konsantrasyonunun logaritması ile orantılıdır. Potansiyometrik ölçümlerde kullanılan temel sensörler pH ya da tek değerlikli iyonlara duyar cam elektrotlar, anyon ya da katyonlara duyar iyon seçimli elektrotlar ve karbondioksit ya da amonyağa yönelik gaz duyar elektrotlardır [14].

Potansiyometrik immunosensörler antibadi-antijen spesifik bağlanmadan sonra oluşan potansiyel değişimlerin ölçülmesine dayanır [8].

2.3. Alan Etkili Transistörler

Alan etkili transistör (FET) ve özellikle iyon duyarlı FET'ler (ISFET) biyosensörlerin gelişiminde temel oluşturmaktadır. Temel sensör olarak metal oksit yarı iletken alan etki transistörlerini (MOSFET) yada iyon duyar alan etki transistörlerini (ISFET) esas alan bu tür enzim sensörleri, enzim ile alan etki transistörlerinin birleştirilmesini ifade edecek şekilde enzim alan etki transistörleri(ENFET) olarak adlandırılırlar.

MOSFET'lerin, gazların ölçümüne uygun hale getirilmesiyle oluşan gaz duyar sensörlerde(GASFET) adsorblanan gaz moleküllerinin disosiyasyonu ve oluşan yükün oksit tabakasına transferi temel ilkeyi oluşturur. Bu durum tabanın dielektrik sabitini değiştirerek ve drain akımında bir modifikasyona yol açarak ölçüme imkan verir [8].

2.4. Kondüktometri

Çözgen içinde gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda elektriksel iletkenlikte değişimin ölçülmesine dayanır. Birçok enzimatik reaksiyonlar iyon konduktometrik veya impedimetrik aletler ölçülebilir.

Bir immunosensörde, elektrot yüzeyine antibadi-antijen etkileşiminden kaynaklanan elektriksel iletkenlik ölçülerek tespit gerçekleştirilir [15,16].

3. PESTİSİT ÖLÇÜMÜNDE KULLANILAN BİYOSENSÖR TİPLERİ

Biyosensörlerin çeşitli ortamlarda (toprak, hava, arıtma tesisi) kirleticilerin konsantrasyonlarını ölçme ve izleme potansiyeli yanında bu tekniklerin konvansiyonel analiz metodlarına göre daha ucuz olması ve ortamda kirleticinin davranışının sürekli izlenebilmesi gibi çok önemli avantajları vardır. Kirleticilerin anında analiz edilebilmesi, özellikle arıtma reaktörlerinin otomatik kontrolünde rahatlıkla kullanılabilir veya ortamdaki

kirleticinin sürekli izlenmesi ile gerekli önlemlerin alınabilmesine izin verir. Konvansiyonel analiz metotları oldukça pahalı, uzun zaman alan ve uzmanlık gerektiren tekniklerdir. Buna karşın biyosensörler düşük maliyetli ve taşınabilir olduklarından yerinde analiz imkânı sağlayan, hassas ve güvenilir biyoanalitik sistemlerdir [17].

3.1. Enzim Bazlı Biyosensörler

Enzimler, canlı hücrelerde üretilen substratları katalizleyen organik katalistlerdir. Enzim bazlı sensörler, temelde enzim katalizli reaksiyonların cevabını ölçer; her fiziksel ölçüm bu reaksiyonun hızı ile ilişkilidir ve tespit için kullanılır. Elektrokimyasal transduserler kullanarak enzim aktivitesi izlemede çeşitli prosedürler kullanılmıştır. Bu aktivitenin değerlendirilmesinde enzimatik reaksiyonlarda elektroaktif ürünler veya kosubstratların direk ölçümünü içerir. Bunun tespiti sentetik mediyatör kullanılarak indirek olarak elektrolit türü ile elektrot arasındaki elektron transferiyle sağlanır. Pestisit tespiti için katalitik aktiviteye veya reaksiyon inhibisyonuna dayalı birçok biyosensörler bulunmaktadır. Pestisitlerin direk tespiti için organofosfor hidrolaz enzimi sıklıkla kullanılır.

Organofosfor hidrolaz (OPH), organofosfor hidrolizleyici enzimdir; geniş substrat spesifikliğine sahiptir ve birçok organofosfor (OP) pestisitleri hidrolizler (Ör: parakson, paratyon, koumafos, diazinon, dursban). Organofosfor asit hidrolaz organofosfor bileşiklerin hidrolizini katalizler, P-O, P-F, P-S veya P-CN bağlarının ayrılması ile iki proton ve alkol üretir; birçok durumda kromoforik ve/veya elektroaktiftir. Oluşan hidrojen iyonu, potansiyometrik olarak takip edilir. Organofosfor hidrolaz, hidroliz ürünlerinin oksidasyon ve redüksiyon akımının amperometrik transduser ile gözlenmesi ile birleştirilebilir.

Organofosfor hidrolaz enzimi, parakson ve paratyonun tespiti için biyosensör olarak kullanılmıştır. Sensörün transduser yapısı, çip duyarlı kapasitif elektrolit iletici yarı iletkenlerden oluşur, bu pH değişimiyle organofosfat bileşiklerin OPH ile katalizlenmesine neden olur [8].

