

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**İÇ ORTAM HAVASINDAN BİYOAEROSOL GİDERİMİ İÇİN ENZİM
KATKILI ANTİBAKTERİYEL NANOLİF FİLTRELERİN GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burçin BAŞSAHİNOĞLU

Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı

Çevre Bilimleri Mühendisliği ve Yönetimi

TEMMUZ 2023

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**İÇ ORTAM HAVASINDAN BİYOAEROSOL GİDERİMİ İÇİN ENZİM
KATKILI ANTİBAKTERİYEL NANOLİF FİLTRELERİN GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burçin BAŞSAHİNOĞLU

(501201710)

Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı

Çevre Bilimleri Mühendisliği ve Yönetimi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Derya Yüksel İMER

TEMMUZ 2023

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**DEVELOPMENT OF ENZYME-DOPED ANTIBACTERIAL NANOFIBER
FILTERS FOR BIOAEROSOL REMOVAL FROM INDOOR AIR**

MASTER'S THESIS

**Burçin BAŞSAHİNOĞLU
(501201710)**

Environmental Engineering Major Sciences

Environmental Sciences, Engineering and Management

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Derya Yüksel İMER

JULY 2023





Berkay, kedi Beyaz ve Aileme,



ÖNSÖZ

Yüksek lisans programım ve tez çalışmam boyunca araştırmalarımın yürütülmesi, deneylerin tasarlanması, sürecin yönetilmesi, deneylerin aksamaması için gerekli malzemelerin temin edilmesini sağlayan ve her zaman değerli bilgileriyle desteğini esirgemeyen danışmanım Doç.Dr. Derya Yüksel İmer'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmamda araştırmalarımın yürütülmesi ve deneylerin tasarlanması sürecinde her zaman destek olan, değerli vaktini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini aktaran fahri danışmanım Dr. Tülay Ergon Can'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda değerli bilgilerini benimle paylaşan, yol gösteren ve desteğini eksik etmeyen sevgili Prof.Dr. C. Elif Özen Cansoy'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarıma ve laboratuvarındaki desteklerinden dolayı sevgili Prof.Dr. Kadir Alp'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımı yürütürken yardımlarını eksik etmeyen, tez sürecimi kolaylaştıran ve destek olan değerli arkadaşlarım Ayşe Güventürk, Sama Ali Qahtan Al-Mutwalli, Esra Büyükkada Kesici, Tuğba Toplu, Mustafa Burak Hız ve Mustafa Taher'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarını gerçekleştirdiğim İTÜ Çevre Mühendisliği laboratuvarı ve çalışanlarına, destek tabakasının temini için MOGUL, GNP temini için NANOGRAFEN Co., SEM ve FTIR analizi için Elifnur Gezmiş Yavuz, *E.coli* DH10B bakteri şuşu temini için Prof.Dr. Bülent Bozdoğan, CLSM analizi için İstanbul Medipol Üniversitesinden Mehmet Şerif Aydın'a sonsuz teşekkür ederim.

Maddi manevi destekleri için annem Emsal, babam Haydar, abim Burak Başşahinoğlu'na teşekkür ederim. Manevi destekleri için sevgili Aysena Özcan, Berkay Aytek ve kedi Beyaz'a teşekkür ederim.

TÜBİTAK 120N017 numaralı proje kapsamında tez çalışmalarını gerçekleştirdim ve sağlanan maddi destekler için teşekkür ederim.

Haziran 2023

Burçin BAŞŞAHİNOĞLU
Çevre Mühendisi

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
SEMBOLLER	xv
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xvii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Tezin Amacı	1
1.2 Tezin Anlam ve Önemi	1
2. LİTERATÜR.....	3
2.1 İç Ortam Hava Kalitesi Önemi ve Standartları	3
2.2 İç Ortam Havası ve Biyoaerosoller	4
2.3 Elektroğirme Yöntemi ile Üretilmiş Nanolifler ve Uygulamaları.....	7
2.4 Grafen Nanoplatelet ve Uygulamaları	11
2.5 Glukoz Oksidaz (GOx) Enzimi ve Uygulamaları	13
3. MATERYAL METOT	19
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler	19
3.2 Nanolif Filtre Üretimi için Saf Polimer ve Nanokompozit Çözeltilerinin Hazırlanması.....	20
3.2.1 Saf PAN polimer çözeltisinin hazırlanması	20
3.2.2 PAN-GNP nanokompozit çözeltisinin hazırlanması.....	21
3.3 Nanolif Filtrelerin Elektroğirme Yöntemi ile Üretimi	22
3.4 Nanolif Filtrelere GOx Enzimi İmmobilizasyon Süreci	25
3.5 Nanolif Filtrelerin Karakterizasyonu ve Yapısal Analizleri	29
3.5.1 SEM analizi.....	29
3.5.2 FTIR analizi	30
3.6 Nanolif Filtrelerin Performansı	31
3.6.1 Su buharı geçirgenliği testi.....	31

3.7 Antibakteriyel Etkinlik Testleri.....	32
3.7.1 Biyoaerosol tutunum testi (Akış hücresi seti-1).....	39
3.7.2 Dinamik kontakt koşullarda antibakteriyel etkinlik testi	41
3.7.3 Agar difüzyon test yöntemi (Zon testi)	42
3.7.4 Bakteri kontakt testi	43
3.7.5 CLSM ile antibakteriyel etkinin tespiti	44
3.7.6 Biyoaerosol tutunum ve antibakteriyel etkinlik testi (Akış hücresi seti-2).....	46
4. SONUÇLAR	49
4.1 Nanolif Filtrelere GOx Enzimi İmmobilizasyon Değerlendirmesi	49
4.2 Nanolif Filtrelerin Karakterizasyon Sonuçları	51
4.2.1 SEM analizi sonuçlarının değerlendirilmesi	51
4.2.2 FTIR sonuçlarının değerlendirilmesi	54
4.3 Nanolif Filtrelerin Performans Sonuçları.....	55
4.3.1 Su buharı geçirgenliği sonuçları.....	55
4.4 Antibakteriyel Etkinlik Testleri Sonuçları	56
4.4.1 Biyoaerosol tutunum testi (Akış hücresi seti-1) sonuçları	57
4.4.2 Dinamik kontakt koşullarda antibakteriyel etkinlik testi sonuçları.....	58
4.4.3 Agar difüzyon test yöntemi (Zon testi) sonuçları.....	60
4.4.4 Bakteri kontakt testi sonuçları.....	61
4.4.5 CLSM ile antibakteriyel etkinin tespiti sonuçları	63
4.4.6 Biyoaerosol tutunum ve antibakteriyel etkinlik testi (Akış hücresi seti-2) sonuçları	64
5. GENEL DEĞERLENDİRME	67
6. KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	79

KISALTMALAR

ACGIH	: Amerikan Hükümet Endüstriyel Hijyenistleri Konferansı
AN	: Akrilonitril
ASHRAE	: Amerikan Isıtma, Soğutma ve Havalandırma Mühendisleri Derneği
ASTM	: Amerikan Test ve Materyalleri Topluluğu
BRI	: Bina İle İlgili Hastalık
BSA	: Sığır Serum Albümini
CEN	: Avrupa Standartlar Komitesi
CLSM	: Konfokal Lazer Taramalı Mikroskopi
CNC	: Selüloz Nanokristal
COVID-19	: Koronavirüs Hastalığı
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DMF	: Dimetilformamid
EPA	: Verimli Partikül Hava Filtresi
FTIR	: Fourier-transform Kızılötesi Spektroskopisi
GOx	: Glukoz Oksidaz
GNP	: Grafen Nanoplatelet
G6P	: Glukoz-6-fosfat
HEPA	: Yüksek Verimli Partikül Hava Filtresi
HRP	: Bayır Turpu Peroksidazı
HVAC	: Isıtma, Soğutma, Havalandırma ve İklimlendirme
ISO	: Uluslararası Standartlar Teşkilatı
LB	: Luria Bertani
MMA-DCPMI	: Metilmetakrilat-Diklorofenilmaleimid
PAN	: Poliakrilonitril
PA-6	: Poliamid 6
PDMS	: Polidimetilsiloksan
PEP	: Fosfoenolpiruvata
PET	: Polietilen Tereftalat

PI	: Poliimid
PLA	: Polilaktik Asit
PM	: Partikül Madde
PTS	: Şeker Fosfotransferaz Sistemi
PU	: Poliüretan
PVA	: Polivinil Alkol
PVDF	: Poliviniliden Florür
SARS	: Ağır Akut Solunum Yolu Yetersizliği Sendromu
SBS	: Hasta Bina Sendromu
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	: Termogravimetrik Analiz
TGA	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
ULPA	: Ultra Düşük Penetrasyonlu Hava Filtresi
UOB	: Uçucu Organik Bileşik
UV	: Ultraviyole
VB	: Viroblock
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
XPS	: X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi

SEMBOLLER

Ag	: Gümüş
cm	: Santimetre
CS	: Kitosan
dak	: Dakika
g	: Gram
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
kg	: Kilogram
kob	: Koloni oluşturan birim
kV	: Kilovoltaj
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
m³	: Metreküp
Mt	: Montmorillonite
N	: Normal
N₂	: Azot
nm	: Nanometre
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
sa	: Saat
sn	: Saniye
TiO₂	: Titanyum dioksit
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
°C	: Santigrat



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Biyoaerosollerin boyutları ve kaynakları (Gollakota vd., 2021).....	5
Çizelge 3.1 : Deneyleerde kullanılan kimyasal ve materyal adları, markaları ve kodları.	19
Çizelge 3.2 : Elektroeğirme parametreleri.....	23
Çizelge 3.3 : Saf PAN polimer çözeltisinden üretilmiş nanolif filtrelerin özellikleri ve isimlendirmeleri.	24
Çizelge 3.4 : PAN-GNP nanokompozit çözeltisinden üretilmiş nanolif filtrelerin özellikleri ve isimlendirmeleri.	24
Çizelge 3.5 : GOx enzim immobilizasyon tekniklerinin uygulaması.....	28
Çizelge 3.6 : Nanolif filtrenin biyoaerosol tutunumu ve antibakteriyel testleri.	39
Çizelge 3.7 : Nanolif filtrelerin dinamik kontakt koşullarda antibakteriyel etkinlik testi deney seti.	41
Çizelge 3.8 : Agar difüzyon test yöntemi (Zon testi) parametreleri.	43
Çizelge 3.9 : Nanolif filtre bakteri kontakt testi deney seti.	44
Çizelge 3.10 : Akış hücresi seti-2 parametreleri.....	47
Çizelge 4.1 : GOx enzimi bağlanmış nanolif filtrelerin OD660 ölçüm sonuçları.	49
Çizelge 4.2 : GOx enzimi bağlanmış nanolif filtrelerin immobilizasyon verim sonuçları.....	50
Çizelge 4.3 : GOx enzim immobilizasyon kayıp oranları.	50
Çizelge 4.4 : Nanolif filtrelerin SEM analizi ile elde edilen fiber çapları.	53
Çizelge 4.5 : Nanolif filtrelerin fiber çap dağılımları.	54
Çizelge 4.6 : Nanoliflerin su buharı geçirgenlik sonuçları.	55
Çizelge 4.7 : Elektroeğrilmiş nanolif filtrelerin su buharı geçirgenlik değerleri.....	56
Çizelge 4.8 : Biyoaerosol tutunum testi (akış hücresi seti-1) sonuçları.	58
Çizelge 4.9 : Dinamik kontakt koşullarda antibakteriyel etkinlik testi sonuçları.....	59
Çizelge 4.10 : Nanolif filtrelerin çevesinde oluşan antibakteriyel etkiye bağlı inhibisyon zonları.	61

Çizelge 4.11 : Bakteri kontakt testi uygulanan filtrelerin zamana göre bakteri sayım sonuçları.....	62
Çizelge 4.12 : Nanolif filtre numunelerinin CLSM görüntülerine göre bakteri canlılık sonuçları.....	63
Çizelge 4.13 : Nanolif filtrelerin gerçek hava ortamında bakteri tutunum verimleri (akış hücresi seti-2).....	64



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : Tez çalışmasının özet nanolif üretim şeması.....	2
Şekil 3.1 : Saf PAN çözelti hazırlama aşaması.....	21
Şekil 3.2 : PAN-GNP çözelti hazırlama aşaması.....	22
Şekil 3.3 : Inovenso NS plus model elektroğirme cihazı.....	22
Şekil 3.4 : Elektroğirme cihazı düzeneği ve parametreleri.....	24
Şekil 3.5 : Elektroğirilmiş PAN ve PAN-GNP nanolif filtreler.....	25
Şekil 3.6 : GOx enzim immobilizasyon prosesi.....	27
Şekil 3.7 : GOx immobilize filtreler.....	28
Şekil 3.8 : Philips XL30SFEG Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	29
Şekil 3.9 : Image J programı.....	30
Şekil 3.10 : OriginLab programı.....	30
Şekil 3.11 : Perkin Elmer Spectrum 100 spektrofotometre cihazı.....	30
Şekil 3.12 : ASTM E96 standardı ıslak kap yöntemi testi.....	31
Şekil 3.13 : Su buharı geçirgenliği deney seti.....	32
Şekil 3.14 : Aseptik koşullar için gerekli cihaz ve malzemeler.....	33
Şekil 3.15 : <i>E.coli</i> DH10B şuşu ve LB besiyeri.....	34
Şekil 3.16 : Deneylerde kullanılan yardımcı cihazlar.....	34
Şekil 3.17 : Seri dilüsyon deney seti.....	35
Şekil 3.18 : Sırasıyla <i>E.coli</i> DH10B bakterisinin çizgi ekim petri görüntüsü ve hazırlanan deney stokları.....	36
Şekil 3.19 : Sırasıyla santrifüj sonrası süpernatant, salin eklenmesi ve bakteri stoğu.....	37
Şekil 3.20 : Akış hücresi sistemi.....	37
Şekil 3.21 : Akış hücresi seti-1.....	40
Şekil 3.22 : Dinamik kontakt koşullarda antibakteriyel etkinlik testi deney tüpleri.....	42
Şekil 3.23 : Bakteri kontakt testi deney seti.....	44
Şekil 3.24 : Mikroskobik boyama ve görüntüleme yöntemi deney cihaz ve malzemeleri.....	45

Şekil 3.25 : Martin Krzywinski tarafından sunulan Image Color Summarizer.	45
Şekil 3.26 : Biyoaerosol tutunum ve antibakteriyel etkinlik testi deneyleri.....	47
Şekil 4.1 : Nanolif filtrelerin SEM görüntüleri ve fiber çaplarının Gauss dağılım grafikleri.....	52
Şekil 4.2 : Nanoliflere ait FTIR spektrumları.....	54
Şekil 4.3 : Nanolif filtrelerin çevresinde oluşan antibakteriyel etkiye bağlı inhibisyon zonları.	60
Şekil 4.4 : Bakteri kontakt testi uygulanan filtrelerin zamana göre bakteri log giderim grafiği.....	62
Şekil 4.5 : Renklendirilmiş CLSM görüntüleri.....	63
Şekil 4.6 : Nanolif filtrelerin gerçek hava ortamında bakteri log giderim grafiği (akış hücresi seti-2).....	65

İÇ ORTAM HAVASINDAN BİYOAEROSOL GİDERİMİ İÇİN ENZİM KATKILI ANTİBAKTERİYEL NANOLİF FİLTRELERİN GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Günümüzde insanlar vaktinin büyük bir kısmını iç mekanlarda geçirmektedirler. İşyerleri, okullar, toplu taşıma ulaşım araçları gibi iç mekanlarda taze hava sirkülasyonu azalmaktadır ve iç ortamda bulunan kirleticilerle temas oranı artmaktadır. İç ortam havasındaki biyoaerosollerin kolayca taşınması ve insanlarla temas etmesiyle birlikte iç ortam havasıyla alakalı astım, alerji, enfeksiyon gibi insan sağlığı üzerinde çeşitli rahatsızlıklar görülebilmektedir. Biyoaerosol, aerosol haline gelmiş hücrelere, virüslere, polenlere veya sporlara verilen genel isimdir. Biyoaerosollerin önemi, yaşanan COVID-19 pandemisiyle birlikte tüm dünyaca deneyimlenmiştir. İç ortamdaki partikül madde giderimi için yaygınlıkla filtrasyon sistemleri kullanılmış ve geliştirilmiştir fakat biyoaerosol giderimine özel filtre dizaynları, etki mekanizması ve filtre performansı arasındaki ilişkiler açısından uygulamalar ve çalışmalar kısıtlı kalmıştır. İç ortam hava kalitesi uygun filtre seçimi ile tasarlanmış sistemlerle iyileştirilebilir.

Bu tez çalışmasının konusu, sürdürülebilir filtrasyon performansı için biyoaerosol giderimi sağlayan nanolif yapıları yenilikçi bir antibakteriyel hava filtresi geliştirmektir. Antibakteriyel nanolif hava filtresi üretiminde, iki temel metodoloji uygulanmıştır (i) Ticari poliakrilonitril (PAN) polimerinin, grafen nanoplatelet (GNP) katkısı ile elektroçirme yöntemi ile üretimi ve (ii) Antibakteriyel özellik kazandırması hedeflenen glukoz oksidaz (GOx) enzimi için farklı immobilizasyon tekniklerinin uygulanması. Tez çalışması nanolif filtre üretimi, enzim immobilizasyonu, SEM, FTIR, CLSM, su buharı geçirgenlik değeri gibi karakterizasyon, yapısal analiz, doğrulama ve test faaliyetlerinin yanı sıra antibakteriyel etkinlik testlerini içermektedir.

Tez çalışmasının ana hedefleri (i) Nanolif üretim yöntemlerini uygulamak, (ii) Enzim immobilizasyon tekniklerini araştırmak ve uygulamak, (iii) Üretilen filtrelere karakterizasyon ve performans testlerinin yanı sıra antibakteriyel testleri de uygulayarak antibakteriyel hava filtrelerinin fizibilitesini araştırmak ve (iv) Biyoaerosol giderimi yaparak iç ortam hava kalitesini iyileştiren ve insan sağlığını koruyan yeni bir antibakteriyel hava filtresi ürünü oluşturmaktır.



