



Hidrojen peroksit dekontaminasyon etkinliğinin belirlenmesine yönelik mikrofluidik katalaz biyosensörü: Mikrobiyal optimizasyon

Ahmet Keskin¹ , Ahmet Koluman^{2*}

¹Pamukkale Üniversitesi Teknoloji Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Pamukkale, Denizli.

Geliş Tarihi / Received:24.06.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 27.09.2021

Özet: Biyolojik suçlar (biyoterörizm dahil) gibi biyolojik riskler, mikroorganizmaların bulaşmasına yol açarak dekontaminasyon gerektirmektedir. Dekontaminasyon, mikroorganizmanın yayılmasını kontrol etmek için kritik bir noktadır. Dekontaminasyon için birçok kimyasal kullanılmaktadır. Ancak ekonomik ve seçkin antimikrobiyal özelliklerinden dolayı hidrojenperoksitin (H₂O₂) uygulamasında siktir. Dekontaminasyon sürecini izlemek için uygun bir sistem bulunamamıştır. Bu çalışmada, H₂O₂ uygulamalarının etkinliğini taramak için katalaz pozitif olduğu bilinen Staphylococcus aureus kullanarak bir bakteriyel mikrofluidic (mikroakışkan) biyosensör tasarladık. Bu çalışmada öncelikle, kurutma prosesi ve prosesin validasyonu ile ilgili olarak çalışmanın mikrobiyal optimizasyon kısmı hazırlanmıştır. Sonuçlar, kurutmanın katalaz reaksiyonu üzerinde hiçbir etkisi olmadığını ve satışta bulunan dekontaminantların bu yaklaşımla değerlendirilebileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Biorisk, dekontaminasyon, hidrojenperoksit, staphylococci, validasyon.

Microfluidic catalase biosensor designed for efficacy of hydrogenperoxide decontamination: Microbial optimization

Abstract: Microfluidic catalase biosensor designed for efficacy of hydrogenperoxide decontamination: Microbial optimization Abstract Bio-risks, like bio-crimes (including bioterrorism), lead contamination with microorganism that needs decontamination. Decontamination is a critical point for controlling spread of microorganism. Many chemicals are used for decontamination where hydrogenperoxide (H₂O₂) is massively applied due to its antimicrobial properties. However, no applicable system found to screen the process of decontamination. We designed a bacterial microfluidic biosensor using Staphylococcus aureus, which is known to be catalase positive, to screen efficacy of H₂O₂ applications. In this study we are representing the microbial optimization part of the study with respect to drying process and validation of the process. The results showed that drying had no effect on the catalase reaction and retail decontaminants can be evaluated with this approach.

Keywords: Biorisk, decontamination, hidrojenperoksit, staphylococci, validation.

Giriş

Biyosensörler, kalitatif veya kantitatif olarak sonuç vermek üzere geliştirilmiş, hızlı tespit sistemleridir. Sistemde analit ile spesifik biyoaktif bir bileşenin etkileşimi sonucu ortaya çıkan sinyalin, bir ölçüm sistemiyle değerlendirilmesi hedeflenir. Biyosensörler, genel olarak üç ana bölümden oluştuğu bildirilmektedir. Bunlar; Analit/reseptör, dönüştürücüler ve sinyal işleyicilerdir (Young ve Mutharasan 2005; Mehrotha 2016; Aldrami 2018).

Bir mikroorganizmanın bütün olarak bir yüzeye stabilize edilerek, mikroorganizmada mevcut biyokimyasal reaksiyonların kullanıldığı mikrobiyal biyosensörler raf ömrü, ekonomiklik ve uygulama kolaylığından dolayı birçok alanda kullanılmaktadır (Yagi 2006). Mikrobiyal biyosensörler biyotoksinlerin tespitinde (Banerjee ve ark. 2013), oksidatif DNA hasarı tespitinde (Knight 2004; Mitchell ve Gu 2004; Ahn ve ark. 2009; Chen ve ark. 2012) kullanılmıştır.

Mikrofluidik yapılar gaz kromatografisi analizlerinde kullanılmak üzere 70'li yıllarda geliştirilmiştir. Çalışma prensibi, kimyasal analizde numune veya reaktif miktarını kapillerler yardımı ile azaltmak hedefine dayanmaktadır. Mikrofluidikler genel olarak mikro seviyeli akışkanların taşınması, kontrollü manipülasyonu ve analizi için kullanılır. Mikro ölçek, makro ölçekle karşılaştırıldığında, düşük örnek ve reaktif hacmi ile maksimum bilgi elde etme, karmaşık protokollerin kullanılmasına olanak sağlama ve hücre mikro ortamının taklit edilmesini sağlama gibi çeşitli avantajları vardır. Mikroakışkan cihazların kimya, fizik, biyoloji, hücre analizi, ilaç keşfi, patojen tespiti, kanser taraması, biyokimya, klinik bilimler, adli bilimler ve biyomedikal araştırmalarda kullanımı yaygınlaşmıştır (Hennessy 2005; Kim ve ark. 2012; Muguruma 2018; Shang ve ark. 2020; Basiri ve ark. 2021).