Sudaki organofosfat pestisitlerin tayini OPH ve akış enjeksiyon amperometrik biyosensör kullanarak gerçekleştirilmiştir. Organofosfat pestisitler aktif amino propil cam boncuklar üzerine immobilize edilmiştir. Çalışma elektrodu olarak karbon pasta elektrot, referans elektrot olarak Ag/AgCl, yardımcı elektrot paslanmaz çelik elektrot kullanılmıştır. Amperometrik sensör cevabı parakson ve metil paratyon için sırasıyla 120 μM ve 140 μM 'dir. Her iki analit için tespit limiti 20 nM'dır [18].

Yeni dual amperometrik/potansiyometrik biyosensör çip ile immobilize enzim OPH kullanarak organofosfor pestisitler tespit edilmiştir. Biyosensör çipin amperometrik ve potansiyometrik transduserler ince film teknikleri vasıtasıyla hazırlanmıştır. Parakson, paratyon, diklorvos ve diazinon benzeri organofosfor pestisitlerin farklı grupları μM konsantrasyon sınırında tespit edilmiştir [19].

Dual transduser akış enjeksiyon biyosensör tespit sistemi, OP nörotoksinlerin gözlenmesinde kullanılmıştır. Biyosensörler, OPH'a dayalıdır. OPH, paratyonun hidrolizini katalizler, oksitlenebilir p-nitrofenol ve organik asit üretir. Potansiyometrik biyosensörlerin aktivitesi pH değişimi ile ilişkilidir [8].

Yukarıda özetlenen çalışmalara ilave literatürdeki mevcut direk tespit örnekleri Tablo 2.1'de ve indirek tespit örnekleri de Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Pestisitlerin enzimatik biyosensörler ile direk tespiti

Analit	Enzim	Tespit Limiti	Sistem	Referans
Di-isopropil fluorofosfatlar	Organofosfor asit anhidrolaz	Kesikli ve akış enjeksiyon için sırasıyla 10 ve 12,5 μM	Amperometri	[20]
Paratyon	Paratyon hidrolaz	1 ng/ml	Amperometri	[21]
Paratyon/ Parakson	Paratyon hidrolaz	15/20 nM	Amperometri	[22]
Parakson/metil paratyon	Organofosfor hidrolaz	20 nM	Amperometri	[18]
Organofosfor nörotoksin	Organofosfor hidrolaz	Parakson ve diklorvos için sırasıyla 2 μM ve 6 μM (potansiyometrik); 70 nM parakson (amperometrik)	Amperometri/ Potansiyometri	[23]

Pestisitlerin indirek enzimatik tespiti için kolinesteraz, tirozinaz, askorbat oksidaz, asetolaktat sentaz ve aldehid dehidrogenaz gibi seçilmiş enzimlerin aktivitesinin inhibisyonuna dayalıdır. Böyle bileşikler, bazı

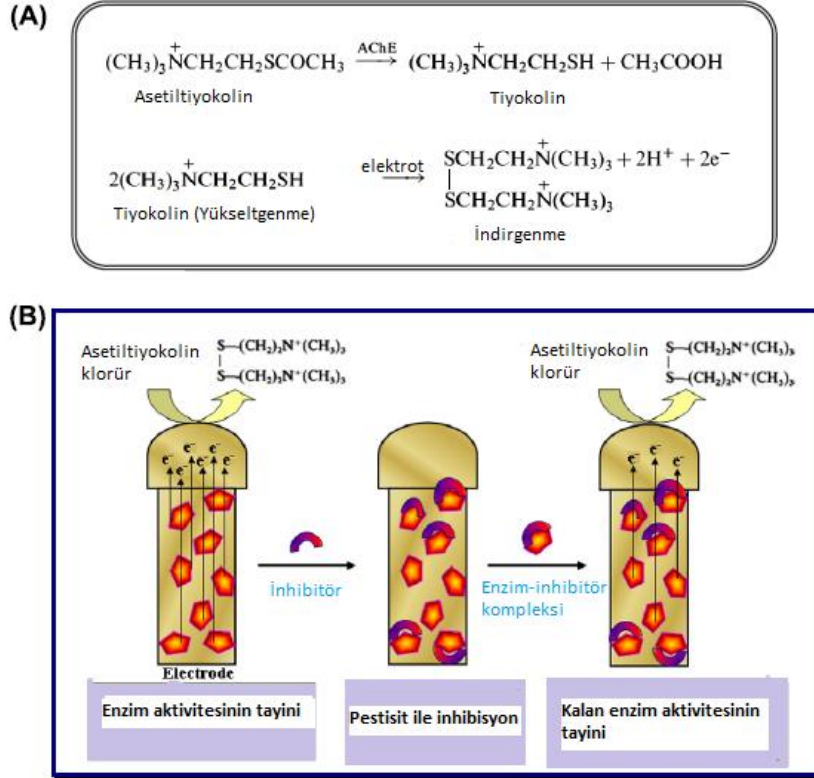
enzimlerle kararlı bileşikler oluşturabilir. Bu yüzden ki, bu pestisitler yapısal olarak substratlara benzer, böylece enzimin aktif merkezini bloklar ve aktivitesini inhibe eder. İnhibisyon substratın varlığından bağımsızdır. Enzimatik biyosensörler çeşitli elektrokimyasal sinyal transduserler, enzim immobilizasyonunda farklı metotlar ve çeşitli analiz metotları kullanarak gerçekleştirilir [8].

