

## Elektroegirme Yöntemi ile Üretilen Antimikrobiyal Nanolif Membranlarda *Lycopodium* Özütü Etkisinin İncelenmesi

Ayşe YÜKSEKDAĞ<sup>1,2,a</sup>

<sup>1</sup>İstanbul Teknik Üniversitesi, İnşaat Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, İstanbul

<sup>2</sup>Prof. Dr. Dincer Topacık Ulusal Membran Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-7751-7556

### Makale Bilgileri

Geliş : 03.09.2024

Kabul : 23.12.2024

DOI: 10.21605/cukurovaumfd.1606113

### Sorumlu Yazar

Ayşe YÜKSEKDAĞ

yuksekdaga@itu.edu.tr

### Anahtar Kelimeler

Elektroegirme

Nanolif

*Lycopodium*

Antimikrobiyal

**Atf şekli:** YÜKSEKDAĞ, A., (2024). Elektroegirme Yöntemi ile Üretilen Antimikrobiyal Nanolif Membranlarda *Lycopodium* Özütü Etkisinin İncelenmesi. Çukurova Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Dergisi, 39(4), 1027-1038.

### ÖZ

Bu çalışmada, *Lycopodium* bitkisinden elde edilen fenolik bileşenler kullanılarak çevreci, ekonomik ve büyük ölçekli üretilen antimikrobiyal nanolif membranlar geliştirilmiştir. Bitki özütü, oda sıcaklığında polimer çözücüsü DMF ile karıştırılıp süzülerek elde edilmiştir. %12 PAN polimeri ile farklı konsantrasyonlarda *Lycopodium* özütü içeren çözeltiler hazırlanmış ve elektroegirme yöntemiyle nanolif membranlar üretilmiştir. Üretilen dört farklı membran (%0, %1, %3, %5 oranlarında bitki özütü içeren membranlar) SEM görüntüleriyle incelenmiş, bitki konsantrasyonunun artışıyla boncuksu yapıların azaldığı ve nanolif kalınlıklarının arttığı gözlenmiştir. %5 oranında özüt içeren membranda nanolif kalınlığı 607 nm'ye çıkarak kontrol membranından yaklaşık üç kat daha kalın olmuştur. FT-IR analizinde 5L membranında oksijen bağlarını temsil eden piklerin kaybolduğu ve 3L membranında antimikrobiyal etkinin başarılı bir şekilde elde edildiği tespit edilmiştir.

## Investigation of the Effect of *Lycopodium* Extract on Antimicrobial Nanofibrous Membranes Fabricated by Electrospinning Method

### Article Info

Received : 03.09.2024

Accepted : 23.12.2024

DOI: 10.21605/cukurovaumfd.1606113

### Corresponding Author

Ayşe YÜKSEKDAĞ

yuksekdaga@itu.edu.tr

### Keywords

Electrospinning

Nanofiber

*Lycopodium*

Antimicrobial

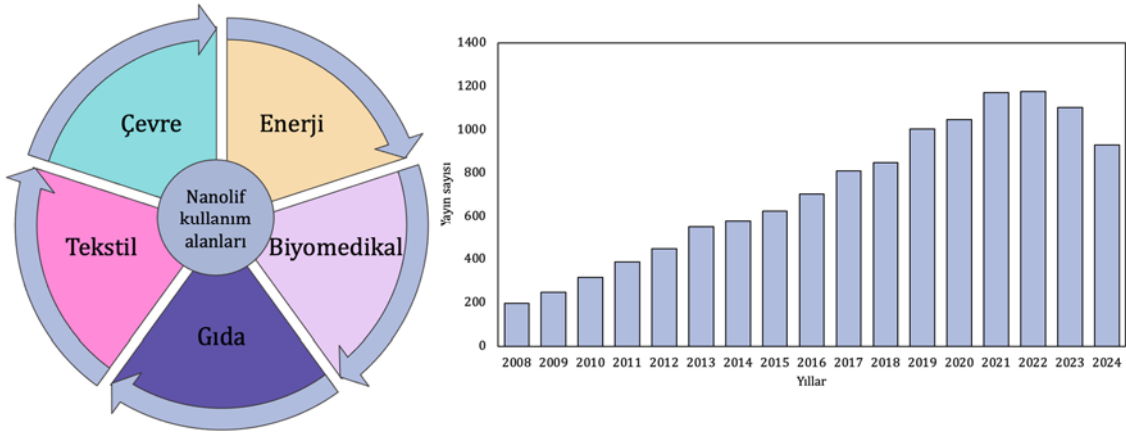
**How to cite:** YÜKSEKDAĞ, A., (2024). Elektroegirme Yöntemi ile Üretilen Antimikrobiyal Nanolif Membranlarda *Lycopodium* Özütü Etkisinin İncelenmesi. Çukurova Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Dergisi, 39(4), 1027-1038.

### ABSTRACT

In this study, antimicrobial nanofiber membranes were developed using phenolic components obtained from the *Lycopodium* plant, which are environmentally friendly, economical, and suitable for large-scale production. The plant extract was mixed with the polymer solvent DMF at room temperature and then filtered to obtain the solution. Solutions containing 12% PAN polymer and varying concentrations of *Lycopodium* extract were prepared, and nanofiber membranes were produced using the electrospinning method. Four different membranes (membranes containing 0%, 1%, 3%, 5% plant extracts) were examined using SEM images, revealing a decrease in bead-like structures and an increase in nanofiber thickness with higher plant concentrations. The nanofiber thickness in the membrane having 5% plant extract increased to 607 nm, making it approximately three times thicker than the control membrane. FT-IR analysis showed that the peaks representing oxygen bonds were absent in the 5L membrane, and the 3L membrane demonstrated successful antimicrobial activity.

## 1. GİRİŞ

Lifler ve filamentler, örümcek ağı ve ipek lifleri gibi farklı doğal ortamlarda canlılar tarafından üretilmekte ve kullanılmaktadır. Bu doğal kaynaklar, günümüzde kimyasal olarak üretilen (sentetik) lif ve nanoliflerin ilham kaynağını oluşturmaktadır. Nanolifler günümüzde pek çok farklı alanda kullanılmaktadır. Su, atıksu ve hava arıtımı, yakıt hücresi uygulamaları, yapay doku uygulamaları, gıda ambalajları ve giyilebilir teknoloji ürünleri sırasıyla çevre, enerji, biyomedikal, gıda ve tekstil sektörlerindeki kullanımlarına birer örnek olarak gösterilebilir. “Web of Science” veri tabanından 21 Ağustos 2024 tarihinde elektroçirime (electrospinning) ve nanolif (nanofiber) anahtar kelimeleri ile aratıldığında bulunan makale sayıları 2008 yılında günümüze kadar Şekil 1’de grafik olarak gösterilmektedir. Bilhassa 2010’lu yıllarda endüstriyel ölçekte nanolif üretiminin gerçekleştirilmesi ile gerek yayın sayılarında gerekse uygulama alanlarında artış gözlenmiştir [1].



Şekil 1. Nanolif membranların kullanım alanları (sol) ve 21 Ağustos 2024 itibari ile Web of Science internet sitesinden elektroçirime ve nanolif anahtar kelimeleri ile çevrimiçi olarak aratılarak bulunan 2008 – 2024 yılları arası yayın sayısı (sağ)

Yukarıda bahsedilen kullanım alanlarında, özellikle antibakteriyel ve antimikrobiyal özellikler taşıyan nanolifler sıklıkla tercih edilmektedir. Özellikle biyomedikal uygulamalar için antibakteriyel nanoliflerin geliştirilmesi ve üretilmesi ayrı bir önem taşıdığı bilinmektedir [2,3]. Öte yandan su ve atıksu arıtımında kullanılan nanolif membranların da antibakteriyel ve antimikrobiyal özelliklere sahip olması son yıllarda araştırılan konular arasında yer almaktadır [4,5]. Arıtma proseslerinde kullanılan membranların en önemli işletme problemlerinden birisi tıkanmadır [6]. Nanolif membranların su akışı yüksek olması sebebiyle su ve atıksu arıtımında sıklıkla tercih edilmektedir [7,8]. Ancak yüksek akı avantajı ile birlikte membran tıkanmasının hızla gerçekleşmesi, membranlarda geri yıkama sıklığının ve uygulama basıncının artmasına yol açmaktadır. Bu işlemler işletme maliyetini arttırmakla birlikte membran ömrünü de kısalttığı için antimikrobiyal özellikli nanolif membranların üretimi çevresel uygulamalar için de ayrı bir öneme sahiptir [9,10].

