

Kimyasal Olarak Modifiye Edilmiş Kitosanın Kuvars Kristal Mikroterazi Kullanarak Antibiyofilm Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Neslihan Nohut Maşlakçı^{1*} 

Özet: Biyomalzemeler üzerinde büyüme ve hücresel bağlanma ile biyofilm oluşumunu engellemek için, yeni biyomalzemeler geliştirilebilir. Bu şekilde biyomalzemeler yeni özellikler kazanabilir. Bu çalışmada, plazma modifiye kitosan (PCh), 5-etoksi-2-metil-benzofuran-3-karboksilik asit (E1) ile kimyasal olarak modifiye edildi. Kimyasal olarak modifiye edilmiş PCh ve PCh-E1 filmlerinin yapıları, X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), Fotoluminesans spektroskopisi (PL) ve Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile incelendi. PCh ve PCh-E1'in elektrospun nanolifleri, destek polimer polivinil alkol (PVA) varlığında yerinde elektroçürme ve kuvars kristal mikroterazi (QCM) kullanılarak, QCM elektrot yüzeyinde mikrogram düzeyinde üretildi. Elektrospun nanoliflerin morfolojileri ve çapları Taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile incelendi. PVA, PVA/PCh ve PVA/PCh-E1'in ortalama lif çapları ve standart sapmaları sırasıyla 280.0 ± 58.9 , 104.5 ± 35.9 ve 99.4 ± 21.9 nm olarak belirlendi. PVA/PCh nanoliflerinden daha ince çapa sahip PVA/PCh-E1 nanolifler elde edildi. Nanolifler ile kaplanmış QCM elektrot yüzeylerinin *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) karşı antibiyofilm aktiviteleri, QCM ile bağlantılı bir akış hücresi kullanılarak değerlendirildi. PVA/PCh-E1 nanolifleri ile kaplanmış QCM elektrodunda (ΔF : -13709.5 Hz, Δm : $530.3 \mu\text{g cm}^{-2}$), PVA/PCh nanolifleri ile kaplanmış QCM elektroduna (ΔF : -14552.7 Hz, Δm : $563.5 \mu\text{g cm}^{-2}$) göre daha az negatif frekans kayması ve kütle artışı belirlendi. QCM sonuçları, PVA/PCh-E1 nanoliflerinin, E1 bileşiğinin olası bir katkısı nedeniyle biyofilm oluşumunu önemli ölçüde azalttığını gösterdi.

Anahtar kelimeler: Biyofilm, Kitosan, Elektroçürme, Lif, Kuvars Kristal Mikroterazi.

The Assessment of Antibiofilm Activity of Chemically Modified Chitosan Using Quartz Crystal Microbalance

Abstract: New biomaterials can be developed to prevent the formation of biofilms on biomaterials through growth and cellular attachment. In this way, biomaterials can gain new properties. In this study, the plasma modified-chitosan (PCh) was chemically modified with 5-ethoxy-2-methyl-benzofuran-3-carboxylic acid (E1). The structures of chemically modified PCh-E1 and PCh films were studied by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), Photoluminescence spectroscopy (PL), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Electrospun nanofibers of PCh and PCh-E1 were produced at the microgram level onto the QCM electrode surface using *in situ* electrospinning and quartz crystal microbalance (QCM) in the presence of a support polymer polyvinyl alcohol (PVA). The morphologies and diameters of electrospun nanofibers were investigated by the Scanning electron microscopy (SEM). The average fiber diameters and standard deviations of PVA, PVA/PCh, and PVA/PCh-E1 were determined as 280.0 ± 58.9 , 104.5 ± 35.9 , and 99.4 ± 21.9 nm, respectively. Finer diameter PVA/PCh-E1 nanofibers were obtained from the PVA/PCh nanofibers. Antibiofilm activities against *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) of a QCM electrode surfaces coated with nanofibers were evaluated using the flow cell associated with the QCM. When QCM electrode coated with the PVA/PCh-E1 nanofibers was used, less negative frequency shift and the mass increase in (ΔF : -13709.5 Hz, Δm : $530.3 \mu\text{g cm}^{-2}$) was detected compared to the QCM electrode coated with PVA/PCh nanofibers (ΔF : -14552.7 Hz, Δm : $563.5 \mu\text{g cm}^{-2}$). QCM results showed that PVA/PCh-E1 nanofibers significantly decrease biofilm formation, due to a possible contribution of E1 compound.

Keywords: Biofilm, Chitosan, Electrospinning, Fiber, Quartz Crystal Microbalance.

¹**Address:** Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Gelendost Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Bölümü, 32900, Gelendost/Isparta, Türkiye

***Corresponding author:** neslihanohut@isparta.edu.tr

Citation: Nohut Maşlakcı, N. (2020). The Assessment of Antibiofilm Activity of Chemically Modified Chitosan Using Quartz Crystal Microbalance. Bilge International Journal of Science and Technology Research, 4 (Special Issue): 13-21.

1. Giriş

Yüzey özellikleri, biyomalzemelerin işleyişinde önemli bir rol oynamaktadır. Bakterilerin polisakkarit, protein ve DNA'dan oluşan biyofilm adlı bir tabaka oluşturduğu bilinmektedir (Marcus vd., 2012; Nohut Maslakci vd., 2015; Nohut Maslakci vd., 2018). Özellikle, çevresel etmenlerden korunmak, besin elde etmek ve yeni genetik özellikler kazanmak gibi çeşitli faktörler mikroorganizmaların biyofilm tabakalarını oluşturma nedenleri arasında yer almaktadır (Gülgör ve Korukluoğlu, 2014; Jamal vd., 2018). Bununla birlikte, mikroorganizmaları dış etkenlerden koruyan bu biyofilm tabakası, tıbbi uygulamalar, su arıtma sistemleri ve süt ürünleri işletmeleri gibi birçok alanda ekonomik zararlara neden olmaktadır (Marcus vd., 2012; Nohut Maslakci vd., 2015; Nohut Maslakci vd., 2018). Biyofilm tabakası toprak ve bitki ekolojisi için atık suya göre avantaj sağlarken, gıda ve kağıt endüstrisinde oluşturduğu kabuklar dezavantaj sağlamaktadır (Shi ve Zhu, 2009; Baumann vd., 2009; Tirola vd., 2009; Asri vd., 2018). Dahası, biyofilm biyomedikal implantlarla ilişkili enfeksiyonlarda ölümcül sonuçlara yol açabilmektedir (Bazaka vd., 2012; Veerachamy vd., 2014; Nohut Maslakci vd., 2018). Biyomalzemeler üzerinde bakteriyel büyüme ve hücre sel bağlanma ile oluşan bu biyofilm tabakası, biyomalzemelerin yüzey modifikasyonu ile önlenabilir. Böylelikle biyomateryaller yeni özellikler kazanabilir (Bazaka vd., 2012; Nohut Maslakci vd., 2015). Bununla birlikte, oksijen içeren heterosiklik bileşikler çeşitli biyokimyasal alanlarda kullanılmakta ve aynı zamanda çok önemli roller oynamaktadır (Kossakowski vd., 2010; Abu-Hashem vd., 2014). Son yıllarda furan ve benzofuran grupları içeren heterosiklik bileşikler, insektisidal, ağrı kesici, anti-kanser, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan, antispesifik ve antiinflamatuvar gibi birçok biyomedikal alanlarda oldukça fazla ilgi görmüştür (Iyengar vd., 1987; Matsuura vd., 1996; Gottesdiener, 1999; Malmström vd., 2001; Zeni vd., 2001; Lopez vd., 2002; Dalvie vd., 2002; Meotti vd., 2003; Goncales vd., 2005; Kossakowski vd., 2010; Abu-Hashem vd., 2014; Khodarahmi vd., 2015). Ayrıca, furan ve furanon grupları içeren çeşitli bileşiklerin bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneği üzerinde engelleyici etkilerinin olduğu çalışmalarda bulunmuştur (Lonn vd., 2012; Nohut Maslakci vd., 2017; Nohut Maslakci vd., 2018). Son yıllarda toksik olmayan, biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen doğal bir polimer olan kitosan ve türevlerinin bakteriler üzerindeki etkileri, QCM ve yüksek performanslı kromatografi (HPLC) gibi çeşitli teknikler kullanılarak araştırılmıştır (Nune vd., 2010; Nohut Maslakci vd., 2015; Nohut Maslakci vd., 2018). Özellikle kitosan bazlı nanolifler, diş uygulamaları için nanokompozitler, doku mühendisliği, tıbbi implantlar, kontrollü ilaç salımı, yara sargıları, filtreleme ve biosensörler gibi biyoteknolojik ve biyomedikal uygulamalarda oldukça fazla dikkat çekmiştir (Pillai ve Sharma, 2009; Sun ve Li, 2011; Zou vd., 2012). Ayrıca yüzey hacim oranı oldukça yüksek olan kitosan

