

Gümüş Nitrat Katkılı Modifiye Nanofiber Membranların Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Antibakteriyel Özellikleri

Burcu ÖZCAN¹, Esengül KIR¹, Nalan ÇİÇEK BEZİR, Tuğba SARDOHAN KÖSEOĞLU^{3*}, İsmail ÖZMEN¹, Atilla EVCİN⁴

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Isparta.

² Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, Isparta.

³ Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Isparta.

⁴ Afyon Kocatepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü, Afyonkarahisar.

*Sorumlu yazar e-posta: tugbakoseoglu@isparta.edu.tr

burcuozcn88@gmail.com

esengulkir@sdu.edu.tr

nalancicek@sdu.edu.tr

ismailozmen@sdu.edu.tr

evcin@aku.edu.tr

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0707-9191>

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0267-1353>

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6641-3444>

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5708-1521>

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5457-8188>

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0163-5097>

Geliş Tarihi: 02.02.2021

Kabul Tarihi: 23.02.2022

Öz

Son yıllarda, fonksiyonelleştirilmiş, elektro lif çekimi yöntemi ile hazırlanmış nanofiber membranlar ile antibakteriyel malzeme üretimi oldukça dikkat çekmektedir. Modifiye edilmiş nanofiber membranların üretiminde polimerik materyaller ile nanopartiküllerin kombinasyonu gerçekleştirilmektedir. Ag, Cu, Ce, ZnO ve TiO₂ gibi birçok nanopartikülün kullanımı artmış ve antibakteriyel aktiviteleri üzerine çalışmaları hız kazanmıştır. Bu nedenle, bu çalışmada, elektro lif çekimi tekniği kullanılarak poliviniliden florür (PVDF) destek tabakası üzerine gümüş nitrat ilavesi ile modifiye nanofiber membranlar hazırlanmıştır. Kitosan (CS), polivinil alkol (PVA), polivinil prolidon (PVP) ve TiO₂ gibi kimyasallar bu membranların hazırlanmasında kullanılmıştır. Modifiye nanofiber membranların karakterizasyonu ise taramalı elektron mikroskobu (SEM), enerji dağılım X-ışınları spektroskopisi (EDS) ve atomik güç mikroskobu (AFM) teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon teknikleri, hazırlanan nanofiber membranların nano yapıda olduklarını kanıtlamıştır. Farklı miktarlarda AgNO₃ içeren modifiye nanofiber membranların antibakteriyel özellikleri, seçilen *E. coli* (25922), *S. aureus* (ATCC 25923, ATCC 6538) ve *P. aeruginosa* (ATCC 35032) bakterilerine karşı iki farklı metot kullanılarak (Agar disk difüzyon ve yayma plak) test edilmiştir. Sonuç olarak, modifiye nanofiber membranların antibakteriyel aktiviteleri, gümüş iyonlarının ilavesi ile tüm bakterilere karşı artmıştır.

Anahtar kelimeler

Antibakteriyel;
Karakterizasyon;
Membran; Nanofiber

Preparation, Characterization and Antibacterial Properties of Silver Nitrate Doped Modified Nanofiber Membranes

Abstract

In recent years, production of antibacterial material using functionalized nanofiber membranes prepared by electro-spinning method has attracted much attention. In the production of modified nanofiber membranes, the combination of polymeric materials with nanoparticles has been performed. The use of many nanoparticles such as Ag, Cu, Ce, ZnO and TiO₂ has increased and studies on their antibacterial activities have accelerated. Therefore, in this study, modified nanofiber membranes were prepared by adding silver nitrate on the polyvinylidene fluoride (PVDF) support layer using electrospinning technique. Chitosan (CS), poly(vinyl alcohol) (PVA), polyvinyl prolidone (PVP) and TiO₂ were used to prepare these membranes. Characterization of the modified nanofiber membranes was also performed by using scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS), and atomic force microscopy (AFM) techniques. The characterization techniques have proven that the prepared nanofiber membranes are nano-structured. The antibacterial properties of modified nanofiber membranes containing different amounts of AgNO₃ were tested against selected *E. coli* (25922), *S. aureus* (ATCC 25923, ATCC 6538) and *P. aeruginosa* (ATCC 35032) bacteria by using two different methods (Agar disc diffusion and Baird Parker agar plate). As a result, the antibacterial

Keywords

Antibacterial;
Characterization;
Membrane; Nanofiber

1. Giriş

Son zamanlarda, membrana dayalı teknolojiler, yüksek ayırma verimleri, nispeten düşük maliyetler ve işlem kolaylığı nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Membran sistemlerinden biri olan polimerik nanofiberler, düşük ağırlık, yüksek yüzey alanı, yüksek hava ve su geçirgenliği ve gözenekli yapısı nedeni ile etkili membran malzemeleri olarak kullanılmaktadır. Polimerik nanofiberler, elektro lif çekimi yöntemi, çok bileşenli eğirme, erime-üfleme, flaş eğirme, şablon sentezi, kendi halinde oluşma ve nanolitografi gibi birçok proses ile üretilebilmektedir. Bu teknikler arasında yer alan, elektro lif çekimi yöntemi, çok sayıdaki polimerik materyallerden daha pürüzsüz nanofiberleri üretmek için kullanılan çok yönlü bir tekniktir. Elektro lif çekimi yöntemi, nanometrik çaplara sahip nanofiberlerin üretiminde kullanılan basit, etkili ve yaygın bir yöntem olarak bilinmektedir (Gao *et al.* 2014). Nanofiberler sürekli olarak polimer çözeltisi üzerinde oluşturulan bir dış elektrik alan yardımı ile üretilebilmektedir. Elektro lif çekimi yöntemi, yüksek voltajın oluşturduğu elektriksel alan ile yüklenen polimer çözeltisinin, topraklanmış ya da zıt kutup ile yüklenmiş yüzey (toplayıcı) üzerinde dağınık bir şekilde nanofiber oluşturulması esasına dayanan en yeni ve en etkin nanofiber üretim tekniğidir. Bu yöntemle pek çok polimerden 3 ile 1000 nm arasında çaplara sahip nanofiberlerin elde edilmesi mümkündür. Hızla gelişen bu teknik ile elde edilen fiberlerin özelliklerinin iyileştirilmesi için birçok modifikasyon yapılabilmektedir. Elektro lif üretim işlemi 1600'lü yıllarda William Gilbert'in elektro-manyetizmanın sıvılar üzerine etkisini gözlemlemesiyle ortaya çıkmıştır. Bu gözlem elektro püskürtme ve elektro üretim işlemlerinin başlangıcı sayılmaktadır (Tucker *et al.* 2012, Baştürk 2012).