DEVELOPMENT OF ENZYME-DOPED ANTIBACTERIAL NANOFIBER FILTERS FOR BIOAEROSOL REMOVAL FROM INDOOR AIR

SUMMARY

Nowadays, people spend most of their time indoors. As fresh air circulation decreases in indoor environments such as workplaces, schools, and public transportation, the likelihood of contact with pollutants in the indoor environment increases.

Indoor air pollutants such as particulate matter (PM_{2.5}, PM₁₀, etc.), volatile organic compounds (VOC), and microorganisms have significant adverse effects on human health such as sick-building syndrome (SBS), building-related illness (BRI), irritation, respiratory tract infections, and even cancer. Indoor air pollutants can be emitted from a variety of sources. These pollutant sources can be related to the fabric of the buildings, construction materials, activities of the building occupants, and heating systems.

Bioaerosols are airborne particles originating from biological sources and include living and dead organisms such as algae, archaea, bacteria, fungal spores, plant pollen, and fragments of plant debris. With the widespread recognition of the potential hazard of biological agents, interest in bioaerosol exposure has increased, and exposure to bioaerosols, especially in indoor environments, can have significant effects on human health. Indoor sources of bioaerosols can generally occur through human emissions such as coughing, sneezing, speaking, or breathing, direct particle scattering of exfoliated skin cells and hair, and these significantly affect airborne bacterial populations.

As the bioaerosols in the indoor air are easily transported and come into contact with people, various health problems such as asthma, allergies and infections related to indoor air can occur. Bioaerosol is the generic name given to aerosolized cells, viruses, pollen, or spores. The importance of bioaerosols has been experienced all over the world during the COVID-19 pandemic.

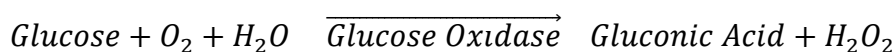
Filtration systems have been widely used and developed for the removal of particulate matter in the indoor environment, but applications and studies have been limited in terms of filter designs specifically for bioaerosol removal, the relationship between the mechanism of action, and filter performance. Indoor air quality can be improved with systems designed with appropriate filter selection.

There has been increased interest in electrospinning as an innovative technique to produce nanofiber assemblies in an easy and customizable manner. The electrospinning process is notable for its versatility and wide applicability, utilizing a wide variety of materials. Electrospun nanofibers draw attention to their extraordinary properties such as small fiber diameter, large specific surface area, high porosity, functionalization suitability to active interfaces, and the ability to add antibacterial agents at the nanoscale.

Natural polymers, synthetic polymers, and polymer blends, carbon and metal oxides are some of the most commonly studied materials in electrospinning. Polyacrylonitrile (PAN) is one of the widely used polymeric materials for filtration, thanks to its high mechanical properties, good solvent resistance, thermal stability, and easy fiber production by electrospinning.

Among nanomaterials, especially graphene-based nanomaterials are seen as promising fillers for the development of high-performance materials. Graphene-supported electrospun polymers have been the focus of attention in a variety of applications, such as energy storage, photocatalysis, tissue engineering, water purification, and antibacterial materials. Graphene is a two-dimensional (2D) honeycomb-like monolayer composed of tight carbon atoms with unique thermal, mechanical, and electronic properties. Graphene nanoplatelets (GNP) are composed of multiple layers of graphene and retain the excellent properties of graphene while also having a lower production cost than graphene. GNP can be used as a reinforcing filler without compromising the long-term performance of nanocomposites. The inclusion of GNPs improves the mechanical, thermal conductivity, thermal stability, gas permeability, and dielectric properties of polymers.

Enzymes are important as environmentally friendly agents to control biofilm formation without creating toxic or harmful effects on the surrounding environments. Some oxidoreductases, such as glucose oxidase, hexose oxidase, and xanthine oxidoreductase, can be used to produce hydrogen peroxide (H₂O₂) from natural substrates as a potent natural oxidant. H₂O₂ is a frequently used biocide in various applications and has no significant toxic effects due to its spontaneous action and subsequent complete decomposition into water and oxygen. Glucose oxidase (GOx), as one of the antibacterial enzymes, has a catalytic feature to oxidize β-D-glucose to gluconic acid and H₂O₂. Glucose oxidase enzyme is of great interest due to its wide applications in chemical, pharmaceutical, food, beverage, clinical chemistry, biotechnology, and other industries. Glucose oxidase enzyme reaction;



For the immobilization of the GOx enzyme, which is intended to provide antibacterial properties, two different techniques were applied to filters i) cross-linking method and ii) modifications plus enzyme loading by diffusion method. These two techniques were applied in two ways i) chemical (with glutaraldehyde) and ii) physical (without glutaraldehyde).

Escherichia coli DH10B, a representative bacterial strain of indoor air microorganisms, was selected to test the antibacterial properties of PAN and PAN-GNP nanofiber filters with immobilized GOx enzyme. In laboratory studies, attention was paid to the low risk of the selected species in terms of biosecurity. Moreover, the *Escherichia coli* DH10B strain is also highly efficient for DNA cloning.

The subject of this thesis is to develop an innovative antibacterial air filter with nanofibers that provides sustainable filtration performance by removing

bioaerosols. Two basic methodologies have been applied in the production of antibacterial nanofiber air filters (i) fabrication of polyacrylonitrile polymer (PAN)/graphene nanoplatelet (GNP) nanofiber by electrospinning method and (ii) application of different enzyme immobilization techniques for glucose oxidase (GOx), which is aimed to provide antibacterial properties. The thesis study includes the production of nanofiber filters, enzyme immobilization, characterization, structural analysis, verification, and testing activities such as SEM, FTIR, CLSM, water vapor permeability value, as well as antibacterial activity tests.

The main objectives of the thesis study are (i) to apply nanofiber fabrication methods, (ii) to research and apply enzyme immobilization techniques, (iii) to investigate the feasibility of antibacterial air filters by applying antibacterial tests as well as characterization and performance tests to the produced filters and (iv) to create a new antibacterial air filter product that improves indoor air quality and protects human health by removing bioaerosols.

The results of the study show that GNP addition to PAN polymer increased the antibacterial property and retention capability. Also, the GOx-doped PAN/GNP nanofiber filter has drawn attention to its antibacterial properties by successfully removing bioaerosols from the air.

The findings of the study show that the GOx enzyme can be immobilized to electrospun nanofibers to remove bioaerosol from indoor air.

The advantages of GOx-doped PAN/GNP nanofiber filters in antibacterial applications are that the GOx and glucose reaction can kill bacteria in an environmentally friendly way without causing toxic effects. On the other hand, different antibacterial tests applied to the produced nanofibers gave mutually supportive results and highlighted the success of the filters.



1. GİRİŞ

1.1 Tezin Amacı

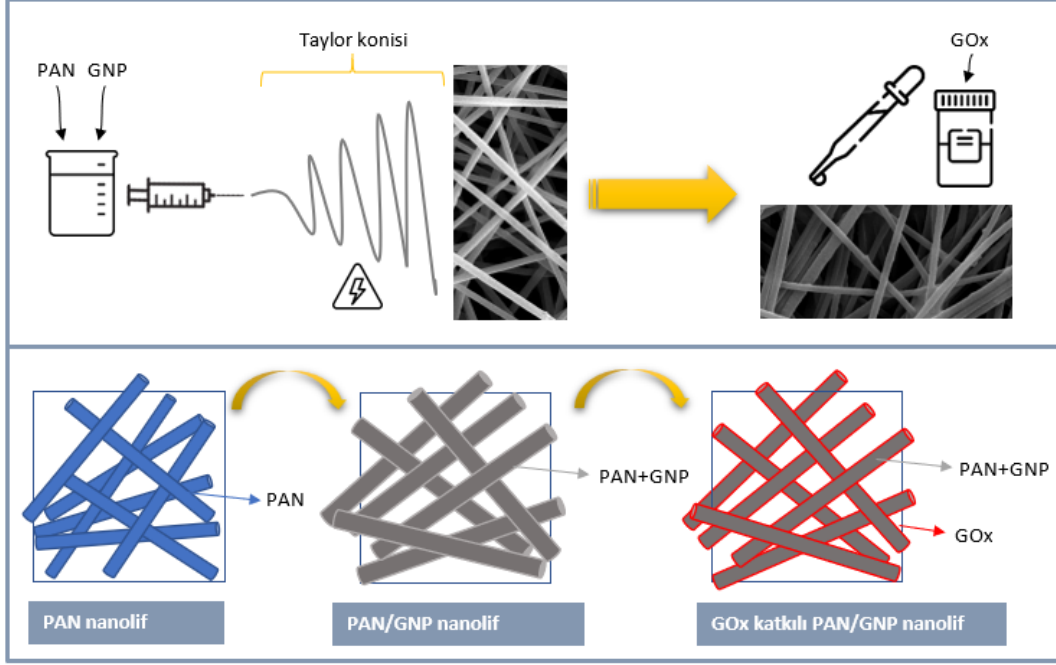
Bu tez çalışmasının amacı antibakteriyel nanolif filtrelerin optimum parametrelerle üretimini ve antibakteriyel özelliği ile iç ortam havasından biyoaerosol giderimindeki etkisini göstermektir. Sürdürülebilir filtrasyon performansı için biyoaerosol giderimi sağlayan nanolif yapıları antibakteriyel hava filtresi geliştirmek hedeflenmiştir.

Antibakteriyel filtre üretiminde, iki temel metodoloji uygulanmıştır (i) Ticari poliakrilonitril (PAN) polimerinin, grafen nanoplatelet (GNP) katkısı ile elektroçirgeme yöntemi ile üretimi ve (ii) Antibakteriyel özellik kazandırması hedeflenen glukoz oksidaz (GOx) enzimi için farklı immobilizasyonu tekniklerinin uygulanması. Tez çalışması nanolif filtre üretimi, enzim immobilizasyonu, SEM, FTIR, CLSM, su buharı geçirgenlik değeri gibi karakterizasyon, yapısal analiz, doğrulama ve test faaliyetlerinin yanısıra antibakteriyel etkinlik testlerini içermektedir. Tez çalışmasının ana hedefleri (i) Nanolif üretim yöntemlerini uygulamak, (ii) Enzim immobilizasyon tekniklerini araştırmak ve uygulamak, (iii) Üretilen filtrelere karakterizasyon ve performans testlerinin yanı sıra antibakteriyel etkinlik testleri de uygulayarak antibakteriyel hava filtrelerinin fizibilitesini araştırmak ve (iv) Biyoaerosol giderimi yaparak iç ortam hava kalitesini iyileştiren ve insan sağlığını koruyan yeni bir antibakteriyel hava filtresi ürünü oluşturmaktır.

1.2 Tezin Anlam ve Önemi

İç ortam havasından biyoaerosol giderimi üzerine çalışmalar oldukça azdır. Aynı zamanda biyoaerosollerin insan sağlığı üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında ilk defa glukoz oksidaz (GOx) enziminin iç ortam hava filtrasyonunda kullanılmak üzere nanolife entegrasyonu çalışılmıştır. GOx enziminin biyosensör ve gıda paketlenmesi üzerine çalışmaları yaygın olsada hava filtrelerinde uygulamaları mevcut değildir. Bu tez kapsamında iç ortam hava filtrasyonunda kullanılmak amacıyla üretilen GOx immobilize edilmiş GNP katkılı nanolif filtrelerin antibakteriyel davranışları ve filtre performansı ilk defa incelenmiştir. Bu çalışma

antibakteriyel iç ortam hava filtrelerinin geliştirilmesi ve benzer çalışmalarda fikir sağlaması için önem taşımaktadır. Şekil 1.1'de tezde çalışılan nanoliflerin üretim şemasının özeti görülmektedir.



Şekil 1.1 : Tez çalışmasının özet nanolif üretim şeması.

2. LİTERATÜR

2.1 İç Ortam Hava Kalitesi Önemi ve Standartları

İnsanlar zamanlarının önemli bir kısmını ev, okul, ofis, araba, uçak gibi iç mekanlarda geçirmektedir ve son yaşanan koronovirüs hastalığı (COVID-19) salgını ile, iç ortam hava kalitesinin insan sağlığı üzerindeki etkileri göz önüne serilmiştir.

İç ortam hava kirleticileri partikül madde (PM_{2,5}, PM₁₀, vb.), uçucu organik bileşikler (UOB) ve mikroorganizmalar gibi bina sakinlerinin sağlığı üzerinde hasta bina sendromu (SBS), tahriş, solunum yolu enfeksiyonları ve hatta kanser gibi önemli olumsuz etkilere sahiptir (G. Wei vd., 2022).

İç ortam hava kirliliği sıklıkla kimyasal kirleticiler üzerinde yoğunlaşmıştır fakat iç ortamlarda çok çeşitli biyolojik materyaller bulunduğundan, solunan biyolojik partiküllerin sağlık üzerindeki etkileri de önem arz etmektedir. İç ortam hava kirleticileri çeşitli kaynaklardan yayılabilir. Bu kirletici kaynakları binaların dokusu, inşaat malzemeleri, bina sakinlerinin faaliyetleri, ısıtma sistemleri ile ilişkili olabilir. Su, hava veya toprak yoluyla dışarıdan sızma da önemli bir kirletici kaynağı olabilir. Bina tasarımlarında kullanılan yalıtım ve sentetik yapı malzemelerinin kullanılması konfor sağlasada havadaki kirleticilerin kolayca üretildiği ve dışarıya oranla daha yüksek konsantrasyonlarda birikebildiği bir ortam oluşturur. Hasta bina sendromu (SBS), bina sakinlerinin bir binada geçirilen zamanla bağlantılı gibi görünen, ancak belirli bir hastalık veya nedenin tanımlanamadığı akut sağlık ve konfor etkileri yaşadığı durumları tanımlar. Bina ile ilgili hastalık (BRI) terimi, teşhis edilebilir bir hastalığın belirti ve semptomlarını tanımlanır ve doğrudan iç ortamdaki bina kirleticilerine atfedilebilir, ancak BRI aksine SBS bir hastalık değildir ve bir fenomeni tanımlar. Genellikle cilt, solunum sistemi, mukoz membran şikayetleri, baş ağrısı, halsizlik ve konsantrasyon bozukluğu gibi genel belirtilerin rapor edildiği durumlar SBS olarak tarif edilmektedir. Ayrıca, bina terk edildikten sonra semptomlar azalır veya kaybolur. SBS salgınları genellikle modern enerji verimli hava geçirmez binalarda, özellikle mekanik ısıtma, havalandırma ve iklimlendirme (HVAC)

sistemleriyle hizmet verilen binalarda daha yaygındır. Böylece, SBS iç ortam hava kalitesi sorunlarıyla ilişkilendirilir (Jones, 1999).

İç ortam hava kalitesini iyileştirmek, insan sağlığını korumak ve hava filtre kalitesini belli bir düzeyde tutmak için bazı standartlar Uluslararası Standartlar Teşkilatı (ISO), İç Ortam Hava Kalitesi Standartları Amerikan Isıtma Soğutma ve Havalandırma Mühendisleri Birliği (ASHRAE), Avrupa Standartlar Komitesi (CEN) gibi kuruluşlarca geliştirilmiştir.

ISO'nun genel havalandırma sistemlerinde kullanılan hava filtreleri ile ilgili ISO 16890 Genel Havalandırma için Hava Filtreleri standardı mevcuttur. ISO 16890 standardı filtre performansını $PM_{1,0}$, $PM_{2,5}$ ve PM_{10} boyutlarına göre sınıflandırır. Öte yandan, ISO 29463 Havadaki Partikülleri Gidermek İçin Yüksek Verimli Filtreler ve Filtre Ortamı standardı EPA, HEPA, ULPA gibi yüksek verimliliğe sahip filtrelerini tanımlar.

ASHRAE 62.1-2019: Kabul Edilebilir İç Hava Kalitesi için Havalandırma standardı, insanların solunum yaptığı alanda kişi başına gerekli olan minimum havalandırma miktarlarını tanımlar ve bu miktarı belirlerken kişinin bulunduğu ortama bağlı olarak endüstriyel varsayımlarda bulunur (ASHRAE, 2019). Ayrıca, ASHRAE 55-2017: Yaşam Alanları İçin Isıl Çevresel Şartlar standardı, ortamlarda ayarlanması gereken sıcaklık ve nem için kabul edilir şartları belirler (ASHRAE, 2017).

CEN tarafından sunulan CR 1752, 2002: Binaların Havalandırması: İç Ortam için Tasarım Kriterleri standardı binalarda havalandırma ve iklimlendirme sistemlerinin tasarımı, devreye alınması, işletilmesi ve kontrolü için iç ortam kalitesini açıklayan yöntem ve kuralları açıklar.

2.2 İç Ortam Havası ve Biyoaerosoller

Biyoaerosoller, biyolojik kaynaklardan kaynaklanan havadaki parçacıklardır ve algler, arkealar, bakteriler, mantar sporları, bitki polenleri ve bitki kalıntılarının parçaları gibi canlı ve ölü organizmaları içermektedir (Matthias-Maser vd., 1995). Biyolojik ajanların potansiyel tehlikesinin yaygın olarak tanınmasıyla birlikte, biyoaerosol maruziyetine olan ilgi artmış ve özellikle iç ortamlarda biyoaerosol maruziyetinin insan sağlığı üzerinde önemli etkileri olabilmektedir.

İç ortam biyoaerosol kaynakları genel olarak öksürme, hapsirme, konuşma veya nefes alma gibi insan emisyonları, pul pul dökülmüş deri hücrelerinin ve saçın doğrudan partikül saçılması yoluyla oluşabilir ve bunlar havadaki bakteri popülasyonlarını önemli bir şekilde etkiler (Gollakota vd., 2021). Çizelge 2.1’de biyoaerosollerin boyutlarını ve kaynaklarını gösteren özet görülmektedir.

Çizelge 2.1 : Biyoaerosollerin boyutları ve kaynakları (Gollakota vd., 2021).