Dekontaminasyon, bir obje veya yüzeyin hastalık yapan mikroorganizmalardan temizlenerek,

Yazışma adresi / Correspondence: Ahmet Koluman, Pamukkale Üniversitesi Teknoloji Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Kınıklı Kampüsü, Pamukkale, Denizli E-posta: akoluman@pau.edu.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0001-6313-4370 • ²0000-0001-5308-8884

temas etmeye uygun hale getirilmesi için yapılan işlemler bütününe verilen isimdir. Biyolojik kirlenmelerin yönetiminde uygulanan dekontaminasyon, bulaşmış nesnelerin sağlığa zararlı olamayacak şekilde yeniden kullanılacak kadar temiz olacak şekilde ya da halk sağlığı açısından risk kabul edilen biyosuçlara ait bulaşların tamamen imha edilmek üzere sterilize ve dezenfekte edilmesidir. Hidrojen peroksit (H_2O_2) sterilizasyonda, dezenfeksiyonda ve antiseptik biyosid olarak kullanılmaktadır. Renksiz bir sıvıdır. Sporoidal aktivite plazma fazında önemli derecede artmasına karşın, hidrojen peroksitin (% 10-30) yüksek konsantrasyonları ve daha uzun temas zamanları gereklidir. Hidrojen peroksit serbest hidroksil radikallerini ürettiği için güçlü okside edici bir ajandır. Serbest hidroksil radikallerinin DNA, lipit, protein gibi hücre bileşenlerine bağlandıkları ve özellikle sülfidril grupları ve çift bağları hedef aldıkları bilinmektedir. Genellikle, % 7,5'lik hidrojen peroksit ile sterilizasyonda 20°C ve 6 saatlik temas süresi, aynı koşullarda dezenfeksiyonda ise 30 dakikalık temas süresi kabul edilmektedir (Rosendale 2002; DeQueiroz ve Day 2008; Lineback ve ark. 2018; Wood ve Adrion 2019; Zulauf ve ark. 2020).

Katalaz, hidrojen peroksitin su ve oksijene indirgemesi katalize eden, tetramerik demir porfirin içeren, yüksek molekül ağırlıklı bir antioksidan enzimdir. Katalaz enzimi pH (4-10) ve sıcaklık (20-50 °C) aralığında aktivite gösterebilmektedir. Aerobik ve pek çok fakültatif anaerobik mikroorganizma katalaz enzimine sahiptir. *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Proteus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp. ve *Bacillus* spp. katalaz pozitif mikroorganizmalara örnek gösterilebilir (Kirkman ve Gaetani, 2007; Alfonso-Prieto ve ark. 2009; Rios-Castillo ve ark. 2017).

Metot validasyonu terimi bir metodun kullanım amacına uygunluğunun objektif kriterler ile teyit edilmesi olarak tanımlanabilir. Metot validasyonu, genellikle analiz sürelerini kısaltmak amacı ile geliştirilen alternatif metotların referans metotlarla eşdeğer olduğunun teyit edilmesinde kullanılır. Bu kapsamda uluslararası standartlar tarafından belirlenen analizler uygulanarak sonuçlar elde edilir. Bu yapılırken kullanılan altın standart metot ile kıyaslamalar yapılarak elde edilen sonuçlarda yanlış pozitiflik, yanlış negatiflik, spesifite ve sensitivite hesaplanması hedeflenir. Böylece geliştirilen yöntemin altın standart yöntem ile uyumu ve kullanılabilirliği ölçülmüş olur. Bu amaçla sonuçların oluşturulmasında iki metot Tablo 1 üzerinde kıyaslanır (Anon 2016a-b; Anon 2017; Anon 2019).

Tablo 1. Validasyon hesaplamalarında kullanılan kıyaslama tablosu.

	Metot 1 Referans sonuç		Toplam	
	Pozitif	Negatif		
Metot 2 Beklenen sonuç	Pozitif	N11	N12	N1-
	Negatif	N21	N22	N2-
Toplam	N-1	N-2	N=N11+N22- veya N=N-1+N-2	

N11=Her iki metot için pozitif sonuçlar

N12=Metot 1 ile ilgili negatif, Metot 2 ile ilgili pozitif sonuçlar

N21= Metot 1 ile ilgili pozitif, Metot 2 ile ilgili negatif sonuçlar

N22= Her iki metot için negatif sonuçlar

Buradan elde edilen verilerle aşağıda bildirilen hesaplamalar yapılır:

- Sensitivite: Pozitiflerin doğru tespit edildiğini göstermek için kullanılır. Tabloda N11/N1- şeklinde hesaplanır.
- Spesifite: Negatiflerin doğru tespit edildiğini göstermek için kullanılır. Tabloda N22/N2- şeklinde hesaplanır.
- Doğruluk: İki metot ile elde edilen sonuçların uyumluluğunu göstermek için kullanılır. Tabloda $(N11+N22)/N$ şeklinde hesaplanır.
- Yanlış Negatiflik Oranı: Pozitif olduğu halde değerlendirilen yöntemle negatif olan sonuçların toplam beklenen pozitif sonuca oranıdır. Tabloda $N12/N1-$ şeklinde hesaplanır.
- Yanlış Pozitiflik Oranı: Negatif olduğu halde değerlendirilen yöntemle pozitif olan sonuçların toplam beklenen negatif sonuca oranıdır. Tabloda $N22/N2-$ şeklinde hesaplanır.
- Kappa sayısı: İki metodun kıyaslanmasından elde edilen verilerin uygunluğu için kullanılan belirteç olup ve tablodan $\kappa = [((N11+N22)/N) - ((N1-xN-1) + (N2-xN-2))/N^2] / 1 - ((N1-xN-1) + (N2-xN-2))/N^2$ şeklinde hesaplanır.