Nanofiberler, geniş serbest yüzey alanları, çoklu yüzey modifikasyonları ve üstün mekanik özellikler gibi kendilerine özgü fizikokimyasal özellikleri

nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmektedirler. Nanofiberler, biyosensör (Kwoun *et al.* 2001), elektronik ve biyomedikal aletler (Zhang *et al.* 2005), doku mühendisliği (Laurencin *et al.* 1999), implant malzemeler (Fujihara *et al.* 2003), yara bandı (Zhang *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2010) ve medikal tekstil materyallerini (Ignatova *et al.* 2013) içeren birçok tıp uygulamasında (Huang *et al.* 2003, Teo and Ramakrishna 2006, Burger *et al.* 2006, Lu and Ding 2008) sıklıkla kullanılmaktadır. Elektro lif çekimi yöntemi ile üretilen nanofiberler ile yüzeyleri daha işlevsel olan nanofiber membranlar hazırlanabilmektedir (Zeytuncu 2014).

Nanofiber membranlara, nanopartiküllerin eklenmesi ile membranların yüzey özellikleri iyileşmekte, membranların kirlenme kapasiteleri azalmakta ve antimikrobiyal yetenekleri artmaktadır. Çalışmamızda, elektro lif çekimi tekniği kullanılarak poliviniliden florür (PVDF) destek tabakası üzerine gümüş nitrat ilavesi ile birlikte kitosan (CS), polivinil alkol (PVA), Polivinil prolidon (PVP) ve titanyum dioksit (TiO₂) kullanılarak modifiye nanofiber membranlar hazırlanmıştır.

Gümüş nanopartiküller (AgNPs), diğer nanomateriyallere göre insan hücrelerine gösterdiği düşük toksisite ve mükemmel antibakteriyel özellikleri nedeniyle biyomedikal ve klinik alanlarda geniş bir uygulama alanı bulmaktadır (Fabrega *et al.* 2009, Liang *et al.* 2016). Gümüş, çok eski tarihlerden bu yana yaraların ve yanıkların tedavisinde de kullanılmıştır. Bu nedenle, gümüş nanopartiküllerin bir membranın seçici tabakasına tutturularak ya da membran yüzeyine aşılansarak yapılan birçok çalışma rapor edilmiştir (Yuan *et al.* 2010, Hong and Jeong 2011, Mahapatra *et al.* 2012, Tian *et al.* 2013, Abdelgawad *et al.* 2014).

PVA, çeşitli kompozit membranların hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. PVA, yüksek kimyasal dirence, iyi mekanik

özelliklere, OH gruplarına ve hidrojen bağı oluşturma yeteneğine sahip olan yarı kristalli ve suda çözünebilen sentetik bir polimerdir (Ohkawa *et al.* 2004, Jia *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2007).

Kitin, tabiatta yaygın olan en önemli doğal polimerlerden biridir. Başlıca kaynakları ise deniz kabukları, karides ve yengeçlerdir. CS, kitinin deasetilasyonu ile elde edilmektedir. CS, biyoyumlu, antibakteriyel, antifungal özeliğe olması ve toksik özellik göstermemesi sebebiyle medikal uygulamalarda çok kullanılan doğal bir polimerdir. CS, çeşitli bakteri ve mantarlara karşı antibakteriyel aktivite göstermektedir. CS'ın antibakteriyel etkisinin esas nedeni moleküler ağırlığı ve konsantrasyonudur. Günümüzde, CS nanofiberleri kapsamlı bir şekilde araştırılmakta ve elektro lif çekimi yöntemi ile CS içeren çeşitli nanofiber ürünleri sentezlenmiştir (Lim and Hudson 2003, Rinaudo 2006, Pokhrel *et al.* 2015).

CS ve gümüşün tek başlarına sahip oldukları antibakteriyel özelliğin kompozit oluşturduktan sonra daha da artması söz konusudur (Hang *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2012). Nitekim, Adipzadeh vd. (2014)' de yaptıkları çalışmada, 70/30 oranında CS/PVA homojen karışımına AgNO₃ eklemişler ve bu karışımı homojen olana kadar karıştırdıktan sonra elektro lif çekimi yöntemiyle nanofiberler üretmişlerdir. Üretilen bu nanofiberlerin yapıları ve özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile ve kimyasal yapısında gümüş nanopartikül oluşumu ise Fourier Transform Infrared (FTIR) spektroskopi ile incelenmiştir. CS/PVA nanofiberlerinin antibakteriyel özellikleri, antibakteriyel test yöntemleri kullanılarak *Escherichia coli* içeren fosfat tampon çözeltisi içinde incelenmiştir. Antibakteriyel test sonuçları, AgNO₃ eklenmesi ile CS/PVA nanofiberlerinin antibakteriyel filtrasyon verimliliğinin önemli ölçüde arttığını göstermiştir (Adibzadeh *et al.* 2014).

Beypınar (2014), yapmış olduğu çalışmada, elektro lif çekimi yöntemiyle, PVA sulu çözeltisinden nanofiber membranlar hazırlamıştır. Değişik miktarlarda akrilli polietilenimin (PEI) içeren çözeltiler PVA çözeltisiyle karıştırılmıştır. UV ve elektro lif çekimi yönteminin eş zamanlı

kullanılmasıyla çapraz bağlı akrilli PEI esaslı nanofiberler elde edilmiştir. Nanofiberlerin kimyasal yapıları FTIR ile karakterize edilmiştir. Nanofiberlerin termal özellikleri de termogravimetrik analiz (TGA) ve diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ile incelenmiştir. Nanofiberlerin yüzey morfolojileri ve ortalama fiber çapları ise SEM ile aydınlatılmıştır (Beypınar 2014).