Organizma	Boyut (µm)	Kaynak
Virüs	<0,1–3	Influanza
Mikoplazma	1–5	M. Pnömoni
Klamidya	1–5	Chlamydia psittasi
Riketsiya	1–5	Coxiella burnetii
Bakteri	1–5	Mikrokok luteus
Bakteri	0,5–5	Bacillus cereus, Thermoactinomyces
Algler	5–10	Klorokok
Damarsız bitkiler	15–30	Yosunlar
Damarlı bitkiler	15–30	Lycopodium eğrelti otları
Damarlı bitkiler	10–50	Ağaçlar, otlar, yabani otlar
Eklembacaklılar	–	Hamamböceği, toz, akar
Hayvanlar	–	Kedi, köpek, fare
Mantarlar	1,5–100	Mantarlar, aspergillus

Biyoaerosoller üzerine epidemiyolojik çalışmalar oldukça azdır ve bu nedenle biyoaerosollerle ilgili bilgi eksikliği vardır. Biyoaerosoller yoluyla biyolojik bulaşmaların öneminin dikkate alınmaması influenza, SARS ve COVID-19 gibi ciddi epidemiyolojik viral salgınlara da neden olmuştur (Gollakota vd., 2021).

Jeong vd. (2022), iç ortamlarda biyoaerosol maruziyetinin neden olduğu zararı en aza indirmek için ulusal ve uluslararası kuruluşların önerdiği kabul edilebilir biyoaerosol konsantrasyon değerlerini derlemiştir;

- Kore Cumhuriyeti Çevre Bakanlığı tıbbi kurumlar, sağlık tesisleri ve gündüz bakım merkezleri gibi çok amaçlı tesislerde bakteri biyoaerosollerini 800 kob/m³ ve mantar biyoaerosollerini 500 kob/m³ ile sınırlandırmıştır (KME, 2021).
- Çin Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri konutlardaki bakteriyel biyoaerosol konsantrasyonunu 2500 kob/m³ ile sınırlandırmıştır (Guo vd., 2020).

- Amerikan Hükümet Endüstriyel Hijyenistleri Konferansı (ACGIH) mantar biyoaerosol konsantrasyon eşliğini 1000 kob/m^3 olarak belirtmiştir (ACGIH, 1989).
- Dünya Sağlık Örgütü (WHO), konutlar için maksimum 500 kob/m^3 mantar biyoaerosolünün kabul edilebilir olduğunu tavsiye etmiştir (WHO, 1988).

Mevcut standart ve tavsiyelerin biyoaerosollerin boyutlarından ziyade konsantrasyonuna odaklandığı görülmektedir. Biyoaerosollerin büyüklükleri, sağlık riskiyle oldukça ilişkilidir ve solunabilen PM_{10} ve $\text{PM}_{2,5}$ sınıflarına dahildir (S. Bin Jeong vd., 2022). Bu nedenle, biyoaerosol konsantrasyon limitlerini içeren standartlar kontaminasyon seviyelerini tahmin etmek için faydalıdır, ancak sağlık riski üzerindeki etkisini değerlendirmek için biyoaerosol boyutlarına odaklanan çalışmalara da ihtiyaç vardır.

Zheng & Yao, (2017) iç ortam havasındaki biyoaerosol partikül boyutlarını araştırmak için bir otel odasından alınan numuneleri test ettiklerinde $0,5$ ile $10 \mu\text{m}$ arasındaki boyutlarda biyoaerosol partiküllerinin olduğunu raporlamıştır (Zheng & Yao, 2017).

Öte yandan, Jeong vd. (2022) yaptığı çalışmada, biyoaerosol boyut dağılımını farklı iç ortamlardan farklı durumlarda aldığı numuneler üzerinde incelemiştir. Nispeten küçük mikroorganizmaların kışın iç ortam havasında daha bol olduğunu bildirmiştir. Aynı zamanda, çok sayıda kültürlenebilir bakteri ve mantar biyoaerosollerinin $3,3 \mu\text{m}$ ve daha küçük boyutta olduğu tespit edilmiştir. $1,1 \mu\text{m}$ 'den daha küçük bakteriyel biyoaerosoller de gözlenmiştir. Bu küçük biyoaerosoller doğrudan solunabilir ve solunum yollarında birikebilir (S. Bin Jeong vd., 2022).

Son zamanlarda, çarpıcı düzeyde partikül madde (PM) kirliliği ve neden oldukları hastalıklar neticesinde yüksek filtrasyon verimliliği ve antibakteriyel aktiviteye sahip filtre malzemeleri ile ilgili araştırmalara ilgi artmıştır (Bortolassi vd., 2019). Cao vd. (2014) PM kaynaklı hava kirliliğinin etkili olduğu Pekin'de gerçekleştirdikleri çalışmada, solunum yolu hastalıklarının ve alerjilerin bulaşmasından sorumlu olan PM'deki solunabilir mikroorganizmaların %80'den fazlasını bakterilerin oluşturduğunu bildirmiştir (Cao vd., 2014). Bu da bakterisidal (öldürücü) özelliklere sahip hava filtrelerini cazip hale getirmektedir.

Ek olarak, gıda, ilaç ve biyoteknoloji endüstrileri için havadaki kirleticiler, tehlikeli biyolojik ajanlar ve alerjenler üzerinde kontrol sağlanması önem arz etmektedir

(Barhate & Ramakrishna, 2007). Temiz oda teknolojisi ile ürün kontaminasyonunu kontrol etmek ve azaltmak hedeflenir ve genellikle havadaki istenmeyen partikülleri gidermek için nanolif filtreler kullanılır (Bortolassi vd., 2019). Böylece, iç ortamlardaki biyoaerosollerini gidermek için filtrasyon yönteminin tercih edildiği ve etkili verim elde etmek için nanolif filtrelerin ön plana çıktığı görülmektedir.

2.3 Elektroğirme Yöntemi ile Üretilmiş Nanolifler ve Uygulamaları

Geleneksel fiber, cam elyaf, meltblown ve spunbond fiber gibi filtreler hava filtrasyonunda sıkça kullanılmaktadır, ancak bunlar fiber çapı ve büyük gözenek boyutu nedeniyle ince partiküllerde düşük filtreleme verimliliği göstermektedir (Z. Wang vd., 2016).

Kolay ve özelleştirilebilir bir şekilde nanolif düzenekleri üretmek için yenilikçi bir teknik olarak elektroğirmeye ilgi artmıştır. Elektroğirme prosesi çok yönlü ve çok çeşitli malzemelerden yararlanarak geniş ölçekte uygulanabilir olmasıyla dikkat çekmektedir (Apetrei & Camurlu, 2020). Elektroğirme, çeşitli nanoliflerin üretilebilmesine olanak sağlayan en basit yöntemlerdendir. Elektroğirilmiş nanoliflerin güçlendirme, filtrasyon, kataliz, biyomedikal ve farmasötik uygulamalar, elektronik ve optik cihazlar, tekstil gibi birçok açıdan potansiyel uygulamaları mevcuttur (Song vd., 2019; Z.-G. Wang vd., 2009). Elektroğirilmiş nanolif filtrelerin iyi derecede mekanik özellikler ve termal kararlılık gösterdiği çalışmalarla desteklenmiştir. Elektroğirilmiş nanolifler küçük fiber çapı, geniş spesifik yüzey alanı, yüksek gözeneklilik, aktif arayüzlere işlevselleştirme uygunluğu ve antibakteriyel ajanların nano ölçekte eklenebilmesi gibi olağanüstü özellikleriyle dikkat çekmektedir (Bortolassi vd., 2019; Apetrei & Camurlu, 2020).

Verimli bir filtre üretmek için çözelti konsantrasyonu, akış hızı, toplayıcıdan iğneye olan mesafe, voltaj ve süre parametreleri gibi elektroğirmenin optimum üretim koşullarını sağlamak oldukça önemlidir (Bortolassi vd., 2019).

Doğal polimerler, sentetik polimerler ve polimer karışımları, karbon ve metal oksitler elektroğirmede en sık çalışılan malzemelerden bazılarıdır (Agarwal vd., 2013). Polimer konsantrasyonunun değiştirilmesi, çözelti viskozitesini değiştirebilir ve daha yüksek viskozite fiberlerde polimer boncuklanmasını azaltır. Yüzey gerilimi fiberlerde boncuklanmaya sebep olur ve azalan yüzey gerilimi boncuklanmayı azaltır (Fong vd.,

1999). Li & Gong (2015) çalışmasında, poliakrilonitril (PAN) hava filtrelerinin fiber çapları 200 nm'den 1 µm'ye yükseldiğinde verimliliğin %98'den %48'e düştüğünü raporlamıştır (X. Li & Gong, 2015). Böylece, küçük fiber çaplarının daha iyi filtrasyon verimliliği sağladığı anlaşılmaktadır. Poliakrilonitril (PAN) yüksek mekanik özellikleri, başarılı çözücü direnci, termal kararlılığı, elektroegirme yoluyla kolay fiber üretimi sayesinde filtrasyon için yaygın olarak kullanılan polimerik malzemelerdendir (Bortolassi vd., 2019). Genellikle, nanolifli membranlar ince partiküller için yüksek filtrasyon verimliliği sağlar fakat aşırı basınç düşüşüne de sahiptir (Z. Wang vd., 2016). Ayrıca, dirençli ve geçirgen fiberli filtre elde etmek için nanolifleri biriktirmek için uygun bir destek tabaka seçimi de önem arz etmektedir (Bortolassi vd., 2019).

Bununla birlikte, daha iyi malzemeler üretmek için, inorganik malzemelerin (TiO₂, SiO₂, ZnO ve Ag nanoparçacıkları gibi çeşitli nanomalzemeler) polimer nanoliflere eklenmesi ile karışık matrisli nanolifler veya kompozitlerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Bunlar, nanoliflerin filtrasyon verimliliğini artırırken, gelişmiş antimikrobiyal özelliklerle birlikte kimyasal, mekanik ve termal stabiliteyi artırarak ön plana çıkmaktadır (Russo vd., 2022). TiO₂, ZnO ve Ag, hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterileri inaktive eden polimerik nanoliflerin hazırlanmasında kullanılan fotoaktif nanopartiküller olarak kabul edilir (Russo vd., 2022).

Son zamanlarda, Vanangamudi vd. (2015a), %99,5'e varan mükemmel antibakteriyel etkinliğe sahip poliviniliden florür (PVDF) ve Ag-Al₂O₃ bazlı yeni kompozit nanolif tasarlamıştır (Vanangamudi vd., 2015a). Salam vd. (2021), yeni bir antiviral kişisel koruyucu ekipman için bir PAN/ZnO elektrospun hibrit nanolife viroblock (VB, gümüş ve lipid veziküllerin kombinasyonu) ajanını ekledi. Viroblock, hem antiviral hem de antibakteriyel bir madde olarak işlev gören beyaz viskoz bir sıvıdır. %5 VB yüklü PAN/ZnO nanolifleri *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerine karşı sırasıyla %92,59 ve %88,64 antibakteriyel etkinlik göstermiştir (Salam vd., 2021). Gelişmiş oksidasyon süreçleri, özellikle fotokataliz, sadece ucuz bir yarı iletken fotokatalizör (örneğin TiO₂) ve bir ışık kaynağı (güneş veya yapay bir UV) gerektirdiğinden, en uygun çevre temizleme teknolojilerinden kabul edilmiştir (Tan vd., 2021).

Öte yandan, adsorpsiyon işlemi, uçucu organik bileşiklerin (UOB) giderilmesinde kullanılan en yaygın ve ideal teknolojidir. Elektrospun nanolifler, bu kirleticiler için mükemmel ve etkili bir üç boyutlu filtre ortamıdır (Buyukada-Kesici vd., 2021).

PAN gibi klasik polimerlere dayalı kompozit nanoliflerin hazırlanması ile UOB'lere karşı adsorpsiyon kapasitesinin geliştirilmesi mümkündür. Polidimetilsiloksan (PDMS) ve poliimid (PI), havadan veya N₂'den aseton, toluen ve ksilen gibi UOB'lerin çıkarılması için tipik nanolif malzemeleridir (Russo vd., 2022). Rebollar-Perez vd. (2011), hava akımlarından UOB'leri çıkarmak için bir cihaz inşa ederek, buhar geçirgenliği için PDMS/a-alümina nanoliflerin uygulamasını araştırmıştır ve nanolifin UOB içeriğini %95'e kadar azaltabildiğini kanıtlamıştır (Rebollar-Perez vd., 2011).

Örneğin, Buyukada-Kesici vd. (2021) elektroğirme ile ürettikleri selüloz nanokristal (CNC)-poliamid 6 (PA-6) kompozit nanofiber filtrelerin yapısal ve mekanik özellikleri ile UOB adsorpsiyon performanslarını toluen üzerinden incelendi. Sonuç olarak, ağırlıkça %17 PA-6 ve ağırlıkça %1,5 CNC içeren nanofiber filtre, %50'lik en iyi toluen adsorpsiyon verimini ve iyileştirilmiş mekanik özellikleri göstermiştir (Buyukada-Kesici vd., 2021).

Ayrıca, polimer membranlar, enzimlerin immobilizasyonu/bağlanması için taşıyıcı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Vasileva vd., 2006). Nanomalzemeler, geniş spesifik yüzey alanı, küçük kütle transfer direnci, büyük enzim yükleme kabiliyeti, yüzey modifikasyonu gibi birçok avantajı nedeniyle enzim immobilizasyonu alanında ilgi çekmiştir (Z.-G. Wang vd., 2009). Nanoyapılı malzemeler, yüksek verimli immobilizasyon için geniş spesifik yüzey alanları sağlayabilen ve aynı zamanda enzimleri stabilize edebilen son derece yüksek yüzey alanı-hacim oranları nedeniyle diğer desteklerden öne çıkmaktadır (Z.-G. Wang vd., 2009).

Bir enzim, katalitik işlevi olan bir tür proteindir (D. Li vd., 2019). Enzimin çevresel koşullara (pH, sıcaklık, metal iyonları, organik çözücüler) karşı çok hassas hale getirir ve kararsızlığa neden olur. Çevre koşullarındaki değişiklikler, serbest enzimlerde aktivite kaybına neden olabilir. Ayrıca, serbest enzimler bir reaksiyondan sonra geri dönüştürülemezler ve pratik uygulamaları kısıtlayan tekrar kullanımları yoktur. Enzim immobilizasyon tekniklerinin yükselişi, enzimlerin kararlılığı ve yeniden kullanımını geliştirebilir ve ayrıca maliyetin düşürülmesi, çevrenin korunması, otomatik sürekli üretim ve diğer birçok açıdan faydalar sağlayabilir (Hanefeld vd., 2009).

Biyo-tabanlı sensörler genellikle enzimlerin bir yüzey üzerinde immobilize edilmesi ile üretilir ve elektrospinning teknolojisi umut vadetmektedir (Iitani vd., 2022).

Örneğin, G. Jeong vd. (2019) elektroğirme yoluyla üretilen azot katkılı çok boyutlu karbon nanoliflerin yüzeyine protein immobilize ederek bir kortizol biyosensörü geliştirdi ve kortizolün saptanmasına olanak sağladı (G. Jeong vd., 2019).

Q. Wang vd. (2013), lakkaz enzimini adsorpsiyon yöntemi ile elektroğirilmiş nanolif yüzeye başarılı bir şekilde immobilize etmiştir. Nanolifin çapına bağlı olarak yüzey alanında %20 ile %40'a varan önemli bir artış gözlemlenmiştir (Q. Wang vd., 2013).

S.-F. Li vd. (2007), elektroğirme ile 300 nm'nin altında tek tip fiber çapına sahip PAN nanolifli membranlar hazırladı. Lipaz enzimi, PAN nanoliflere kovalent olarak immobilize edildi. Lipaz immobilizasyonundan sonra, nanolif çapı ve morfolojinin önemli ölçüde değişmediği gözlemlendi. Nanolifte enzim yüklemesi %2,1'e (w/w) kadar ulaşabilirken, immobilize enzim %81,3 ile yüksek aktivitesini hala korudu (S.-F. Li vd., 2007).

Fazel vd. (2016), glutaraldehit ile çapraz bağlama yoluyla bayır turpu peroksidazı (HRP) enzimini immobilize etmek için elektroğirilmiş polivinil alkol (PVA)/sığır serum albümini (BSA) biyokompozit membranları kullandı. Enzim yüklemesi %27,3'e (w/w) kadar ulaştı. Glutaraldehit buharı ile çapraz bağlamadan sonra elektrospun PVA/BSA nanolifli membranlarda immobilize edilmiş HRP'nin aktivitesi, test edilen en yüksek hidrojen peroksit konsantrasyonundaki serbest enzimin %50 'sinin üzerinde olduğu görüldü. Sabitlenmiş HRP, 11 tekrar kullanım döngüsünden sonra başlangıç aktivitesinin %73'ünü korumuştur (Fazel vd., 2016).

Vasileva vd. (2006) yaptığı çalışmada, kovalent olarak immobilize edilen glukoz oksidazın (GOx), PAN ve metilmetakrilat-diklorofenilmaleimid (MMA-DCPMI) kopolimerinden üretilen ultrafiltrasyon membranlar üzerindeki davranışını incelenmiştir. Deney sonuçlarında, PAN ve kopolimer MMA-DCPMI karışımından hazırlanan ultrafiltrasyon membranlarının, GOx immobilizasyonu için uygun olduğu görülmüştür. Çalışma sonucunda, bağlanmış enzimin aktivitesinin serbest enzime göre daha yüksek, kararlı ve dış etkenlere (sıcaklık, pH, vb.) karşı daha toleranslı olduğu görülmüştür. GOx enziminin immobilize edilmesi ile bağlı enzimin yüksek erişilebilirliği ve yeniden kullanılabilirliği sağlanırken tekrarlanan kullanımlarda enzim sızıntısı olmaz. Enzim immobilizasyonu için akrilonitril (AN) ile diğer vinil monomerlerin kopolimerlerine dayalı membranlar, taşıyıcılar olarak oldukça kullanışlıdır. AN kopolimeri, uygun fonksiyonel grup içermediği için modifiye

edilmeden enzim immobilizasyonuna uygun değildir. Kullanım kolaylıklarını artırmak için genellikle bu membranlara ek bir modifikasyon uygulanması gereklidir (Vasileva vd., 2006).

2.4 Grafen Nanoplatelet ve Uygulamaları

Polimer nanokompozitler son zamanlarda birçok avantajlı özelliğiyle ilgi görmektedir. Nano katkı malzemeleri tipik olarak 100 nm'nin altında olduğundan, bir polimer matrise dahil edildiklerinde hacim başına ultra geniş yüzey alanı sağlarlar (Badia vd., 2021).