Tablo 2. Pestisit indirek tespiti için enzimatik biyosensörler

Analit	Substrat	Enzim	Tespit Limiti	Referans
Triklorfon	Butirilkolin	Butiriltiyokolin esteraz	<0,1 µM	[25]
Koumafose/triklorfon/ metiyokarb	Tiyokolin	Tiyokolin esteraz	0,02/0,4/0,3/0,08 µg/ml	[26]
Karbaril	Asetilkolin	Asetil tiyokolin esteraz	5.10-5 mol/l	[31]
Karbofuran	Asetilkolin	Asetil tiyokolin esteraz	nM	[27]
Maltiyon	Asetilkolin	Asetil tiyokolin esteraz	0,03 ng/ml	[32]
Triazofos	Asetilkolin	Asetil tiyokolin esteraz	0,01 µM	[33]
Paraokson/klorprifos etilokson	p-aminofenol	Kolin esteraz	19,1/1,24 Nm	[34]
Klorprifosmetil/ koumafos/karbofuran	Tiyokolin	Tiyokolin esteraz	2.10-8, 5.10-8 ve 8.10-8	[35]
Karbofuran/ parakson	Asetilkolin/ Buturilkolin	Asetilkolin esteraz/Buturilkolin esteraz	0,2 ve 0,6 nM	[36]
Klorprifos etil okson	Tiyokolin	Kolin esteraz	1 ppb	[37]
Diklorvos/karbofuran	Asetilkolin/ Tiyokolin	Kolin esteraz/ kolin oksidaz	1,3.10-3/0,01 ppb	[38]
Karbaril/Karbofuran	Asetilkolin/ Tiyokolin	Asetilkolin esteraz/ kolin oksidaz	2 µg/ml	[39]
Triklorofon	Asetilkolin/ Tiyokolin/H2O2	Kolin esteraz/ Kolin oksidaz/peroksidaz	5 ng/ml	[40]
Aldikarb	Glikoz-6-P/glikoz	Asit fosfotaz/ glikoz oksidaz	40 µg/ml	[41]
Metil paratyon/diazinon/ karbofuran/karboy	Monofenol	Tirozinaz	6/19/5/10 ppb	[29]
Triazin	Monofenol	Tirozinaz	0,5.10-9 mol/l	[42]
Diazinon/diklorvos	Monofenol	Tirozinaz	5 ve 75 µM	[43]
Ziram/diram/çinko dietilditiyokarbamat	Monofenol	Tirozinaz	0,074/1,3/1,7 µM	[44]
Zineb	Propinoaldehid	Aldehid dehidrogenaz	8 ppb	[45]
Herbisit	Prüvat	Asetolaktat sentaz	1 µM	[46]
Etil parakson	Askorbat	Askorbat oksidaz	1 ppm	[30]

Asetilkolin (ACh) veya Butirilkolin (BuCh) substrat olarak kullanıldığında, reaksiyon ürünleri kolin ve organik asittir. Kolin, elektrokimyasal olarak aktif değildir, enzim aktivitesinin değişimi, biyosensör yüzeyinde asit üretimi ile tespit edilir. Asetiltiyokolin (ATCh) veya butiriltiyokolin (BuTCh) yapay substrat olarak kullanıldığında reaksiyon ürünleri tiyokolin (TCh) ve bir organik asittir. Tiyokolin anodik olarak platin elektrot

veya modifiye elektrotlar kullanılarak oksitlenebilir [24]. Şekil 2’de asetilkolin esteraz kullanılarak hazırlanan bir biyosensörün cevabı ve pestisit çözeltilisinde asetilkolin esteraz enziminin inhibisyonu ile ilgili ölçüm stratejisi mevcuttur [41].



Şekil 2. (A) Asetilkolin esteraz kullanılarak hazırlanan bir biyosensörün cevabı (B) pestisit çözeltilisinde asetilkolin esteraz enziminin inhibisyonu ile ilgili ölçüm stratejisi [41]

Butirilkolin esteraz dayalı potansiyometrik biyosensörler enzimin glutaraldehid ile elektrot yüzeyinde elektropolimerize polietilenimin filmin ağlaştırılması ile geliştirilmiştir. Enzim inhibisyonuna dayalı olarak triklorfon tespit edilmiştir. Tespit limiti $0,1 \mu\text{M}$ 'dan küçüktür [25].

Kolin esteraz sensörlere dayalı camı karbon ve planar epoksi grafit elektrotların elektrot yüzeyi polianilin tabakalar ile hazırlanmıştır. Polianilin, yüksek iletim kararlılığı ve duyarlılığı sağlar. Tespit limitleri koumafos, triklofon, aldikarb, metiyokarb için sırasıyla 0,02, 0,04, 0,03, 0,08'dir [26].