Yapılan literatür taraması sonucunda özellikle elektro lif çekimi yöntemi kullanılarak CS ve Ag ilaveli nanofiber membran çalışmalarına rastlanılmıştır. Bu çalışmada ise, mevcut çalışmalardan farklı ve onlara ilave olarak, elektro lif çekimi yöntemi kullanılarak PVDF destek tabakası üzerine gümüş nitrat ilavesi ve CS, PVA, TiO₂, PVP gibi kimyasalların kullanımı ile modifiye nanofiber membranlar hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Hazırlanan modifiye nanofiber membranların antibakteriyel özellikleri de *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ve *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) bakterilerine karşı test edilmiştir. *E. coli* ve *P. aeruginosa*, gram negatif bakteri grubuna girmektedir. *E. coli*, birçok omurgalı canlının ince ve kalın bağırsağında yaşamaktadır. Bağırsakta yaşadığı için, *E. coli* 'nin çevresel sularda varlığı dışkı kirlenmesinin bir belirtisidir. *E. coli*, sindirim sistemi, üriner sistem enfeksiyonları gibi rahatsızlıklara sebep olabilmektedir (Omerovic *et al.* 2017). *P. aeruginosa* ise yaygın olarak toprak ve suda bulunmaktadır. Nemli ortamlarda kolaylıkla çoğalabilmektedir. İmmun sistemi zayıf olan konakçılarda yaygın olarak enfeksiyonlara sebep olabilmektedir. Kronik akciğer enfeksiyonu başta olmak üzere pek çok enfeksiyonun ortaya çıkmasına sebep olduğu görülmektedir (Sırıken ve Öz 2017). *S. aureus* gram pozitif bakteri grubuna girmektedir. *S. aureus* doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Burun ve boğaz boşluğunda, insan ve hayvan dışkısında, apseleri yaralarda bulunabilmektedir. Bulaşıcılığı daha çok insan kaynaklı olarak görülmektedir. *S. aureus*, pnömoni, eklem enfeksiyonları, endokardit, apse/çıban ve diğer cilt enfeksiyonları gibi birçok rahatsızlığa sebep olabildiği bilinmektedir (Gülbandılar 2009).

2. Materyal ve Metod

2.1 Kullanılan kimyasal maddeler

Deneyleerde kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 1.'de verilmiştir. Tüm kimyasal maddeler Merck, Carlo Erba ve Fluka firmalarından temin edilmiş ve analitik saflıktadır.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve formülleri

Kimyasal Madde	Formülü
Polivinil alkol (PVA)	(C ₂ H ₄ O) _n
Kitosan (CS)	C ₅₆ H ₁₀₃ N ₉ O ₃₉
Gümüş nitrat	AgNO ₃
Polivinil prolidon (PVP)	(C ₆ H ₉ NO) _n
Titanyum dioksit	TiO ₂
Asetik asit	CH ₃ COOH
Dimetil formamid (DMF)	C ₃ H ₇ NO
Dietanolamin	C ₄ H ₁₁ NO ₂
Polietilen glikol (PEG)	HO(C ₂ H ₄ O) _n H
Hidroklorik asit	HCl
Tetra-n-butil ortotitanat	C ₁₆ H ₃₆ O ₄ Ti
Etanol	C ₂ H ₅ OH

Membranların hazırlanmasında kullanılan membran destek tabakası PVDF'dür. Bu destek tabakaları, yüksek sıcaklıklara ve kimyasallara karşı dayanıklıdır. Modifiye nanofiber membranları hazırlamada kullanılan membran destek tabakası PVDF, Millipore firmasından temin edilmiştir. Çizelge 2' de orijinal PVDF destek tabakasının özellikleri verilmiştir.

Çizelge 2. Orijinal PVDF destek tabakasının özellikleri

Membran	Orijinal PVDF
Gözenek Çapı	0.22 µm ve 0.45 µm
Kalınlığı	0.11 µm
Yapısı	Hidrofil
Geçirgenlik	%70
Membran Türü	Poliviniliden florür

2.2 Nanofiber membranların hazırlanması

Gümüş nitrat katkı modifiye nanofiber membranların hazırlanmasında farklı oranlarda çözeltiler hazırlanmış ve bu çözelti karışımları ile nanofiberler, PVDF destek tabakası üzerine üretilmiştir. Bu çözelti karışımları aşağıda verilmiştir.

a) Ag-CS nanofiber membran üretimi (AKN2): Ag-CS nanofiber membran üretimi, Adibzadeh vd. (2014) tarafından yapılan çalışmadan yararlanılarak ve bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir (Adibzadeh *et al.* 2014). 20 mL saf su içerisine 2 g PVA alınarak çözülmüştür. Aynı bir beherde de %3'lük 1 g CS alınarak 20 mL %2'lik asetik asit çözeltisi içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Bir sonraki aşamada, iki çözelti toplam hacmi 10 mL (3 mL CS + 7 mL PVA) olacak şekilde karıştırılmış ve içine 0.2 g AgNO₃ ilave edilmiştir. Çözelti homojen oluncaya kadar karıştırılmıştır. Hazırlanan bu çözelti karışımı 10 mL'lik şırıngaya çekilerek elektro lif çekimi düzeneğine yerleştirilmiştir. 0.1 mL/h sabit akış hızı ve 5 dk süre ile nanofiberler 0.45 µm' lik çapa sahip PVDF destek tabakası üzerinde üretilmiştir.

b) Ag-TiO₂ nanofiber membran üretimi (ATN1 ve ATN2): Ag-TiO₂ nanofiber membran üretimi, Adibzadeh vd. (2014) tarafından yapılan çalışmadan yararlanılarak ve bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir (Adibzadeh *et al.* 2014). İlk olarak, TiO₂ çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 3.6 mL tetra-n butil ortotitanat cam behere alınmış ve üzerine 100 mL etanol ve 2.4 mL dietanol amin ilave edilmiştir. Manyetik karıştırıcıda 1 saat karıştırıldıktan sonra üzerine 0.24 mL polietilen glikol damla damla ilave edilerek 1 saat daha karıştırılmıştır. Başka bir beherde ise 100 mL %99'luk etanol içerisinde 10 g PVP çözülmüştür. Toplam TiO₂ ve PVP miktarı 17 mL olacak şekilde bu iki çözelti karıştırılmıştır. Bir sonraki aşamada, hazırlanan çözelti karışımı içine 6 mL DMF içinde 0.34 g AgNO₃ (%2) çözümlenerek ilave edilmiştir (14 mL PVP + 3 mL TiO₂ + 0.34 g AgNO₃ (%2)). ATN1 ve ATN2 modifiye nanofiber membranlar aynı şekilde hazırlanmıştır. ATN1 için 0.22 µm PVDF destek tabakası, ATN2 için ise 0.45 µm PVDF destek tabakası kullanılmıştır. Hazırlanan bu çözelti karışımı 10 mL'lik şırıngaya çekilerek elektro lif çekimi düzeneğine yerleştirilmiştir. 0.1 mL/h sabit akış hızı ve 5 dk süre ile nanofiberler PVDF destek tabakaları üzerinde üretilmiştir.