Nano malzemeler arasında, nanokarbonlar ve özellikle grafen bazlı nano malzemeler yüksek performanslı malzemelerin geliştirilmesi için umut verici dolgu maddeleri olarak görülmektedir. Grafen katkılı elektroğrılmış polimerler örneğin enerji depolama, fotokataliz, doku mühendisliği, su arıtma ve antibakteriyel malzemeler gibi çeşitli uygulamalarda ilgi odağı olmuştur (Scaffaro & Lopresti, 2018).

Grafen, benzersiz termal, mekanik ve elektronik özelliklere sahip, sıkı karbon atomlarından oluşan iki boyutlu (2B) petek benzeri bir tek katmandır (Geim, 2009). Grafen nanoplateletler (GNP), çok sayıda grafen katmanından oluşur ve grafenin mükemmel özelliklerini korurken, grafenden daha düşük üretim maliyetine de sahiptir (M. Li vd., 2022). GNP, nanokompozitlerin uzun vadeli performansından ödün vermeden takviye dolgu maddesi olarak kullanılabilir. GNP'lerin dahil edilmesi, polimerlerin mekanik, termal iletkenlik, termal kararlılık, gaz geçirgenliği ve dielektrik gibi özelliklerini iyileştirir (Badia vd., 2021).

Scaffaro & Lopresti (2018) çalışmasında elektroğirme ile üretilmiş GNP katkılı filtre üzerine araştırma yapmıştır. GNP'lerin pekiştirici etkisi, elektroğrılmış polilaktik asit (PLA) membranları üzerinde değerlendirilmiştir. Ağırlıkça %0,125, %0,25 ve %0,5 GNP içeren kompozit membranların fiber morfolojisinin oldukça düzgün ve düzenli olduğu gözlemlenmiştir. Öte yandan, ağırlıkça %1 GNP içeren membranda GNP yumrularının varlığı gözlemlenmiştir. Bu GNP oranının nanolif yapıyı önemli ölçüde etkileyebileceğini göstermiştir. Ayrıca, GNP katkısı, fiber çaplarında bir miktar artışa sebebiyet vermiştir. Bu artış, GNP'nin çözelti viskozitesini artırması ve çözücü buharlaşma kinetiği üzerindeki etkisi ile alakalıdır. Çekme testleri sonucu, PLA'ya GNP eklenmesinin, malzemelerin elastik özelliklerinde önemli bir iyileşmeye yol

açtığı görülmüştür. Böylece, GNP'ler elektroğrılmış nanolif malzemenin mukavemetini artırabilir. Termogravimetrik analiz (TGA) ölçümleri sonucu, PLA'ya GNP eklenmesinin daha iyi bir termal kararlılık sağladığı da görülmüştür (Scaffaro & Lopresti, 2018).

Nanoyapılı ajanların küçük parçacık boyutları sayesinde hücre zarlarından penetrasyonu kolaylaştırarak hücre içi süreçleri etkilediği ve bu durumun antibakteriyel etki ile sonuçlandığı raporlanmıştır (Park vd., 2013). Bu durum, GNP katkılı nanolif filtrelerin antibakteriyel etki gösterme özelliğine dikkat çekebilir.

Öte yandan, solunum koruma ve iç hava temizleme söz konusu olduğunda nanolifli filtrelerin antibakteriyel özellik göstermesi oldukça önem kazanmaktadır (Vanangamudi vd., 2015b). Hu vd. (2010) yaptığı çalışmada, grafen bazlı nano kağıtların düşük maliyetle üretilebileceğini, ayrıca minimum sitotoksosite göstererek *E.coli* bakterilerinin büyümesini etkili bir şekilde önleyen biyoyumlu bir nanomalzeme olduğunu raporlamıştır. Sitotoksik maddeler, hücreye toksik şekilde etki edip hücreyi öldüren ya da fonksiyonunu durduran maddelerdir. Öncelikle, grafen bazlı nano kağıtların, hücresel alımı ve sitotoksitesi bir memeli hücre hattı A549 ile değerlendirilmiştir. Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) çalışmaları, grafenin sitoplazmanın endozomunun içinde olduğunu göstermiş ve endositoz yoluyla A549 hücreleri içinde özümsenebileceği ileri sürülmüştür (Hu vd., 2010).

Öte yandan, Hu vd. (2010), *E.coli* DH5A hücrelerinin grafen ile etkileşimi araştırarak antibakteriyel aktivitesini değerlendirmiştir. Grafenin *E.coli* DH5A hücrelerinin metabolik aktivitesini etkili bir şekilde düşürmesi, *E.coli*'ye karşı güçlü bir inhibisyon kabiliyetinin olduğunu düşündürmüştür. Grafen ile muamele edilen *E.coli*'nin mikrobiyal canlılığı koloni sayma yöntemiyle ölçülmüş ve anlamlı bir şekilde grafenin *E.coli* büyümesini neredeyse tamamen baskıladığı ve %98,5'e varan canlılık kaybına yol açtığı bulunmuştur. TEM analizleri, *E.coli*'nin hücre bütünlüğünü büyük ölçüde kaybettiğini, hücre zarının ciddi şekilde tahrip olduğunu ve sitoplazmanın dışarı aktığını ortaya çıkarmıştır. Grafen bazlı kağıtların antibakteriyel aktivitesi, havadaki bakteriler taklit edilerek *E. coli* DH5A hücreleri kağıt üzerine ekilmiş ve üzerine Luria Bertani (LB) büyüme ortamı (%1,5 agar ile) yayılıp 37 °C derecede bir gece inkübasyonundan sonra, grafen kağıtta herhangi bir hücre büyümesi gözlemlenmemiştir. Bu grafen kağıdın antibakteriyel etkisini ima etmiştir. Ek olarak, SEM analizleri grafen bazlı kağıt üzerindeki *E.coli* hücre zarlarının bütünlüğünü

kaybettiğini doğrulamış ve grafen bazlı kağıdın bakteri öldürme etkisini göstermiştir (Hu vd., 2010).

Rago vd. (2015), grafen bazlı malzemelerin bakterilere karşı sitotoksikite etkisi üzerine bir çalışma yapmış ve GNP'lerin antibakteriyel ajanlar olarak kullanılmasını incelemiştir. GNP'lerin antibakteriyel aktivitesi diş çürüklerinde başlıca etkili mikrobiyolojik ajan olan *Streptococcus mutans*'a karşı, yetişkin ve çocuklardan alınan tükürük ve plaka numuneleri ile test edilmiştir. Sonuçlar, GNP'lerin *S.mutans* hücreleri üzerindeki öldürme etkisinin hem yan boyuta hem de kalınlığına bağlı olarak, daha düşük kalınlıkta ve daha küçük boyutlu GNP'lerin daha güçlü antibakteriyel aktivite sergilediğini göstermiştir. Taramalı elektron mikroskobu (TEM) analizi sonuçlarında, GNP'lerin hücrelerle güçlü bir şekilde etkileşime girdiği görülmüştür. SEM analizleri, bakteri hücrelerinin çoğunun hücresel bütünlüklerini kaybederek nanoplatelet yüzeyinde buruştuğunu göstermiş ve GNP'nin bakteri yüzeyinde ciddi mekanik hasarlara neden olduğuna dair kanıt oluşturmuştur. Bakteri hücreleri ve GNP'ler arasında iki farklı mekanik etkileşimin hücre ölümüne neden olduğu varsayılmıştır. İlki, hücre yakalama ve bunun sonucunda sarma ve büzülmedir. İkincisi, yumuşak hücre duvarının GNP nanomalzemenin sert keskin kenarları ile doğrudan etkileşiminden kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak, GNP'lerin *S.mutans*'ları ve dolayısıyla diş çürüklerini kontrol etmek için diş malzemeleri olarak oldukça etkili olabilecekleri ileri sürülmüştür (Rago vd., 2015).

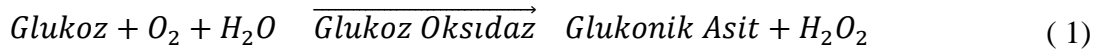
Borges vd. (2020) çalışmasında, tıbbi bir cihaz olan kateter üretiminde sıkça kullanılan bir polimer olan poliüretan (PU) içine dahil edilen GNP'lerin antibakteriyel potansiyelini araştırmıştır. PU ve GNP ile elde edilen kompozit materyalin, kateter ilişkili enfeksiyondan sorumlu olan *Staphylococcus epidermidis*'e karşı antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Deney sonucunda, PU-GNP kompozit yüzeyin *S.epidermidis*'e karşı hem çürüme önleyici (bakteriyel yapışmada %70 azalma) hem de bakterisidal aktivite (%70 bakteri ölümü) sergilediği raporlanmıştır (Borges vd., 2020).

2.5 Glukoz Oksidaz (GOx) Enzimi ve Uygulamaları

Bakteriyel enfeksiyona ve biyolojik kirlenmeye neden olan bakteriyel kontaminasyon, insan sağlığı ve endüstri sorunlarına neden olduğu için zorlu ve önemli konulardan biri olmuştur. Bakteriler de dahil olmak üzere suda yaşayan organizmaların ıslak yüzeylerde birikmesi olan biyolojik kirlilik, gemi direnci, boru tıkanması ve azalan

membran akışı gibi çeşitli endüstri sorunlarına neden olur (Lee vd., 2020). Örneğin, patojenik bakterilerin insan vücudu üzerinde veya içinde çoğalmasının neden olduğu bakteriyel enfeksiyon, tetanoz, tifo ve difteri gibi çeşitli hastalıklara neden olan bakteriyel kontaminasyonla ilgili sorunların bariz bir örneğidir (Serra vd., 2015). Fenolik ve kuaterner amonyum bileşikleri gibi kimyasal maddeler, endüstriyel ve tıbbi alanlarda herhangi bir malzemeyi dezenfekte etmek için sıkça kullanılmaktadır. Fakat, bu tür kimyasal maddeler genellikle toksik oldukları ve yavaş bir oranda bozdukları için insan ve ekosistem üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Böylece, bakteriyel kontaminasyonu engellemek için etkili ve toksik olmayan alternatif stratejiler geliştirmek önem arz etmektedir (Lee vd., 2020).

Enzimler, ılıman koşullar altında çeşitli mekanizmalarla yüksek özgülüğe sahip bir antibakteriyel ajan olarak kullanılabilirler, örneğin substratların oksidasyonu ile reaktif oksijen türlerinin üretilmesi, bakteri hücre duvarlarının bozulması ve hücreden hücreye iletişimin engellenmesi. Glukoz oksidaz, heksoz oksidaz ve ksantin oksidoredüktaz gibi bazı oksidoredüktazlar, doğal substratlardan güçlü bir doğal oksidan olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) üretmek için kullanılabilir. H_2O_2 , çeşitli uygulamalarda sıkça kullanılan bir biyosittir ve spontan etkisi ve ardından tamamen su ve oksijene ayrışması nedeniyle önemli bir toksik etkisi yoktur (Lee vd., 2020). Glukoz oksidaz (GOx), antibakteriyel enzimlerden biri olarak, β -D-glukozu, glukonik asit ve H_2O_2 'ye okside etmek için katalitik bir özelliğe sahiptir (Dubey vd., 2017).



Glukoz oksidaz enzimi, kimya, ilaç, yiyecek, içecek, klinik kimya, biyoteknoloji ve diğer endüstrilerdeki geniş uygulamaları nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Biyosensörlerde glukoz oksidazın yeni uygulamalarıyla önemi artmıştır (Bankar vd., 2009). Ayrıca, bakteriyel büyüme için besinleri (oksijen ve glukoz) azaltarak H_2O_2 doğal antibakteriyel maddesini üretme avantajından dolayı, GOx gıda proseslerinde ve pansuman gibi biyomedikal işlemlerde sıkça uygulanmaktadır (Lee vd., 2020). Özellikle, GOx katalizli glukoz oksidasyonundan üretilen H_2O_2 'in antibakteriyel mekanizmasının, reaktif oksijen türlerinin saldırısıyla hücre duvarı yapısının hasarını içerdiği raporlanmıştır (Lee vd., 2020). GOx, yaygın kullanımı ve biyolojik sıvılardaki glukoz konsantrasyonunun belirlenmesi için tıbbi teşhiste bir reaktif olarak kullanılması nedeniyle ön plana çıkmaktadır (Vasileva vd., 2006).

Şeker hastalığı küresel bir sağlık sorunudur ve Clark & Lyons (1962)'un glukoz tayini için enzimatik elektrot kavramını ilk kez tanıtmış olmasından bu yana glukoz biyoalgılayıcılar en çok çalışılan ve ticari olarak temin edilebilen analitik cihazlardan olmuştur. Bir enzimatik elektrotun genel amacı, spesifik analitin konsantrasyonuna eşdeğer bir elektrik sinyali elde etmektir. Genel olarak, biyomolekül (örn. enzim) yüksek düzeyde seçicilik sergiler. Glukoz biyoalgılayıcıları, glukoz tespiti için sürekli olarak geliştirilmektedir. Ayrıca, iletken polimerler, karbon nanoelementler, metal nanopartiküller dahil olmak üzere biyoalgılayıcıların performansını iyileştirmek için yeni malzemeler araştırılmaktadır. Bu bağlamda, nanoyapılı malzemelerin gelişmesi büyük öneme sahiptir (Apetrei & Camurlu, 2020).

Ayrıca, nanolif tabanlı biyoalgılayıcılar, hassas algılama ve teşhis cihazlarının geliştirilmesinde umut vaat etmektedirler. Elektrot yüzeyli nanolifler, biyomoleküllerin immobilizasyonu için geliştirilmiş yüzey alanlı platformlar sağlayarak çok yönlülüğe izin verir ve yüksek biyoalgılayıcı verimliliğine yol açan transdüksiyon sürecini geliştirebilir. Algılayıcı yapımında nanoliflerin kullanımı gaz algılama uygulamalarıyla başlamış ve biyo-cihazların gelişimiyle devam etmiştir (Apetrei & Camurlu, 2020). Nanolif tabanlı biyoalgılayıcıların geliştirilmesindeki önemli husus, biyoreseptörün işlevselliğini korumasıdır (Putzbach & Ronkainen, 2013).

İmmobilizasyon, sürekli katalitik işlem için enzim moleküllerinin katı bir desteğe yerleştirilmesi anlamına gelir. Enzim moleküllerinin yerleştirilmesi, kovalent bağlanmaları veya suda çözünmeyen işlevselleştirilmiş polimerlere adsorpsiyonları ile yapılabilir (Bayramoğlu vd., 2010). Enzim immobilizasyonunda kullanılan nano destek seçiminde yüksek yüzey alanı, yüksek gözeneklilik, mekanik ve kimyasal kararlılık ve kimyasal modifikasyon için yüzey işlevselliği başlıca göz önünde bulundurulması gereken hususlardır (Manuel vd., 2015). Polianilin aşılı destek, enzimlerin immobilizasyonu için iletken polimer matrisi olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Owino vd., 2008). PAN membranları, makromoleküllerin immobilizasyonu için fonksiyonel gruplara sahip değildir. Bu nedenle, yüzey özelliklerini değiştirmek için membran yüzeyi fonksiyonel polimerlerle aşıl原因arak genellikle modifiye edilir. Ayrıca, bir protein olarak GOx'un, karmaşık üç boyutlu yapısının yanı sıra güçlü molekül kuvvetleri nedeniyle tek başına nanoliflere elektroegrilmesi imkansızdır (Ge vd., 2012). Bu nedenle GOx enzimi, nanoliflere

genellikle immobilizasyon tekniği ile bağlanır. GOx enzimi immobilizasyonu için iletken polimer polianilin, polietilenimin-aşılı poli filmler, poli(glisidil metakrilat)-Si(1 1 1) hibritleri, poliüretan film, selüloz asetat- poli(metilmetakrilat) membran ve iletken kopolimerler gibi farklı polimerik destek malzemeleri kullanılmıştır (Bayramoğlu vd., 2010).

Bayramoğlu vd. (2010) alışmasında, PAN membran üzerinde polianilinin aşı polimerizasyonu kullanılarak iletken PAN/PANI kompozit membran hazırlamıştır. Kompozit membranın aşılanmış PANI zincirleri, GOx enziminin immobilizasyonu için kullanılmıştır. Serbest ve immobilize enzimler için optimum pH, sıcaklık, kinetik parametreler ve depolama stabiliteleri araştırılmıştır. İmmobilize edilmiş GOx enzimin aktivitesi 20°C dereceden 35°C dereceye kadar artmaya devam ettiği, 35°C ile 45°C arasındaki sıcaklıklarda optimum bir reaksiyon gosterdiği görülmüştür. Ek olarak, serbest ve immobilize GOx'lar, 4°C derecede fosfat tampon çözeltisi içinde saklanarak raf ömrü tespiti için aktivite ölçümleri sonucunda immobilize glukoz oksidazın, serbest enzime kıyasla yüksek depolama kararlılığı göstererek yüksek raf ömrü sağladığı raporlanmıştır (Bayramoğlu vd., 2010).

İmmobilize enzimlerin biyoteknolojik süreçlerdeki başarısı, biyokatalitik membranların performansını artırmaya yönelik temel araştırmalara ilgiyi artırmıştır. İmmobilize enzimin önemli bir özelliği depolama kararlılığıdır. GOx immobilize edilmiş ve serbest enzimin içeren filtrelerin, belirli aralıklarla enzim aktivitesi ölçüldüğünde, immobilize enzim aktivitesinin, serbest enzimin aktivitesine göre daha kararlı olduğu gözlemlenmiştir (Vasileva vd., 2006).

Yüzeysel biyokirlenme birçok yerde meydana gelebilir, halk sağlığı ve endüstriyel operasyonları derinden etkileyebilir (T. Wei vd., 2019). Filtrasyon gerçekleştikçe, membran yüzeyinde biyokirlenme oluşur ve geçirgenlikte düşüşe neden olur. Ayrıca, membran yüzeylerindeki biyokirlenme, enerji tüketimini arttırır ve sistemin erken kapanmasına neden olur. Biyokirlenme, hücre dışı polimerik maddeler gibi yapışkan biyomoleküller salgılayan ve hücre birikimi, kolonizasyon ve olgunlaşma yaşam döngüsünü takip ederek bir "biyofilm" oluşumuyla başlar. Biyofilm bir kez oluştuktan sonra, yapısındaki yapışkan hücre dışı polimerik maddeler nedeniyle, geleneksel işlemler kullanılarak uzaklaştırılması oldukça zordur (Kim vd., 2021).