Biyomedikal ve çevre uygulamalarında antimikrobiyal ve antibakteriyel nanolif membranların geliştirilmesi için kullanılan en yaygın stratejilerden birisi metal organik çerçeve, nanotüp ve nanopartikül gibi nanomalzemelerin membran matrisinde kullanılmasıdır. Gümüş nanopartikül (AgNP) [11], bakır oksit (CuO) [12], Titanyum dioksit (TiO<sub>2</sub>) [13], karbon nanotüp (KNT) [14] ve zeolitik imidazol çerçeve (ZIF-8) [15] antimikrobiyal membran üretiminde yaygın olarak kullanılan nanomalzemelerdir. Yapılan bir çalışmada ağırlıkça %8 ZIF-8 katkılı poliviniliden florür (PVDF) nanolif yağ-su ayırma membranlarından, ZIF-8 katkısı olmayan membrana göre daha iyi antimikrobiyal performans elde edilmiştir [16]. Başka bir çalışmada selüloz nanokristal ve AgNP ile modifiye edilen membranların *Escherichia coli* hücrelerinin yaklaşık %75’ini etkisiz hale getirebildiği, aynı zamanda membran ayırma performansına olumsuz bir etki olmadığı gözlenmiştir [17]. Ancak nanomalzemelerin zamanla membran bünyesinden yıkanarak ortama salınması bu yöntemin dezavantajları arasındadır. Ayrıca nanomalzeme katkılı membranların üretiminin ticari boyutta gerçekleştirilmesi de bir diğer zorluklardandır.

Antimikrobiyal membran üretiminde izlenen bir diğer yöntem de sentetik ya da doğal antibakteriyel ajanların kullanılmasıdır. Bu yöntem daha çok yara örtüsü vb. biyomedikal ürünlerin üretiminde tercih edilmektedir. Antibiyotik yüklü biyopolimerik nanolif membranlar sıklıkla yara örtüsü üretiminde kullanılmaktadır [18]. Siprofloksazin antibiyotik etken maddesinin polivinil alkol (PVA) nanolif membranlarının yüzeyine kaplanmasıyla [19] ve terbinafin etken maddesinin PVA polimer çözeltisine karıştırılmasıyla [20] başarılı bir şekilde antibakteriyel nanolifler üretilmiştir. Doğal antibakteriyel ajanlar olarak ise bitkilerden elde edilen uçucu yağlar ve bal kullanılabilir. Bu maddelerin saf halleri doğrudan elektrodeğirmeye kullanılmadığından polimer çözeltilerine karıştırılarak nanolif üretimine entegre edilmektedirler [18]. Uçucu yağların antibakteriyel, antiviral ve antimikrobiyal özellikleri, sahip oldukları fenolik maddelerden kaynaklanmaktadır [21]. Örneğin, tarçın, limon otu ve nane nanolif yara örtüsü üretiminde başarılı bir şekilde kullanılmıştır [22]. Uçucu yağlara alternatif olarak tıbbi bitki özütleri de hem ihmal edilebilir yan etkileri hem de sentetik ilaçlara kıyasla oldukça ekonomik olması sebebiyle son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir. Bitkilerin su veya organik çözücü özütleri de yine polimer çözeltisi içerisine karıştırılarak nanolif membran bünyesine tutturulur ve antimikrobiyal özellikleri nanoliflere kazandırılır [23].

Kibrit otu, kurt pençesi ya da tilki kuyruğu olarak da bilinen *Lycopodium*, zengin polifenol içeriği sayesinde antibakteriyel, antimantar, antioksidan ve antikanser özelliklere sahip tıbbi bir bitkidir. Bu bitki, kas ağrısı, karın ağrısı ve Alzheimer gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmede kullanılan ilaçların üretiminde kullanılmaktadır [24]. Önceki çalışmalar *Lycopodium* bitkisinde p-hidroksi-benzoik, p-kumarik, vanilik, dihidrokafeik ve ferulik asitler gibi çeşitli fenolik asitlerin varlığını tespit etmiştir. Çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal özellikleriyle bilinen fenolik asitler, bu bitkinin tıbbi özelliklere sahip olmasını sağlamaktadır [25].

Bu çalışmanın yeniliği ve amacı daha önce nanolif membran üretiminde kullanılmayan *Lycopodium* bitkisinin özütü ile antimikrobiyal özellikler taşıyan yenilikçi bir nanolif membran geliştirmektir. Bu amaçla atıksu arıtımında yaygın olarak kullanılan poliakrilonitril (PAN) polimeri ile dimetil formamid (DMF) çözücüsü içinde özütlenmiş *Lycopodium*, polimer çözeltisine farklı oranlarda karıştırılarak çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden elektrodeğirme ile nanolif membranlar üretilmiş ve karakterizasyon sonuçlarına göre *Lycopodium* özütünün kullanılabilirliği araştırılmıştır.

## 2. YÖNTEM

### 2.1. Bitki Özütlerinin Hazırlanması

Türkiye’de yetiştirilmiş *Lycopodium* bitkisi, kurutulmuş halde temin edilmiştir. Daha sonra laboratuvar ölçekli halkalı değirmen ile öğütülerek Şekil 2’deki gibi toz haline getirilmiştir. Özütleme işleminden önce en az iki saat 103-105°C’de kurutulmuştur. *Lycopodium* özütlerini hazırlamak için polimerik membran üretiminde ve özellikle elektrodeğirme yöntemi ile nanolif membran üretiminde sıklıkla kullanılan dimetilformamid (DMF) (AKSA Akrilik Kimya, Türkiye) çözücüsü kullanılmıştır. Öğütülmüş ve nemi uzaklaştırılmış toz *Lycopodium* bitkisi, ağırlıkça %0, %1, %3 ve %5 karışım oranlarında DMF çözücüsü ile oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmıştır. Bu membranlara sırasıyla 0L, 1L, 3L ve 5L kodları verilmiştir. Karıştırma hızı bitki parçalarının çökmesini engelleyecek ve karıştırma esnasında vorteks oluşacak şekilde 400 devir/dakika olarak seçilmiştir. Bu süre sonunda bitki özütü içerikli çözücü kaba filtre kağıdından hızla süzülerek arta kalan katı faz ayrımı sağlanmıştır. Elde edilen katı çözücüler, Şekil 2’nin 2. adımında görülmektedir. Ağırlıkça %1, %3 ve %5 oranında üç farklı konsantrasyonda bitki özütü hazırlanmıştır. Bundan sonraki adımda bitki özütü çözücüler ve özüt içermeyen DMF solventi ile polimer çözeltileri hazırlanmıştır. Polimer olarak poliakrilonitril (PAN) (150000 Dalton, AKSA Akrilik Kimya, Türkiye) kullanılmıştır. Dört farklı *Lycopodium* konsantrasyonu içeren DMF çözeltileri ile ağırlıkça %12 PAN polimeri 24 saat boyunca 60°C’de karıştırılarak polimer çözeltileri hazırlanmıştır (Şekil 2 - 3. adım).