Planar altın elektrot yüzeyine, asetilkolin esterazın (AChE) adsorpsiyonu ve stabilizasyonu arttırmak için elektrodopolanmış altın nanopartiküller kullanılmıştır. Asetiltiyokolin immobilize enzim ile tiyokoline dönüştürülür. Nanopartikül tabaka varlığında, asetiltiyokoline sensör cevabı önemli derecede azalır ve elektrodun kullanımını sınırlar. Bu sensör ile karbofuran nM konsantrasyonunda tespit edilmiştir [27].

Bunların dışında bi-enzimatik biyosensörler kullanılarak kolinesterazlar, kolin oksidaz (CHO) ile birleştirilmiştir. Kolinin oksidasyonu kolin oksidaz tarafından katalizlenir, reaksiyon sırasında oksijen tüketilir ve H_2O_2 üretilir. Böylece, bunlarının birinin konsantrasyonundaki değişim bienzimatik cevabın temelidir. Oksijen, Clark elektrot ile H_2O_2 platin, grafit, screen printed elektrot ile ölçülür [8].

Asetilkolin esteraz ve kolin oksidaz enzimleri yüksek duyarlılık, geniş lineer sınır ve düşük tespit limitleri ile organofosfat bileşiklerin analizlenmesini sağlarlar. Büyük yüzey alanı sağlayan karbon nanotüpler kullanılarak organofosfat pestisitler tayin edilmiştir [28].

Tirozinaz enzimi (polifenol oksidaz), monofenolü o-difenollere ve ileride o-kinonlara oksitlenmesini katalizler. Reaksiyon prosesi, kinonun indirgenmesi ile amperometrik olarak takip edilebilir. Karbamat ve organofosfor pestisitlerin tespiti için optimize edilmiş biyosensörlere örnek bir biyosensör Yaico ve arkadaşları (2007) tarafından geliştirilen enzimatik olarak jeneredilmiş kinoid ürünlerin elektroindirgenmesine dayalı screen printed biyosensördür. Kompozit elektrot, ko-fitalosiyanın modifiye selüloz grafit kompozitin elektrokimyasal transduser olarak polikarbonat desteğe immobilizasyonu ile hazırlanır. Tirozinaz biyosensör enzimin kompozit

elektrot yüzeyine glutaraldehit ve sığır serum albumin (BSA) ile çapraz bağlanmasıyla hazırlanmıştır. Sonuçlar, metil paratyon ve karbofuran enzim prosesinde yarışmalı inhibisyonuna neden olur; diazinon, karbaril için 10-50 ppb olarak bulunmuştur [29].

Organofosfor pestisitler, askorbat oksidaz enziminin aktivitesinin inhibisyonu ile tespit edilebilir. Denklem 1'de görüldüğü gibi askorbat oksidaz askorbati oksitleyerek dehidroaskorbat ve suya dönüştürür.



Etil paraksonun tespiti için salatalık dokusu (askorbik asit oksidaz bakımından zengin), teflon ve naylon membran arasına immobilizlenerek Clark tip oksijen elektrota ataçlanır. Biyosensör, etil paraksonun askorbik asit oksidazın inhibisyonuna dayalıdır. Lineer cevap 1-10 ppm arasındadır [30].

3.2. Hücre Bazlı Biyosensörler

Canlı mikroorganizmalar (alg, bakteri, maya ve funguslar) biyosensörler için biyokatalitik element olarak kullanılabilir. Mikrobiyal (tüm hücre veya hücrenin bir kısmı) biyosensörler, bazı uygulamalar için basit ve ucuzdur, enzimlerin eliminasyonu ve saflaştırılmasını gerektirmez, enzim için gerekli kofaktörü sağlar [8].

p-nitrofenil-substitute organofosfatın direk tespiti için amperometrik mikrobiyal biyosensörler geliştirilmiştir. Biyosensör p-nitrofenol yıkıcıdan oluşur. *Pseudomonas putida JS444*, karbon pasta elektroda immobilize hücre yüzeyinden organofosfor hidrolazı immobilizler. Ara yüzeyin elektrooksidasyon akımı ölçülür ve organofosfatların konsantrasyonu ile orantılıdır. Optimum operasyon koşulları altında paraokson, metil paratyon, ve paratyonun tespit limitleri sırasıyla 0,28; 0,26; 0,29 ppb'dir [47].

Biyoreseptör olarak *Chlorella vulgaris* mikroalg kullanarak biyozimatik konduktometrik biyosensör geliştirmişler. Alg, sığır serum albumin (BSA) membran içine glutaraldehit ile depolanır ve konduktometrik elektrotla birleştirilir. Yerel iletkenlik değişimleri alg alkalın fosfat ve asetilkolin esteraz aktiviteleri ile gerçekleşir. Pestisitler için iç deneyler paratyon metil ve karbofuranın tersine paraokson metilin *Chlorella vulgaris* asetilkolin esterazı inhibe ettiğini gösteriyor [48].

Organofosfor pestisitlerin tespitine yönelik biyosensörlere başka bir örnek, hücre yüzeyinde ifade edilen organofosfor hidrolazın genetik mühendislenmiş hücre ile hazırlanmış karbon pasta elektrodudur. Organofosfor hidrolaz enzimiyle parakson, paratyon ve metil paratyon p- nitrofenole hidrolizlenir. Karbon transduserde anodik olarak ölçülen oksidasyon akımıyla tespitler sağlanır. Mükemmel depo stabilitesine, 45 gün 40 °C'de saklandığında %100 orijinal aktiviteye sahiptir [49].