2.3 Deney düzeneği

Elektro lif çekimi deneyleri, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, Güneş Enerjisi Araştırma Laboratuvarında mevcut olan top syringe pump top-5300 model elektro lif çekimi cihazı ile yapılmıştır. Yüksek voltajlı güç kaynağı ise Gamma ES30 marka DC güç kaynağıdır.

2.4 Kullanılan cihazlar

2.4.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Üretilen nanofiberlerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için SEM kullanılmıştır. Tüm analizler FEI QUANTA FEG 250 model SEM cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Malzemelerin yüzey morfolojilerinin incelenmesi yanında element analizi de Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (EDS) ile yapılmıştır. Hazırlanan modifiye membranların SEM ve EDS ölçümleri nanofiberlerin yoğun bir şekilde biriktiği 7.07 cm² çapa sahip olan membranların orta kısmından alınarak gerçekleştirilmiştir.

2.4.2 Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)

Hazırlanan modifiye nanofiber membranların yüzey özellikleri, ez-AFM Nanomagnetics model AFM cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

2.5 Antibakteriyel ölçümler için kullanılan malzemeler

Çalışmada kullanılan *E. coli* (25922), *S. aureus* (ATCC 25923) ve *P. aeruginosa* (ATCC 35032) test bakterileri Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Yayma plak metodu deneyleri ise Afyon Kocatepe üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği bölümünde gerçekleştirilmiştir. Bakterilerin aktiveştirilmesi için Nutrient agar (Merck) ve antibakteriyel etki testlerinde de Caso Soy Broth (Merck) besiyerleri kullanılmıştır.

2.6 Antibakteriyel ölçümler için kullanılan metotlar

Hazırlanan modifiye nanofiberlerin antibakteriyel özellik gösterip göstermediğinin tespiti için Agar disk difüzyon metodu ve Yayma plak metodu olmak üzere iki metot denenmiştir.

2.6.1 Agar disk difüzyon metodu

Agar disk difüzyon metodu kullanılarak hazırlanan nanofiber membranların antibakteriyel özellikleri test edilmiştir. Agar disk difüzyon metodu, Biswas vd. (2014) tarafından yapılan çalışmadan yararlanılarak ve bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir (Biswas *et al.* 2014).

Test edilecek mikroorganizma Miller Hinton agar üzerinde aktiveştirildikten sonra bir lop alınarak 5 mL Caso broth'a ekilmiştir. 37°C'de 180 rpm'de 0.5 McFarland standardına ulaşıncaya kadar inkübasyon yapılmıştır. %0.85 w/v NaCl ile 1-1.5x10⁷ hücre içeren bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonundan petri kaplarına 100 µL eklenerek drigalski spatülü yardımıyla Miller Hinton agar üzerine yayılmıştır. 15 dk agarın üzerinin kuruması beklenmiştir. Bu işlemin ardından, 6 mm çapında hazırlanmış membran agar üzerine yerleştirilmiştir. Bu işlemden sonra petri kapları düz bir şekilde 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Zon oluşturup oluşturmadıkları belirlenmiştir.

2.6.2 Yayma plak metodu

Staphylococcus aureus (ATCC 6538) bakterilerinin sayısı, yayma plak yöntemiyle Baird Parker agar kullanılarak yapılmıştır. Öncelikle analizlerde kullanılacak bakteri olan *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) bakterileri nutrient broth içerisinde 24 saat 37°C'de çoğaltılmıştır. Çoğaltılan mikroorganizmadan, her bir numune yüzeyine cm² de 106 kob/mL bakteri olacak şekilde aşılama yapıldıktan sonra steril pipet ile yüzeye homojen bir şekilde yayılmıştır. Numuneler deneme düzeyine uygun süre ve ortamlarda bekletildikten sonra her bir numuneden steril swap yardımı ile yüzeyden

örnekler alınmış ve swaplar içlerinde steril 10 mL ringer bulunan tüpler içerisine aktarılmıştır. Bu tüplerden seri dilüsyonlar hazırlandıktan sonra her dilüsyondan çift paralel olacak şekilde baired parker agara ekim yapılmış ve steril bir drigalski spatülü yardımı ile homojen bir şekilde yayılmıştır.

Analizlerde kullanılacak besiyeri otoklavda 121°C'de, 1 atmosfer basınç altında 20 dakika boyunca sterilize edildikten sonra oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Bu şekilde her ekim yapılacak numune için 3'er adet karanlık, aydınlık ve UV ışıkta bakılmak üzere dilüsyon hazırlanmıştır. Besiyerinin numuneyi emmesi beklendikten sonra besiyerleri 24 saat 37°C'de etüvde inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon sonrasında 0.5 mm'den daha büyük etrafı beyaz zonlu siyah renkli koloniler sayılarak örneklerin cm² sindeki bakteri sayısı Eşitlik (1)'e göre hesaplanmıştır (Nickerson and Sinskey 1974, Depkes 1989, Halkman ve Yücel 2005).

$$N = C/[Vx(n_1 + 0.1xn_2)xd] \quad (1)$$

Burada;