liflerinin, biyofilm oluşumuna neden olan bakteri hücrelerinin lif yüzeyine yapışmasını sağladığı ve dolayısıyla bakterilerin etkilerini azalttığı bilinmektedir (Abrigo vd., 2015; Nohut Maslakci vd., 2015). Bununla birlikte, sentetik polimer bazlı nanoliflerde bakteri hücre tanıma modellerinin olmaması, biyomedikal ve sensör uygulamalarını kısıtlamıştır (Kim vd., 2017). Ayrıca, bakteri hücreleri ve lifler arasındaki etkileşimi anlamaya çalışan QCM tekniğinin kullanıldığı çok az sayıda çalışma vardır (Nohut Maslakci vd., 2015; Kim vd., 2017).

Bu çalışmada PCh, E1 ile kimyasal olarak modifiye edildi. Elde edilen PCh ve PCh-E1'in kimyasal yapıları XPS, PL ve FTIR ile karakterize edildi. Modifiye edilmiş kitosan nanolifleri, destek polimer (PVA) varlığında yerinde elektrodeğirme ve QCM tekniği kullanılarak, QCM elektrot üzerinde biriktirildi. PVA/PCh ve PVA/PCh-E1 nanoliflerinin SEM görüntüleri alınarak lif morfolojisi ve lif boyutları incelendi. Liflerle kaplı QCM elektrot yüzeylerinin *P. aeruginosa* karşı antibiyofilm aktivitesi, QCM ile bağlantılı bir akış hücresi kullanılarak zamana bağlı olarak incelendi. QCM sonuçları, PVA/PCh-E1 nanoliflerinin E1'in olası bir katkısı nedeniyle biyofilm oluşumunu önemli ölçüde azalttığını gösterdi.

2. Materyal ve Yöntem

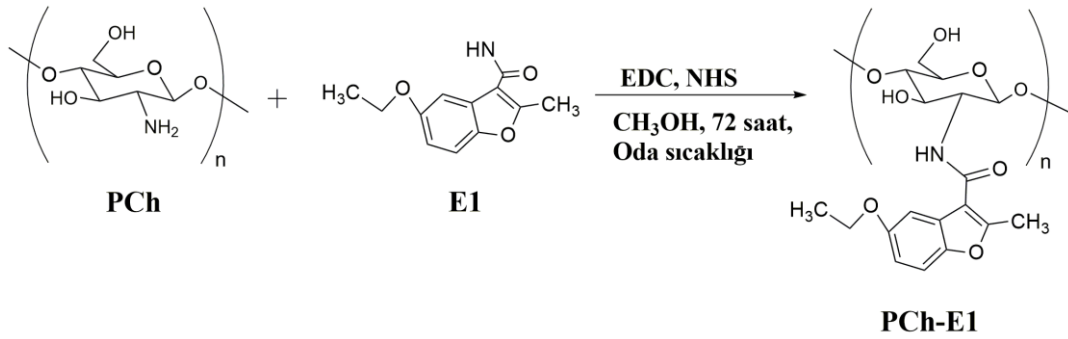
2.1. Materyal

5-etoksi-2-metil-benzofuran-3-karboksilik asit (C₁₂H₁₂O₄), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC, C₈H₁₇N₃.HCl, saflık ≥% 98), N-hidroksisüksinimid (NHS, C₄H₅NO₃, saflık >% 97), hidrazin (N₂H₄, % 98), poli(vinil alkol), kitosan düşük moleküler ağırlık (deasetilasyon derecesi >% 75) Sigma-Aldrich'ten satın alındı. Sigma-Aldrich'ten alındığı gibi susuz metanol (CH₃OH, % 99.8) ve asetik asit (glasiyal) (C₂H₄O₂, % 100) kullanıldı.

Bu çalışmada, kitosanın serbest amino gruplarının işlevini artırmak ve E1 ile moleküler bağlantıyı sağlayabilmek için radyo frekans (RF) hidrazin plazma ile modifiye edilmiş kitosan tozları tercih edilmiştir (Uygun vd., 2011). Altın kaplı kuvars kristal elektrotlar (5 MHz), QCM çalışmalarında kullanılmak üzere seçildi. Elektrodeğirme işleminden önce, elektrot yüzeyleri literatürde belirtildiği gibi piranha çözeltisi (3/1 (v/v) oranında H₂SO₄ / % 30'luk H₂O₂) kullanılarak temizlendi (Channasanon vd., 2007; Nohut Maslakci vd., 2015). Biyofilm çalışmaları için Gram-negatif bir bakteri olan *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu seçildi. *P. aeruginosa* bir gece boyunca 35 °C'de Luria-Bertani (LB) sıvı besi yeri (Miller) içerisinde inkübe edildi.

2.2. Karakterizasyon

PCh ve PCh-E1 filmlerinin yapıları Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi kullanılarak incelendi. Kızılötesi spektrumlar, PerkinElmer Spectrum BX FTIR sistemi (Beaconsfield, Buckinghamshire, HP91QA, İngiltere) üzerinde oda sıcaklığında preslenmiş KBr peletlerinde 400 ve 4000 cm^{-1} arasındaki bölgede kaydedildi. PCh ve PCh-E1 filmlerinin X-ışını fotoelektron spektrumları (XPS), monokromatik AlK α -X ışını kaynağı kullanılarak bir PHI-5000 Versaprobe yöntemi ile 45 açı ve 30 A derinlikte elde edildi. PCh ve PCh-E1 filmlerinin ve E1 nanopartiküllerinin fotoluminesans spektrumları (PL), bir Shimadzu RF 5301PC spektrofotometre ile incelendi. PCh ve PCh-E1 nanoliflerinin morfolojileri Quanta 250 SEM, Phillips XL-30S FEG model taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak analiz edildi.