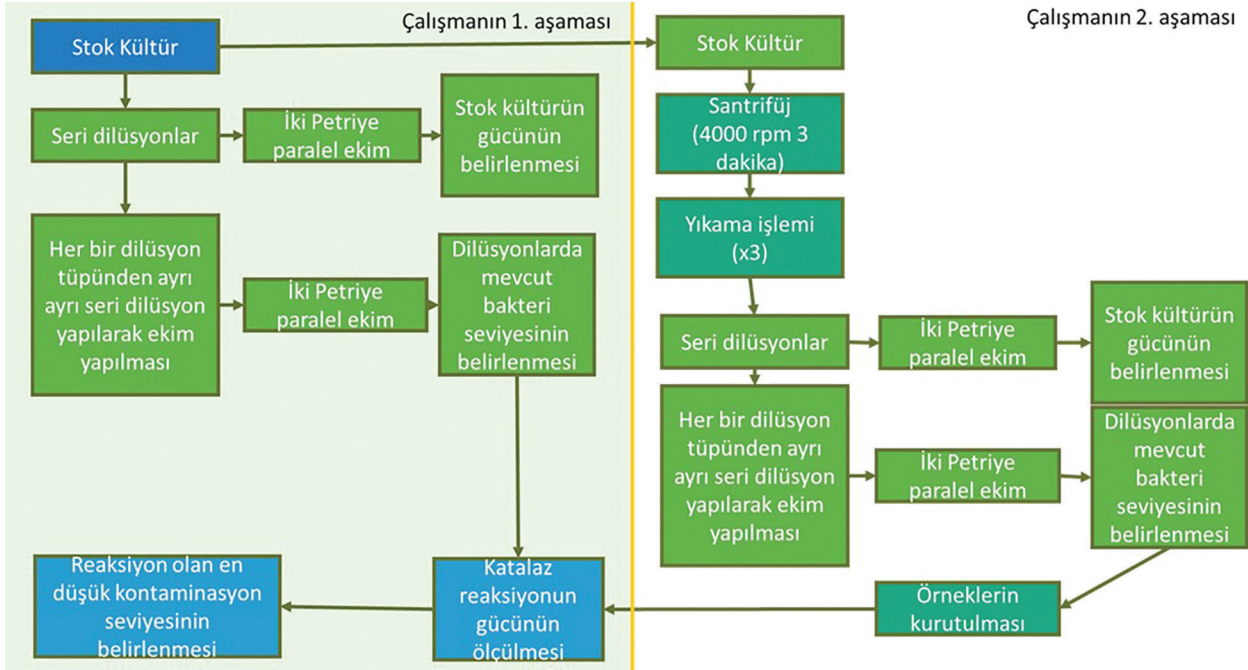
Mikrobiyal Biyosensörlerin validasyon ve verifikasyonunda mikrobiyolojik yöntem validasyon ve verifikasyonu uygulanmaktadır (Dushek ve ark. 2014; Goode ve ark. 2014; Anon 2016a-b; Anon 2017; Zutz ve ark. 2017; Anon 2019; Fares ve ark. 2020).

Bu çalışmanın amacı, hidrojen peroksit içeren dekontaminantların etkinliklerini ölçmek için tasarlanan mikrofluidik katalaz biyosensörü için reaksiyonun optimizasyonu yapmaktır. Mikrobiyal katalaz aktivitesinin biyosensörlerde kullanımı için gerekli validasyon aşamalarını gerçekleştirip, mikrofluidik yapıya adaptasyon öncesi reaksiyonun doğruluğunu göstermek hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Çalışma üç aşamada hazırlanmıştır. İlk aşamada katalaz reaksiyonu optimize edilmiş, ikinci aşamada da

kurutma işlemi yapılarak işlem yeniden tekrar edilmiş ve validasyon yapılmıştır. Üçüncü aşamada da piyasa örnekleri yeni yaklaşım ile kontrol edilmiştir. Çalışmaya ait akış şeması Şekil 1.de gösterilmiştir.



Şekil 1. Çalışmaya ait işlem şeması.

Bakteri kültürü hazırlama

Stok kültür halinde -20°C 'de depolanan *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 kültürü 9 mL Brain Heart Infusion broth (BHI, Oxoid, England) içerisinde pasajlanmıştır. Zenginleştirme 37°C etüvde 24 saatlik üreme için bekletilmiş takiben Baird Parker Agar (BP, Oxoid, England) pasajlanmış ve 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Tipik koloni morfolojisi oluşana kadar işlem 3 kere tekrar edilmiştir. Tipik *S. aureus* kolonisinden 1 adet alınarak BHI içerisine pasajlanmış ve 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda Maximum Recovery Diluent (MRD, Merck, Almanya) ile seri dilüsyonlar hazırlanarak Plate Count Agar (PCA, Oxoid, England) yüzeyine yayma plak yöntemi ile ekilmiş ve 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda sayımı yapılmıştır. Sayım sonuçları çıkana kadar seri dilüsyonlar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Seri dilüsyonlardan her bir tüp ayrı bir örnek olarak kabul edilerek buradan da seri dilüsyonlar yapılarak sayımlar yapılmıştır. Y-bağımlı değişkeni ile X-bağımsız değişkenleri arasındaki doğrusal korelasyon verilere ne düzeyde uyumlu olduğu yanında, regresyon denkleminin eğimiyle de ilgi kurularak (R^2) hesaplanmış ve ölçümlerde sapma belirlenmiştir.

Katalaz reaksiyonu optimizasyonu

Ekim sonuçlarına göre, buzdolabında bir gece bekleyen seri dilüsyonlarda her tüpte bulunan bakteri seviyesi yeniden PCA ile sayılmak üzere ekimler yapılarak 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu dilüsyonlardan vortex ile homojenizasyonu takiben $100\ \mu\text{L}$ temiz bir lam yüzeyine alınmış ve üzerine % 7,5'lük H_2O_2 solüsyonundan $100\ \mu\text{L}$ ile karıştırılmıştır. Köpürme pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir. Bu aşama üç tekrarlı çalışılmıştır. Toplam her bir dilüsyondan 30 örnekte analiz yapılmıştır.