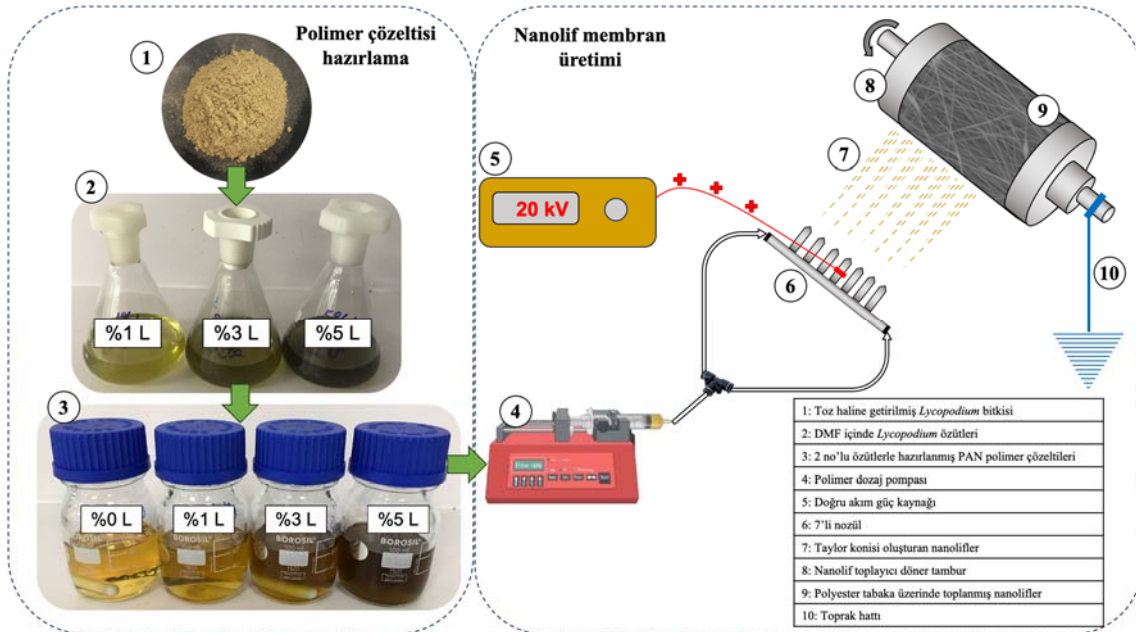
### 2.2. Nanolif Membran Üretimi

Nanolif membranlar elektrodeğirme yöntemi ile üretilmişlerdir. Bunun için yatay konfigürasyonlu, 7 adet paslanmaz çelik nozüllü ve sıcaklık kontrollü elektrodeğirme cihazı kullanılmıştır (ASENTEK, Türkiye). Üretim öncesinde döner tambur üzerine polyester membran destek tabakası sarılmıştır. Hazırlanan polimer çözeltileri plastik enjektör içine alınarak şırınga pompası ile 0,5 mL/saat debide nozül yatağına

beslenmiştir. Pozitif voltaj, tambur dönme hızı ve nozül-tambur arası mesafe Çizelge 1'deki değerlerde sabit tutularak her bir polimer çözeltisi için saat nanolif üretimi gerçekleştirilmiştir. Tüm üretimlerden önce elektroegirme kabin içi sıcaklığı 30°C'ye sabitlenmiş ve bağıl nem sürekli olarak ölçülerek değişimi takip edilmiştir. Üretimin başlangıcından sonuna kadar bağıl nem %35-40 arasında değişkenlik göstermiştir.

Çizelge 1. Elektroegirme ile nanolif membran üretim parametreleri

Parametre	Değer
Voltaj	20 kV
Polimer dozajı	0,5 mL/saat
Üretim süresi	2 saat
Nozül sayısı/çapı	7 adet/0,8 mm
Tambur dönme hızı	500 devir/dakika
Nozül – tambur arası mesafe	10 cm
Sıcaklık	30°C
Bağıl nem	%35-40



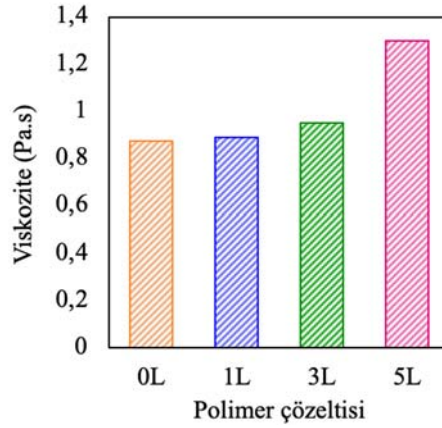
### 2.3. Karakterizasyon Çalışmaları

Polimer çözeltilerinin akmaya karşı dirençleri titreşim prensibi ile çalışan viskozimetre ile ölçülmüştür (AND, Japonya). Üretilen nanolif membranların fonksiyonel grupları, 650-4000  $\text{cm}^{-1}$  aralığında FT-IR (Perkin Elmer, ABD) ölçümleri ile analiz edildi. Nanolif membran morfolojileri, üç farklı ölçekte taramalı elektron mikroskobu (SEM) (FEI, Quanta FEG 250, ABD) ile görüntülenmiştir. Görüntüleme öncesinde membranlar altın paladyum karışımı ile kaplanarak iletken hale getirilmiştir. ImageJ programı kullanılarak 5  $\mu\text{m}$  ölçekli SEM görüntülerinden 100 adet nanolif kalınlığı ölçümü alınmış ve nanoliflerin kalınlık dağılım grafikleri oluşturulmuştur. Membranların antimikrobiyal özelliklerini incelemek için her bir membrandan 47 mm çapında örnekler kesilerek vakum süzme setine yerleştirilmiştir. Ardından, ileri biyolojik atıksu arıtma tesisinden temin edilen ve askıda katı madde konsantrasyonu yaklaşık 8000 mg/L olan aktif çamurdan 10 mL süzümüştür. Süzme işlemini takiben 48 saat inkübasyon süresinden sonra membranlar Syto-9 (canlı hücre görüntülemesi için) ve Propidyum iyodür (ölü hücre görüntülemesi için) içeren karışık floresan ajan ile boyanmıştır. Boyama işleminden sonra en az 30 dk bekletilerek Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) (C2, Nikon, Japonya) ile görüntüler alınmıştır. Alınan görüntüler, ImageJ programı ile analiz edilerek canlı ve ölü hücrelerin bulunduğu alanlar ölçülmüştür. Daha sonra canlı/ölü oranları hesaplanarak antimikrobiyal performansları değerlendirilmiştir.

### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1. Polimer Çözeltisi Karakterizasyonu

*Lycopodium* ve çeşitli bitkilerin bünyesindeki fenolik bileşiklerin özütlenmesi için su, etanol ve aseton gibi çözücülerin kullanıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur [26, 27]. Bahsi geçen çözücülerin kullanılması durumunda, özütleme işleminden sonra çözücünün buharlaştırılarak uzaklaştırılması, geride kalan çözünmüş katı maddelerin polimer çözücüsü içerisine karıştırılması gerekmektedir. Bu işlem de buharlaştırma kaynaklı, proses maliyetini oldukça arttırmakta ve gerçek ölçekte üretimi zorlaştırmaktadır. Bu sebeple, bu çalışma kapsamında, bitki özütlerinin doğrudan membran üretiminde yani polimer çözeltisi hazırlanmasında kullanılması hedeflenmiştir. Dolayısıyla bu çözücüler yerine, polimer çözünürleştirmede kullanılan DMF çözücüsü içerisinde *Lycopodium* bitkisi özütlenmiştir. Diğer çözücülerde olduğu gibi DMF de seçici bir özütleme gerçekleştirememektedir. Ancak polimer çözünürleştirmede kullanılan bir çözücü olduğundan dolayı özütleme kapasitesinin yüksek olacağı ve dolayısıyla solvent içerisinde çözünecek madde miktarının fazla olacağı göz önünde bulundurulmuştur. Her ne kadar polimer konsantrasyonu bu çalışma kapsamında sabit tutulsa da artan *Lycopodium*/DMF oranına bağlı olarak özütleme işleminden gelecek toplam çözünmüş katı madde konsantrasyonunun artması beklenen bir sonuçtur. Artan çözünmüş katı madde konsantrasyonu da polimer çözeltisi viskozitesinin artışına yol açmaktadır. Çözelti viskozitesi ise nanofiber morfolojisini doğrudan etkilemektedir [28]. Bu sebeple, viskozite sonuçlarının değerlendirilmesi önem teşkil etmektedir.