Şekil 1. PCh-E1 için önerilen reaksiyon mekanizması

2.4. PCh ve PCh-E1 Nanoliflerinin Hazırlanması

PCh filmi (çözünürlük süresi: 10 gün) ve PCh-E1 filmi (çözünürlük süresi: 6 gün), ağırlıkça %2 konsantrasyonda homojen çözeltiler hazırlamak için oda sıcaklığında manyetik bir karıştırıcı ile ağırlıkça %2'lik asetik asit çözeltisi içerisinde çözüldü. Reolojik ve düşük elektrodeğirme özelliklerinden dolayı kitosandan lif elde etmek oldukça zordur (Ohkawa vd., 2006; Klossner vd., 2008). Bu nedenle, PVA, lif üretimi için destek polimer olarak seçilmiştir (Charernsriwilaiwat vd., 2010; Uygun vd., 2011). Ağırlıkça %10 PVA çözeltisi saf suda, 24 saat içinde 70 °C'de hazırlandı. PCh ve PCh-E1 çözeltileri ile PVA çözeltisi 1:1 (v/v) hacim oranlarında hazırlanarak, 4 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. PVA/PCh ve PVA/PCh-E1 kodlarında iki polimer çözeltisi hazırlandı.

Lif üretimi için çalışmada ev yapımı bir elektrodeğirme sistemi kullanıldı. Polimer çözeltileri, 0–30 kV aralığında yüksek voltajlı doğru akım (DC) dönüştürücü güç kaynağına (EMCO 4300) bağlı 2 mL'lik bir şırıngaya yerleştirildi. Elektrodeğirme parametreleri şırınga besleme hızı: 10 $\mu\text{L}/\text{saat}$, uygulanan elektrik potansiyeli: 22 °C'de 24 kV ve iğne ucu ile topraklanmış QCM elektrot yüzeyi arasındaki mesafe: 10 cm olacak şekilde optimize edildi. İğne ucundan sabit miktarda çözelti vermek için bir şırınga pompası (New Era Pump System Inc., ABD) kullanıldı.

2.3. PCh-E1'in Kimyasal Modifikasyonu

İlk olarak, E1 (10 mg), metanol (2.5 mL) içerisinde çözüldü. RF hidrazin plazma ile modifiyeli kitosan (PCh) filmler literatürde belirtildiği gibi hazırlandı (Nohut Maslakci vd., 2015). Daha sonra bu çözelti, başlangıç malzemesi olarak bir PCh film (44.3 mg, kullanılan film boyutu: 1.5x1.5 cm^2), EDC (12 mg) ve NHS (2.8 mg) karışımı içeren bir şişeye konuldu (Hoven vd., 2007; Nohut Maslakci vd., 2018). Çözelti, manyetik bir karıştırıcı yardımıyla oda sıcaklığında 72 saat karıştırıldı. Modifiye edilmiş PCh-E1 filmleri, iki kez metanol ile yıkandı ve daha sonra 3 gün boyunca bir vakum altında kurutuldu. PCh ve E1'in kimyasal olarak modifiye edilmiş ürünü için önerilen reaksiyon mekanizması Şekil 1'de verilmiştir. PCh ve PCh-E1 filmlerinin kalınlığı sırasıyla yaklaşık 0.143 ve 0.140 mm olarak belirlendi.

2.5. QCM-Elektrodeğirme Çalışması

Araştırma kuvars kristal mikroterazi (RQCM) (Maxtek Inficon, ABD) 5 MHz AT-cut kuvars kristal cihazı, QCM elektrot yüzeyinin nanolif kaplaması sırasında zamanın bir fonksiyonu olarak kütle ve frekans değişikliklerinin yerinde izlenmesi için ve daha sonra *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu gerçek zamanlı olarak değerlendirmek için kullanıldı.

PVA/PCh ve PVA/PCh-E1 nanolifleri, 20 dakika süreyle yerinde elektrodeğirme-QCM işlemleri sırasında dikey olarak konumlandırılmış bir QCM elektrot yüzeyi üzerinde biriktirildi. Çalışmalar 3 kez tekrarlandı. QCM elektrot yüzeyinde biriken liflerin kütle-frekans ilişkisi, aşağıda açıklanan Sauerbrey denklemi ile belirlendi (Denklem 1) (Sauerbrey, 1959):

$$\Delta F = -2F_0^2 \Delta m / [A(\mu\rho)^{1/2}] \quad \text{Denklem (1)}$$

burada ΔF , rezonans frekansındaki kaymadır ($\Delta F = F - F_0$) (Hz), Δm (μg), kütle değişimi ve A (cm^2), kristal yüzey alanıdır. Kristalin temel frekansı (F_0) 5 MHz'dir. ρ , kuvarsin yoğunluğudur (2.648 g cm^{-3}). μ kuvarsin kayma modülüdür ($2.947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$). Yerinde QCM elektrodeğirme çalışması sırasında, QCM elektrodunda biriken lif örneklerinin rezonans frekansını (F) düşürdüğü gözlenmiştir.