Kurutmanın katalaz reaksiyonu üzerine etkisinin belirlenmesi

Stok kültür yeniden BHI'ya pasajlanmış ve inkübasyonu takiben $4000\ \text{rpm}$ 'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Takiben dipte kalan kısım yeniden $1000\ \mu\text{L}$ MRD ile sulandırılmış ve santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi toplam 3 kere tekrar edilmiştir. Takiben son kez sulandırılan kültür, vortex ile homojenize edilerek seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlardan seri ekimler yapılmış aynı zamanda lam yüzeyinde 10 ayrı yere damlatılmıştır. Damla-lar laminar kabin içerisinde oda sıcaklığında kurutulmuş (yaklaşık 30 dakikada kurumuştur) ve kurumayı

takiben hemen % 7,5'lük H₂O₂ eklenerek ölçümler alınmıştır. Kurutmanın etkisinin olup olmadığı bu şekilde belirlenmiştir. Tüm örneklerde köpürmenin olduğu son dilüyon katalaz reaksiyonunun en düşük sınırı kabul edilmiştir. Aynı çalışma *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) ile negatif kontrol olarak tekrar edilmiştir. Tüm analiz aşamaları 3 kere tekrar edilmiştir.

Validasyon

Etkinliği belirlemeyi takiben *S. aureus* stoğundan en düşük katalaz reaksiyonu belirlenen seviyede, orta seviyede ve yüksek seviyede yeniden sulandırma yapılarak lam yüzeyinde 10 ayrı yere damlatılmıştır. Damlalar laminar kabin içerisinde oda sıcaklığında kurutulmuş ve % 7,5'lük H₂O₂ eklenerek 10 kere ölçüm alınmıştır. Çalışmada negatif kontrol olarak *S. mutans* kullanılarak en yüksek seviyede 10 kere aynı ölçümler tekrar edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda yanlış pozitiflik, yanlış negatiflik, spesifite ve sensitivite hesaplanmıştır.

Farklı dekontaminantlar ile analiz yönteminin tekrarlanması

İçerisinde 2,87 log₁₀ kob/mL seviyede *S. aureus* bulunan ve laminar kabinde kurutulmuş lamlar önceden hazırlanmıştır. Bu lamlar üzerine piyasada satılan beş farklı ürün konularak reaksiyon hedeflenmiştir. Bu kapsamda piyasadaki elde edilen ürünlerin etkinliği kalitatif olarak ölçülmek istenmiştir. Piyasadaki elde edilen ve analize alınan ürünlerin içerikleri Tablo 2'de bildirilmiştir.

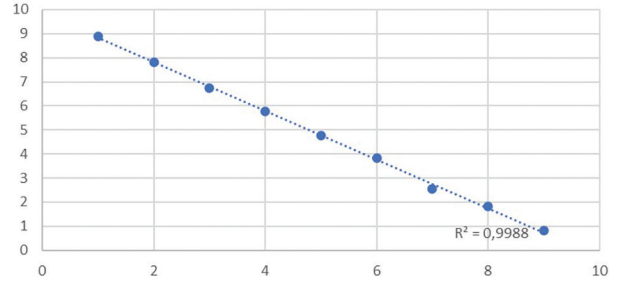
Tablo 2. Çalışmada kullanılan farklı dezenfektanların bileşimleri.

	H2O2	Alkol	Gümüş nanopartikül	Perasetik asit
Dezenfektan A	% 7,5	% 35	-	% 3
Dezenfektan B	% 7,5	-	40nm 200 ppm	-
Dezenfektan C	% 7,5	% 15	-	-
Dezenfektan D	% 14	-	-	-
Dezenfektan E	% 25	-	-	-

Bulgular

Çalışmada kullanılan *S. aureus* suşunun başlangıç kontaminasyon seviyesinin ortalama 8,90 log₁₀ kob/mL olduğu (R²=0,9988) belirlenmiştir. Her bir dilüsyonun gücünün belirlenmesine bağlı olarak elde edilen *S. aureus* dilüsyonlarında toplam canlı bakteri sayımları Şekil 2'de gösterilmiştir.

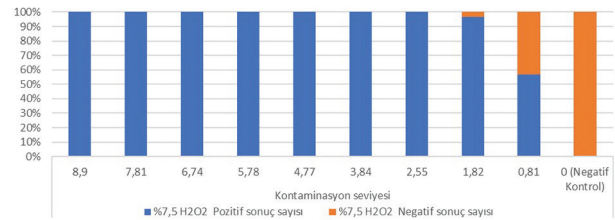
S. aureus seri dilüsyonlarında canlı bakteri sayım sonuçları



Şekil 2. *S. aureus* dilüsyonlarında toplam canlı bakteri sayımları.

Bu dilüsyonlardan yapılan katalaz reaksiyonu sonucunda tamamının pozitif olduğu en düşük bakteri seviyesi belirlenmiştir. Buna göre 30 analizin tamamının pozitif olduğu son seviye 2,55 log₁₀ kob/mL olarak belirlenmiştir. Bu aşamaya ait veriler Şekil 3'de özetlenmiştir.

S. aureus seviyesine bağlı olarak katalaz reaksiyonu veren dilüsyonlar



Şekil 3. Katalaz reaksiyonu veren minimum dilüsyonların belirlenmesine ait grafik (log₁₀ kob/mL).