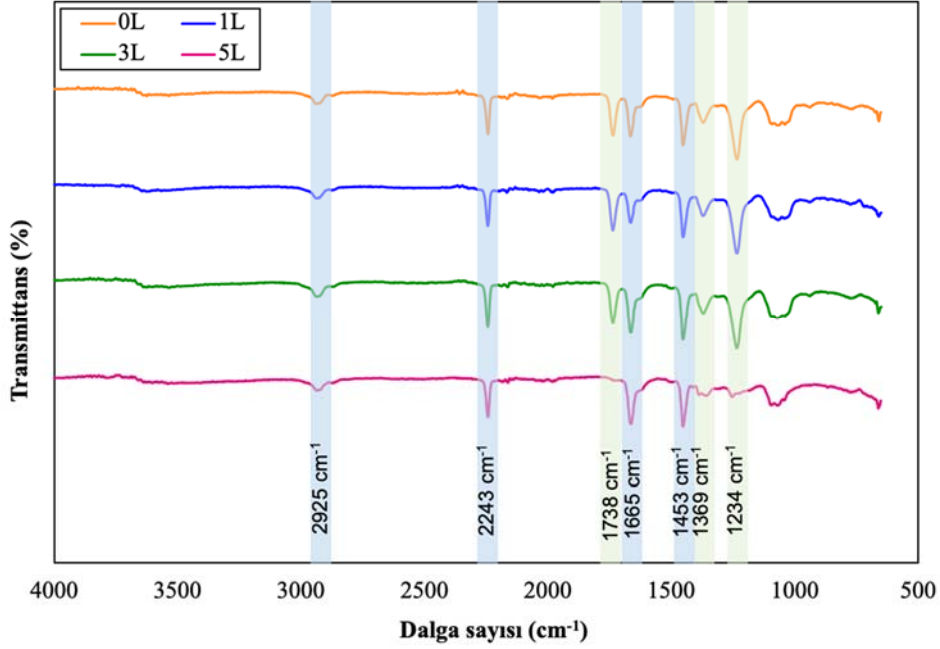
Şekil 3. Farklı oranlarda *Lycopodium* içeren polimer çözeltilerinin viskozite ölçümleri

Şekil 3'te dört farklı polimer çözeltisinin viskoziteleri görülmektedir. Bitki özütü katkısız çözücü ile hazırlanan çözeltinin (0L) viskozitesi 0,87 Pa.s olarak ölçülmüştür. Nasouri vd., %12 PAN polimerini DMF içerisinde çözerek hazırladıkları çözeltide 0,67 Pa.s viskozite değeri ile benzer mertebede sonuç elde etmişlerdir [29]. Bitki özütü katkılı çözücülerin kullanılması ile beraber 1L, 3L ve 5L çözeltileri için viskoziteler sırasıyla 0,89; 0,95 ve 1,3 Pa.s olarak gözlenmiştir. Bu sonuçlar, artan bitki konsantrasyonunun polimer viskozitesini arttırdığını doğrulamaktadır. Buradan çıkan sonuca göre bitki konsantrasyonunun membran morfolojisini etkileyeceğinden, bitki konsantrasyonu optimizasyonu oldukça önem taşıyan bir parametre konumundadır.

#### 3.2. Membran Karakterizasyonu

Saf PAN ve *Lycopodium* özütü katkılı PAN nanolif membranların kızılötesi emilim spektrumlarını karşılaştırmak için FT-IR analizi yapılmıştır. 650 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  aralığında yapılan analizlerin sonucu Şekil 4'te gösterilmektedir. PAN nanolif membranların düzgün bir şekilde sentezlediğini gösteren karakteristik pik, 2243  $\text{cm}^{-1}$ 'de ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ) nitril bağı olup 2925 $\text{cm}^{-1}$ , 1453 $\text{cm}^{-1}$  ve 1369  $\text{cm}^{-1}$ 'deki bantlar PAN'in metilen ( $-\text{CH}_2$ ) grubundaki farklı titreşimleri göstermektedir [30, 31]. Üretilen tüm nanolif membranlarda 2243  $\text{cm}^{-1}$  nitril piki gözlenmiştir. *Lycopodium* konsantrasyonunun artışına bağlı olarak nitril pikinde bir değişim gözlenmemiştir. 1L ve 3L kodlu membranlar ile saf PAN membranlarında gözlenen pikler aynı olmakla birlikte 5L kodlu membranın yani *Lycopodium* özütünün en yüksek noktada olduğu membranın FT-IR piklerinden 1738  $\text{cm}^{-1}$  ve 1234  $\text{cm}^{-1}$  de kayıplar gözlenmektedir. Bu pikler sırasıyla C=O (ester) ve C-O (alkil aril eter) yapılarına işaret etmektedir. Stabilizasyon sırasında PAN nanoliflerinin kimyasal yapısına

oksijenin dahil edilerek karbonil, eter ve hidroksil gruplarının oluştuğu kabul edilmektedir [30]. Bu pikler oksijen bağlarını temsil ettiğinden, 5L membranında kaybolmaları, oksijen nanolif kimyasal yapısına giriş yapamadığını göstermektedir. Bu sonuç, bir önceki bölümde açıklanan viskozite artışı ile bağdaştırılmıştır. En yüksek polimer çözeltisi viskozitesinin gözleendiği 5L kodlu nanolif membranında, elektroegirme ile üretim esnasında nanolif bünyesine oksijen girişi engellenmiş ve böylece bahsi geçen piklerin FT-IR da gözlenmemesine yol açmıştır.