2.6. QCM ile Biyofilm Oluşumunun Değerlendirilmesi

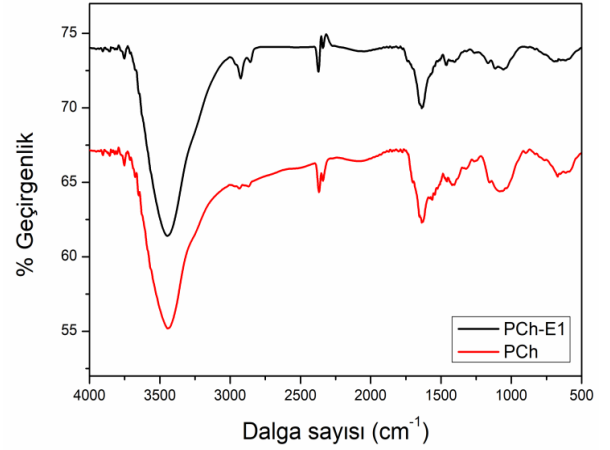
QCM biyofilm deneylerinde lif kaplı altın kaplamalı 5 MHz AT-kesimli kuvars kristali QCM elektrodunun yerleştirildiği bir akış hücresi (Inficon Maxtek, FC-550) kullanıldı. Çalışmada, lifler ile kaplanmış yüzeylerdeki moleküler adsorpsiyon ve etkileşimleri gerçek zamanlı olarak değerlendirmek için QCM kullanıldı. Birim alan başına adsorbe edilen kütle ($\mu\text{g cm}^{-2}$) değerlendirilirken, kuvars kristalinin salınım frekansındaki (ΔF) değişiklikler ölçüldü. Böylece adsorbe edilen kütle yapısal özellikleri hakkında yeni bilgiler elde edildi. Akış hücresi, içinden sıvının beslendiği bir giriş ve çıkıştan oluşmakta ve QCM elektrot, üst ve alt tarafı arasında yaklaşık 0.3419 cm^2 lik bir alanla etkinleştirilmiştir. Kuvars kristal elektrodun rezonans frekans değişimi, elektrotun üst ve alt yüzeylerinin üst üste binmesi ile elde edildi. Elektrot yüzeyinde biriken kütle literatürde belirtildiği gibi izlendi (Nohut Maslakci vd., 2015). Kristaller, QCM çalışmalarında kullanılmadan önce en az 5 dakika boyunca piranha çözeltisi (3/1 (v/v) oranında $\text{H}_2\text{SO}_4 / \% 30$ 'luk H_2O_2) ile temizlendi, saf su ile durulandı ve son olarak bir azot gaz akışı ile kurutuldu (Channasanon vd., 2007). Bu temizleme işlemi iki kez tekrarlandıktan sonra, QCM elektrotları yerinde elektroçürme tekniği ile kaplandı. Lif kaplı elektrotlar akış hücresine yerleştirildi. 50 cm uzunluğunda ve 1.5 mm iç çapa sahip bir kılcal boru aracılığıyla, Luria-Bertani (LB) suyu (100 mL) akış hücresi içinde, peristaltik bir pompa (Instech, model P720 peristaltik pompa) yardımı ile kapalı bir döngü içinde $63 \mu\text{L dk}^{-1}$ lık bir akış hızında sürekli olarak pompalandı.

Tüm deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. PVA/PCh ve PVA/PCh-E1 nanolif numunelerinin her biri için üç kopya gerçekleştirildi. Çalışmada model organizma olarak seçilen *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu başlatmak için tercih edildi. QCM-biyofilm çalışmalarına başlamadan önce *P. aeruginosa* hücreleri, LB broth'ta 35°C 'de 24 saat kültürlendi. 24 saatin sonunda, *P. aeruginosa* süspansiyonunun optik yoğunluğu (OD_{600}) 0.1'e ayarlandı, bu yaklaşık 2.10^6 – 5.10^6 CFU mL^{-1} 'e karşılık gelmektedir (Nohut Maslakci vd., 2015). Daha sonra optik yoğunluğu 600 nm'de belirlenen *P. aeruginosa* kültürü, 100 ml Luria-Bertani (LB) besi ortamına ilave edildi ve akış hücresi içerisinden geçirildi.

3. Bulgular ve Tartışma

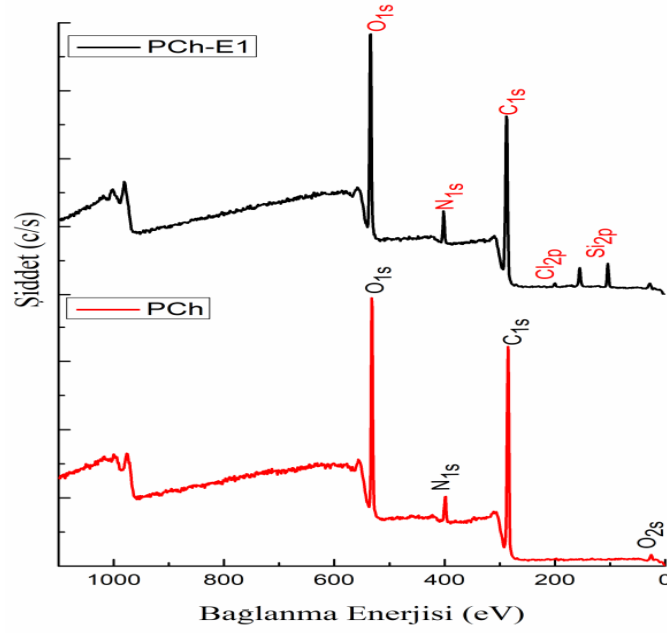
3.1. Modifiye PCh ve PCh-E1 Filmlerinin Karakterizasyonu

PCh, PCh-E1 filmlerinin FTIR spektrumları Şekil 2'de gösterilmektedir. PCh filminin karakteristik bantları, 3434 cm^{-1} 'de -OH, 2943 cm^{-1} 'de -CH, 1666 cm^{-1} 'de karbonil grubunun C=O gerilmesi (amid I), 1598 cm^{-1} 'de -NH deformasyonu, 1424 cm^{-1} 'de -CH₂ gerilme titreşimi, 1382 cm^{-1} 'de metil grubunun C-H gerilmesi, 1260 cm^{-1} 'de birincil amino grubu (-NH₂) ve 1026 cm^{-1} 'de C-O gerilmesine atfedildi (Nohut Maslakci vd., 2018). PCh-E1 filmi için gözlen 3434, 2928, 1636 ve 1169 cm^{-1} 'deki karakteristik pikler sırası ile -OH, -CH, C=O (karbonil grubu (amid I)), CH=N ve C-O gerilme bantlarına aittir. Bu karakteristik bantlar, elde edilen modifiye yapıların hem PCh hem de E1 içerdiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 2. PCh ve PCh-E1 filmlerinin FTIR spektrumları

XPS, C_{1s}, N_{1s} ve O_{1s} hatlarının davranışını gözlemleyerek kimyasal bileşimleri analiz etmek için kullanılmıştır (Şekil 3). PCh filmi için C_{1s} (285 eV), N_{1s} (402 eV) ve O_{1s} (530 eV) sinyalleri görülürken, E1'in bağlanması ile C_{1s}, N_{1s} ve O_{1s} sinyalleri sırasıyla 288, 402 ve 533 eV'de gözlenmiştir. 285 eV'deki C_{1s} zirvesi, PCh'deki C-C ve C-H kimyasal bağlarına atfedilirken, 286 eV'deki C_{1s} zirvesi, PCh-E1'deki C-O veya C-O-C kimyasal bağlarına atfedilmiştir (Nohut Maslakci vd., 2015). Bununla birlikte, PCh-E1 için, safsızlıklardan dolayı 201 eV ve 154-103 eV'de görülen bağlanma enerjilerinin, sırası ile Cl ve Si piklerine ait olduğu gözlenmiştir. C-O (285 eV) kimyasal bağındaki artış, PCh'nin oksijeni C-OH şeklinde yapıya dahil ettiğini göstermiştir (Nohut Maslakci vd., 2015). PCh-E1 filminin karbon atomu konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak, 286 eV'de gözlenen C_{1s} pik yoğunluğunda da bir azalma gözlenmiştir. Ayrıca, PCh-E1 filminin atomik oksijen değeri, E1'den dolayı artmıştır (Tablo 1).