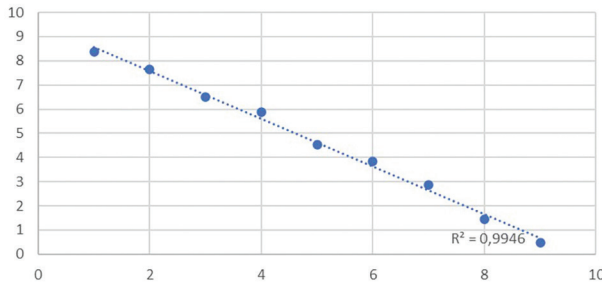
Stok kültürden yeniden pasaj yapılarak elde edilen yeni stokta ilk aşamada uygulanan kontaminasyon seviyesi belirleme işlemi tekrar edilmiştir. Buna göre kurutma aşamasında kullanılacak *S. aureus* suşunun sayısı 8,36 log₁₀ kob/mL olarak (R²=0,9946) belirlenmiştir ve buna ait veriler Şekil 4'de özetlenmiştir. Çalışmada, negatif kontrol olarak *S. mutans* suşu en yüksek seviyeden (8 log₁₀ kob/mL) hazırlanmış ve bir önceki aşamaya benzer şekilde 10 damla lama konularak analiz yapılmıştır.

İlk aşamada yapılan analize benzer şekilde 30 damla örneği kurutulmuş ve bunlarda katalaz reaksiyonu gözlemlenmiştir. Buna göre 30 analizin tamamının pozitif olduğu son seviye 2,87 log₁₀ kob/mL olarak belirlenmiştir. Bu verilere ait görsel Şekil 5'de sunulmuştur.

Validasyon aşamasında üç farklı seviyede (Düşük=2,87 log₁₀ kob/mL, Orta=3,841 log₁₀ kob/mL,

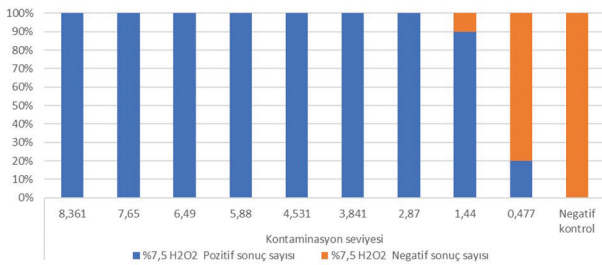
Yüksek= $4,531 \log_{10}$ kob/mL) *S.aureus* 10'ar damla şeklinde hazırlanmış ve kurutulmuştur. Ek olarak negatif kontrol olarak *S.mutans* en yüksek seviyeden (8 \log_{10} kob/mL) hazırlanmış ve 10 damla lama konularak kurutulmuştur. Bu aşamaya ait veriler Tablo 3'de sunulmuştur.

Kurutma öncesi *S.aureus* seri dilüsyonlarında canlı bakteri sayım sonuçları



Şekil 4. Kurutma aşamasında kullanılacak *S.aureus* suşunun gücünün belirlenmesi.

S.aureus seviyesine bağlı olarak katalaz reaksiyonu veren dilüsyonlar



Şekil 5. Katalaz reaksiyonu veren minimum dilüsyonların kurutulmuş örneklerden belirlenmesine ait grafik.

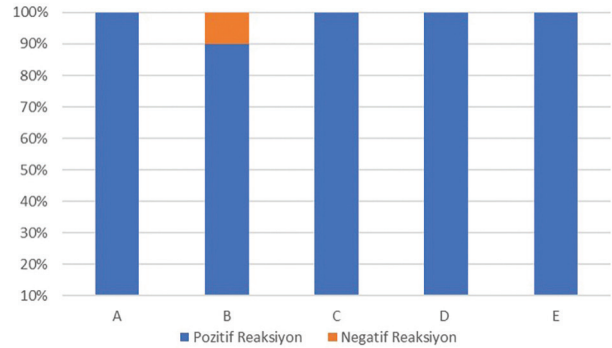
Tablo 3. Validasyon sonuçlarına ait tablo.

		Bilinen sonuç		Toplam
		Pozitif	Negatif	
Deney sistemi sonucu	Pozitif	29	1	30
	Negatif	0	10	10
Toplam		29	11	40

Analiz yönteminin yanlış pozitiflik (% 0), yanlış negatiflik (% 0,33), sensitivite (% 96), spesifite (% 100), doğruluk (% 97,5) olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre kurutmanın etkisinin düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Piyasa örneklerinde yapılan analizlerde sadece 1 örnekte negatif sonuç alınmıştır. Bu örnek içerisinde gümüş nanopartikül içermektedir. Piyasa örneklerine ait veriler Şekil 6'da gösterilmiştir.

Ticari örnekler ile elde edilen katalaz reaksiyon sonuçları



Şekil 6. Ticari örneklere ait katalaz reaksiyon sonuçları.

Tartışma ve Sonuç

Katalaz enzimin farklı alanlarda kullanıldığı bildirilmiştir. Bu kapsamda, süte prezervatif olarak eklenen H₂O₂ giderilmesinde kullanılabilir (Tarhan 1995). Tam aksine kan katalazının seviyesini belirlemede de kullanılan farklı yöntemler mevcuttur (Peimian ve ark. 1996; Mahmoud ve Hadwan 2016). H₂O₂ dekontaminasyon amacıyla yaygın kullanılan bir kimyasaldır. Özellikle tıbbi sterilizasyon için buhar formunda veya plazma halinde kullanımı yaygındır (Volker ve Moirandat 2000). COVID-19 salgınında erişimi sıkıntılı olan N95 maskelerde de, kullanım süresini arttırmak için, H₂O₂ dekontaminasyonu uygulanmıştır (Oral ve ark. 2020). Dekontaminasyonda yaygın olarak kullanılmasına rağmen, etkinlik ölçümünde, tanımlı standart bir yaklaşım oluşturulamamıştır. Yaklaşımlar daha çok laboratuvarında miktar tespitine yöneliktir (Keisho ve ark. 2018).