Biyosensör, polikarbonat membran üzerine *Escherichia coli* kültürünün depolanması ile hazırlanır ve membran cam elektroda O-ring ile tutturulmuştur. Paraokson, paratyon, metil paratyon ve diazinon için cevaplar incelenmiştir; tespit limitleri her analit için 3 µM'dır [50].

3.3. DNA Bazlı Biyosensörler

Guanin oksidasyonuna dayalı DNA biyosensörler pestisitlerin analizlerinde kullanılmıştır. DNA sensörleri, DNA molekülünün çeşitli bileşiklerle birleşmesi ve DNA redoks özelliklerinde (guaninin oksidasyonu) veya DNA tabaka üzerinde elektro-aktif analitin eklenmesiyle hazırlanır. Voltametri, potansiyometri sık kullanılan elektrokimyasal tekniklerdir.

Polipirol-polivinil sulfonat (ds-CT-DNA-PPy-PVS) filme tutuklanmış çift iplikli dana timus deoksiribonükleik asit, indium-tin-oksit (İTO) kaplanmış cam tabakaya fabrike edilmiştir. Bu biyosensör ile klorprifos 0,0016-0,025 ppm ve malatyon 0,17-5 ppm olarak tespit edilmiştir [51].

Polianilin (PANI) polivinil sulfonat bazlı DNA biyosensörler elektrokimyasal tutuklama tekniği ile indium tin oksit (ITO) kullanılarak fabrike edilir. Çift iplikli dana timus biyoelektrotlar kare dalga voltametri Fourier transform infrared spektroskopisi, tarama elektron mikroskopisi ve elektrokimyasal empedans teknikler kullanarak karakterize edilmiştir. Bu PANI-PVS/ITO biyoelektroda tutturulmuş dsCT-DNA'nın kullanıldığı biyosensörler klorprifos ve malatyonun tespit limitlerini sırasıyla 0,5 ppb ve 0,01 ppb olarak tespit etmişler. Cevap süresi 30 saniye, biyosensör 6 ay stabildir [52].

Dünyamızda, biyosensörlerde biyoreseptör olarak kullanılmaya aday bir çok biyolojik materyal bulunmaktadır. Enzimler, hücreler ve genetik materyal (DNA) en sık kullanılan biyoreseptörlerdir. Herhangi bir biyomateryalin biyoreseptör amaçlı kullanımı için tek koşul, materyalin istenilen analiti bir şekilde özgün olarak tanıma kapasitesine sahip olmasıdır. Enzim bazlı biyosensörlerde, biyoreseptör olarak kullanılan enzimler en çok bilinendir. Enzimlerin substratlarına karşı oldukça yüksek bir özgünlüğü, afinitesi mevcuttur. Binlerce kimyasal

arasından ilgili oldukları substratı seçer ve reaksiyonu katalizlerler. Tabii tüm diğer reaksiyonlarda olduğu gibi enzimatik reaksiyonlarda da ortamın sıcaklığı, pH'sı, iyonik kudreti ve diğer çevre şartları önemli rol oynar. Olumsuz koşullar enzimin aktivitesini yitirmesine ve bundan dolayı tayinin gerçekleşmemesine neden olur. Bu sebepten dolayı enzim bazlı biyosensörlere alternatif hücre bazlı biyosensörler kullanılmaktadır. Reaksiyonu gerçekleştirecek olan enzim, hücre içinde bulunduğu için dış ortamdaki koşullardan etkilenmez ve ayrıca enzimin saflaştırması gibi zor ve maliyetli basamakların kullanılmasına gerek kalmaz.

3.4. Tartışma

Bir biyosensörün hazırlanması için elektrotlara, analiz edilecek maddeyi özgü enzim gibi bir biyoreseptöre ve elektrokimyasal ölçüm cihaza ihtiyaç duyulur. Bu gerekli ekipmanlar, GC, HPLC ve LC/MS/MS sistemlerinden daha ucuzdur [8].

Pestisit ölçümlerinde kullanılan GC-MS, HPLC ve LC/MS/MS gibi yüksek maliyetli cihazın teminin yanı sıra farklı örnek matrislerinde kompleks ve zaman alıcı örnek hazırlama gerekliliği uygulamalarda analizleri kısıtlayıcı en önemli faktördür. Ayrıca bu cihazların kullanımı için kalifiye bir personel de gereklidir [8,53]. Klasik metotların çalışılmasında bu dezavantajların bulunmasından dolayı biyosensörler pestisitlerin tayininde literatürde sıklıkla kullanılmaktadır. Cesarino ve arkadaşları (2012), lahanada, brokoli ve elmada karbaril ve metomil pestisitleri elektrokimyasal asetilkolin biyosensörü ve HPLC/DAD kullanarak tespit etmişlerdir. Sonuçlar karbaril için elmada sırasıyla 1,68 ve 1,59 $\mu\text{mol/L}^{-1}$, metamil için lahanada sırasıyla 2,33-2,22 $\mu\text{mol/L}^{-1}$ ve brokolide 1,85-1,75 $\mu\text{mol/L}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir [54].