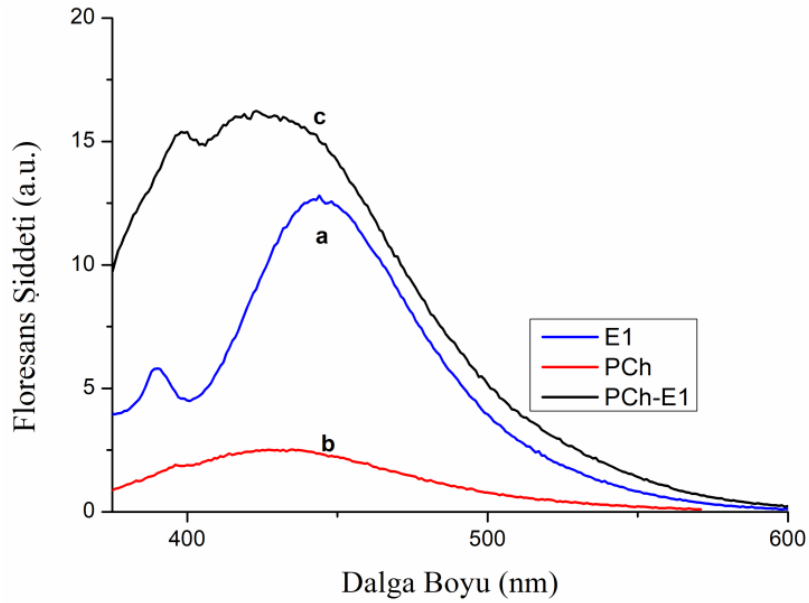
Şekil 3. PCh ve PCh-E1 filmlerinin XPS spektrumları

Tablo 1. PCh ve PCh-E1 filmlerinin atomik değerleri

Örnek	% Atom				
	C _{1s}	O _{1s}	N _{1s}	Si _{2p}	Cl _{2p}
PCh	67.5	27.0	5.4	-	-
PCh-E1	61.4	28.0	5.6	4.7	0.3

350 nm'lik bir uyarma dalga boyunda alınan E1, PCh ve PCh-E1'in fotoluminesans spektrumlarında sırası ile 445, 430 ve 428 nm'de emisyon pikleri gözlenmiştir (Şekil 4)

(Mi, 2005; Kumar vd., 2010). PCh-E1 spektrumu, Şekil 4'te gösterildiği gibi, maksimum emisyonunda kırmızıya kayma göstermiştir. PCh zincirine bağlı E1 bileşiği, modifiye edilmiş PCh-E1'in maksimum emisyon dalga boyunda bir kırmızıya kaymasına neden olabilir. Bununla birlikte, emisyon dalga boyu, ikame edici yan grupların elektronik konjuge yapılarından önemli ölçüde etkilenir (Nohut Maslakci vd., 2015; Nohut Maslakci vd., 2018). Ayrıca, elektronik etkiye bağlı olarak dalga boyundaki değişiklikler kırmızıya kaymaya neden olabilir (Nohut Maslakci vd., 2015; Nohut Maslakci vd., 2018).

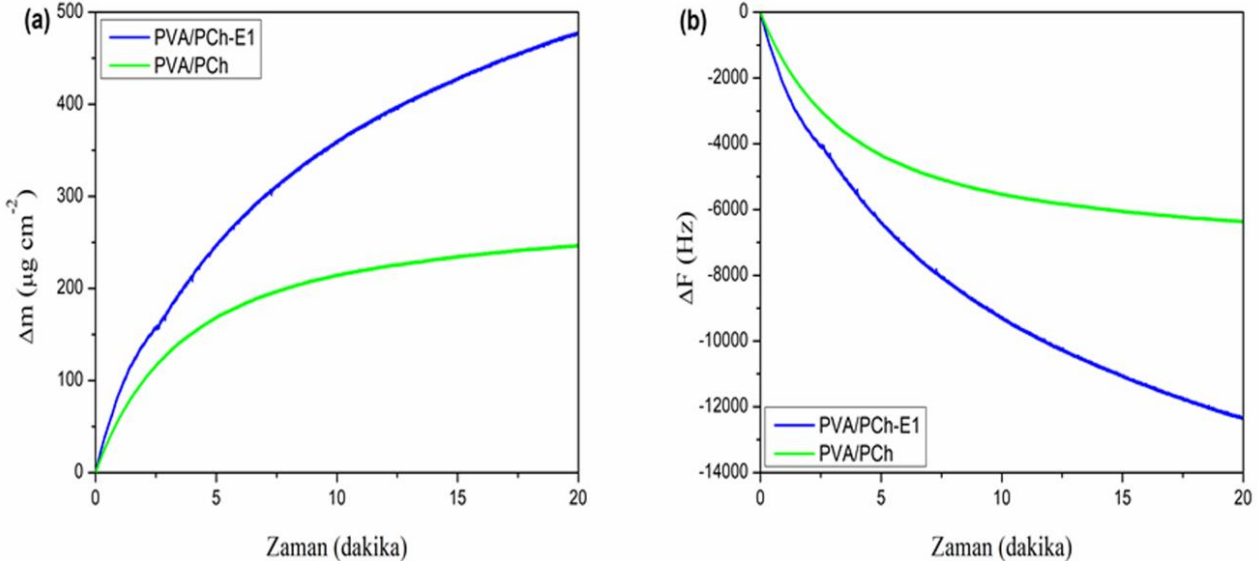


Şekil 4. 350 nm'lik bir uyarma dalga boyunda (a) E1, (b) PCh ve (c) PCh-E1'in PL spektrumları

3.2. PVA/PCh ve PVA/PCh-E1 Nanoliflerinin QCM Ölçümleri

QCM elektrot yüzeyinde toplanan PVA/PCh ve PVA/PCh-E1 nanoliflerin Δm ve ΔF değerleri, zamanın bir fonksiyonu olarak QCM tekniği ile belirlenmiştir (Şekil 5a-b). PVA/PCh-E1 nanoliflerinin QCM ölçümlerinin, PVA/PCh nanoliflere göre nispeten daha yüksek bir frekans kaymasına sahip olduğu gözlemlendi. Elektroğürme işlemine 20 dakika devam edildi. Tablo 2'de verilen verilere dayanarak, QCM elektrot yüzeyinde 20 dakika süreyle

biriken lifler daha sonra biyofilm çalışmaları için kullanıldı. Kütle değişimi, elektrot yüzeyinde biriken liflerin tipine ve liflerde bulunan yapıların moleküler ağırlığına bağlı olarak değişti. 20 dakika boyunca, PVA/PCh-E1 nanoliflerin kütesinin ($477.1 \mu\text{g cm}^{-2}$), PVA/PCh nanoliflerin kütesine ($246.3 \mu\text{g cm}^{-2}$) kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 5a ve Tablo 2). Nanolifler yüksek bir spesifik yüzey alanına ve gözenekliliğe sahip olabilmektedir. Bu durum, daha fazla bakterinin yapışması için geniş bir bağlantı alanı sağlayarak daha yüksek bir hassasiyet sağlamaktadır (Wang vd., 2010).