GOx, membran yüzeyindeki bakteri hücrelerini yerinde etkisiz hale getiren hidrojen peroksit (H_2O_2) üretmek için glukoz oksidasyonunu katalize eder. Glukozun toksik olmayışı, sert kimyasallar gerektirmeden çevre açısından güvenli bir çalışma sağlar. GOx katalizli glukoz oksidasyonunun biyosidal mekanizması iyi tanımlanmıştır ve patojen yok etme, gıda güvenliği ve yüzey kaplamada uygulanmaktadır. Enzimler, çevredeki ortamlar üzerinde toksik veya zararlı etkiler oluşturmadan biyofilm oluşumunu kontrol etmek için çevre dostu ajanlardan biri olarak önem taşımaktadır (Kim vd., 2021).

Öte yandan, Lee vd. (2020) etkili bir antibakteriyel ajan olarak manyetik nanopartiküller ile gömülü GOx-bakır hibrit nanoçiçeklerin medikal sargı bezinde uygulanması üzerine bir çalışma yapmıştır. 'MNP-GOx NF'ler olarak adlandırılan, bakteriyel dekontaminasyon için etkili bu ajan, amin işlevli manyetik nanopartikül (NH_2 -MNP) gömülü bir GOx-bakır hibrit nanoçiçeklerdir. MNP-GOx NF'ler, GOx katalizli glukoz oksidasyonundan H_2O_2 üreterek etkili antibakteriyel aktivite göstermiştir. Bakteri hücrelerinin MNP-GOx NF'ler ile 3 saatlik muamelesinden sonra *Staphylococcus aureus* ve *E.coli*'nin %99,9'u öldürülmüştür. Bu, MNP-GOx NF'lerin muamelesine karşı gram-pozitif *S. aureus*'un, gram-negatif *E.coli*'den daha savunmasız olduğunu göstermiştir. MNP-GOx NF'ler, sekiz kez yinelenen bakteri öldürme için manyetik ayırma yoluyla geri dönüştürülen kullanımlardan sonra bile bakterisidal aktivitenin %97'sini koruyabilmiştir. Son olarak, antibakteriyel gazlı bezlerin imalatı için MNP-GOx NF'ler kullanılabileceği ve biyosensörler, biyoyakıt hücreleri ve biyodönüşümün yanı sıra bakteriyel dekontaminasyondaki uygulamaları için büyük bir potansiyel oluşturduğu ileri sürülmüştür (Lee vd., 2020).

Ge vd. (2012)'nin yaptığı çalışmada, gıda paketlemede kullanmak ve gıda raf ömrünü uzatmak için GOx immobilize kompozit membran konsepti denenmiştir. Bu çalışma ile, PVA/CS/çay ekstresi elektroğrılmış nanolif membrana, GOx immobilize edilmesiyle yeni bir gıda paketleme malzemesi elde edilmiştir. İmmobilize enzimin optimal aktivitesi, serbest enziminkine göre %68'in üzerinde olduğu görülmüştür. Oksijen konsantrasyonu %1'den az olduğunda mikroorganizmaların büyümesi ve çoğalması önemli ölçüde inhibe edilmiş ve böylece gıdanın raf ömrü uzamıştır. GOx ile immobilize edilen elektroğrılmış membran, test edilen numunelere %73 oranında deoksidasyon uyguladığı görülmüştür. Bu çalışma ile GOx immobilize kompozit membranların gıda muhafazası için kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Ge vd., 2012).

Oksijen gıdaların bozulmasında önemli bir faktördür, bu nedenle ambalajdaki oksijeni çıkarmak gıdaların raf ömrünü uzatmak için önemlidir ve GOx glukoz ve oksijenin reaksiyonunu katalize ederek oksijeni başarıyla uzaklaştır (Ge vd., 2012).

Önceki çalışmalarda GOx doğrudan gıdaya eklenmiştir, Ge vd. (2012)'nin çalışmasında ise kitosan ve çay ekstraktı ile bir araya getirilen GOx, elektroğrılmış membran üzerinde immobilize edilerek denenmiştir ve etkili olduğu deneyler sonucunda gözlemlenmiştir. Elektroğrılmış membranlardaki immobilize GOx'un deoksidasyonda etkili olduğu ve düşük oksijen koşullarında mikropların büyümesini engellediği anlaşılmıştır (Ge vd., 2012).

Apetrei & Camurlu, (2020) çalışmasında, glukozun amperometrik tespiti için, GOx çapraz bağlanması ve biyoalgılama matrisleri olarak elektroğrılmış kompozit nanoliflerin geliştirilmesi üzerine bir konsept sunmuştur. Poliakrilonitril (PAN) ve katyonik kil (montmorillonite (Mt)) bazlı kompozit elektroğrılmış nanolifler üretmiş ve glukoz oksidaz (GOx) enzimini çapraz bağlama yöntemiyle immobilize etmiştir. Böylece, glukoz biyoalgıyıcılarının geliştirilmesi konsepti üzerine odaklanmıştır. PAN/Mt kompozit nanolif, kil mineralinin biyoyumlu özellikleri ve elektroğrılmış nanoliflerin geniş yüzey alanı nedeniyle gelişmiş biyosensör performansına olanak sağlamıştır. Son olarak, PAN/Mt biyosensörlerinin gerçek numunelerde uygulanabilirliği, iki meyve suyunda glukoz içeriği ölçülerek test edilmiş ve başarılı sonuçlar ortaya koymuştur (Apetrei & Camurlu, 2020).

Lee vd. (2020) yapmış olduğu çalışmada, GOx immobilize nanokompozitlerin sekiz kez geri dönüştürüldükten sonra bile ilk bakterisidal aktivitesinin %97'sini koruduğunu gözlemlenmiştir. Ayrıca, immobilize GOx aktivitesinin, H₂O₂ üretmek üzere glukoz oksidasyonunu sürdürmek için yeterince kararlı olduğunu ortaya koymuştur (Lee vd., 2020). Bayramoğlu vd. (2010) immobilize edilmiş GOx enziminin operasyonel kararlılığını çalışmasında ölçülmüştür. GOx immobilize PAN/PANI membranının 20 tekrar çalışmanın sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık %63'ünü koruduğunu raporlamıştır (Bayramoğlu vd., 2010). Ek olarak, Rauf vd. (2006) çalışmasında, immobilize GOx enzimi, 35 tekrar çalışmanın ardından ilk aktivitenin %33'ünü koruyarak iyileştirilmiş operasyonel kararlılık gösterdiğini ve bir aylık saklama süresinin ardından aktivitenin %94'ünü koruduğunu raporlanmıştır (Rauf vd., 2006). Bu yüksek operasyonel istikrar, pratik uygulamalarda operasyonel maliyeti önemli ölçüde azaltabilir (Bayramoğlu vd., 2010).

3. MATERYAL METOT

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler

Nanolif filtre üretimi, nanolif filtrelere enzim immobilizasyonu, antibakteriyel etkinlik testleri ve filtre analizlerinde kullanılan kimyasal maddelerin adları, markaları ve kodları Çizelge 3.1’de mevcuttur.

Çizelge 3.1 : Deneyleerde kullanılan kimyasal ve materyal adları, markaları ve kodları.

Kimyasal/Materyal Adı	Marka	Kod
Agar	Sigma-Aldrich	CAS 91079-40-2
Destek Tabakası	Mogul	PET-17 g/m ³
Dimetil Sülfoksit	Merck	1.02952.2500
D(+)-Glukoz	Merck	1.08337.1000
Gliserol	Fisher BioReagents	CAS 56-81-5
Glukoz Oksidaz (GOx)	Sigma-Aldrich	G-7141
Glutaraldehit Solüsyonu (%25)	Sigma-Aldrich	CAS 111-30-8
Grafen Nanoplatelet (GNP)	Özel Üretim	190.000 U
Hidrojen Peroksit	-	CAS 7722-84-1
Metil Alkol	Sigma-Aldrich	CAS 67-56-1
Sodium Chloride (NaCl)	Fisher BioReagents	BP358-1
N, N-Dimetilformamid (DMF)	Merck	1.03034.2500
Poliakrilonitril (PAN)	Sigma-Aldrich	25014-41-9
Propidyum İyodürün, SYTO13	ThermoScientific	L7012
Sodyum Fosfat Monobazik Dihidrat	Sigma-Aldrich	13472-35-0
Tryptone	Sigma-Aldrich	T7293-250G
Tween 80	-	CAS 9005-65-6
Yeast Extract	Biolife	18P019

I. Lee vd. (2020) ve Kim vd. (2021) makalelerinin incelenmesi doğrultusunda GOx enzimin 190.000 U aktivitesi de dikkate alındığında 6 µg/mL GOx solüsyon konsantrasyonu ve GOx solüsyonunun glukoz parçalama kapasitesi hesaba katılarak %0,5 w/v glukoz oranı deneyleerde kullanılmıştır.

3.2 Nanolif Filtre Üretimi için Saf Polimer ve Nanokompozit Çözeltilerinin Hazırlanması

Nanolif filtre üretiminde poliakrilonitril (PAN) polimeri ve grafen nanoplatelet (GNP) kullanılmıştır. PAN polimeri ve GNP toz şeklindedir. PAN'ın molekül ağırlığı 150.000 g/mol'dür. GNP, NANOGRafen Co.'dan temin edilmiştir. Atık lastikten üretilen GNP, siyah renklidir ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) elementel analizine göre yapısındaki C oranı %87, O oranı %9, Fe oranı %0,5 ve diğer elementler oranı %3,5'tir. GNP yüzey alanı 100–130 m²/g'dır.

PAN polimerinin ve GNP'nin çözücüsü olarak N, N-Dimetilformamid (DMF) kimyasalı kullanılmıştır. Saf PAN polimer çözeltisi ağırlıkça %12 oranında PAN içermektedir. Nanokompozit PAN-GNP çözeltisi ağırlıkça %12 oranında PAN ve ağırlıkça %0,5 oranında GNP içermektedir. Hazırlanan saf PAN ve PAN-GNP nanokompozit çözeltileri elektroçirme yöntemiyle nanolif üretiminde kullanılmıştır.

Liu vd. (2012), ham grafenden elde edilmiş genişleyebilir grafenin DMF solüsyonunda sonikasyon işlemine tabi tutulması ile pul pul dökülen, tek katmanlı ve stabil grafenlerin başarılı bir şekilde elde edilebileceğini doğrulamıştır. Deney sonuçları, yaklaşık 3 nm kalınlıktaki genişleyebilir grafenden, yaklaşık 1,2 nm kalınlığındaki tek tabakalı grafenin elde edildiğini göstermiştir. (Liu vd., 2012).

3.2.1 Saf PAN polimer çözeltisinin hazırlanması

PAN polimeri cam numune şişesinin içerisineki 30 mL DMF çözücüsünde ağırlıkça %12 olacak şekilde hassas terazide tartılmıştır. DMF yoğunluğu 0,944 g/mL'dir ve aşağıdaki denklemler doğrultusunda ağırlıkça %12 PAN oranı elde edebilmek için 3,86 g PAN hassas terazide tartılmıştır.

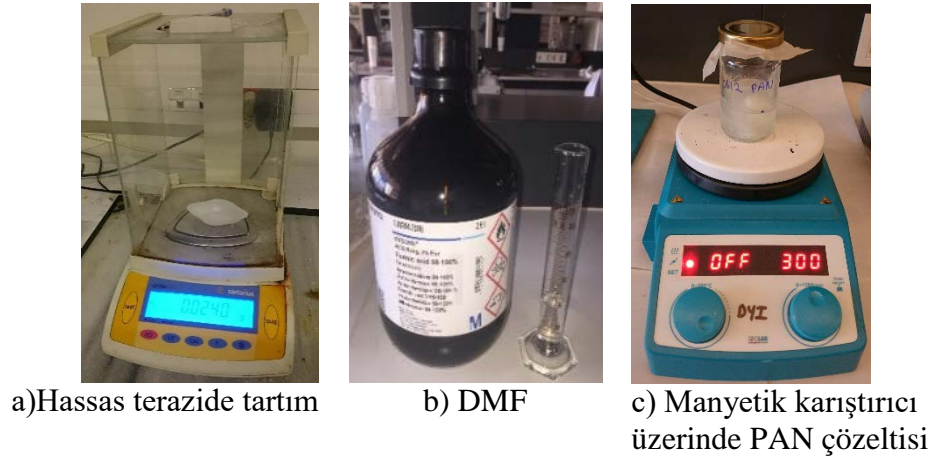
$$Hacim \times Yoğunluk = Kütle \quad (2)$$

$$30 \text{ mL DMF} \times 0,944 \frac{\text{gr}}{\text{mL}} = 28,32 \text{ gr} \quad (3)$$

$$\frac{PAN}{PAN + 28,32 \text{ gr}} = \frac{12}{100} \quad (4)$$

$$PAN \text{ kütlesi} = 3,86 \text{ gr} \quad (5)$$

Çözelti oda sıcaklığında bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda hazırlanmıştır. Şekil 3.1’de saf polimer çözeltisinin hazırlanma aşamaları görülmektedir.



Şekil 3.1 : Saf PAN çözelti hazırlama aşaması.

3.2.2 PAN-GNP nanokompozit çözeltisinin hazırlanması

PAN polimeri cam numune şişesinin içerisindeki 30 mL DMF çözücüsünde ağırlıkça %12 olacak şekilde hassas terazide tartılmıştır. DMF yoğunluğu 0,944 g/mL’dir ve aşağıdaki denklemler doğrultusunda ağırlıkça %12 PAN oranı elde edebilmek için 3,86 g PAN hassas terazide tartılmıştır. Cam numune şişesinin içerisindeki 30 mL DMF çözücüsünde ağırlıkça %0,5 GNP elde edebilmek için aşağıdaki denklemler doğrultusunda 0,1609 g GNP hassas terazide tartılmıştır.

$$PAN + DMF = 3,86 \text{ g} + 28,32 \text{ g} = 32,18 \text{ g} \quad (6)$$

$$32,18 \text{ g} \times \frac{0,5}{100} = 0,1609 \text{ g GNP} \quad (7)$$

Daha sonra GNP ve DMF çözeltisi Hielscher marka UP200St model sonikasyon cihazı ile %30 amplitude değerinde 20 dak. süreyle dispersiyeye edilmiştir. Scaffaro & Lopresti, (2018) çalışmasında, sonikasyondan önce GNP’lerin incelenmiş SEM görüntüleri analizinde farklı boyutlara sahip düzensiz agregalar gözlemlenmiştir (Scaffaro & Lopresti, 2018). Sonikasyon işlemi stabil ve tek katmanlı GNP elde etmek için faydalıdır.

Sonikasyon ardından, ağırlıkça %12 olacak şekilde hassas terazide tartılan 3,86 g PAN polimeri nanoeklemleri dispersiyonuna eklenerek, oda sıcaklığında bir gece boyunca

manyetik karıştırıcıda hazırlanmıştır. Şekil 3.2’de PAN-GNP nanokompozit çözeltisinin hazırlanma aşamaları görülmektedir.



a) GNP

b) PAN-GNP nanokompozit çözeltisi

Şekil 3.2 : PAN-GNP çözelti hazırlama aşaması.

3.3 Nanolif Filtrelerin Elektroğirme Yöntemi ile Üretimi

Elektroğirme yöntemi ile saf PAN ve PAN-GNP kompozit nanolif filtrelerin üretimi, laboratuvar ortamında Şekil 3.3’te görülen Inovenso NS Plus model elektroğirme cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneyler esnasında kullanılmış olan elektroğirme cihazının toparlayıcı tipi tambur (drum) kolektördür. Tamburlu kolektörler, aralıksız nanolif üretimi için en sık kullanılan kolektör tipidir (Babu vd., 2023).



Şekil 3.3 : Inovenso NS plus model elektroğirme cihazı.

PAN nanolif filtre üretimi için ağırlıkça %12'lik saf PAN polimer çözeltisi kullanılmıştır. PAN-GNP nanolif üretimi için ise ağırlıkça %12'lik PAN ve %0,5'lik GNP içeren nanokompozit çözelti kullanılmıştır. PAN polimeri ve GNP çözeltileri için %100 polietilen terephthalattır (PET) ve 17 g/m³ birim ağırlığa sahip Mogul-Polyester Spunbond marka destek tabakası kullanılmıştır.

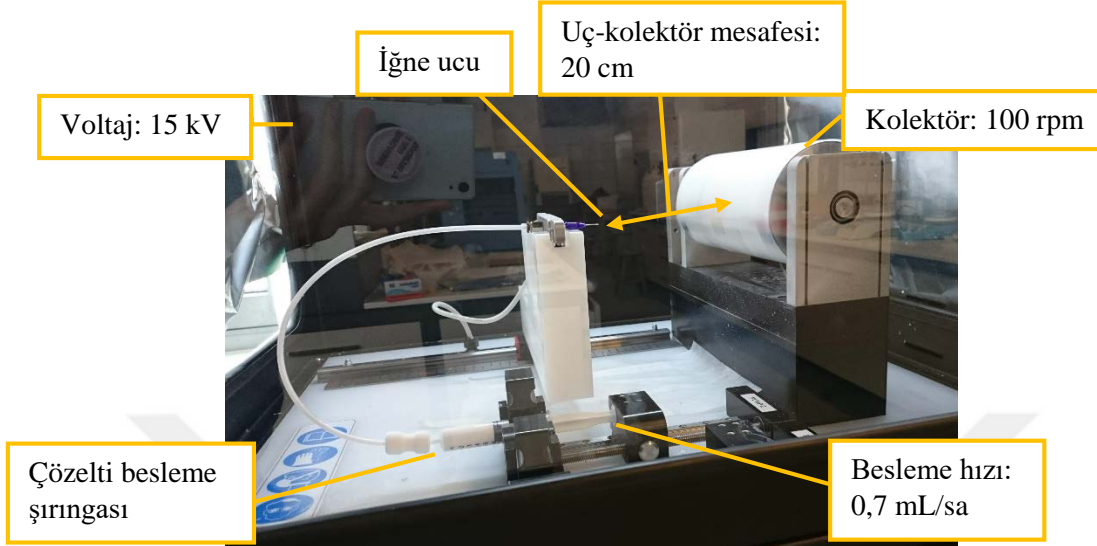
Elektroegirme parametreleri düzgün çaplı ve boncuksuz fiberler elde etmek için optimize edilmiştir. Besleme hızı 0,7 mL/sa, voltaj 15 kV, kolektör dönme hızı 100 rpm ve uç-kolektör arası mesafe 20 cm olarak ayarlanmıştır. Nanolif filtre üretim aşamasında besleme hızı, voltaj, kolektör dönme hızı ve uç-kolektör arası mesafe parametreleri sabit tutulup, optimizasyon parametresi olarak elektroegirme süresi çalışılmış ve üretim süresi 15, 30 ve 45 dak. olarak uygunlanmıştır. Çizelge 3.2 'de elektroegirme prosesinde kullanılan parametreler ve üretilen filtrelerin kodları görülmektedir.