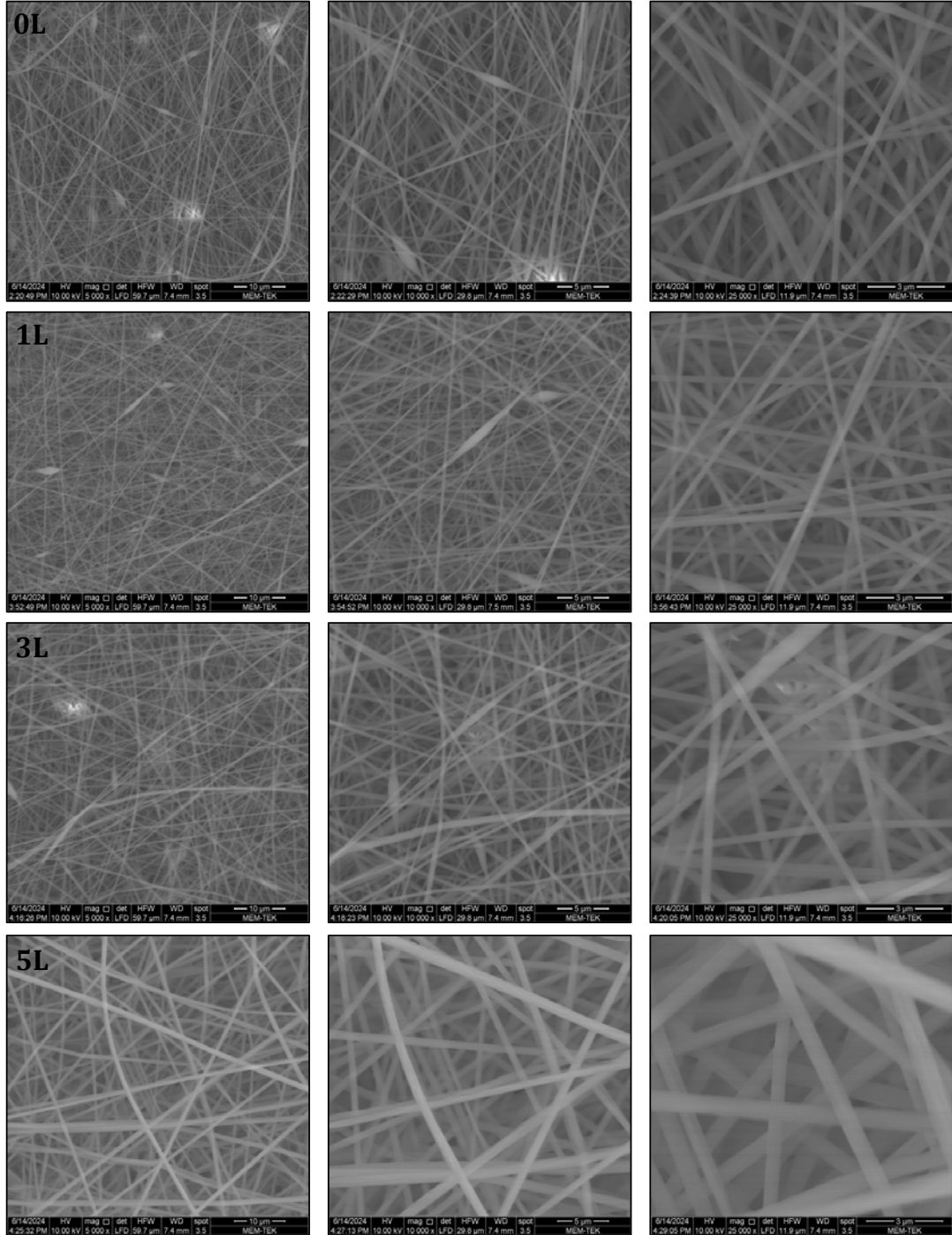
Şekil 4. Farklı oranlarda *Lycopodium* içeren membranlara ait FT-IR spektrumları

Üretilen nanolif membranların yapılarını incelemek ve nanolif kalınlıklarını ölçebilecek görüntü elde etmek için üç farklı büyütme oranında SEM görüntüleri çekilmiştir. Şekil 5'te saf PAN (0L) ve üç farklı konsantrasyonda *Lycopodium* özütü katkılı PAN (1L, 3L ve 5L) nanolif membranların 5000x, 10000x ve 25000x büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri verilmiştir. *Lycopodium* özütlemesi işlemindeki konsantrasyonun artışına bağlı olarak nanolif kalınlıklarında artış gözlenmiştir. 0L, 1L ve 3L kodlu membranlarda ayrıca baloncuk yapıları gözlemlenirken 5L kodlu membranda bu baloncuk yapıları oluşmamıştır. Bunun sebebi, *Lycopodium* özütlemesi sırasında daha fazla çözünmüş maddenin polimer çözeltisi matrisine dahil olmasıdır. Seçici bir özütleme işlemi olmadığından fenolik maddeler ile beraber bitki bünyesindeki diğer mineraller ve tuzlar da polimer çözeltisine dahil edilmiştir. 2020 yılında yapılan bir çalışmada nanolif membran üretimindeki baloncuk yapılarını bastırmak için, polimer çözeltisine tuz ilave edilmesi gerektiği raporlanmıştır [32].

SEM görüntülerinden, polimer çözeltisi viskozitesinin membran morfolojisini doğrudan etkilediği sonucu net bir şekilde görülmektedir. Özellikle 5L membranına ait elektron mikroskobu görüntüleri incelendiğinde nanoliflerin daha bantsı yapıda olduğu görülmektedir. Diğer membranlardaki nanoliflerin yapısı ise silindirik görünümündedir. 5L membranındaki bantsı yapının gözlenmesi de yine artan polimer çözeltisinin başka bir sonucudur. Stepanyan ve çalışmaları arkadaşlarının 2016 yılında yayınlanan çalışmasında nanoliflerin çapları deneysel çalışmalar ile beraber matematiksel olarak ifade edilmiştir ve elde ettikleri sonuç, bu çalışmanın sonucu ile örtüşmektedir. Çözelti viskozitesinin 3000 mPa ve altında olması durumunda düzgün silindirik yapıda nanolifler elde edilmişken, viskozitenin 3000 mPa değerinin üzerine çıkmasıyla silindirik yapı yerine daha bantsı yapıda nanoliflerin elde edildiği raporlanmıştır [33].

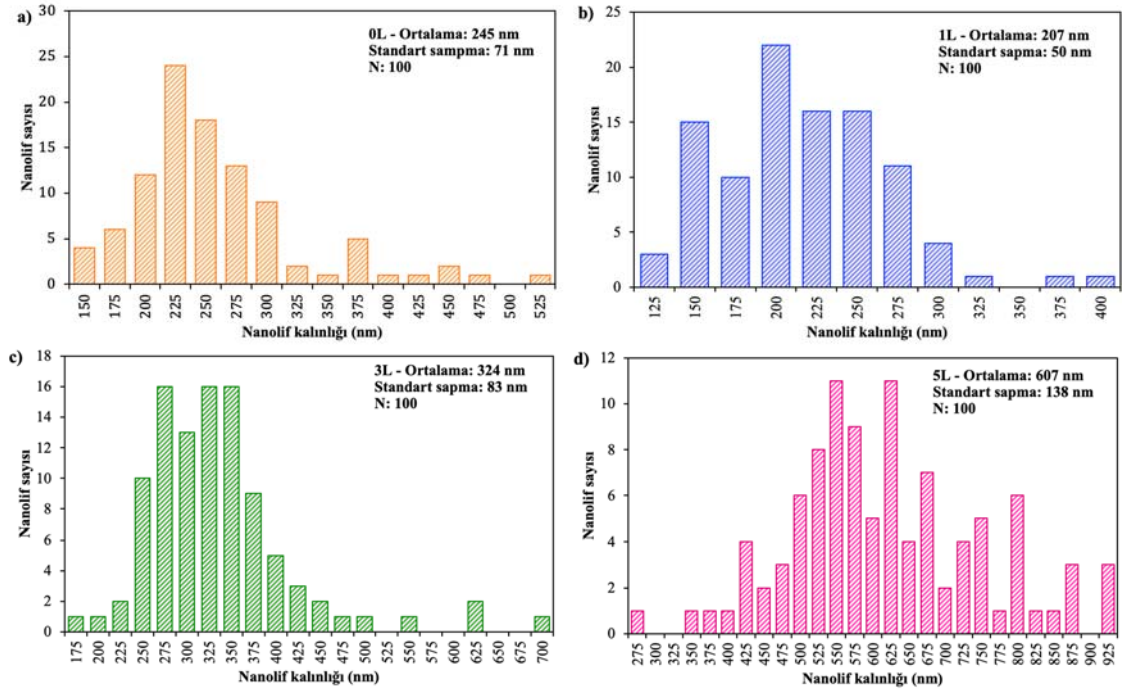
Elektron mikroskobundan elde edilen nanolif yüzey görüntülerini daha detaylı incelemek için ImageJ programı kullanılmıştır. Şekil 5'te orta sütunda yer alan 5 µm ölçekli her bir membrana ait SEM görüntüsünden 100 farklı nanolif kalınlığı ölçülmüş ve nanolif kalınlık dağılım grafikleri hazırlanmıştır. Şekil 6'da dört farklı membrana ait nanolif kalınlık dağılımları, ortalama nanolif kalınlığı ile standart sapma değerleri görülmektedir. 0L, 1L, 3L ve 5L membranları için elde edilen ortalama nanolif kalınlıkları sırası ile 245 ± 71 nm, 207 ± 50 nm, 324 ± 83 nm ve 607 ± 138 nm'dir. 0L ve 1L nanolif kalınlıkları birbirine

oldukça yakın olup, nanolif kalınlıkları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. 3L membranında ise 0L membranına kıyasla ortalama nanolif kalınlığı %32 artış göstermiş olmakla beraber kabul edilebilir bir kalınlıktır. Öte yandan 5L membranına ait nanolif kalınlığı dağılımına bakıldığında hem nanolif çaplarının daha geniş bir aralığa yayıldığı (275 - 925 nm) hem de ortalama nanolif kalınlığının 0L membranına kıyasla yaklaşık 3 kat arttığı görülmektedir. Bu kalınlık artışı esnasında, silindirik yapıda oluşması gereken nanoliflerin artan viskoziteye bağlı olarak üretim esnasında gerilerek yassılaştırılması ve bantı bir form kazanmasından kaynaklanmaktadır. Literatürde PAN ile nanolif üreten bir çalışmada polimer konsantrasyonunun %6'dan %12'ye yükselmesiyle elde edilen viskozite artışının bir sonucu olarak ortalama nanolif kalınlığının yaklaşık beş kat arttığı gözlenmiştir [34].