Şekil 5. PVA/PCh ve PVA/PCh-E1 nanoliflerin QCM elektrot yüzeylerinde oluşumu sırasında zamanın bir fonksiyonu olarak kütle (a) ve frekans (b) değişimi

Tablo 2. QCM elektrot yüzeyinde bırakılan nanoliflerin zamanın bir fonksiyonu olarak kütle ve frekanstaki değişikliklerin ölçülmesi

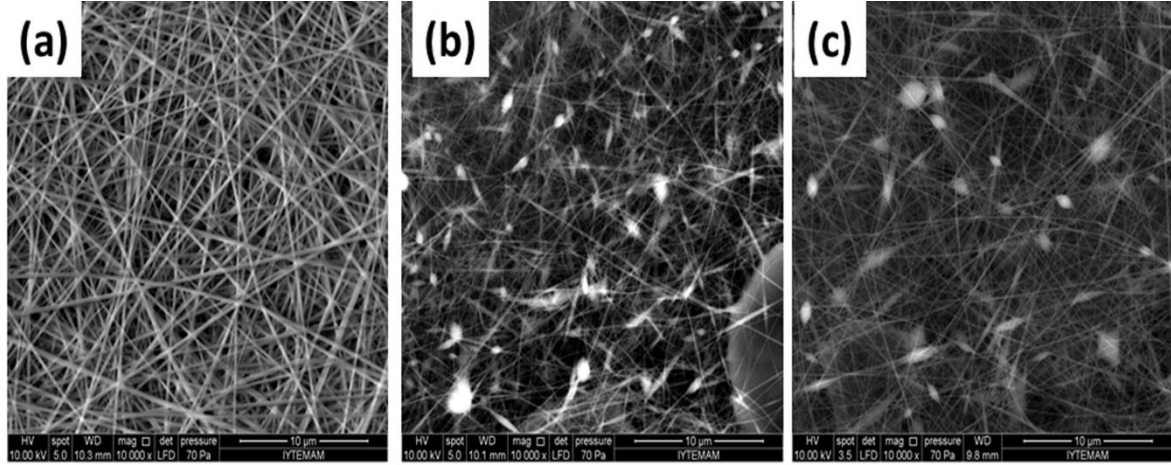
Örnek	ΔF (Hz)	Δm ($\mu\text{g cm}^{-2}$)
PVA/PCh nanolifler	-6365.4	246.3
PVA/PCh-E1 nanolifler	-12346.7	477.1

3.3. SEM Sonuçları

Saf PVA, PVA/PCh ve PVA/PCh-E1 nanoliflerinin aynı elektroğürme parametrelerinde elde edilen SEM görüntüleri Şekil 6'da gösterilmektedir.

PVA, PCh çözeltisinin nispeten zayıf eğrilebilirliği ve reolojik özelliklerinden dolayı PCh'nin nanoliflerini elde edebilmek için destek polimer olarak seçilmiştir (Zhou vd., 2006; Nohut Maslakci vd., 2015). PVA'nın kitosan karışımına dahil edilmesi, PCh'nin işlenebilirliğinde bir artışa, gerilme mukavemetinde bir azalmaya, nem içeriğinde bir artışa ve karışımdaki PCh ağındaki kristallikte

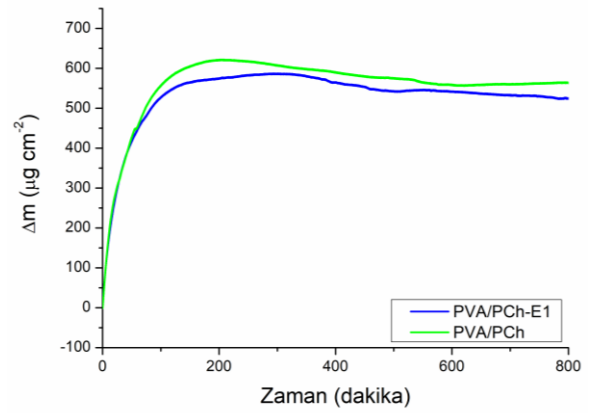
bir azalmaya neden olmuştur (Zhou vd., 2006; Nohut Maslakci vd., 2015). Bu şekilde, homojen çözeltideki PCh içeriği ile daha ince liflerin üretildiği gözlemlendi. Ancak lifler daha kırılğan hale geldi (Gholipour vd., 2009). Nanolifler üretilmiş olmasına rağmen, PCh ve PCh-E1 çözeltilerinin yüksek viskoziteleri nedeniyle lif yüzeylerinde boncuk oluşumu gözlemlenmiştir (Gholipour vd., 2009). Bununla birlikte, Şekil 6b ve c'de görüldüğü gibi, PVA/PCh-E1 nanolifleri, PVA/PCh nanoliflerinden daha az boncuk oluşumuna ve daha ince lif yapılarına sahiptir. Geliştirilen kitosan nanolifleri, homojenlik, gözeneklilik ve kalınlık gibi çeşitli özellikler elde etmek için E1 bileşiği ile daha da modifiye edilebilir. PVA, PVA/PCh ve PVA/PCh-E1'in ortalama lif çapları ve standart sapmaları sırasıyla 280.0 ± 58.9 , 104.5 ± 35.9 ve 99.4 ± 21.9 nm olarak belirlendi. Önceki çalışmalarda, mikro boyutlu liflerin, lif haritalarına hücre girişine izin verdiği görülürken, daha küçük lif çaplarına sahip lif haritalarının ise yalnızca lif yüzeyinde hücrelerin çoğalmasına izin verdiği gözlemlenmiştir (Eichhorn ve Sampson, 2010; Matsumoto ve Tanioka, 2011; Kargar vd., 2012; Mortimer vd., 2016). Sonuç olarak, bu çalışma PVA/PCh-E1 bazlı nanoliflerin daha ince çaplı olduğunu ve bakteriyel inhibisyonunda daha etkili olduğunu göstermiştir. Bu durum, PVA/PCh-E1 nanoliflerinin sahip olduğu yüksek yüzey alanına atfedilebilir.