4. SONUÇ

Bu derlemede, biyosensörlerin önemli bir çevre kirleticisi olan pestisitlerin elektrokimyasal tespitindeki kullanımı örneklerle açıklanmıştır. Biyosensörler kolay hazırlanma, düşük maliyet ve yerinde analize imkan sağladığından çevre kirleticilerinin analizinde GC, HPLC ve LC/MS/MS gibi klasik metotlara alternatiftir. Cesarino ve arkadaşları (2012) nin biyosensör ve yüksek analitik karşılaştırmalı ölçüm sonuçları (elektrokimyasal asetilkolin biyosensörü ve HPLC/DAD kullanarak) biyosensörlerin konvansiyonel sistemler yerine kullanılabilirliğini göstermektedir [54]. Yerinde analiz, kirliliğin anında tespit edilmesini sağlar, böylece laboratuvara transfer maliyeti gerektirmez. Bu avantajlarından dolayı biyosensörler çevresel analizlerde ve proses kontrollerinde başarılı bir rol oynarlar. Akutik çevrede biyosensörler kullanarak pestisit ve herbisit analizlerine örnekler yukarıda verilmiştir. Ayrıca, tek kullanımlık biyosensörler, minyatürizasyon ve düşük maliyet gibi bazı ilave avantajlar sağladığından gelecek vaad etmektedir.

5. KAYNAKLAR

- [1] FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2002. International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. Retrieved on 2007-10-25.
- [2] KAYGISIZ, H., "Tarımda İlaçlı Mücadelenin Temel Prensipleri", Hasad Yay., 2, 127, 2003.
- [3] TİRYAKİ, O., CANHİLAL, R., HORUZ S., "KAYSERİ Tarım İlaçları Kullanımı ve Riskleri", Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 26(2), 154-169, 2010.
- [4] GOLD, L.S., MANLEY, N.B., SLONE, T.H., WARD, J.M., "Compendium of Chemical Carcinogens by Target Organ: Results of Chronic Bioassays in Rats, Mice, Hamsters, Dogs and Monkeys", Toxicol Pathol, 29, 639-652, 2001.
- [5] FARAG, A.T., EWEİDAH, M.G., TAYEL, S.M., EL-SEBAE, A.H., "Developmental Toxicity of Acephate by Gavage in Mice", Reprod Toxicol, 14, 241-245, 2000.
- [6] <http://did.ormansu.gov.tr/did/Files/98-83-EC.pdf>
- [7] TS 266 İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmeliği (R.G. 17.02.2005, 25730).
- [8] MOSTOFA, A.E.G., "Electrochemical Biosensors for the Detection of Pesticides", The Open Electrochemistry Journal, 2, 22-42, 2010
- [9] LIU, T., SU, H., QU, X., JU, P., CUI, L., AI, S., "Acetylcholinesterase Biosensor Based on 3-carboxyphenylboronic Acid/reduced Graphene Oxide-Gold Nanocomposites Modified Electrode for Amperometric Detection of Organophosphorus and Carbamate Pesticides", Sensors and Actuators, B 160, 1255-1261, 2011.