Çizelge 3.2 : Elektroegirme parametreleri.

Üretilen Nanolif Filtre Kodu	Besleme Hızı (mL/sa)	Voltaj (kV)	Kolektör Dönme Hızı (rpm)	Üretim Süresi (dak.)
PAN15	0,7	15	100	15
PAN30	0,7	15	100	30
PAN45	0,7	15	100	45
PAN-GNP15	0,7	15	100	15
PAN-GNP30	0,7	15	100	30
PAN-GNP45	0,7	15	100	45

Elektroegirme cihazında iğne ucu ile kolektör arasındaki mesafe tabla oynatılarak optimum mesafe olarak belirlenen 20 cm'e ayarlanmıştır. Uygun ölçülerde kesilmiş destek tabakası alüminyum folyo üzerine yapıştırılmıştır. Kolektör yüzeyi temizlenmiş ve alüminyum folyo üzerindeki destek tabakası herhangi bir pürüz ve hava boşluğu kalmayacak şekilde kolektör üzerine yerleştirilmiştir. Elektroegirme cihazındaki şırınga içerisindeki çözelti borular vasıtası ile iğne ucuna ulaşır. Burada borular içerisinde hava boşluğu kalmamasına dikkat edilmiştir. Ayrıca, homojen bir üretimin gerçekleşmesi için iğne ucunda damlacık oluşmadığına emin olunur. Düzenek hazırlandığında elektroegirme cihazının kapağı kapatılarak çalıştırılır. Burada iş sağlığı ve güvenliği açısından, cihazda voltaj bulunduğu için kapak kapatıldıktan sonra çalıştırılması önem arz etmektedir. Elektroegirme cihazı çalıştırıldığında iğne ucundaki çözelti sürekli pompalanarak beslenir ve voltaj sayesinde Taylor konisi

oluşturarak homojen bir şekilde kolektör üzerinde nanolif tabakayı oluşturur. Şekil 3.4'te elektroğirme yöntemi ile nanolif filtre üretilirken kullanılan düzenek ve parametreler görülmektedir.



Şekil 3.4 : Elektroğirme cihazı düzenneği ve parametreleri.

Saf PAN ve PAN-GNP nanokompozit çözeltilerinden üretilen nanolif filtrelerin kodları, üretim süreleri, içerikleri ve kullanılan destek tabakası bilgisi Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'te gösterilmektedir.

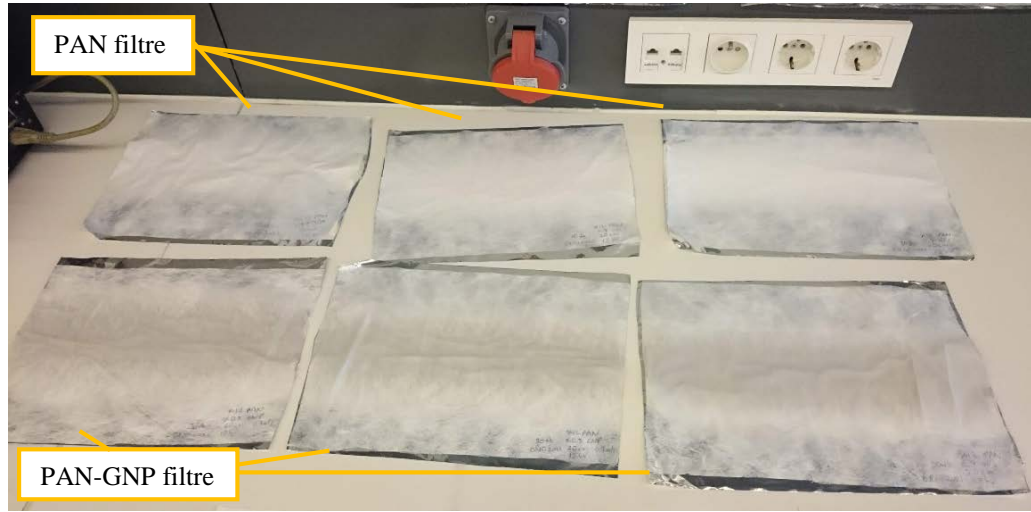
Çizelge 3.3 : Saf PAN polimer çözeltisinden üretilmiş nanolif filtrelerin özellikleri ve isimlendirmeleri.

Nanolif Filtre Kodu	PAN Polimeri (Ağırlıkça)	Destek Tabakası	Üretim Süresi (dak.)
PAN15	% 12	PET-17 g/m ³	15
PAN30	% 12	PET-17 g/m ³	30
PAN45	% 12	PET-17 g/m ³	45

Çizelge 3.4 : PAN-GNP nanokompozit çözeltisinden üretilmiş nanolif filtrelerin özellikleri ve isimlendirmeleri.

Nanolif Filtre Kodu	PAN Polimeri (Ağırlıkça)	GNP (Ağırlıkça)	Destek Tabakası	Üretim Süresi (dak.)
PAN-GNP15	% 12	% 0,5	PET-17 g/m ³	15
PAN-GNP30	% 12	% 0,5	PET-17 g/m ³	30
PAN-GNP45	% 12	% 0,5	PET-17 g/m ³	45

Şekil 3.5'te elektroğrılmış PAN ve PAN-GNP nanolif filtreler görülmektedir.



Şekil 3.5 : Elektroğrılmış PAN ve PAN-GNP nanolif filtreler.

3.4 Nanolif Filtrelere GOx Enzimi İmmobilizasyon Süreci

Üretilen nanolif filtrelere antibakteriyel etki kazandırması hedeflenen glukoz oksidaz (GOx) enziminin immobilizasyonu (bağlanması) için araştırılmış iki farklı teknik kimyasal (glutaraldehit içeren orijinal yöntem) ve fiziksel (glutaraldehit kullanılmadan) olmak üzere iki ayrı yol ile uygulanmıştır. Deneyle sonuçları en etkili olan yönteme karar verilmiştir.

Enzim immobilizasyon deneylerinde 190.000 U aktiviteli GOx enzimi kullanılmıştır. Enzim aktivitesi (U), 1 dakikada 1 µmol glukozun parçalanmasını ifade eder. Aşağıdaki hesaplamalara göre 1 g 190.000 U aktiviteli GOx enzimi, dakikada 34,2 g glukozu parçalama kapasitesine sahiptir.

$$1 U = 1 \mu\text{mol glukoz parçalanması/dak} \quad (8)$$

$$1 \text{ g GOx} = 190.000 U \quad (9)$$

$$\frac{1 \text{ g GOx}}{\text{dak.}} = 190.000 \mu\text{mol glukoz parç.} = 0,19 \text{ mol glukoz parç.} \quad (10)$$

$$\begin{aligned} (\text{glukoz molekül ağırlığı}) \times \text{mol} &= 180 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 0,19 \text{ mol} \\ &= 34,2 \text{ g glukoz parç./dak} \end{aligned} \quad (11)$$

190.000 U aktiviteli GOx enziminden 0,01 g hassas terazide tartılarak 50 mL sodyum fosfat tampon içerisinde deneylerde kullanılmak üzere 0,2 mg/mL konsantrasyonunda GOx enzim solüsyonu elde edilmiştir.

İki farklı immobilizasyon tekniği kimyasal ve fiziksel olmak üzere dört şekilde ön karakterizasyon sonuçlarına göre karar verilen PAN30 ve PAN-GNP30 nanolif filtrelerine uygulanmış ve immobilizasyon verimliliği ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda en uygun olduğu anlaşılan immobilizasyon tekniğine karar verilmiştir.

- a. İlk olarak, Apetrei & Camurlu (2020) makalesinde uygulanan çapraz bağlama yöntemi ile GOx enzim immobilizasyon tekniğinden yararlanılmıştır. Kimyasal yöntemde, 3 mL GOx enzim solüsyonu ve 3 mL glutaraldehit solüsyonu (sodyum fosfat tampon içerisinde 2,5 w/v) ile enzim solüsyonu birinci teknikte kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Glutaraldehit solüsyonu ile hazırlanan GOx enzim solüsyonundan 1 mL, 5 cm çapında daire olarak kesilmiş nanolif filtrelere damlatılıp oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Filtreler kuruduktan sonra, 20 mL sodyum fosfat tampon içerisinde 24 saat boyunca +4 °C derecede muhafaza edilmiştir. Fiziksel uygulama için aynı yöntem glutaraldehit solüsyonu kullanılmaksızın nanolif filtrelere uygulanmıştır.
- b. İkinci olarak, Dayal & Godjevargova (2005) makalesinde uygulanan difüzyonla GOx enzim yükleme yöntemi ile immobilizasyon tekniğinden yararlanılmıştır. Kimyasal yöntemde, nanolif filtrelere öncelikle modifikasyon uygulanmıştır. Modifikasyonun amacı PAN zarlarında aktif amid grupları oluşturmak ve sonrasında kovalent enzim bağlanmasını sağlayabilmektir. Metil alkol, distile su, 2N sodyum hidroksit ve dimetil sülfoksit solüsyonu, her birinden 5'er mL olacak şekilde toplamda 20 mL hazırlanmış ve bir petri içerisine aktarılmıştır. 5 cm çapındaki daire olarak kesilmiş nanolifler, petri içerisindeki karışıma koyulmuş ve 35 °C dereceye, 5 dak. ısıtılmıştır. Sonrasında, hidrojen peroksit (0,5 mL, %20) eklenmiş ve 3 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra, nanolifler metil alkol ve distile su ile yıkanmıştır. Modifikasyon sonrası, difüzyon ile enzim yüklemesi aşamasına geçilmiştir. 5 cm çapındaki daire olarak kesilmiş nanolifler %25 glutaraldehit solüsyonu içerisinde +4 °C derecede 1 saat bekletilmiştir. Sonrasında distile su ile yıkanmıştır. Ardından, 1 mL GOx enzim solüsyonu filtrelere damlatılıp oda

sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Nanolifler kuruduktan sonra, 20 mL sodyum fosfat tampon içerisinde +4 °C derecede muhafaza edilmiştir. Fiziksel uygulama için aynı yöntem glutaraldehit solüsyonu kullanılmaksızın nanolif filtreler üzerine uygulanmıştır.

Bu dört işlem PAN30 ve PAN-GNP30 nanolif filtrelerine uygulanmış ve sonra GOx enzimi immobilize edilmiş PAN30 ve PAN-GNP30 nanolif filtrelerin bekletilmiş olduğu sodyum fosfat tampon solüsyonlarından 24 saat ve 1 hafta sonra örnekler alınmıştır. Bu örnekler ile nanolif filtreler üzerine bağlanan enzim miktarının tespiti Lowry vd. (1951) metodu takip edilerek 660 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. Sonuçlar doğrultusunda, immobilize edilmiş nanolif filtrelerden GOx enzim kaybı miktarının tespiti yapılmıştır.

Enzim kaybı miktarı aşağıdaki gibi hesaplanmıştır. Burada N immobilize edilen GOx enzim konsantrasyonu, N_0 24 saat sonra sodyum fosfat tampon içerisindeki GOx enzim konsantrasyonu ve N_1 ise 1 hafta sonra sodyum fosfat tampon içerisindeki GOx enzim konsantrasyonudur.

$$\text{Kayıp oranı (\%)} = \frac{N - N_{0/1}}{N} \times 100 \quad (12)$$

Şekil 3.6'da GOx enzim immobilizasyon prosesi ve 4 °C derecede muhafaza edilmek üzere sodyum fosfat tampon içerisinde muhafaza edilen GOx immobilize PAN30 ve PAN-GNP30 filtreler ve OD660 ölçüm aşamaları görülmektedir.



Şekil 3.6 : GOx enzim immobilizasyon prosesi.

Çizelge 3.5'te iki farklı immobilizasyon tekniğinin uygulanması özetlenmektedir.

Çizelge 3.5 : GOx enzim immobilizasyon tekniklerinin uygulaması.

Nanolif Filtre Kodu	İmmobilizasyon Tekniği	Uygulama
PAN30	Çapraz bağlama	Kimyasal (Glutaraldehit ile)
PAN30	Çapraz bağlama	Fiziksel (Glutaraldehit olmadan)
PAN30	Modifikasyon+Difüzyonla enzim yükleme	Kimyasal (Glutaraldehit ile)
PAN30	Modifikasyon+Difüzyonla enzim yükleme	Fiziksel (Glutaraldehit olmadan)
PAN-GNP30	Çapraz bağlama	Kimyasal (Glutaraldehit ile)
PAN-GNP30	Çapraz bağlama	Fiziksel (Glutaraldehit olmadan)
PAN-GNP30	Modifikasyon+Difüzyonla enzim yükleme	Kimyasal (Glutaraldehit ile)
PAN-GNP30	Modifikasyon+Difüzyonla enzim yükleme	Fiziksel (Glutaraldehit olmadan)

Şekil 3.7'de GOx immobilize edildikten sonra sodyum fosfat tampon içerisinde muhafaza edilen filtrelerin testlerde kullanılmak üzere çeker ocak altında kurutulması görülmektedir.



Şekil 3.7 : GOx immobilize filtreler.

İmmobilize edilmiş PAN30 ve PAN-GNP30 nanolif filtreler bundan sonra PAN30_GOx ve PAN-GNP30_GOx olarak adlandırılmaya devam edilecektir.

3.5 Nanolif Filtrelerin Karakterizasyonu ve Yapısal Analizleri

Üretilen nanolif filtrelerin analizleri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve fourier-transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Böylece filtrelerin morfolojisi ve kimyasal yapısı hakkında fikir elde edinmesi hedeflenmiştir. PAN30, PAN-GNP30, PAN30_GOx ve PAN-GNP30_GOx filtreleri üzerinde analizler uygulanmıştır.

3.5.1 SEM analizi

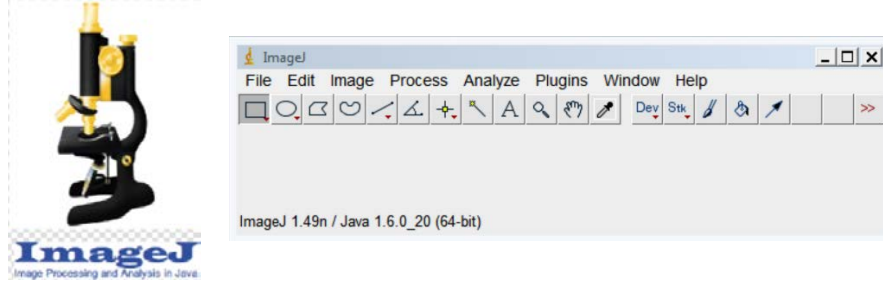
Gebze Teknik Üniversitesinde bulunan Philips XL30SFEG Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak, üretilen nanolif filtrelerin yüzey yapısı (morfolojisi) ve nanolif çapları tespit edilmiştir. Philips XL30SFEG Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) cihazına ait görsel Şekil 3.8'de görülmektedir.



Şekil 3.8 : Philips XL30SFEG Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).

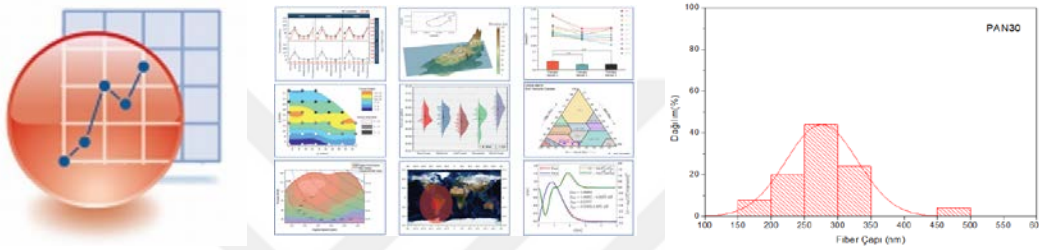
SEM analizine hazırlanmak üzere, nanolif filtre numuneleri yüksek vakum altında ($3,7 \times 10^{-6}$ mbar) altın ile kaplanmıştır. Analiz sonucunda 2000x, 5000x, 10000x ve 20000x büyütme değerlerinde SEM görüntüleri elde edilmiştir.

Şekil 3.9'da verilen Image J isimli görüntü analiz programı kullanılarak nanolif çap boyut analizleri gerçekleştirilmiştir. Image J programı, SEM görüntülerinden fiber çap ortalaması hesaplamada kullanılmaktadır. Öncelikle SEM görüntüsündeki ölçek Image J programına tanıtılmış ve 25 farklı noktadan ölçüm alınarak nanolif çapları belirlenmiştir. Ölçülen nanolif çaplar, program hafızasından Excel dosyasına aktarılarak ortalama nanolif çap değerleri ve standart sapmalar hesaplanmıştır.



Şekil 3.9 : Image J programı.

Nanoliflerin çap dağılımları Şekil 3.10'da görülen OriginLab isimli programda Gauss dağılımı yaklaşımı ile grafik haline getirilmiştir.

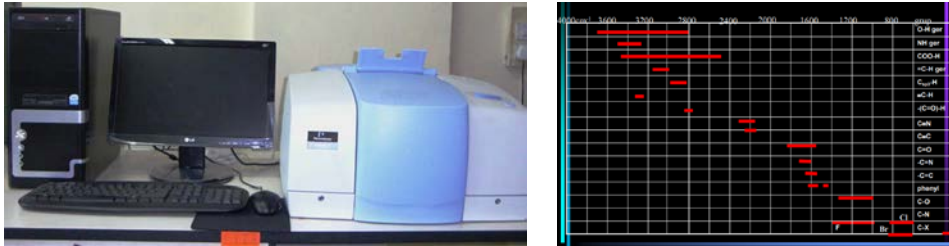


Şekil 3.10 : OriginLab programı.