Şekil 6. PVA (a), PVA/PCh (b) ve PVA/PCh-E1 (c) nanoliflerinin SEM görüntüleri

3.4. QCM-Biyofilm Çalışmaları

Kuvars kristal mikroterazi (QCM), hücre yüzeyi etkileşimlerini değerlendirmek için bir piezoelektrik kuvars sensörüne bağlanan bir kütlenin frekansındaki değişikliklerin gerçek zamanlı izlenmesini sağlar (Marcus vd., 2012; Nohut Maslakci vd., 2018). *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumu, sabit bir bakteri ortamında PVA/PCh ve PVA/PCh-E1 nanolifleri ile kaplanmış QCM elektrot yüzeyleri için değerlendirildi (Şekil 7). 800 dakikadaki negatif frekans kaymaları, Sauerbrey denklemini takiben bir yüzeye bakteri kütesinin eklenmesi ile ilişkilendirilmiştir. QCM elektrodu üzerindeki negatif frekans kaymaları, elektrot yüzeyine yapışan bakteri kütesinde bir artışa karşılık gelmektedir. *P. aeruginosa* kültürü akış hücresinden geçirilirken, lif kaplı QCM elektrot yüzeylerinde 800 dakika boyunca kütle ve frekans değişiklikleri belirlendi. ΔF , elektrot yüzeyindeki kütle artmasıyla azaldı. PVA/PCh nanoliflerle kaplanmış QCM elektrotunda maksimum negatif frekans kayması (ΔF : -14552.7 Hz, Δm : $563.5 \mu\text{g cm}^{-2}$) gözlemlendi. PVA/PCh-E1 nanolifler ile kaplanmış QCM elektrodu kullanıldığında, PVA/PCh ile kaplanmış QCM elektroduna kıyasla daha az negatif frekans kayması ve kütle artışı (ΔF : -13709.5 Hz, Δm : $530.3 \mu\text{g cm}^{-2}$) gözlemlendi. PVA/PCh ve PVA/PCh-E1 nanolifler ile kaplanmış elektrot yüzeylerine 800 dakika boyunca yapışan *P. aeruginosa*'nın ortalama kütleleri ve standart sapmaları sırasıyla 515.8 ± 47.6 ve $527.3 \pm 3.0 \mu\text{g cm}^{-2}$ olarak belirlendi (Şekil 7). Elde edilen sonuçlar önceki çalışmalarla tutarlı olup, PVA/PCh-E1 nanolifleri ile kaplanmış QCM elektrodu, tercih edilen bir biyofilm oluşumu sergiledi. QCM-biyofilm deneyleri, PVA/PCh-E1 nanoliflerle kaplanmış QCM elektrodunun, PVA/PCh nanoliflerle kaplı QCM elektrotuna kıyasla *P. aeruginosa* hücrelerini önemli ölçüde engellediğini gösterdi.



Şekil 7. PVA/PCh ve PVA/PCh-E1 nanoliflerle kaplanmış elektrot yüzeylerinde *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumu sırasındaki zamana karşı kütle değişimi

4. Sonuç

Bu çalışmada PCh, *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumuna karşı biyolojik aktivitesini geliştirmek için E1 ile kimyasal olarak modifiye edildi. XPS, PL ve FTIR analizleri ile E1'in kimyasal reaksiyonlarla PCh film yüzeyine başarıyla modifiye edildiğini doğruladı. PVA/PCh ve PVA/PCh-E1 nanolifleri, yerinde elektroçizme-QCM tekniği ile QCM elektrot yüzeylerine homojen bir şekilde biriktirildi. Nanolifler ile kaplı elektrotların biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi QCM ile incelendi. PVA/PCh-E1 nanolifler ile kaplanmış QCM elektrodun ortalama kütle ve standart sapmasının (Δm : $527.3 \pm 3.0 \mu\text{g cm}^{-2}$), PVA/PCh nanolifler ile kaplı QCM elektrodunkinden (Δm : $515.8 \pm 47.6 \mu\text{g cm}^{-2}$) daha düşük olduğu belirlendi. Bu durum PVA/PCh-E1 nanoliflerinin biyofilm oluşumunu daha iyi engellediğini gösterdi. Sonuç olarak, PVA/PCh-E1 nanoliflerle kaplanmış QCM elektrot yüzeyi, PCh nanoliflerden daha iyi bir performans sergilemiştir. Elde edilen PVA/PCh-E1 nanolifler, biyomedikal uygulamalar için potansiyel adaylar olarak düşünülebilir.

KAYNAKLAR

- Abrigo, M., Kingshott, P., McArthur, S.L. (2015). Electrospun polystyrene fiber diameter influencing bacterial attachment, proliferation, and growth. *Applied Materials & Interfaces*, 7, 7644-7652.
- Abu-Hashem, A.A., Hussein, H.A.R., Aly, A.S., Gouda, M.A. (2014). Synthesis of benzofuran derivatives via different methods. *Synthetic Communications*, 44, 2285-2312.
- Asri, M., Elabed, S., Koraichi, S.I., Ghachtoul N.E. (2018). Biofilm-based systems for industrial wastewater treatment. Hussain, C.M. (ed.), *Handbook of Environmental Materials Management*, Springer, Cham., 1-21pp, https://doi.org/10.1007/978-3-319-73645-7_137.
- Baumann, A.R., Martin, S.E., Feng, H. (2009). Removal of listeria monocytogenes biofilms from stainless steel by use of ultrasound and ozone. *Journal of Food Protection*, 72(6), 1306–1309.
- Bazaka, K., Jacob, M.V., Crawford, R.J., Ivanova, E.P. (2012). Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95, 299–311.
- Channasanon, S., Graisuwan, W., Kiatkamjornwong, S., Hoven, V.P. (2007). Alternating bioactivity of multilayer thin films assembled from charged derivatives of chitosan. *Journal of Colloid and Interface Science*, 316, 331.
- Charernsriwilaiwat, N., Opanasopit, P., Rojanarata, T., Ngawhirunpat, T., Supaphol, P. (2010). Preparation and characterization of chitosan-hydroxybenzotriazole/polyvinyl alcohol blend nanofibers by the electrospinning technique. *Carbohydrate Polymers*, 81, 675-680.
- Dalvie, D.K., Kalgutkar, A.S., Khojasteh-Bakht, C.S., Scott Obach, R., O'Donnell, P.O. (2002). Biotransformation reactions of five-membered aromatic heterocyclic rings. *Chemical Research in Toxicology*, 15, 269-299.
- Eichhorn, S. J., Sampson, W.W. (2010). Relationships between specific surface area and pore size in electrospun polymer fibre networks. *Journal of The Royal Society Interface*, 7, 641-649.
- Gholipour, K.A., Bahrami, S.H., Nouri, M. (2009). Chitosan-poly(vinyl alcohol) blend nanofibers: Morphology, biological and antimicrobial properties. *e-Polymers*, 9(1),1-12.
- Goncales, C.E.P., Araldi, D., Panatieri, R.B., Rocha, J.B.T., Zeni, G., Nogueira, C.W. (2005). Antinociceptive properties of acetylenic thiophene and furan derivatives: Evidence for the mechanism of action, *Life Sciences* 76, 2221–2234.
- Gottesdiener, K., Mehlich, D.R., Huntington, M., Yuan, W.Y., Brown, P., Gertz, B., Mills, S., 1999. Efficacy and tolerability of the specific cyclooxygenase-2 inhibitor DFP compared with naproxen sodium in patients with postoperative dental pain, *Clinical Therapy*, 21, 1301–1312.
- Gülgör, G., Korukluoğlu, M. (2014). Mikroorganizmalar arasında çoğunluk algılanması (Quorum Sensing). *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(2), 83-92.
- Hoven, V. P., Tangpasuthadol, V., Angkitpaiboon, Y., Vallapa, N., Kiatkamjornwong, S. (2007). Surface-charged chitosan: Preparation and protein adsorption. *Carbohydrate Polymers*, 68, 44-53.
- Iyengar, S., Arnason, J.T., Philogene, B.J.R., Murand, P., Werstink, N.H., Timmins, G., (1987). Toxicokinetics of the phototoxic allelochemical α -terthienyl in three herbivorous lepidoptera. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 29, 1–9.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., Kamil, M.A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81, 7-11.
- Kargar, M., Wang, J., Nain, A. S., Behkam, B. (2012). Controlling bacterial adhesion to surfaces using topographical cues: a study of the interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with nanofiber-textured surfaces. *Soft Matter*, 8, 10254-10259.
- Kim, B.J., Cheong, H., Choi, E.S., Yun, S.H., Choi, B.H., Park, K.S., Kim, I.S., Park, D.H., Cha, H.J. (2017). Accelerated skin wound healing using electrospun nanofibrous mats blended with mussel adhesive protein and polycaprolactone. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 105, 218-225.
- Khodarahmi, G., Asadi, P., Hassanzadeh, F., Khodarahmi, E. (2015). Benzofuran as a promising scaffold for the synthesis of antimicrobial and antibreast cancer agents: A review. *Journal of Research in Medical Sciences*, 20(11), 1094–1104.
- Klossner, R.R., Queen, H.A., Coughlin, A.J., Krause, W.E. (2008). Correlation of chitosan's rheological properties and its ability to electrospun. *Biomacromolecules*, 9, 2947-2953.
- Kossakowski, J., Krawiecka, M., Kuran, B., Stefańska, J., Wolska, I. (2010). Synthesis and preliminary evaluation of the antimicrobial activity of selected 3-benzofurancarboxylic acid derivatives. *Molecules*, 15, 4737-4749.
- Kumar, S., Nigam, N., Ghosh, T., Dutta, P.K., Yadav, R.S., Pandey, A.C. (2010). Preparation, characterization, and optical properties of a chitosan-anthraldehyde crosslinkable film. *Journal of Applied Polymer Science*, 2010, 115, 3056-3062.
- Lonn, S.J., Naemi, A., Benneche, T., Scheie, A.A. (2012). Thiophenones inhibit *Staphylococcus epidermidis*