Mikrofluidik biyosensörler daha küçük hacimlerde analizi yapmalarına bağlı olarak hem tasarruflu, hem ekonomik hem de taşınabilir seçenekler olarak kabul edilmektedir. Bizim çalışmamızda da mikrofluidik biyosensör tasarımı için ilk aşama olan mikrobiyal optimizasyon yapılmıştır. Bu amaçla mikroorganizmanın tamamı kullanılmıştır. Mikroorganizmanın tamamının kullanıldığı mikrobiyal biyosensörlerde enzimlerin aktivitesi kaybolmamaktadır. Enzim temelli biyosensörler genellikle bir işlem sonrasında ortamda kalan atık ürünlerin kantitatif veya kalitatif ölçümünü hedefleyen sistemlerdir. Katalaz enzimi işlevi gereği hidrojen peroksiti katalizleyen ve ortamda su ve oksijen açığa çıkaran bir enzimdir. Tarım ürünleri başta olmak üzere zararlı mikroorganizmaları veya bunların kalıntılarını tayin etmek için biyosensör uygulamalarında sıkça katalaz enzimi kullanılmaktadır. Benzer bir çalışmada katalaz

enzimi oluşturulan bir biyosensör ile pestisit tayini yapılmıştır (Palüzar ve Özcan 2017). Bakterinin tüm olarak yerleştirildiği mikrobiyal sensörler raf ömrü açısından belirgin bir uzama sağladığı gibi, stabilizasyon ve kullanım açısından da kolaylık sağlamaktadır. Chen ve ark. (2011) *Escherichia coli* ile oksidatif DNA hasarını ölçen bir biyosensör yapmışlardır. Çalışmalarında tüm bakteriyi kullanmanın enzim kullanımından daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada bakterilerin kullanıldığı biyosensörlerin sensitivite ve spesifite açısından seçkin olduklarını vurgulamışlardır (Mitchell ve Gu 2004; Ahn ve ark. 2009; Chen ve ark. 2012). Bizim çalışmada kullanılan *S.aureus* ile elde edilen sensitivite ve spesifite sonuçlarımız bildirilen çalışmalarla uyum göstermektedir. Mikrobiyal biyosensörlerle yapılan çalışmalarda sonuçların sensitivite ve spesifitenin yüksek olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir (Hennessy 2005; Kim ve ark. 2012; Muguruma 2018; Shang ve ark. 2020; Basiri ve ark. 2021). Bizim çalışmamızda da elde edilen veriler yanlış pozitiflik (% 0), yanlış negatiflik (% 0,33), sensitivite (% 96), spesifite (% 100), doğruluk (% 97,5) olarak elde edilmiştir. Çalışmamızdan elde edilen veriler literatür ile uyum göstermektedir.

Çalışmamızın son aşamasında piyasada bulunan beş farklı ürün konularak reaksiyon izlenmiştir. Mikroorganizmanın piyasada bulunan H_2O_2 içeren dezenfektanlardan sadece birinde yapılan bir tekrarda negatif sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Bunun da muhtemel sebebinin bakteri konsantrasyonunda homojenizasyonda bozulma veya stabilizasyon sorunu olabileceği düşünülmüştür. Aynı zamanda gümüş nanopartikül hızlı biçimde antimikrobiyal etki göstermektedir. Buna bağlı olarak da negatif sonuç gözlemlenebileceği düşünülmüştür. Goyal ve ark. (2014) yaptıkları bir çalışmada virüsler üzerine H_2O_2 içeren dezenfektan buharının etkili olduğunu bildirmiş, ancak bakterilerde uygulanırken katalaz enziminin etkinliği düşürebileceğini bildirmiştir. Özellikle hastanelerde yapılan dezenfeksiyonda H_2O_2 içeren dezenfektanların kullanımının yaygın olduğu ve 4 logaritma azalma tetikledikleri bildirilmiştir. Benzer şekilde bazı durumlarda katalaz pozitif mikroorganizmaların etkinliği düşürebildiği bildirilmiştir (Weber ve ark. 2016). Benzer bir başka çalışmada, Humayun ve ark. (2019), H_2O_2 içeren dezenfektanların fumigasyonunu takiben % 2 oranında hastane odalarında canlı bakteri bulunabildiğini bildirmiştir. Benzer sonuçlar Falagas ve ark. (2011) ve Ali ve ark. (2016) tarafından da bildirilmiştir. Yaptıkları çalışmada H_2O_2 içeren dezenfektan uygulamasını takiben

katalaz aktivitesine bağlı *S.aureus* suşlarının canlı kaldığını bildirmişlerdir.

Biyolojik kirlenmeler birçok ortamda meydana gelebildiği gibi biyosuçlar kapsamında da meydana gelebilir. Bilinen dekontaminantların uygulanmasında kontrol mekanizması mevcut değildir. Kontrol tüm sürecin bitiminde luminensans veya floresans tabanlı takip ile yapılmaktadır. Tarafımızdan mikrobiyal optimizasyonu yapılan sistem dekontaminasyon sırasında ilgili yüzeylere yerleştirilebilecek böylece dekontaminantın ilgili yüzeylere penetrasyonu ve etkinliği ölçülebilecektir. Bu amaçla *S.aureus* bütün olarak yüzeye kurutulularak sabitlenmesinin katalaz reaksiyonu üzerine etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda elde edilen veriler ışığında sistemin güven aralığı yüksek ve hassas bir yapısı olduğu da gözlemlenmiştir. Bundan sonrasında mikrofluidik yapıya yerleştirilecek mikroorganizmanın uygulamalarda etkinliklerine bakılması hedeflenmektedir.

Teşekkür: Bu makale içerisinde yer alan veriler, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yüksek Lisans Projesi desteği alınarak yürütülen 2020FEBE037 kodlu "Hidrojen peroksit dekontaminasyon etkinliğinin belirlenmesine yönelik mikrofluidik katalaz biyosensörü" projesi kapsamında üretilmiştir.