3.5.2 FTIR analizi

Fourier-transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi ile nanolif filtrelerin organik bağları karakterize edilmiştir. FTIR, filtredeki kimyasal değişikliklerin moleküler düzeyde incelenmesi için hızlı, güvenli, objektif ve etkili bir yöntem sağlamaktadır.

Üretilen nanolif filtrelerin FTIR analizleri Gebze Teknik Üniversitesi Kimya bölümünde bulunan Perkin Elmer Spectrum 100 spektrofotometre cihazı ile yapılmıştır. Perkin Elmer Spectrum 100 spektrofotometre cihazı Şekil 3.11'de görülmektedir.



Şekil 3.11 : Perkin Elmer Spectrum 100 spektrofotometre cihazı.

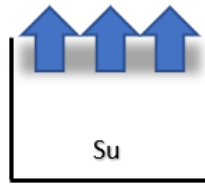
3.6 Nanolif Filtrelerin Performansı

Membran filtreler, su buharının bir ortamdan diğerine geçişine izin veren gözenekli malzemelerdir. Su buharı geçirgenliği testi, iç ortam hava filtrelerinin performanslarını belirlemek için önemlidir.

Mustapha vd. (2020), binalarda tüketilen enerjinin yaklaşık %50'sinin ısıtma, havalandırma ve iklimlendirme (HVAC) sistemlerinden kaynaklandığını ve iç ortam nemi söz konusu olduğunda filtre verimliliğinin etkilendiğini bildirmiştir. Ayrıca, filtreden nemi uzaklaştırmak için uygulanan yöntemler sistemin harcadığı toplam enerjinin yaklaşık %20-40'ını oluşturarak enerji tüketiminde artışa neden olmaktadır. Filtre geçirgenliği az ise su buharı malzeme içinde tutularak yoğunlaşmaya neden olur. Böylece dahili nem artar ve filtrenin kütle transferini engeller (Mustapha vd., 2020). Verimli bir filtre elde etmek için yüksek su buharı geçirgenliğine sahip olması iç ortam nemine karşı toleranslı olabileceğini göstermektedir.

3.6.1 Su buharı geçirgenliği testi

Su buharı geçirgenlik testinde birim zamanda su buharı geçiş hızı analiz edilir. Filtrelerin su buharı geçirgenliğini ölçmek için Şekil 3.12'de görülen en yaygın kullanılan test olan Amerikan Test ve Malzeme Derneği (ASTM) E96 standardında açıklanan ıslak kap yöntemi dikkate alınmıştır.



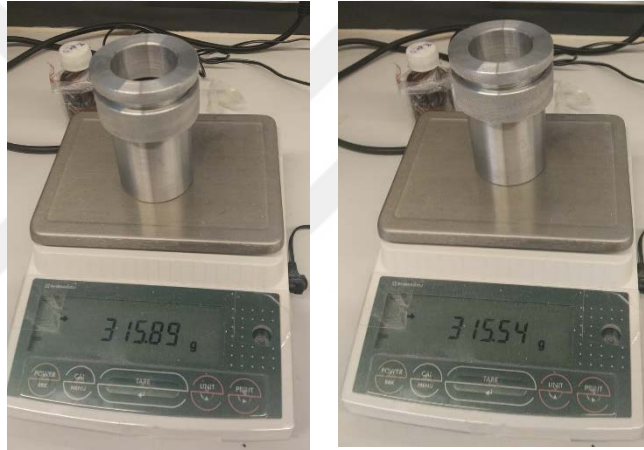
Şekil 3.12 : ASTM E96 standardı ıslak kap yöntemi testi.

Düzeneğe bir miktar distile su eklenir ve uygun ölçüde kesilmiş nanolif filtreler aktif yüzeyi aşağı yöne bakacak şekilde düzeneğe yerleştirilir. Düzenek deney boyunca 40 °C'de sabit kalması için ısıtıcı üzerine koyulur ve termometre ile sıcaklık değeri takip edilir. Deney başlangıcında düzenek tartılır ve 1 saat boyunca 40 °C'de bekletildikten sonra düzenek tekrar tartılır. İlk ve son tartım arasındaki fark nanolif filtre direncini aşabilen su buharı miktarıdır. Filtreden geçen su miktarı, filtre yüzey alanına bölünerek $g/m^2/sa$ biriminde sonuç elde edilir. Su buharı geçirgenlik sonucu filtrenin kalınlık ve

hidrofilik özelliği hakkında fikir vermektedir. Şekil 3.13'te su buharı geçirgenliği deney seti görülmektedir.



a) Düzenekteki su sıcaklığı 40 °C dereceye ayarlanırken.



b) Deneye başlarken ilk tartım sonucu c) 1 saat sonunda son tartım sonucu.

Şekil 3.13 : Su buharı geçirgenliği deney seti.

3.7 Antibakteriyel Etkinlik Testleri

GOx enzimi immobilize edilmiş PAN ve PAN-GNP nanolif filtrelerin, antibakteriyel özelliklerinin test edilmesi amacıyla iç ortam havasındaki mikroorganizmaları temsili bir bakteri suşu seçilmiştir. Laboratuvar çalışmalarında biyogüvenlik açısından seçilen türün düşük risk taşımaya dikkat edilmiştir. Ayrıca, *Escherichia coli* DH10B suşu, DNA klonlaması için de oldukça verimlidir. Bu amaçla *E.coli* DH10B suşu Prof.Dr. Bülent Bozdoğan'dan temin edilmiştir. Deneyler esnasında kontaminasyonu engellemek ve en aza indirmek için kullanılan malzemeler İTÜ laboratuvarlarında bulunan Hirayama markalı HV50-L Otoklav cihazı ile sterilize edilmiştir. Ayrıca,

antibakteriyellik deneyleri boyunca mikrobiyal kontaminasyon riskini en aza indirmek için çalışma alanları ve ekipmanlar düzenli aralıklarla alkol solüsyonu ve dezenfektan ile temizlenmiş, bunzen beki alevi etrafında deneyler gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.14'te aseptik koşullar için gerekli cihaz ve malzemeler olan 135 °C sıcaklığa kadar çıkabilen Hirayama HV50-L Otoklav cihazı, bunzen beki ve steril çalışma ortamı görülmektedir.



a) Hirayama HV50-L Otoklav b) Bunzen beki ve steril deney ekipmanları

Şekil 3.14 : Aseptik koşullar için gerekli cihaz ve malzemeler.

Antibakteriyellik test sonuçları kob biriminde elde edilerek sonuçlar yorumlanmıştır. Koloni oluşturan birim (kob) tahlili, agar ortamında görülen bir mikroorganizma kolonisinin tek bir hücreden türetildiği varsayımıyla kolonileri sayarak bir kültür solüsyonundaki canlı bakteri sayısını tahmin etme yöntemidir (Tsuchiya vd., 2018).

Antibakteriyel etkinlik testleri öncesinde ilk olarak bakteri stoklanması gerçekleştirilmiş ve uygulanan testlerde kullanılan yöntemlerin ana hatları aşağıda iki aşamada özetlenmiştir.

I. Liyofilize halde gelen bakteri süşunun uygun besiyerinde canlandırılması ve stoklanması;

Escherichia coli DH10B süşu için önerilen Luria Bertani (LB) besiyeri litrede 10 g tryptone, 10 g NaCl ve 5 g yeast extract içermektedir. Bu formülasyona sahip besiyerinin sıvı ve katı formları (litrede 15 g agar ilavesi ile) önceden hazırlanmıştır. Şekil 3.15'te *E.coli* DH10B süşu, sıvı LB besiyeri ve LB agar görülmektedir.



a) *E.coli* DH10B şuşu b) Sıvı LB besiyeri c) LB agar

Şekil 3.15 : *E.coli* DH10B şuşu ve LB besiyeri.

Liyofilize bakteri aseptik şartlarda oda sıcaklığına getirilip sıvı LB besiyerine ekilerek bir gün boyunca 37 °C'de çalkalamalı ortamda inkübe edilmiştir. Deneylerde İTÜ laboratuvarlarında bulunan ve Şekil 3.16'da görülen Stuart SI500 Orbital Incubator markalı orbital çalkalayıcı, Elektromag marka santrifüj ve Fisherbrand marka vorteks karıştırıcı cihazlar kullanılmıştır.



a) Stuart SI500 Orbital Incubator cihazı

b) Elektromag santrifüj cihazı

c) Fisherbrand vorteks karıştırıcı

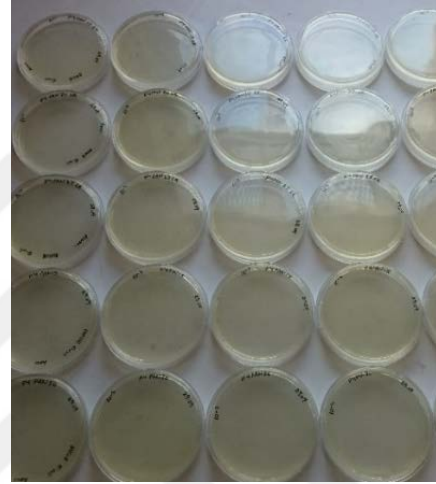
Şekil 3.16 : Deneylerde kullanılan yardımcı cihazlar.

Ertesi gün büyümüş olduğu gözlemlenen bakteri kültürü bir seri dilüsyonla bu seferde LB agarın olduğu petrilere alınarak bir gece 37 °C'de inkübe edilmiştir. Şekil 3.17'de bakteri büyümüş sıvı LB besiyeri ve seri dilüsyon deney seti aşamaları görülmektedir.



a) Bakteri ekilmemiş duru görünümlü sıvı LB besiyeri

b) Bakteri büyümüş bulanık görünümlü sıvı LB besiyeri



c) Seri dilüsyon

d) LB agara bakteri yayımı

Şekil 3.17 : Seri dilüsyon deney seti.

Bu aşamada bakteri türünün saflığı kontrol edilmiş, morfolojisi incelenmiş ve kültürdeki bakteri sayısının 10^9 kob/mL üzeri olduğu saptanmıştır.

Bakteri sayımı için aşağıdaki formül kullanılmıştır;

$$\frac{\text{kob}}{\text{mL}} = \frac{\text{Koloni Sayısı}}{(\text{Bakteri Hacmi}) \times (\text{Seyreltme Faktörü})} \quad (13)$$

Gerekli kontrolleri sağlanmış suşu -20 °C derecede saklanmak üzere stoklanmıştır. Bu işlem bir gece büyümüş bakteri kültürünün yarı oranda gliserol ile karıştırılması ve uygun tüplerde muhafaza edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Liyofilize halde gelen bakteri suşunun uygun besiyerinde canlandırılması ve stoklanması aşamaları Şekil 3.18'de görülmektedir.

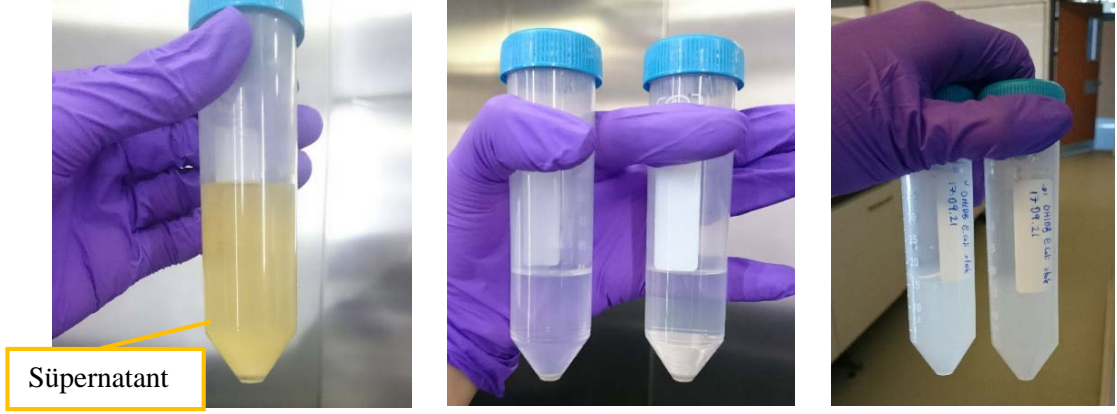


Şekil 3.18 : Sırasıyla *E.coli* DH10B bakterisinin çizgi ekim petri görüntüsü ve hazırlanan deney stokları.

II. Üretilen nanolif filtrelerin antibakteriyel etkinlik testlerinin gerçekleştirilmesinde izlenen yöntem;

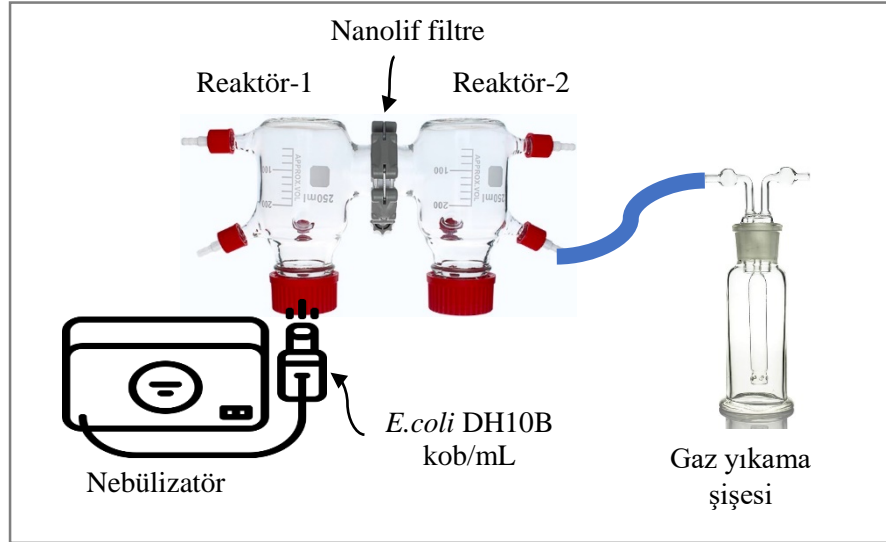
Bakterilerin stoklanması iki yöntem kullanılmıştır bunlardan ilki yani bakteriyi sıvı veya katı besiyerinde saklamaya dayalı yöntem bakteri süşunun devamlılığı için gereklidir ve yukarıda özetlenmiştir. İkinci bakteri stoğu ise salin içerisindeki bakterilerin belirli bir zaman aralığında konsantrasyon (kob) olarak stabil halde kalmasını sağlayarak, antibakteriyel etkinlik testlerinde kullanılmasını amaçlamıştır.

Bu aşamada -20 °C derecede stoklanan *E.coli* DH10B bakterisi sıvı LB besiyerinde bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün çoğalmış bakteri kültürü besiyeri kalıntılarının ortamdan uzaklaştırılması amacı ile 15 dak. 3750 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant dökülmüş, yerine salin çözeltisi (litrede 9 g NaCl içeren izotonik ortam) eklenmiştir. Salin ile karıştırılan bakteriler santrifüjleme işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlemin üç kez tekrarı ile bakteriler besiyeri kalıntılarından arındırılmıştır. En son salin ile tamamlanan bakteri stoğu buzdolabında 4 °C derecede yaklaşık bir aya kadar sayısını ve canlılığını muhafaza etmektedir. Bu şekilde hazırlanan 4 °C derece stoğu antibakteriyel deney setlerine uygun stoktur ve içerisindeki bakteri sayısının hesaplanması önemlidir. Stoğun bakteri sayımında 10'un katları şeklinde azalan bakteri titreleri LB agarın olduğu petrilere aseptik şartlarda yayılmaktadır. Ertesi gün oluşan kolonilerin sayımı ile bakteri stoğunun sayısı kob/mL cinsinden hesaplanmaktadır. Her stok bitiminde yeni bakteri stoğu bu şekilde hazırlanmaktadır. Şekil 3.19'da santrifüj aşamalarında bakteri solüsyonunun görünümü ve stok elde edilmesi görülmektedir.



Şekil 3.19 : Sırasıyla santrifüj sonrası süpernatant, salin eklenmesi ve bakteri stoğu.

Nanolif filtrelerin bakteri tutunum deneylerinde Şekil 3.20’de görülen akış hücresi sistemi kullanılmıştır. Akış hücresi sistemi üç parçadan oluşmaktadır. Birinci parça bakterilerin yerleştirildiği ve aerosol oluşturulduğu nebulizatör kısmıdır. İkinci parçada ise iki kapalı cam şişenin birbirleri ile bağlandığı ve aralarına nanolif filtrelerin yerleştirildiği akış hücresi elemanı (reaktörler) bulunmaktadır. Nebulizatör yardımı ile filtreye gönderilen bakterilerin bir kısmı filtre üzerinde tutunmaktadır ve bir kısmı ise filtreyi geçerek çıkışta bulunan gaz yıkama şişesinde birikmektedir. Gaz yıkama şişesinin olduğu bu kısım geçen bakterilerin toplandığı üçüncü parçadır.



Şekil 3.20 : Akış hücresi sistemi.