Şekil 5. Farklı oranlarda *Lycopodium* içeren nanolif membranlarına ait yüzey SEM görüntüleri (soldan sağa 5000x, 10000x ve 25000x büyütme)

Buraya kadar yapılan karakterizasyon çalışmalarından elde edilen ortak sonuç, *Lycopodium* bitki özütünün doğrudan polimer çözücü solventinde %3 oranına kadar özütlenmesi ile başarılı bir şekilde nanolif membranlarının elde edilebildiği, ancak bitki konsantrasyonunun %5'e yükselmesi ile hem kimyasal bağlarda hem de membran morfolojisinde ciddi farklılaşmalar gerçekleştiği görülmüştür. Dolayısıyla, *Lycopodium* özütlerinin polimerik nanolif membran üretiminde bitki konsantrasyonunun optimizasyonunun yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Mevcut bitki konsantrasyonu çalışma aralığında (%0 - %5) optimum membranın 3L (%3 *Lycopodium* özütü içeren) olarak seçilmiştir. Konsantrasyonun daha fazla artmasıyla membran morfolojisi bozulmaktadır. Dolayısıyla özütlenme işleminde *Lycopodium* konsantrasyonu daha fazla arttırılmamalıdır.



Şekil 6. Farklı oranlarda *Lycopodium* içeren membranların nanolif kalınlık dağılımları

### 3.3. Antimikrobiyal Performans

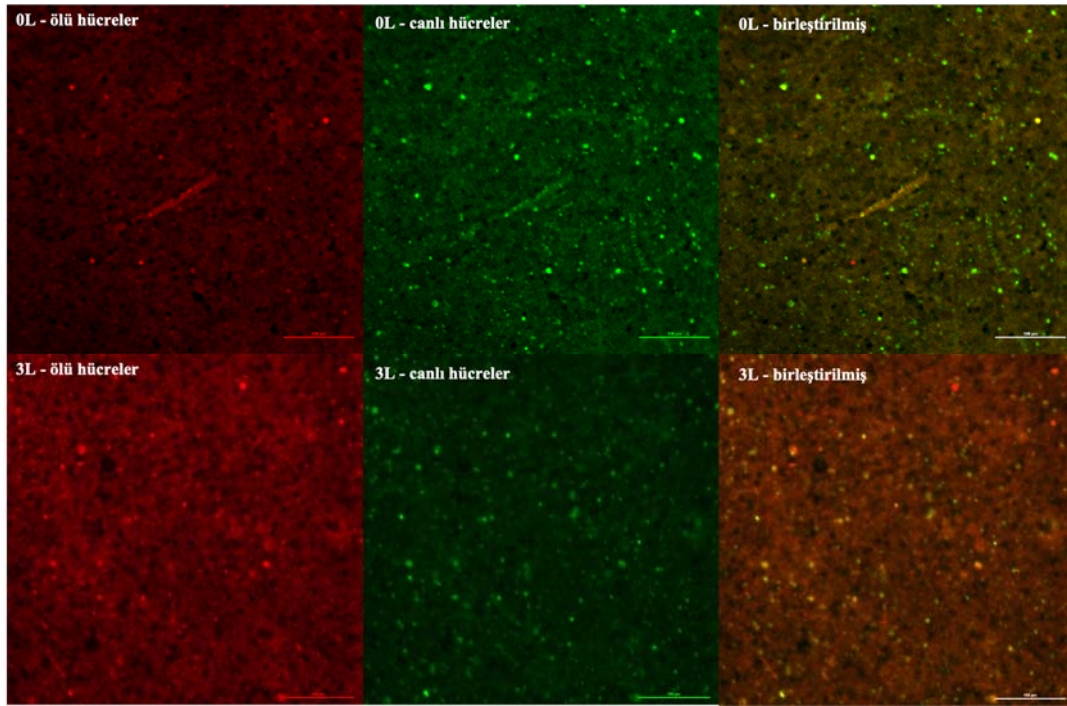
Üretilen polimerik nanolif membranların karakterizasyon testlerinden sonra, çalışmanın esas amacı olan antimikrobiyal performansları test edilmiştir. Şekil 7'de saf (0L) ve optimum olarak belirlenen 3L membranlarından 10 mL 8000 mg/L aktif çamur süzölmüş ve 48 saat boyunca inkübe edilmiş membranların CLSM görüntüleri verilmiştir. Kırmızı emisyon veren görüntüler (sol sütun) ölü hücreleri, yeşil emisyon veren görüntüler (orta sütun) canlı hücreleri temsil etmektedir. Sağ sütunda ise ölü ve canlı hücrelerin beraber gösterildiği görüntüler mevcuttur. Membranların antimikrobiyal performanslarını belirlemek üzere CLSM görüntüleri ImageJ programında işlenerek ölü ve canlı hücre sayımları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra canlı/ölü hücre oranları hesaplanmıştır. 0L membranı için canlı/ölü hücre oranı 0,9 iken, 3L membranında bu değer dokuz kat düşerek 0,1 olarak hesaplanmıştır. Yani 3L membranında canlı hücre sayısı oldukça azalmış ve ölü hücre sayısı artış göstermiştir. Dolayısıyla, *Lycopodium* bitkisi bünyesinde bulunan fenolik bileşiklerin başarılı bir şekilde nanolif yapısına kazandırıldığı ve antimikrobiyal etkisini gösterdiği kanıtlanmıştır. Bu sonuç, membran biyoreaktör gibi yaygın olarak biyolojik atıksu arıtımında kullanılan membranların tıkanma eğilimini azaltmak için umut vaat etmektedir. Antimikrobiyal etkisi ile membran yüzeyine tutunan mikroorganizmaların canlılığını koruma oranının azalması ile biyofilm oluşumu engellenecek ve sonuç olarak daha az tıkanma gerçekleşecektir. Bu sayede membranlarda geri yıkama ve kimyasal yıkama sıklığı azalacaktır. Başka bir sonucu ise daha az tıkanma sebebiyle membranların işletme maliyeti azalacaktır. Daha az kimyasal yıkama yapılması ile membran ömrünün uzaması da beklenen sonuçlardan bir diğeridir.

Literatürdeki nanopartikül katkılı antimikrobiyal membran performansları incelendiğinde, *Lycopodium* özütünün karşılaştırılabilir antimikrobiyal özellikler gösterdiği gözlemlenmiştir. Örneğin, AgNP katkılı ters



osmoz polimerik membranlarının antimikrobiyal özelliklerinin araştırıldığı bir makalede, katkısız membrana kıyasla yüzeydeki canlı bakteri sayısında %75'lik bir tespit edilmiştir [35]. Benzer şekilde, başka bir çalışmada grafen oksit katkılı ileri osmoz membranlarındaki canlı bakteri sayısının kontrol membranlarına kıyasla %92'den %62'ye düştüğü gözlenmiştir [36].