Çıkar Çatışması Bildirimi: Yazarların herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Etik Bildirim: Çalışma etik ilke ve kuralları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Kaynaklar

- Ahn JM, Hwang ET, Youn CH, Banu DL, Kim BC, Niazi JH, Gu MB. Prediction and classification of the modes of genotoxic actions using bacterial biosensors specific for DNA damages. *Biosens Bioelectron.* 2009 Dec 15;25(4):767-72. doi: 10.1016/j.bios.2009.08.025.
- Alfonso-Prieto M, Biarnés X, Vidossich P, Rovira C. The molecular mechanism of the catalase reaction. *J Am Chem Soc.* 2009 Aug 26;131(33):11751-61. doi: 10.1021/ja9018572.
- Alhadrami HA. Biosensors: Classifications, medical applications, and future prospective. *Biotechnol Appl Biochem.* 2018 May;65(3):497-508. doi: 10.1002/bab.1621. Epub 2017 Nov 23.
- Ali S, Muzslay M, Bruce M, Jeanes A, Moore G, Wilson AP. Efficacy of two hydrogen peroxide vapour aerial decontamination systems for enhanced disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridium difficile* in single isolation rooms. *J Hosp Infect.* 2016 May;93(1):70-7. doi: 10.1016/j.jhin.2016.01.016. Epub 2016 Feb 9.
- Anonim (2016a) International Standardization Organization. ISO 16140-2:2019 Microbiology of the food chain - Method validation.
- Anonim (2016b) International Standardization Organization ISO 13485:2016 Medical devices - Quality management systems - Requirements for regulatory purposes
- Anonim (2017) International Standardization Organization ISO 17468:2016 Microbiology of the food chain - Technical requirements and guidance on establishment or revision of a standardized reference method