- [10] CHAUHAN, N., NARANG, J., PUNDIR, C.S., "Immobilization of Rat Brain Acetylcholinesterase on ZnS and Poly(indole-5-carboxylic acid) Modified Au Electrode for Detection of Organophosphorus Insecticides", *Biosensors and Bioelectronics*, 29, 82– 88, 2011.
- [11] TELEFONCU, A., "Biyosensörler", Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, 1-9, 1999.
- [12] AYKUT, U., TEMİZ, H., "Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı", *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3, 51-59, 2006.
- [13] SASSOLAS, A., BLUM, L. J., LECA-BOUVIER, B.D., "Immobilization Strategies to Develop Enzymatic Biosensors", *Biotechnology Advances*, 30, 489–511, 2012.
- [14] DİNÇKAYA, E., "Biyosensörler", Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir, 81 –142, 1999.
- [15] TUAN, M.A., SERGEI, V.D., MINH, C.V., NICOLE, J.R., CHIEN, N. D., JEAN-MARC C., "Conductometric Tyrosinase Biosensor for the Detection of Diuron, Atrazine and its Main Metabolites", *Talanta*, 63, 365-70, 2004.
- [16] CULLEN, D.C., SETHI, R.S., LOWE, C.R., "Multi-analyte Miniature Conductance Biosensor", *Anal. Chim. Acta*, 231, 33-40, 1990.
- [17] ROGERS, K.R., "Recent Advances in Biosensor Techniques for Environmental Monitoring", *Analytica Chimica, Acta*, 568, 222–231, 2006.
- [18] MULCHANDANI, P., CHEN, W., MULCHANDANI, A., "Flow-injection Amperometric Enzyme Biosensor for Direct Determination of Organophosphate Nerve Agents", *Environ. Sci. Technol.*, 35, 2562-65, 2001.
- [19] SCHOENING, M.J., KRAUSE, R., BLOCK, K., MUSAHMEN, M., MULCHANDANI, A., WANG, J., "A Dual Amperometric/potentiometric FIA-based Biosensor for the Distinctive Detection of Organophosphorus Pesticides", *Sens. Actuators B*, 95, 291-96, 2003.
- [20] SIMONIAN, A.L., GRIMSLEY, J.K., FLOUNDERS, A.W., SCHOENIGER, J.S., CHENG, T.C., DEFRANK, J.J., WILD, J.R., "Enzyme-based Biosensor for the Direct Detection of Fluorine-containing Organophosphates", *Anal. Chim. Acta*, 442, 15-23, 2001.
- [21] SACKS, V., ESHKENAZI, I., NEUFELD, T., DOSORETZ, C., RISHPON, J., "Immobilized Parathion hydrolase: An Amperometric Sensor for Parathion", *Anal. Chem.*, 72, 2055-58, 2000.
- [22] CHOUGH, S.H., MULCHANDANI, A., MULCHANDANI, P., CHEN, W., WANHG, J., ROGERS, K.R., "Organophosphorus Hydrolase-based Amperometric Sensor: Modulation of Sensitivity and Substrate Selectivity", *Electroanalysis*, 14, 273-76, 2002.
- [23] WANFG, J., KRAUSE, R., BLOCK, K., MUSAMEH, M., MULCHANDANI, A., MULCHANDANI, P., CHEN, W., SCHOENING, M.J., "Dual Amperometric Potentiometric Biosensor Detection System for Monitoring Organophosphorus Neurotoxins", *Anal. Chim. Acta.*, 465, 197-203, 2002.
- [24] SILVANA, A., JEAN-LOUIS, M., "Twenty Years in Cholinesterase Biosensors: From Basic Research to Practical Applications", *Biomol. Eng.*, 23, 1-15, 2006.
- [25] REYBIER, K., ZAİRİ, S., JAFFREZİC-RENAULT, N., "The Use of Polyethylenimine for Fabrication of Potentiometric Cholinesterase Biosensors", *Talanta*, 56, 1015-20, 2002.
- [26] IVANOV, A.N., LUKACHOVA, L.V., EYTUGYN, G.A., KARYAKINA, E.E., KISELEVA, S.G., BUDNIKOV, H.C., ORLOV, A.V., KARPACHEVA, G.P., KARYAKIN, A.A., "Polyaniline-modified Cholinesterase Sensor for Pesticide Determination", *Bioelectrochemistry*, 55, 75-78, 2002.
- [27] OLGA, S., JON, R. K., "An Acetylcholinesterase Enzyme Electrode Stabilized by an Electrodeposited Gold Nanoparticle Layer", *Electrochem. Commun.*, 9, 935-40, 2007.
- [28] LIN, Y.H., LU, F., WANG, J., "Disposable Carbon Nanotube-modified Screen-printed Biosensor for Amperometric Detection of Organophosphorus Pesticides and Nerve Agents", *Electroanalysis*, 16, 145-149, 2004.
- [29] YAICO, D., TANIMOTO DE, A., LUCAS, F.F., "Amperometric Biosensing of Carbamate and Organophosphate Pesticides Utilizing Screen-printed Tyrosinase-modified Electrodes", *Anal. Chim. Acta*, 596, 210-21, 2007.
- [30] REKHA, K., GOUDA, M.D., THAKUR, M.S., KARANTH, N.G., "Ascorbate Oxidase Based Amperometric Biosensor for Organophosphorus Pesticide Monitoring", *Biosens. Bioelectron.*, 15, 499-502, 2000.
- [31] JOSIANE, C., SERGIO, A.S.M., "Determination of Carbaryl in Tomato "In Natura" Using an Amperometric Biosensor Based on the Inhibition of Acetylcholinesterase Activity", *Sens. Actuators B*, 129, 40-46, 2008.