Bu çalışmada, membran yüzeyi modifikasyonu ve antimikrobiyal nanopartiküllerin sentezi gibi ek kimyasallar ve işlemler ile su bazlı bitki ekstraksiyonu ve ardından buharlaştırma gibi ilave bir şekilde yoğun enerji tüketen işlemlere gerek kalmadan membranlara antimikrobiyal özellikler başarılı bir şekilde kazandırılmıştır. Sonuç olarak *Lycopodium* bitkisinin DMF çözücüsüyle 24 saat boyunca teması ve ardından basit bir katı-sıvı ayrımı işlemi, membranlara antimikrobiyal özellikler kazandırmak için yeterli bulunmuştur. Geliştirilen yöntem hem ekonomik hem de ölçeklenebilir bir membran üretim yöntemi niteliğindedir.



Şekil 7. Aktif çamur filtrelenmiş membranların CLSM görüntüleri

#### 4. SONUÇLAR

Bu çalışmada, tıbbi bitkiler arasında yer alan *Lycopodium*'un içerisinde barındırdığı fenolik bileşiklerden faydalanarak doğrudan özütlenme yöntemi ile basit, çevreci, uygulanabilir, büyük ölçekte üretilebilir ve ekonomik bir antimikrobiyal nanolif membran üretimi gerçekleştirilmiştir. Doğrudan özütlenme yöntemi ile tıbbi bitki, polimer çözücüsü ile oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmış ve süzülerek katı kısmı ayrılmıştır. Böylece polimer çözücüsü olarak kullanılan DMF içerisine bitki özütü entegre edilmiştir.

Bitki özütünün kullanıldığı mevcut yöntemlerde, bitki öncelikle su, etanol ya da aseton gibi çözücülerde özütlendikten sonra çözücünün evaporasyonla uçurulması işlemi gerçekleştirilmektedir. Evaporasyon ise oldukça enerji yoğun bir süreçtir ve hem üretim maliyetini artırır hem de büyük ölçekte üretimi daha zor hale getirebilir. Öte yandan antimikrobiyal nanolif üretiminde kullanılan bir diğer strateji, AgNP, ZnO ve ZIF-8 gibi çeşitli nanomalzemelerin kullanılmasıdır. Bu nanomalzemelerin sentezi için birçok ilave kimyasal ve proses gerekmektedir, gerçek ölçekte üretimi de oldukça maliyetlidir. Dahası, bu nanomalzemeler zaman içerisinde membran bünyesinden sıyrılarak çevresel ortama yayılmaktadır. Dolayısıyla hem çevreci hem de gerçek ölçekte üretilebilir yeni bir nanolif membran üretim yönteminin araştırılması ve geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Bu makale kapsamında yapılan çalışmada ağırlıkça %12'lik PAN polimeri ile farklı konsantrasyonlarda *Lycopodium* özütü içeren DMF solventi ile polimer çözeltileri hazırlanarak elektroçekim yöntemi ile

nanolif membranlar üretilmiştir. %0 (0L, kontrol membranı), %1 (1L), %3 (3L) ve %5 (5L) olacak şekilde dört farklı membran üretilerek karakterizasyon testleri yürütülmüştür. Bitki özütlemeye konsantrasyon daha fazla arttırılamamıştır çünkü özütleme işleminde bitki konsantrasyonunun artması ile polimer çözeltisi viskozitesinde artış gözlenmiştir. Viskozite artışı nanolif membran üretimini doğrudan etkileyen bir yöntemdir. Nanolif membranların yüzey morfolojileri incelendiği SEM görüntülerinde, bitki konsantrasyonunun artmasına paralel olarak boncuksu yapıların azaldığı, öte yandan nanolif kalınlıklarının arttığı ve en yüksek konsantrasyonda nanoliflerin daha çok bantsı yapılarla sahip olduğu gözlenmiştir. Nanolif kalınlık dağılımları incelendiğinde ise 0L ve 1L membranları arasında anlamlı bir fark tespit edilmemişken, 3L membranında ortalama 245 nm'den 324 nm'ye yükselmiştir. 5L membranında ise 607 nm'ye yükselerek kontrol membranına göre yaklaşık üç katına çıkmıştır. FT-IR sonuçlarına bakıldığında tüm membranlarda PAN karakteristik piki 2243  $\text{cm}^{-1}$ 'de ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ) nitril bağı gözlemlenirken, 5L membranında 1738  $\text{cm}^{-1}$  ve 1234  $\text{cm}^{-1}$  pikleri görülmemiştir. Bu pikler oksijen bağlarını temsil ettiğinden, 5L membranında kaybolmaları, oksijenin nanolif kimyasal yapısına giriş yapamadığını göstermektedir.

Buraya kadar yapılan çalışmalarda nanolif morfolojisi bozulmadan *Lycopodium* bitki özütü konsantrasyonunun en fazla %3'e kadar arttırılabildiği sonucuna varılmıştır. Bu noktadan sonra çalışmanın esas amacı olan nanolif membranların antimikrobiyal performansını incelenmiştir. Aktif çamur süzölmüş 0L ve 3L membranlarının CLSM görüntülerinde canlı ve ölü hücre sayımları yapılmıştır. 0L membranında canlı/ölü hücre oranı 0,9 olarak hesaplanmış iken 3L membranında bu değer dokuz kat düşerek 0,1 olmuştur. Bu sonuç 3L membranında başarılı bir şekilde antimikrobiyal etkilerin elde edildiğini göstermektedir. Ayrıca, literatürdeki mevcut antimikrobiyal membranlardan elde edilen performanslar ile karşılaştırılabilir düzeydedir.

Sonuç olarak, daha ekonomik ve çevreci bir yöntem ile antimikrobiyal nanolif membran üretimi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmadan elde edilecek bir diğer fayda, atıksu arıtımında biyofilm oluşumundan kaynaklanan membran tıkanmasının azalması ve dolayısı ile işletme maliyetinin azaltılmasıdır. *Lycopodium* bitkisinin ülkemizde yetişmesi ayrıca bir fırsat niteliğindedir. Sonraki çalışmalarda, membranın antimikrobiyal stabilitesini koruma süresi üzerindeki çalışmalar özellikle membran biyoreaktör uygulamaları ile devam edecektir. Yine antimikrobiyal nanomalzeme katkılı membranların performanslarının karşılaştırılması da planlanan çalışmalar arasındadır.

## 5. TEŞEKKÜR

Bu çalışma İstanbul Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: MAB-2023-44539.

## 6. KAYNAKLAR

1. Xue, J., Wu, T., Dai, Y., Xia, Y., 2019. Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications. *Chemical Reviews*, 119(8), 5298-5415.
2. Shi, R., Ye, J., Li, W., Zhang, J., Li, J., Wu, C., Zhang, L., 2019. Infection-responsive electrospun nanofiber mat for antibacterial guided tissue regeneration membrane. *Materials Science and Engineering: C*, 100, 523-534.
3. Xue, C., Hsu, K.M., Chiu, C.Y., Chang, Y.K., Ng, I.S., 2021. Fabrication of bio-based polyamide 56 and antibacterial nanofiber membrane from cadaverine. *Chemosphere*, 266, 128967.
4. Mousa, H.M., Hamdy, M., Yassin, M.A., Seleman, M.M.E.S., Abdel-Jaber, G.T., 2022. Characterization of nanofiber composite membrane for high water flux and antibacterial properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 651, 129655.
5. Shalaby, T., Hamad, H., Ibrahim, E., Mahmoud, O., Al-Oufy, A., 2018. Electrospun nanofibers hybrid composites membranes for highly efficient antibacterial activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 354-364.
6. Meng, F., Chae, S.R., Drews, A., Kraume, M., Shin, H.S., Yang, F., 2009. Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): Membrane fouling and membrane material. *Water Research*, 43(6), 1489-1512.
7. Li, M., Wang, D., Xiao, R., Sun, G., Zhao, Q., Li, H., 2013. A novel high flux poly (trimethylene terephthalate) nanofiber membrane for microfiltration media. *Separation and Purification Technology*, 116, 199-205.