- biofilm formation at non-toxic concentrations, *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 65, 326–334.
- Lopez, F., Jett, M., Muchowski J.M., Nitzan D., O'Yang C., (2002). Synthesis and biological evaluation of keterolac analogs. *Heterocycles*, 56, 91-95.
- Malmström, J., Jonsson, M., Cotgreave, I.A., Hammarström, L., Sjödin, M., Engman, L. (2001). The antioxidant profile of 2,3-dihydrobenzo[b]furan-5-ol and its 1-thio, 1-seleno and 1-telluro analogues. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 3434-3440.
- Marcus, I.M., Herzberg, M., Walker, S.L., Freger, V. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* attachment on QCM-D sensors: The role of cell and surface hydrophobicities. *Langmuir*, 28, 6396-6402.
- Matsumoto, H., Tanioka, A. (2011). Functionality in electrospun nanofibrous membranes based on fiber's size, surface area, and molecular orientation. *Membranes*, 1(3), 249-264.
- Matsuura, H., Saxena, G., Farmer, S.W., Hancock, R.E.W., Towers, G.H.N. (1996). Antibacterial and antifungal polvine compounds from *Glehnia littoralis* ssp. *leiocarpa*. *Planta Medica*, 62, 256–259.
- Meotti, F.C., Silva, D.O., Santos, A.R.S., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W. (2003). Thiophenes and furans derivatives: a new class of potential pharmacological agents. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 15, 37-44.
- Mi, F.L. (2005). Synthesis and characterization of a novel chitosangelatin bioconjugate with fluorescence emission. *Biomacromolecules*, 6, 975-987.
- Mortimer, C.J., Burke, L., Wright, C.J. (2016). Microbial interactions with nanostructures and their importance for the development of electrospun nanofibrous materials used in regenerative medicine and filtration. *Journal of Microbial Biochemical Technology*, 8, 195-201.
- Nohut Maslakci, N., Akalin, R.B., Ulusoy, S., Oksuz, L., Uygun Oksuz, A. (2015). Electrospun fibers of chemically modified chitosan for in situ investigation of the effect on biofilm formation with quartz crystal microbalance method. *Industrial Engineering Chemistry Research*, 54, 8010–8018.
- Nohut Maslakci, N., Ulusoy, S., Uygun Oksuz, A. (2017). Investigation of the effects of plasma-treated chitosan electrospun fibers onto biofilm formation. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 246, 887-895.
- Nohut Maslakci, N., Ulusoy, S., Uygun Oksuz, A. (2018). Investigation of the effects of chemically grafted chitosan nanofibers on *P. aeruginosa* PA01 biofilm formation using quartz crystal microbalance technique. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 669(1), 76-93.
- Nune, V., Sharon, L.W., Osnat, G., Moshe, H. (2010). Reduced bacterial deposition and attachment by quorum-sensing inhibitor 4-nitro-pyridine-N-oxide: The role of physicochemical effects, *Langmuir*, 26, 12089-12094.
- Ohkawa, K., Minato, K.I., Kumagai, G., Hayashi, S., Yamamoto, H. (2006). Chitosan nanofiber. *Biomacromolecules*, 7, 3291-3294.
- Pillai, C.K.S. Sharma, C.P. (2009). Electrospinning of chitin and chitosan nanofibres, *Trends in Biomaterials Artificial Organs*, 22, 179-201.
- Sauerbrey, G. (1959). Verwendung von Schwingquarzen zur Wagung dünner Schichten und zur Mikrowagung. *Zeitschrift für Physik*, 155, 206-222.
- Shi, X., Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 407-413.
- Sun, K., Li, Z.H. (2011). Preparations, properties and applications of chitosan based nanofibers fabricated by electrospinning, *Express Polymer Letters*, 5, 342–361.
- Tirola, M., Lahtinen, T., Vuento, M., Oker-Blom, C. (2009). Early succession of bacterial biofilms in paper machines. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 929–937.
- Uygun, A., Kiristi, M., Oksuz, L., Manolache, S., Ulusoy, S. (2011). RF hydrazine plasma modification of chitosan for antibacterial activity and nanofiber applications, *Carbohydrate Research*, 346, 259-265.
- Veerachamy, S., Yarlagadda, T., Manivasagam, G., Yarlagadda, P.K.D.V. (2014). Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H Journal of Engineering in Medicine*, 228(10), 1083-1099.
- Wang, X., Ding, B., Sun, M., Yu, J., Sun, G. (2010). Nanofibrous polyethyleneimine membranes as sensitive coatings for quartz crystal microbalance-based formaldehyde sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 144, 11-17.
- Zeni, G., Lüdtke, D.S., Nogueira, C.W., Panatieri, R.B., Braga, A.L., Silveira, C.C., Stefani, H.A., Rocha, J.B.T., (2001). New acetylenic furan derivatives: synthesis and anti-inflammatory activity. *Tetrahedron Letters*, 42, 8927-8930.
- Zhou, Y., Yang, D., Nie, J. (2006). Electrospinning of chitosan/poly(vinyl alcohol)/acrylic acid aqueous solutions. *Journal of Applied Polymer Science*, 102, 5692-5697.
- Zou, A., Huo, M., Zhang, Y., Zhou, J., Yin, X., Yao, C., Zhu, Q., Zhang, M., Ren J., Zhang, Q. (2012). Octreotide-modified N-octyl-O, N-carboxymethyl chitosan micelles as potential carriers for targeted antitumor drug delivery, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101, 627-640.