N: Örneğin 1 g ya da 1 mL'sindeki mikroorganizma sayısı

C: Sayımı yapılan tüm petri kaplarındaki koloni sayısının toplamı

V: Sayımı yapılan petri kaplarına aktarılan hacim (mL)

n₁: İlk seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kabı adedi

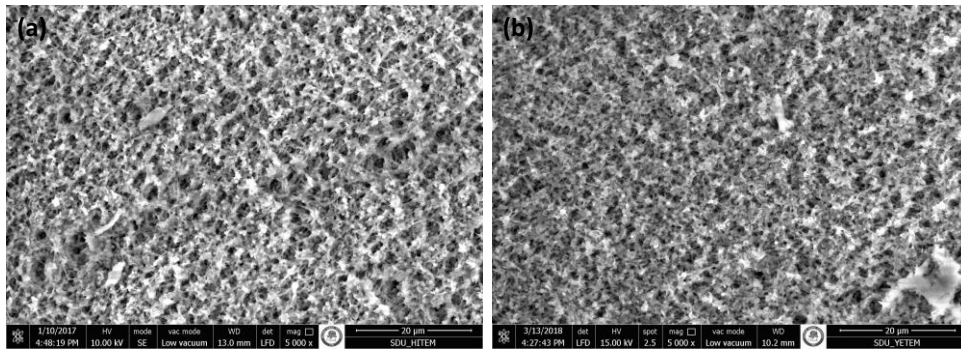
n₂: İkinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kabı adedi

d: Sayımın yapıldığı ardışık iki seyreltiden daha konsantre olanın seyrelme oranı

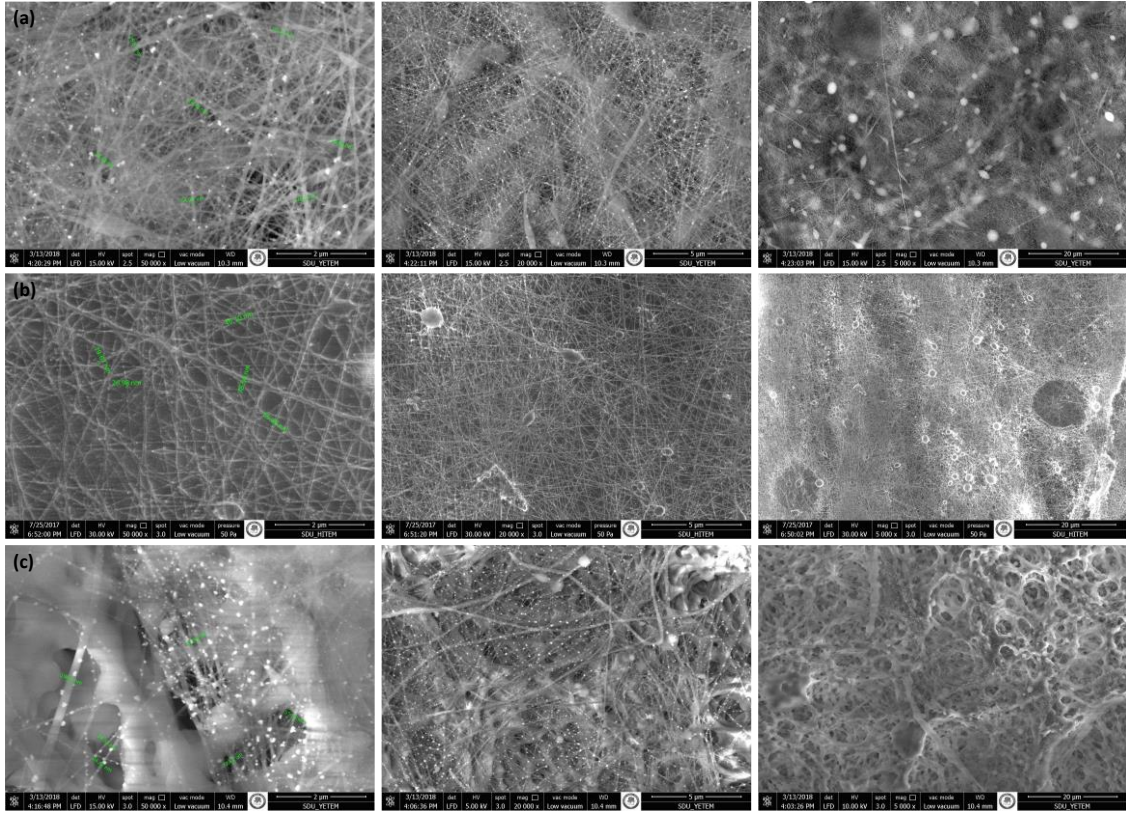
3. Bulgular

3.1 SEM ölçümleri

Orijinal PVDF destek tabakalarının SEM görüntüleri Şekil 1'de verilmiştir. Hazırlanan tüm modifiye nanofiber membranların (AKN2, ATN1, ATN2) SEM görüntüleri ise Şekil 2'de verilmiştir. SEM görüntülerinden görülebileceği gibi orijinal PVDF destek tabakalarına kıyasla diğer modifiye nanofiber membranların morfolojik yapıları farklıdır. Orijinal PVDF destek tabakalarında gözenekli bir yapı görülmektedir. AKN2, ATN1 ve ATN2 nanofiber membranlarda ise fiber yapılar net olarak gözlenmektedir. Şekil 2 (a-c)'de her üç nanofiber membran için verilen ve birinci SEM görüntülerinden elde edilen nanofiberlerin yarıçap değerleri görülmektedir.



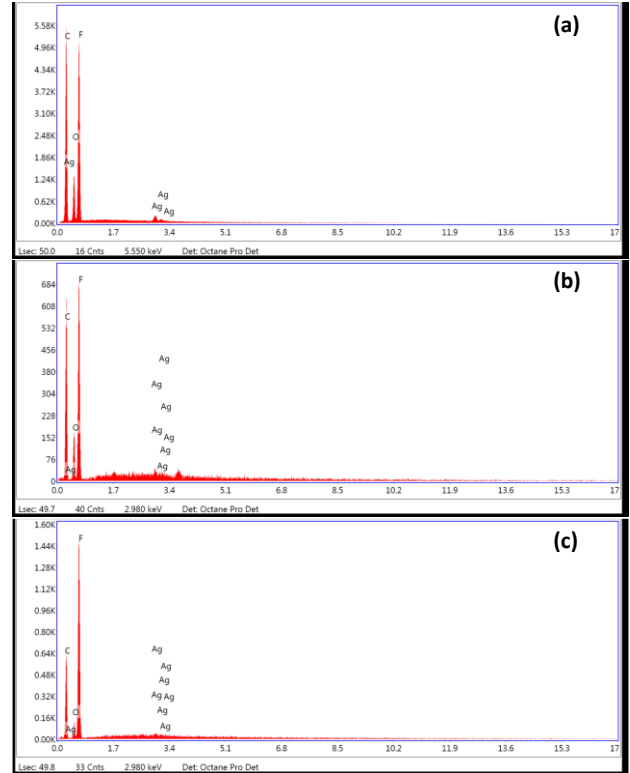
Şekil 1. Orijinal PVDF destek tabakalarının SEM görüntüleri (a) 0.22 µm Orijinal PVDF (b) 0.45 µm Orijinal PVDF