8. HMTShirazi, R., Mohammadi, T., Asadi, A.A., Tofighy, M.A., 2022. Electrospun nanofiber affinity membranes for water treatment applications: A review. *Journal of Water Process Engineering*, 47, 102795.
9. Tian, J.Y., Ernst, M., Cui, F., Jekel, M., 2013. Correlations of relevant membrane foulants with UF membrane fouling in different waters. *Water Research*, 47(3), 1218-1228.
10. Gao, Y., Qin, J., Wang, Z., Østerhus, S.W., 2019. Backpulsing technology applied in MF and UF processes for membrane fouling mitigation: A review. *Journal of Membrane Science*, 587, 117136.
11. Yu, Y., Zhou, Z., Huang, G., Cheng, H., Han, L., Zhao, S., Meng, F., 2022. Purifying water with silver nanoparticles (AgNPs)-incorporated membranes: Recent advancements and critical challenges. *Water Research*, 222, 118901.
12. Preda, N., Costas, A., Beregoi, M., Apostol, N., Kuncser, A., Curutiu, C., Enculescu, I., 2020. Functionalization of eggshell membranes with CuO–ZnO based p–n junctions for visible light induced antibacterial activity against *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 10(1), 20960.
13. Padovani, G.S., Sanches, A.O., Moura Aouada, M.R., Malmonge, L.F., de Paula, F.R., 2024. Photocatalytic and antimicrobial efficacy of PVDF/TiO<sub>2</sub> membranes fabricated by solution blow spinning. *Journal of Applied Polymer Science*, 141(1), e54761.
14. Silva, M.A., Felgueiras, H.P., De Amorim, M.T.P., 2020. Carbon based membranes with modified properties: Thermal, morphological, mechanical and antimicrobial. *Cellulose*, 27, 1497-1516.
15. Luo, D., Wang, C., Tong, Y., Liu, C., Xiao, Y., Zhu, Z., Wang, Y., 2020. An NIF-doped ZIF-8 hybrid membrane for continuous antimicrobial treatment. *RSC Advances*, 10(13), 7360-7367.
16. Geng, Q., Dong, S., Li, Y., Wu, H., Yang, X., Ning, X., Yuan, D., 2022. High-performance photoinduced antimicrobial membrane toward efficient PM<sub>2.5</sub>-0.3 capture and oil-water separation. *Separation and Purification Technology*, 284, 120267.
17. Jackson, J.C., Camargos, C.H., Liu, C., Martinez, D.S., Paula, A.J., Rezende, C.A., Faria, A.F., 2024. Antimicrobial activity of thin-film composite membranes functionalized with cellulose nanocrystals and silver nanoparticles via one-pot deposition and layer-by-layer assembly. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 10(3), 639-651.
18. Homaeigohar, S., Boccaccini, A.R., 2020. Antibacterial biohybrid nanofibers for wound dressings. *Acta biomaterialia*, 107, 25-49.
19. Chouhan, D., Chakraborty, B., Nandi, S.K., Mandal, B.B., 2017. Role of non-mulberry silk fibroin in deposition and regulation of extracellular matrix towards accelerated wound healing. *Acta biomaterialia*, 48, 157-174.
20. Paskiabi, F.A., Bonakdar, S., Shokrgozar, M.A., Imani, M., Jahanshahi, Z., Shams-Ghahfarokhi, M., Razzaghi-Abyaneh, M., 2017. Terbinafine-loaded wound dressing for chronic superficial fungal infections. *Materials Science and Engineering: C*, 73, 130-136.
21. Bulman, S.E., Tronci, G., Goswami, P., Carr, C., Russell, S.J., 2017. Antibacterial properties of nonwoven wound dressings coated with Manuka honey or methylglyoxal. *Materials*, 10(8), 954.
22. Liakos, I., Rizzello, L., Hajiali, H., Brunetti, V., Carzino, R., Pompa, P.P., Mele, E., 2015. Fibrous wound dressings encapsulating essential oils as natural antimicrobial agents. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(8), 1583-1589.
23. Shan, Y.H., Peng, L.H., Liu, X., Chen, X., Xiong, J., Gao, J.Q., 2015. Silk fibroin/gelatin electrospun nanofibrous dressing functionalized with astragaloside IV induces healing and anti-scar effects on burn wound. *International Journal of Pharmaceutics*, 479(2), 291-301.
24. Banerjee, J., Biswas, S., Madhu, N.R., Karmakar, S.R., Biswas, S.J., 2014. A better understanding of pharmacological activities and uses of phytochemicals of *Lycopodium clavatum*: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(1), 207-210.
25. Orhan, I., Özçelik, B., Aslan, S., Kartal, M., Karaoglu, T., Şener, B., Choudhary, M.I., 2007. Antioxidant and antimicrobial actions of the clubmoss *Lycopodium clavatum* L.. *Phytochemistry Reviews*, 6, 189-196.
26. Dymek, A., Widelski, J., Wojtanowski, K.K., Płoszaj, P., Zhuravchak, R., Mroczek, T., 2021. Optimization of pressurized liquid extraction of Lycopodiaceae alkaloids obtained from two *Lycopodium* species. *Molecules*, 26(6), 1626.
27. Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A.H., Khalel, K.I., 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827-831.
28. Wang, C., Chien, H.S., Hsu, C.H., Wang, Y.C., Wang, C.T., Lu, H.A., 2007. Electrospinning of polyacrylonitrile solutions at elevated temperatures. *Macromolecules*, 40(22), 7973-7983.

29. Nasouri, K., Shoushtari, A.M., Kafrou, A., 2012. Investigation of polyacrylonitrile electrospun nanofibres morphology as a function of polymer concentration, viscosity and Berry number. *Micro & Nano Letters*, 7(5), 423-426.
30. Wu, M., Wang, Q., Li, K., Wu, Y., Liu, H., 2012. Optimization of stabilization conditions for electrospun polyacrylonitrile nanofibers. *Polymer Degradation and Stability*, 97(8), 1511-1519.
31. Zhang, C., Yang, Q., Zhan, N., Sun, L., Wang, H., Song, Y., Li, Y., 2010. Silver nanoparticles grown on the surface of PAN nanofiber: Preparation, characterization and catalytic performance. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 362(1-3), 58-64.
32. Higashi, S., Hirai, T., Matsubara, M., Yoshida, H., Beniya, A., 2020. Dynamic viscosity recovery of electrospinning solution for stabilizing elongated ultrafine polymer nanofiber by TEMPO-CNF. *Scientific Reports*, 10(1), 13427.
33. Stepanyan, R., Subbotin, A.V., Cuperus, L., Boonen, P., Dorsch, M., Oosterlinck, F., Bulters, M.J.H., 2016. Nanofiber diameter in electrospinning of polymer solutions: Model and experiment. *Polymer*, 97, 428-439.
34. Gu, S.Y., Ren, J., Vancso, G.J., 2005. Process optimization and empirical modeling for electrospun polyacrylonitrile (PAN) nanofiber precursor of carbon nanofibers. *European Polymer Journal*, 41(11), 2559-2568.
35. Ben-Sasson, M., Lu, X., Bar-Zeev, E., Zodrow, K.R., Nejati, S., Qi, G., Elimelech, M., 2014. In situ formation of silver nanoparticles on thin-film composite reverse osmosis membranes for biofouling mitigation. *Water Research*, 62, 260-270.
36. Perreault, F., Jaramillo, H., Xie, M., Ude, M., Nghiem, L.D., Elimelech, M., 2016. Biofouling mitigation in forward osmosis using graphene oxide functionalized thin-film composite membranes. *Environmental Science & Technology*, 50(11), 5840-5848.