- Anonim (2019) International Standardization Organization ISO/TC 34/SC9 Validation requirements on establishment or revision of a standardized reference method.
- Banerjee P, Kintzios S, Prabhakarandian B. Biotoxin detection using cell-based sensors. *Toxins* (Basel). 2013 Nov 29;5(12):2366-83. doi: 10.3390/toxins5122366.
- Basiri A, Heidari A, Nadi MF, Fallahy MTP, Nezamabadi SS, Sedighi M, Saghazadeh A, Rezaei N. Microfluidic devices for detection of RNA viruses. *Rev Med Virol*. 2021 Jan;31(1):1-11. doi: 10.1002/rmv.2154. Epub 2020 Aug 26.
- Chen Z, Lu M, Zhuang G, Wang H. Enhanced bacterial biosensor for fast and sensitive detection of oxidatively DNA damaging agents. *Anal Chem*. 2011 May 1;83(9):3248-51. doi: 10.1021/ac200426x. Epub 2011 Mar 31.
- Chen Z, Lu M, Zou D, Wang H. An E. coli SOS-EGFP biosensor for fast and sensitive detection of DNA damaging agents. *J Environ Sci (China)*. 2012;24(3):541-9. doi: 10.1016/s1001-0742(11)60722-5.
- DeQueiroz GA, Day DF. Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. *J Appl Microbiol*. 2007 Oct;103(4):794-802. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03299.x.
- Dushek O, Lellouch AC, Vaux DJ, Shahrezaei V. Biosensor architectures for high-fidelity reporting of cellular signaling. *Biophys J*. 2014 Aug 5;107(3):773-782. doi: 10.1016/j.bpj.2014.06.021.
- Falagas ME, Thomaidis PC, Kotsantis IK, Sgouros K, Samonis G, Karageorgopoulos DE. Airborne hydrogen peroxide for disinfection of the hospital environment and infection control: a systematic review. *J Hosp Infect*. 2011 Jul;78(3):171-7. doi: 10.1016/j.jhin.2010.12.006. Epub 2011 Mar 9.
- Fares H, Abbass Y, Valle M, Seminara L. Validation of Screen-Printed Electronic Skin Based on Piezoelectric Polymer Sensors. *Sensors* (Basel). 2020 Feb 20;20(4):1160. doi: 10.3390/s20041160.
- Goode JA, Rushworth JV, Millner PA. Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. *Langmuir*. 2015 Jun 16;31(23):6267-76. doi: 10.1021/la503533g. Epub 2014 Dec 2.
- Goyal SM, Chander Y, Yezli S, Otter JA. Evaluating the virucidal efficacy of hydrogen peroxide vapour. *J Hosp Infect*. 2014 Apr;86(4):255-9. doi: 10.1016/j.jhin.2014.02.003. Epub 2014 Feb 27
- H. Murguruma, *Biosensors: Enzyme Immobilization Chemistry*, Editor(s): Klaus Wandelt, *Encyclopedia of Interfacial Chemistry*, Elsevier, 2018, Pages 64-71, ISBN 9780128098943, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13486-9>.
- Humayun T, Qureshi A, Al Roweily SF, Carig J, Humayun F. Efficacy Of Hydrogen Peroxide Fumigation In Improving Disinfection Of Hospital Rooms And Reducing The Number Of Microorganisms. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2019 Oct-Dec;31(Suppl 1)(4):S646-S650.
- K. Yabuta, H.Futamura, K. Kawasaki, M. Hirao, H. Sugiyama, Design-oriented regression models for H2O2 decontamination processes in sterile drug product manufacturing considering rapidity and sterility, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 548, Issue 1, 2018, Pages 466-473, ISSN 0378-5173, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.055>.
- Kim J, Park HD, Chung S. Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation. *Molecules*. 2012 Aug 15;17(8):9818-34. doi: 10.3390/molecules17089818.
- Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci*. 2007 Jan;32(1):44-50. doi: 10.1016/j.tibs.2006.11.003. Epub 2006 Dec 8.
- Knight AW. Using yeast to shed light on DNA damaging toxins and irradiation. *Analyst*. 2004 Oct;129(10):866-9. doi: 10.1039/b404874c.
- Leman Tarhan, Use of immobilised catalase to remove H2O2 used in the sterilisation of milk, *Process Biochemistry*, Volume 30, Issue 7, 1995, Pages 623-628, ISSN 1359-5113, [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)00066-2](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)00066-2)
- Lineback CB, Nkemngong CA, Wu ST, Li X, Teska PJ, Oliver HF. Hydrogen peroxide and sodium hypochlorite disinfectants are more effective against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms than quaternary ammonium compounds. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018 Dec 17;7:154. doi: 10.1186/s13756-018-0447-5.
- Mahmoud H. Hadwan, New Method for Assessment of Serum Catalase Activity, *Indian Journal of Science and Technology*, Vol 9(4), DOI: 10.17485/ijst/2016/v9i4/80499, January 2016
- Mehrotra P. (2016). Biosensors and their applications - A review. *Journal of oral biology and craniofacial research*, 6(2), 153-159. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>
- Mitchell RJ, Gu MB. An *Escherichia coli* biosensor capable of detecting both genotoxic and oxidative damage. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004 Mar;64(1):46-52. doi: 10.1007/s00253-003-1418-0. Epub 2003 Aug 23.
- Oral E., K.K. Wannomae, R. Connolly, J. Gardecki, H. M. Leung, O. Muratoglu, A. Griffiths, A. N. Honko, L. E. Avena, L. G. A. McKay, N.Flynn, N. Storm, S.N. Downs, R. Jones, B. Emmal, Vapor H2O2 sterilization as a decontamination method for the reuse of N95 respirators in the COVID-19 emergency medRxiv 2020.04.11.20062026; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.11.20062026>
- Palúzar H, Özcan HM (). Katalaz Temelli PANI Biyosensörü ile Deltameterinin Belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2017, 21(2), 644-651.
- Peimian Ou, Simon P. Wolff, A discontinuous method for catalase determination at 'near physiological' concentrations of H2O2 and its application to the study of H2O2 fluxes within cells, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, Volume 31, Issues 1-2, 1996, Pages 59-67, ISSN 0165-022X, [https://doi.org/10.1016/0165-022X\(95\)00039-T](https://doi.org/10.1016/0165-022X(95)00039-T).
- Ríos-Castillo AG, González-Rivas F, Rodríguez-Jerez JJ. Bactericidal Efficacy of Hydrogen Peroxide-Based Disinfectants Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria on Stainless Steel Surfaces. *J Food Sci*. 2017 Oct;82(10):2351-2356. doi: 10.1111/1750-3841.13790. Epub 2017 Aug 23.
- Rosendal ME. Decontamination strategies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2002 Mar;32(2):311-21, v. doi: 10.1016/s0195-5616(01)00007-9.
- Shang Y, Sun J, Ye Y, Zhang J, Zhang Y, Sun X. Loop-mediated isothermal amplification-based microfluidic chip for pathogen detection. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;60(2):201-224. doi: 10.1080/10408398.2018.1518897. Epub 2018 Dec 20.
- Stupak EÉ, Stupak IV. [Cyclic digene system as a control element of a bacterial biosensor]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 2012 Jan-Feb;48(1):18-22. Russian.
- Volker Sigwarth, Claude Moirandat Development and Quantification of H2O2 Decontamination Cycles, *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* Jul 2000, 54 (4) 286-304
- Weber DJ, Kanamori H, Rutala WA. 'No touch' technologies for environmental decontamination: focus on ultraviolet devices and hydrogen peroxide systems. *Curr Opin Infect Dis*. 2016 Aug;29(4):424-31. doi: 10.1097/QCO.0000000000000284.
- William Hennessy, CHAPTER 10 - Flow and Level Sensors, Editor(s): Jon S. Wilson, *Sensor Technology Handbook*, Newnes, 2005, Pages 237-254, ISBN 9780750677295, <https://doi.org/10.1016/B978-075067729-5/50050-1>.
- Wood JP, Adrion AC. Review of Decontamination Techniques for the Inactivation of *Bacillus anthracis* and Other Spore-Forming Bacteria Associated with Building or Outdoor Materials. *Environ Sci Technol*. 2019 Apr 16;53(8):4045-4062. doi: 10.1021/acs.est.8b05274. Epub 2019 Apr 2.
- Yagi K. Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007 Jan;73(6):1251-8. doi: 10.1007/s00253-006-0718-6. Epub 2006 Nov 17.
- Young H. Lee, Raj Mutharasan, CHAPTER 6 - Biosensors, Editor(s): Jon S. Wilson, *Sensor Technology Handbook*, Newnes, 2005, Pages 161-180, ISBN 9780750677295, <https://doi.org/10.1016/B978-075067729-5/50046-X>.
- Zulauf KE, Green AB, Nguyen Ba AN, Jagdish T, Reif D, Seeley R, Dale A, Kirby JE. Microwave-Generated Steam Decontamination of N95 Respirators Utilizing Universally Accessible Materials. *mBio*. 2020 Jun 25;11(3):e00997-20. doi: 10.1128/mBio.00997-20.
- Zutz C, Wagener K, Yankova D, Eder S, Möstl E, Drillich M, Rychli K, Wagner M, Strauss J. A robust high-throughput fungal biosensor assay for the detection of estrogen activity. *Steroids*. 2017 Oct;126:57-65. doi: 10.1016/j.steroids.2017.07.005. Epub 2017 Jul 14.