Şekil 2. Gümüş nitrat katkıli modifiye nanofiber membranların SEM görüntüleri (a) AKN2 (b) ATN1 (c) ATN2

3.2. EDS Ölçümleri

AKN2, ATN1 ve ATN2 modifiye nanofiber membranları için elde edilen SEM-EDS sonuçları Şekil 3 (a-c)' de ve Çizelge 3'te verilmiştir. Şekil 3'te nanofiber membranlara Ag iyonunun dahil edildiği görülmektedir. Çizelge 3'ten de görüldüğü gibi AKN2, ATN1 ve ATN2 modifiye nanofiber membranları için sırasıyla, yaklaşık olarak %2.20, % 0.38 ve %0.34 oranında Ag iyonu membran yapısına (ölçüm alınan alan kapsamında) dahil edilmiştir.



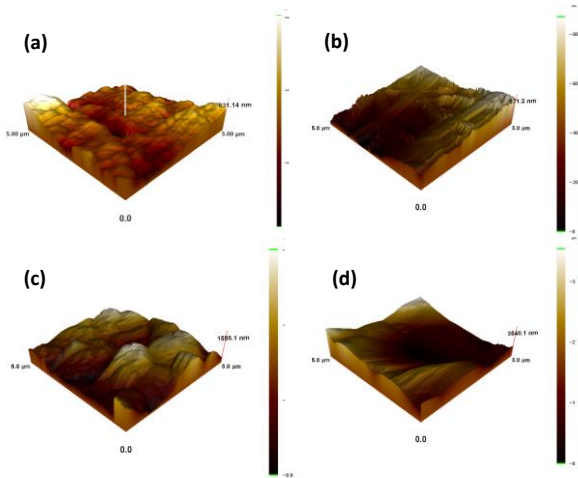
Şekil 3. Gümüş nitrat katkıli modifiye nanofiber membranların EDS spektrumu (a) AKN2 (b) ATN1 (c) ATN2

Çizelge 3. Hazırlanan nanofiber membranların atom miktarları

Membran Kodu	Element	Ağırlık %	Atomik %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	R	A	F
AKN2	C K	47.16	58.23	505.38	6.64	0.2644	1.0606	0.9817	0.5287	0.0000
	O K	13.18	12.22	134.49	19.98	0.0363	1.0087	1.0007	10.2728	1.0000
	F K	37.46	29.25	586.98	8.41	0.1192	30.9353	1.0088	0.3403	1.0000
	Ag L	2.20	0.30	30.34	16.32	0.0168	0.6596	1.2409	1.1175	1.0379
ATN1	C K	47.99	58.37	60.38	8.65	0.2205	1.0459	0.9849	0.4392	1.0000
	O K	13.07	11.94	16.51	14.71	0.0199	1.0071	1.0046	0.1511	1.0000
	F K	38.56	29.65	78.75	10.76	0.0602	0.9385	1.0133	0.1664	1.0000
	Ag L	0.38	0.05	3.38	40.75	0.0038	0.7212	1.2886	1.3302	1.0536
ATN2	C K	42.88	53.85	64.93	8.97	0.1807	1.0560	0.9829	0.3991	1.0000
	O K	6.80	6.41	12.39	15.41	0.0114	1.0170	1.0027	0.1646	1.0000
	F K	49.98	39.69	173.55	9.64	0.1012	0.9477	1.0114	0.2137	1.0000
	Ag L	0.34	0.05	3.96	48.11	0.0034	0.7285	1.2870	1.3089	1.0514

3.3. AFM Ölçümleri

Orijinal PVDF destek tabakasının ve hazırlanan modifiye nanofiber membranların (AKN2, ATN1 ve ATN2) AFM görüntüleri Şekil 4' te verilmiştir. Şekil 4(a-d)'den de görüldüğü gibi orijinal PVDF destek tabakası ve AKN2, ATN1 ve ATN2 modifiye nanofiber membranların yüzey morfolojileri farklıdır. Orijinal PVDF'nin yüzeyinde yükseklikler ve çöküntüler bulunurken, AKN2, ATN1 ve ATN2 nanofiber membranlarının yüzeyi daha düz ve homojendir. Ayrıca çöküntülerde kaybolmuştur. Orijinal PVDF ye göre hazırlanan modifiye nanofiber membranların yüzeylerindeki bu çöküntülerin kaybolması nanofiber yapının oluştuğunun göstergelerinden biridir.



Şekil 4. Gümüş nitrat katkılı modifiye nanofiber membranların AFM görüntüleri (a) Orijinal PVDF destek tabakası, (b) AKN2, (c) ATN1, (d) ATN2.

3.4. Agar Disk Difüzyon ve Yayma Plak Ölçüm Sonuçları

AKN2, ATN1 ve ATN2 modifiye nanofiber membranlarının antibakteriyel özellikleri ilk olarak agar disk difüzyon metodu ile incelenmiştir. Hazırlanan modifiye nanofiber membranların *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* bakterilerine karşı zon çapları ölçülmüştür. Çizelge 4'ten de görüldüğü gibi AKN2, ATN1 ve ATN2 membranlarının diğer bakterilere göre *S. aureus*'a karşı daha iyi antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bakteri sayımı (*S. aureus*) ise yayma plak metodu kullanılarak AKN2 ve ATN1 modifiye nanofiber membranlar için yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 5'te verilmiştir. Çizelge 5'ten de görüldüğü gibi AKN2 ve ATN1 membranların kullanıldığı ortamdaki bakteri sayımı karanlık, aydınlık ve UV de gerçekleştirilmiştir. Bu sonuçlara göre AKN2 modifiye nanofiber membranı eklenen bütün *S. aureus* bakterilerini yok ederken ATN1 membranı ise bu bakterilerin sayısını azaltmıştır.