- [32] DAN, D., JIAWANG, D., YUAN, T., XI, C., "Application of Chemisorption/ Desorption Process of Thiocholine for Pesticide Detection Based on Acetylcholinesterase Biosensor", *Sens. Actuators B*, 134, 908-12, 2008.
- [33] DAN, D., XI, H., JIE, C., AIDONG, Z., "Amperometric Detection of Triazophos Pesticide Using Acetylcholinesterase Biosensor Based on Multiwall Carbon Nanotube-Chitosan Matrix", *Sens. Actuators B*, 127, 531-35, 2007.
- [34] ANDREESCU, S., NOGUER, T., MAGEARU, V., Marty, J.L., "Screen-printed Electrode Based on Acetylcholinesterase for the Detection of Pesticides in Presence of Organic Solvents", *Talanta*, 22, 169-76, 2002.
- [35] IVANOV, A., EYTUGYN, G., BUDNIKOV, H., RICCI, F., MOSCONE, D., PALLESCHI, G., "Cholinesterase Sensors Based on Screen-printed Electrodes for Detection of Organophosphorus and Carbamic Pesticides", *Anal. Bioanal. Chem.*, 377, 624-31, 2003.
- [36] ALBAREDA-SITVENT, M., MERKOCI, A., ALEGRET, S., "Pesticide determination in tap water and juice samples using disposable amperometric biosensors made using thick-film technology", *Anal. Chim. Acta*, 31, 35-44, 2001.
- [37] MONTESINOS, T., PEREZ-MUNGUIAa, S., VALDEZ, F., MARTY, J.L., "Disposable Cholinesterase Biosensor for the Detection of Pesticides in Water-miscible Organic Solvents", *Anal. Chim. Acta*, 431, 231-37, 2001.
- [38] SNEJDARKOVA, M., SVOBODOVA, L., NIKOLELIS, D.P., WANG, J., HIANIK, T., "Acetylcholine Biosensor Based on Dendrimer Layers for Pesticides Detection", *Electroanalysis*, 15, 1185-1191, 2003.
- [39] PALCHETTI, I., CAGNINI, A., DEL CARLO, M., COPPI, C., MASCINI, M., TUMER, A.P.F., "Determination of Acetylcholinesterase Pesticides in Real Samples Using a Disposable Biosensor", *Anal. Chim. Acta*, 337, 315-321, 1997.
- [40] MAZZEI, F., BOTRE, F., BOTRE, C., "Acid Phosphatase/Glucose Oxidase Based Biosensors for the Determination of Pesticides", *Anal. Chim. Acta*, 336, 67-75, 1996.
- [41] PUNDIR C.S., CHAUHAN N., "Acetylcholinesterase Inhibition-based Biosensors for Pesticide Determination: A Review, *Analytical Biochemistry*, 429, 19-31, 2012.
- [42] CAMPANELLA, L., DRAGONE, R., LELO, D., MARTINI, E., TOMASSETTI, M., "Tyrosinase Inhibition Organic Phase Biosensor for Triazinic and Benzotriazinic Pesticide Analysis (part two) ", *Anal. Bioanal. Chem.*, 384, 915-21, 2006.
- [43] EVERETT, W.R., RECHNITZ, G.A., "Mediated Bioelectrocatalytic Determination of Organophosphorus Pesticides with a Tyrosinase-based Oxygen Biosensor", *Anal. Chem.*, 70, 807-810, 1998.
- [44] PEREZ-PITA, M.T., REVIEJO, A.J., MANUEL-DE-VILLENA, F.J., PINGARRON, J.M., "Amperometric Selective Biosensing of Dimethyl- and Diethyldithiocarbamates Based on Inhibition Processes in a Medium of Reversed Micelles", *Anal. Chim. Acta*, 340, 89-97, 1997.
- [45] NOGUER, T., GRADINARU, A., CIUCU, A., MARTY, J.L., "A New Disposable Biosensor for the Accurate and Sensitive Detection of Ethylenebis (dithiocarbamate) Fungicides". *Anal. Lett.*, 32, 1723-38, 1999.
- [46] SEKI, A., ORTEGA, F., MARTY, J.L., "Enzyme Sensor for the Detection of Herbicides Inhibiting Acetolactate Synthase", *Anal. Lett.*, 29, 1259-71, 1996.
- [47] Lei, Y., Mulchandani, P., Wang, J., Chen, W., Chen, W.; Mulchandani, A. Highly sensitive and selective amperometric microbial biosensor for direct determination of p-nitrophenyl-substituted organophosphate nerve agents. *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39, 8853-57.
- [48] CHOUTEAU, C., DZYADEVYCH, S., DURRIEU, C., CHOVELON, J.M., "A Bienzymatic Whole Cell Conductometric Biosensor for Heavy Metal Ions and Pesticides Detection in Water Samples", *Biosens. Bioelectron*, 21, 273-81, 2005.
- [49] MULCHANDANI, P., CHEN, W., MULCHANDANI, A., WANG, J., CHEN, L., "Amperometric Microbial Biosensor for Direct Determination of Organophosphate Pesticides Using Recombinant Microorganism with Surface Expressed Organophosphorus Hydrolase", *Biosens. Bioelectron*, 16, 433-37, 2001.
- [50] MULCHANDI, A., MULCHANDI, P., CHAUHAN, S., KANEVA, I., CHEN, W., "A Potentiometric Microbial Biosensor for Direct Determination of Organophosphate Nerve Agents", *Electroanalysis*, 10, 733-37, 1998.
- [51] NIRMAL, P., KAVITA, A., SURINDER, P.S., MANOJ, K.P., HARPAL, S., BANSI, D.M., "Polypyrrole-polyvinyl Sulphonate Film Based Disposable Nucleic Acid Biosensor", *Anal. Chim. Acta*, 589, 6-13, 2007.
- [52] NIRMAL, P., SUMANA, G., KAVITA, A., HARPAL, S., MALHOTRA, B.D., "Improved electrochemical nucleic acid biosensor based on polyaniline polyvinyl sulphonate", *Talanta*, 74, 1337-43, 2008.[53]

STOYTCHIEVA, M., ZLATEV, R., "Organophosphorus Pesticides Analysis", *Pesticides in the Modern World-Trends in Pesticides Analysis*, 143-164, 2011.

[54] CESARİNO, I., MORAES, F.C., LANZA, M.R.V., MACHADO A.S.S., "Electrochemical detection of carbamate pesticides in fruit and vegetables with a biosensor based on acetylcholinesterase immobilised on a composite of polyaniline-carbon nanotubes", *Food Chemistry* 135, 873-879, 2012.