AgNO₃ katkılı modifiye nanofiber membranların mikroorganizmalar üzerinde gösterdiği önerilen inhibitör mekanizması, bakteri hücre zarlarının negatif yüklü olması ve pozitif yüklü CS' in bu hücre zarları ile etkileşime geçerek bakterilerin hücre zarı geçirgenliğini etkileyebilmesi ve değiştirebilmesi şeklindedir. Bu durum, bakterilerin doğal bileşenlerine ve hücre zarlarına zarar vermekte ve

sonuçta bakterinin ölümüne yol açmaktadır (Xu et al. 2007).

Çizelge 4. Modifiye nanofiber membranların zon çapları

Membran kodu	<i>E. coli</i> 25922 Zon çapı mm (10^8 cfu mL ⁻¹ 1 cm ²)	<i>E. coli</i> 25922 Zon çapı mm (10^3 cfu mL ⁻¹ , 6.06 mm çap)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 Zon çapı mm (2.1×10^7 cfu mL ⁻¹ , 6.06 mm çap)	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 35032 Zon çapı mm (10^7 cfu mL, 6.06 mm çap)
AKN2	2.81	Çok az	9	9
ATN1	3.16	-	10	7
ATN2	1.13	-	8	Çok az

Çizelge 5. AKN2 ve ATN1 membranlarının bakterisidal özellikleri

Eklenen Bakteri Sayısı	Bakteri Sayımı (kob (cm ²) ⁻¹)		
	Karanlık	UV	Aydınlık
AKN2	0	0	0
ATN1	9×10^2	1.1×10^2	1.4×10^3

4. Sonuç

Bu çalışmada, elektro lif çekimi yöntemi kullanılarak PVDF destek tabakası üzerine gümüş nitrat ilavesi ile modifiye nanofiber membranların hazırlanması amaçlanmıştır. Yapılan literatür taramaları sonucunda elektro lif çekimi yöntemi kullanılarak PVDF destek tabakası üzerine CS, TiO₂ ve AgNO₃ ilaveli nanofiber membran çalışmalarına bizim bilgimiz dahilinde rastlanılmamıştır. Bu çalışmada, elektro lif çekimi yöntemi kullanılarak PVDF destek tabakası üzerine gümüş nitrat ilavesi ile modifiye nanofiber membranlar hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu anlamda yeni tür nanofiber membranlar hazırlanmış ve antibakteriyel özellikleri incelenmiştir.

Hazırlanan modifiye nanofiber membranların morfolojisi SEM ile aydınlatılmış ve nanofiber yapının PVDF destek tabakası üzerinde oluştuğu gösterilmiştir. Nanofiber membranların elemental analizi ise EDS tekniği ile araştırılmış ve yaklaşık olarak %2.20, % 0.38 ve %0.34 oranlarında Ag iyonunun membran yapısına ilave edildiği görülmüştür. Membranların yüzeyine eklenen fonksiyonel grupların yoğunlukları ve yapının oluşturduğu pürüzlülük de AFM ile araştırılmıştır. Orijinal PVDF yüzeyinin yükselti ve çöküntülere

sahip bir yapıda olduğu görülmüştür. AKN2, ATN1 ve ATN2 nanofiber membranların yüzeyinde ise çöküntüler kaybolmuş ve daha düz, homojen bir yapı görülmüştür. Modifiye nanofiber membranların yüzeylerindeki çöküntülerin kaybolması, nanofiber yapının oluşmasından kaynaklanmaktadır.

Modifiye nanofiber membranların antibakteriyel özellikleri ilk olarak agar disk difüzyon metodu ile araştırılmıştır. Bakteri sayımı ise yayma plak metodu kullanılarak yapılmıştır. Deney sonuçları incelendiğinde, AKN2, ATN1 ve ATN2 nanofiber membranların özellikle *S. aureus* başta olmak üzere *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakterilerine antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu araştırmadan elde edilen bulgular *E. coli* (25922), *S. aureus* (ATCC 25923, ATCC 6538) ve *P. aeruginosa* (ATCC 35032)'a bağlı enfeksiyonlarda, çalışmamızda hazırlanan nanofiber membranların tedavi amaçlı kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bunun yanısıra, hazırlanan modifiye nanofiber membranların biyoyumluluk çalışmaları yapılarak, yara bandı, sargı bezi vb. medikal uygulamaları üzerine araştırmalar da yapılabilir.

Kaynaklar

- Abdelgawad, A.M., Hudson, S.M., Rojas, O.J., 2014. Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (Chitosan/Silver-Nps/Polyvinyl Alcohol) systems. *Carbohydrate Polymers*, **100**, 166-178.
- Adibzadeh, S., Bazgir, S., Katbab, A.A., 2014. Fabrication and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) electrospun nanofibrous membranes containing silver nanoparticles for antibacterial water filtration. *Iranian Polymer Journal*, **23**, 645-654.
- Au, H.T., Pham, L.N., Vu, T.H.T., Park, J.S., 2012. Fabrication of an antibacterial non-woven mat of a poly(lactic acid)/chitosan blend by electrospinning. *Macromolecular Research*, **20**, 51-58.
- Baştürk, E., 2012. Çapraz bağlı PVA/B nanofiberlerin elektrospin yöntemi ile hazırlanması ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 132.
- Beypinar, F., 2014. Polietilenimin esaslı nanofiberlerin hazırlanması ve karbon dioksit gazı geçirgenliğinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 67.
- Biswas, C., Zuo, X., Chen, S.C., Schibeci, S.D., Forwood, J.K., Jolliffe, K.A., Sorrell, T.C., Djordjevic, J.T., 2014. Functional disruption of yeast metacaspase, Mca1, leads to miltefosine resistance and inability to mediate miltefosine-induced apoptotic effects. *Fungal Genetics and Biology*, **67**, 71-81.
- Burger, C., Hsiao, B.S., Chu, B., 2006. Nanofibrous materials and their applications. *Annual Review of Materials Research*, **36**, 333-368.
- Depkes, R.I., 1989. *Materia Medika Indonesia*, Jilid V. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Halaman, 549-553.
- Fabrega, J., Fawcett, S.R., Renshaw, J.C., Lead, J.R., 2009. Silver nanoparticle impact on bacterial growth: effect of pH, concentration, and organic matter. *Environmental Science & Technology*, **43**, 7285-7290.
- Fujihara, K., Huang, Z.M., Ramakrishna, S., Satknanantham, K., Hamada, H., 2003. Performance study of braided carbon/PEEK composite compression bone plates. *Biomaterials*, **24(15)**, 2661-2667.
- Gao, Y., Truong, Y.B., Zhu, Y., Kyratzis, I.L., 2014. Electrospun antibacterial nanofibers: production, activity, and in vivo applications. *Journal of Applied Polymer Science*, **131(18)**, 1-13.
- Gülbandılar, A., 2009. Kütahya yöresinde burun mukozasındaki *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığının ve antibiyotik duyarlılığının araştırılması. *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi (Journal of Scientific Reports-A)*, **18**, 1-6.
- Halkman, B.D.H., Yücel, K.P., 2005. Gıdalarda Radyasyon Uygulamalarının Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri, *Gıda*, **30(6)**, 409-416.
- Hang, A.T., Tae, B., Park, J.S., 2010. Non-woven mats of poly(vinyl alcohol)/chitosan blends containing silver nanoparticles: Fabrication and characterization. *Carbohydrate Polymers*, **82**, 472-479.
- Hong, H.F., Jeong, S., 2011. Effect of nano sized silver on electrospun nylon-6-fiber. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **11(1)**, 372-376.
- Huang, Z.M., Zhang, Y.Z., Kotaki, M., Ramakrishna, S., 2003. A review on polymer nanofibers by electrospinning applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, **63**, 2223- 2253.
- Ignatova, M., Rashkov, I., Manolova, N., 2013. Drug-loaded electrospun materials in wound-dressing applications and in local cancer treatment. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **10**, 469- 483.
- Jia, Y.T., Gong, J., Gu, X.H., Kim, H.Y., Dong, J., Shen, X.Y., 2007. Fabrication and characterization of poly(vinyl alcohol)/chitosan blend nanofibers produced by electrospinning method. *Carbohydrate Polymers*, **67**, 403-409.
- Kwoun, S.J., Lec, R.M., Han, B., Ko, F.K., 2001. Polymer nanofiber thin films for biosensor applications. In: Proceedings of the IEEE 27th Annual Northeast Bioengineering Conference, 9– 10.
- Laurencin, C.T., Ambrosio, A.M.A., Borden, M.D., Cooper Jr, J.A., 1999. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, **1**, 19–46.
- Liang, D., Lu, Z., Yang, H., Gao, J., Chen, R., 2016. Novel asymmetric wettable AgNPs/Chitosan wound dressing: In Vitro and In Vivo evaluation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **8(6)**, 3958-3968.
- Lim, S.H., Hudson, S.M., 2003. Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals. *Journal of Macromolecular Science: Part C: Polymer Reviews*, **C43**, 223-269.
- Lu, P., Ding, B., 2008. Applications of electrospun fibers. *Recent Patents on Nanotechnology*, **2**, 169-182.

- Mahapatra, A., Garg, N., Nayak, B.P., Mishra, B.G., Hota, G., 2012. Studies on the synthesis of electrospun PAN-Ag composite nanofibers for antibacterial application. *Journal of Applied Polymer Science*, **124(2)**, 1178-1185.
- Nickerson, J.T., Sinskey, A.J., 1974. *Microbiology of Foods And Food Processing*, American Elsevier Publishing Co., Inc. New York, **18(4)**: 471.
- Ohkawa, K., Cha, D.I., Kim, H., Nishida, A., Yamamoto, H., 2004. Electrospinning of chitosan. *Macromolecular Rapid Communications*, **25**, 1600-1605.
- Omerovic, M., Müştak, H.K., Kaya, İ.B., 2017. *Escherichia coli* patotiplerinin virülens faktörleri. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, **28(1)**, 1-6.
- Pokhrel, S., Yadav, P.N., Adhikari, R., 2015. Applications of chitin and chitosan in industry and medical science: A Review. *Nepal Academy of Science and Technology*, **16**, 99-104.
- Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, **31**, 603-632.
- Sırıken, B., Öz, V., 2017. *Pseudomonas aeruginosa*: özellikleri ve quorum sensing mekanizması. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, **18**, 42-52.
- Teo, W.E., Ramakrishna, S., 2006. A Review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*, **17**, R89-R106.
- Tian, L., Wang, P., Zhao, Z., Ji, J., 2013. Antimicrobial activity of electrospun poly(butylene succinate) fiber mats containing PVP-capped silver nanoparticles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **171(7)**, 1890-1899.
- Tucker, N., Stanger, J.J., Staiger, M.P., Razzaq, H., Hofman, K., 2012. The history of the science and technology of electrospinning from 1600 to 1995. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, **7**, 63-73.
- Xu, H., Ma, L., Shi, H., Gao, C., Han, C., 2007. Chitosan-hyaluronic acid hybrid film as a novel wound dressing: in vitro and in vivo studies. *Polymers for Advanced Technologies*, **18**, 869-875.
- Yuan, J., Geng, J., Xing, Z., Shen, J., Kang, I.K., Byun, H., 2010. Electrospinning of antibacterial poly(vinylidene fluoride) nanofibers containing silver nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, **116(2)**, 668-672.
- Zahedi, P., Rezaeian, I., Ranaei-Siadat S.O., Jafari, S.H., Supaphol, P., 2010. A Review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polymers for Advanced Technologies*, **21**, 77- 95.
- Zeytuncu, B., 2014. Elektrospinning tekniği ve UV ışımalarının eşzamanlı olarak uygulanması ile nanofiber membranların hazırlanması ve kıymetli metallerin adsorpsiyonunda uygulanması. Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 172.
- Zhang, Y.Z., Lim, C.T., Ramakrishna, S., Huang, Z.M., 2005. Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **16**, 933-946.
- Zhang, Y., Huang, X., Duan, B., Wu, L., Li, S., Yuan, X., 2007. Preparation of electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) membranes. *Colloid and Polymer Science*, **285**, 855-863.
- Zhang, W., Xing, M.M.Q., Maibach, H.I., 2010. Nanofibrous materials for wound care. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, **29**, 143-152.
- Zhang, L., Bai, X., Tian, H., Zhong, L., Ma, C., Zhou, Y., Chen, S., Li, D., 2012. Synthesis of antibacterial film CTS/PVP/TiO₂/Ag for drinking water system. *Carbohydrate Polymers*, **89**, 1060-1066.