Amaçlanan deney aşamaları şu şekildedir:

- I. Konsantrasyonu bilinen bakteriler nebulizatör yardımı ile aerosol haline getirilir. Uygulamalarda 1 mL bakteri stoğunun aerosolleştirilmesi, nebulizatörün akış oranı ve akış hücreesindeki yoğunlaşma ile optimize edilmiştir.
- II. Bakteri stoğu bittikçe yenileneceğinden her stoğun başlangıç konsantrasyonu değişebilmekle birlikte yüksek konsantrasyonlu (10^6 kob/mL ve üzeri) bakteri stokları ile çalışılması planlanmıştır.
- III. Giren bakteri konsantrasyonunun çıkan bakteri konsantrasyonu ile farkına dayanan bakteri giderim verimleri gerek logaritmik azalma ile ifade edilebileceği gibi direk giderim verimi hesabı ile de tespit edilebilmektedir. Log azaltımı, bakteri konsantrasyonunun (kob/mL) logaritma (10 tabanı) oranı olarak tanımlanır. Bir log azaltımı, %90 bakteri azalmasına karşılık gelir ve genellikle bir biyosit etkisini kanıtlayan minimum değer olarak kabul edilir (W.H.O., 2011). Böylece, iki değer arasında en az 1 log fark gözlemlenmesinin önemli bir etki olduğu anlaşılmaktadır. Aşağıda, N_0 başlangıç anındaki mikrobiyal ajan (bakteri) miktarını, N ise uygulama sonrası çıkan mikroorganizma miktarını belirtmektedir.

$$\text{Giderim verimi (\%)} = \frac{N_0 - N}{N_0} \times 100 \quad (14)$$

$$\text{Log azaltma} = \log \left[\frac{N}{N_0} \right] \quad (15)$$

Bu hesaplar yardımı ile her bir üretilen nanolif filtreye dair ayrı ayrı filtre bakteri tutunum verimi veya filtre bakteri giderimi (antibakteriyel filtre denemeleri aşamasında) hesapları yapılmaktadır. Antibakteriyel filtre veriminde ise aerosol halinde gönderilen bakteriler burada tutunarak zamanla GOx enzimi ile biyofilm oluşturma kapasitelerinin engellenmesi ile antibakteriyel bir ortamla karşılaşacaklardır. Bunun sonucunda başlangıç konsantrasyonu ile filtre üzerindeki yaşayan bakteri konsantrasyonu filtrenin bir yıkama solüsyonu (%2 Tween 80 içeren salin) ile yıkanması sonucu anlaşılır. Uygun bekleme süreleri sonucunda alınan numunelerin yıkama solüsyonunda yıkanması ve vortekslenerek seri dilüsyonlar halinde seyreltilmesi Travnickova vd. (2019) yönteminden uyarlanmıştır.

IV. Seri dilüsyonlardan alınan örneklerin uygun nütrientleri ve agarı içeren besiyerinin olduğu petrilere Jett vd. (1997) yöntemine göre yayma ekim yapıp inkübe edilmiştir. Ardından gerçekleştirilecek sayımlar ile bakteri giderim verimleri hesaplanır. Deney setleri aseptik şartlarda gerekli kontrollerin sağlanabildiği özel alanlarda gerçekleştirilir.

V. Biyolojik ajanların (bakteri) gerçek zamanlı bilgi veren mikroskopik analizler yardımı ile antibakteriyel etkiye maruziyetlerinin gözlemlenmesini içeren yöntemeye dayalı konfokal lazer tarama mikroskopi (CLSM) analizleri, seçilen yüksek etkili nanolif filtreler üzerinde gerçekleştirilecek şekilde planlanmıştır.

Üretilen nanolif filtrelerin antibakteriyel etkinlik testlerinin gerçekleştirilmesinde izlenen yöntemler Çizelge 3.6'da görülmektedir.

Çizelge 3.6 : Nanolif filtrenin biyoaerosol tutunumu ve antibakteriyel testleri.

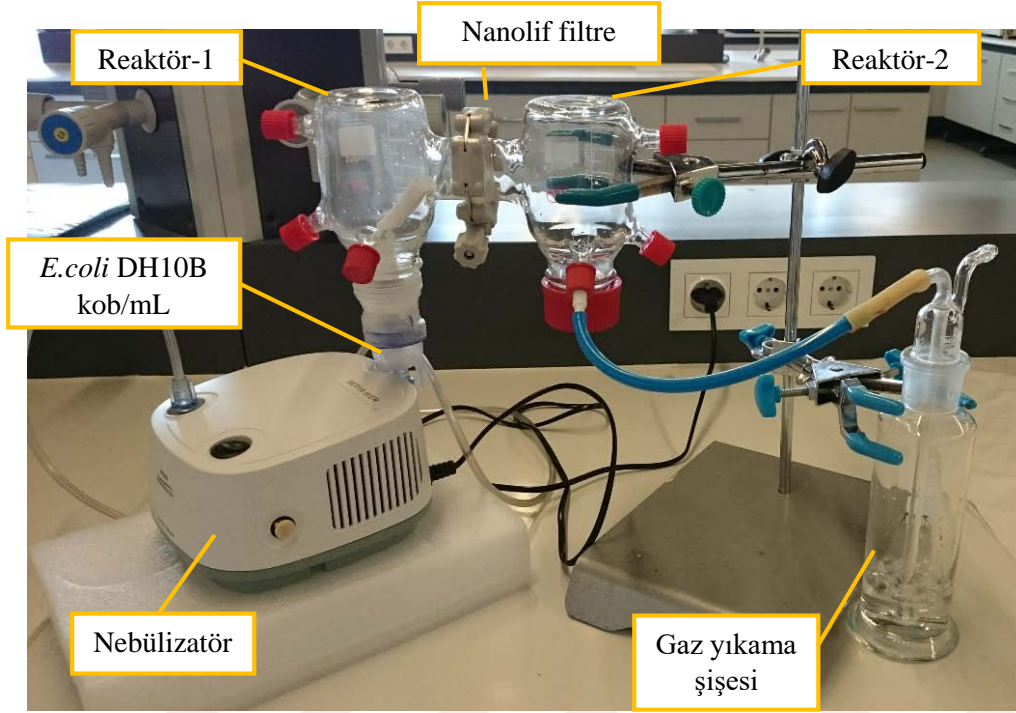
No	Deney Seti
1	Akış hücresi seti-1
2	Dinamik kontakt koşullarda antibakteriyel etkinlik testi
3	Zon testi
4	Bakteri kontakt testi
5	CLSM ile antibakteriyel etkinin tespiti
6	Akış hücresi seti-2

3.7.1 Biyoaerosol tutunum testi (Akış hücresi seti-1)

Akış hücresi seti düzeneğinde, test mikroorganizmaları bir nebulizör ile aerosol haline getirilir. Su buharı havada bulunan biyoaerosoller üzerinde yoğunlaştığında, biyoaerosollerin partikül boyutunun artmasına neden olur. Bu amplifikasyon, havadaki biyoaerosoller ile su buharı yoğunlaşmasının kombinasyonu nedeniyle oluşur. Deney standart iç ortam hava koşulları altında gerçekleştirilmiştir; 20-25,5 °C sıcaklık ve %30-60 bağıl nem. Akış hücresi sistemi laminer bir hava akışına, eşit parçacık dağılımına ve 15,9 cm²'lik (4,5 cm çapında) bir filtre test alanına sahiptir. Test organizması olarak 1 mL *E.coli* DH10B stoğu ($9,2 \times 10^8$ kob/mL) kullanılmıştır ve 0,2 mL/dak biyoaerosol akış hızında çalıştırılmıştır.

Akış hücresi seti-1'de *E.coli* DH10B suşu Şekil 3.21'de görülen deney düzeneği yardımı ile biyoaerosol haline getirilmiştir. Ardından bakteri aerosollerinin düzenek üzerinden kontrollü bir şekilde PAN15, PAN30, PAN45, PAN-GNP15, PAN-GNP30 ve PAN-GNP45 nanolif filtreler tutunması sağlanmıştır. Nanolif filtrelerin bakteri

aerosollerini sadece fiziksel anlamda bir bariyer olarak tutma verimlerine göre bir değerlendirme yapılmıştır. Burada gerçekleşen tutunma verimi testlerinin sonraki aşamalarda filtrelere GOx enziminin immobilize edilmesi ile yapılacak antibakteriyel etkinlik testlerine ön fikir vermesi için planlanmıştır.



Şekil 3.21 : Akış hücresi seti-1.

İlk olarak akış hücresine nebulizatör kısmına $9,2 \times 10^8$ kob/mL titresinde *E.coli* DH10B suşu 1 mL kadar yerleştirilip ardından ilgili filtreler sırası ile aynı başlangıç konsantrasyonu bakteri ile muamele olacak şekilde deney seti devam etmiştir. Nebulizatöre 1 mL bakteri yerleştirildikten sonra akış hücresine ilgili filtrelerden bir tanesi (Ör: PAN15) yerleştirilerek akış hücresi sisteminin elemanları kaçaklara karşı kontrol edilmiştir. Filtreden çıkan/kaçan bakteriler gaz yıkama şişesinin bulunduğu 50 mL salin çözeltisinde toplanmıştır. Nebulizatörün bir filtre için çalışma döngüsü yaklaşık 10 dak. bir süre aralığında planlanmıştır. Bu süre aralığında 1 mL bakteri solüsyonunun nebulizatörde tamamıyla bitmiş olmasına dikkat edilmiştir. Akış hücresinin cam cidarlarında aerosolün yoğunlaşma oluşturmaması, sistemin hava geçişi sırasında zorlanmaması diğer dikkat edilen unsurlardır. Filtreden geçtikten sonra gaz yıkama şişesinde toplanan bakterilerin konsantrasyonu buradan alınan örnek numunenin petri üzerinde sayımı ile hesaplanmıştır. Gaz yıkama şişesinden alınan numune bir seri dilüsyon ile 10^{-10} 'a kadar seyreltilmiştir. Bu seyreltmelerden alınan 100 µL örnekler petrilere yayılmış bir gece 37 °C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün

koloni sayımı yapılan örneklerin kob/mL cinsinden konsantrasyonları hesaplanmıştır. Giriş konsantrasyonu bilinen bakterinin çıkış konsantrasyonunun hesaplanması ile aradaki fark itibari ile filtre tutma verimi belirlenmiştir.

Bakteriyi bir nebulizatör yardımı ile aerosol haline getirerek filtrelerin üzerine kontrollü ve aseptik şartlarda ileten akış hücresi seti sistemin bütün parçaları her deney öncesi steril edilerek sızıntılara karşı test edilmiştir. Bu şekilde gerçek ortam havasında oluşan bakteri aerosolleri simüle edilmiş, kontrollü ve kaçakların olmadığı bir ortam yaratılarak yüksek bakteri miktarlarının ‘gerçek hava ortamı’ davranışında filtrelere ulaşması sağlanmıştır. Çalışılan bakteri miktarlarının yüksek olmasının sebebi niceliksel bir giderim farkını açıkça saptayabilmek içindir. Bu deney sonucunda 30 dakikada üretilmiş filtrelerin uygunluğuna karar verilmiştir. Gelecek deneylere PAN30 ve PAN-GNP30 filtreleri ile devam edilmiştir.

3.7.2 Dinamik kontakt koşullarda antibakteriyel etkinlik testi

GOx immobilize nanolif filtrelerin, dinamik kontakt koşullarda antibakteriyel etkisini gözlemlenmek için ASTM E2149 uluslararası test standartları baz alınarak deney tasarlanmıştır. Deney seti için 6 farklı falkon deney tüpü planlanmıştır. Her bir 6 falkona 10’ar mL önceden hazırlanmış *E.coli* DH10B stoğu (1×10^8 kob/mL) eklenmiştir. Üç ve altı numaralı tüplere glukoz (%0,5 w/v) eklenmiştir. PAN30, PAN30_GOx, PAN-GNP30 ve PAN-GNP30_GOx filtreler eşit alanlarda (1×1 cm²) kesilmiş ve falkonlara aktarılmıştır. Bir gün boyunca belli zaman aralıklarında alınan numuneler seri dilüsyonlarla seyreltilerek LB agar üzerine yayılıp 1 gece 37 °C derecede inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün LB agar üzerinde gözlemlenen koloniler ile sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.7’ de dinamik kontakt koşullarda antibakteriyel etkinlik testi deney numarası, parametreleri mevcuttur.

Çizelge 3.7 : Nanolif filtrelerin dinamik kontakt koşullarda antibakteriyel etkinlik testi deney seti.

Deney No	Nanolif Filtre Kodu	Deney Tüpü İçeriği		Örnekleme (saat)
1	PAN30	<i>E.coli</i> DH10B	-	0, 0,5, 1, 2, 4, 20, 25
2	PAN30_GOx	<i>E.coli</i> DH10B	-	0, 0,5, 1, 2, 4, 20, 25
3	PAN30_GOx	<i>E.coli</i> DH10B	Glukoz (%0,5 w/v)	0, 0,5, 1, 2, 4, 20, 25
4	PAN-GNP30	<i>E.coli</i> DH10B	-	0, 0,5, 1, 2, 4, 20, 25
5	PAN-GNP30_GOx	<i>E.coli</i> DH10B	-	0, 0,5, 1, 2, 4, 20, 25
6	PAN-GNP30_GOx	<i>E.coli</i> DH10B	Glukoz (%0,5 w/v)	0, 0,5, 1, 2, 4, 20, 25

Şekil 3.22’ de dinamik kontakt koşullarda antibakteriyel etkinlik testi deney tüpleri görülmektedir.



Şekil 3.22 : Dinamik kontakt koşullarda antibakteriyel etkinlik testi deney tüpleri.

3.7.3 Agar difüzyon test yöntemi (Zon testi)

Antibakteriyel etki taşıyan malzemelerin ortama “olası salınan bir bakterisidal etki” varlığını tespit etmek için, bakteri ile malzeme uygun besi yeri ortamında “birebir etkileşime” sokularak oluşan veya oluşabilecek inhibisyon zonları gözlemlenebilmektedir. Bu yöntem uluslararası JIS L 1902 Halo metodundan revize edilerek uygulanmıştır. Bunun için uygun deney şartları aşağıdaki gibi dizayn edilmiştir.

E.coli DH10B şuşu aseptik şartlarda oda sıcaklığına getirilip sıvı LB besiyere ekilerek bir gün boyunca 37 °C derecede çalkalamalı ortamda inkübe edilmiştir. 100 mL taze LB sıvı medyum içerisindeki *E.coli* DH10B, LB agarlı petrilere steril ortamda yayılmıştır. PAN30, PAN30_GOx, PAN-GNP30 ve PAN-GNP30_GOx filtreler 1,5 cm çapında kesilerek aktif yüzeyi, bakteri yayılmış olan LB agara bakacak şekilde yerleştirilmiştir. Üç ve altı numaralı deney numunelerine glukoz (%0,5 w/v) eklenmiştir. Deney seti bir gün boyunca 37 °C derecede inkübe edilmiş ertesi gün inhibisyon zonları kontrol edilmiştir. Çizelge 3.8’de deney setinde kullanılan filtrelerin kodları ve içerikleri görülmektedir.

Çizelge 3.8 : Agar difüzyon test yöntemi (Zon testi) parametreleri.

Deney No	Nanolif Filtre Kodu	Filtre Deney Koşulları	
1	PAN30	<i>E.coli</i> DH10B	-
2	PAN30_GOx	<i>E.coli</i> DH10B	-
3	PAN30_GOx	<i>E.coli</i> DH10B	Glukoz (%0,5 w/v)
4	PAN-GNP30	<i>E.coli</i> DH10B	-
5	PAN-GNP30_GOx	<i>E.coli</i> DH10B	-
6	PAN-GNP30_GOx	<i>E.coli</i> DH10B	Glukoz (%0,5 w/v)

3.7.4 Bakteri kontakt testi

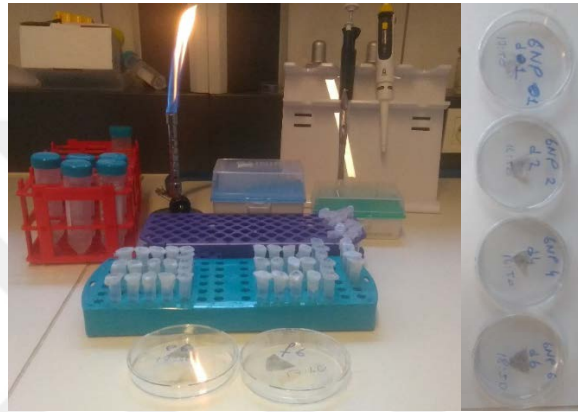
Bakteri kontakt testi gerçek ortam koşullarını simüle eden yöntemlerden bir tanesidir. Bu deneyde GOx enziminin immobilize halini taşıyan filtrelerin bakteriye etkisi ölçülmüştür. Önceki deneylerde sıvı ortamda veya agar üzerinde filtreler bakteri ile temas ettirilmişti. Bu testte ise bakteriler direkt olarak filtreye herhangi bir besiyeri veya yoğun sıvı ortam olmadan temas ettirilmektedir. Direkt temasa dayalı yöntem; bakteriyostatik (bakteri büyümesinin engellenmesi) ve bakterisit (bakteri öldürme) etkilerin tespit edildiği AATCC 100 uluslararası standart yöntemi baz alınarak uygulanmıştır

Deneyle için *E.coli* DH10B stok solüsyonu (7×10^8 kob/mL) önceden hazırlanmıştır. 6 set olacak şekilde PAN30, PAN30_GOx, PAN-GNP30 ve PAN-GNP30_GOx filtreleri eşit alanlarda kesilip hazırlanmıştır. Ayrıca, PAN30_GOx ve PAN-GNP30_GOx kontrol filtrelerine glukoz (%0,5 w/v) damlatılmıştır. Sonrasında her bir filtreye *E.coli* DH10B stok solüsyonu damlatılmıştır.

Filtreler uygun bekleme sürelerinin (1, 60, 240 ve 360 dak.) ardından, 10 mL'lik yıkama solüsyonunda 10 dak. vortekslenmiştir. Başlangıç *E.coli* DH10B konsantrasyonu 10 mL'lik yıkama solüsyonu ile $4,2 \times 10^6$ kob/mL'ye kadar seyrelmiştir. Filtrenin 10 dak. vortekslediği yıkama solüsyonundan alınan örnekler seri seyreltilerek LB agara yayılıp bir gece 37 °C derecede inkübe edilip, ertesi gün koloni sayımı yapılmıştır. Çizelge 3.9'da deney parametreleri ve Şekil 3.23'te bakteri kontakt testi deney seti görülmektedir.

Çizelge 3.9 : Nanolif filtre bakteri kontakt testi deney seti.

Deney No	Nanolif Filtre Kodu	Filtre Deney Koşulları		Örnekleme (dak.)
1	PAN30	<i>E.coli</i> DH10B	-	1, 60, 240, 360
2	PAN30_GOx	<i>E.coli</i> DH10B	-	1, 60, 240, 360
3	PAN30_GOx	<i>E.coli</i> DH10B	Glukoz (%0,5 w/v)	1, 60, 240, 360
4	PAN-GNP30	<i>E.coli</i> DH10B	-	1, 60, 240, 360
5	PAN-GNP30_GOx	<i>E.coli</i> DH10B	-	1, 60, 240, 360
6	PAN-GNP30_GOx	<i>E.coli</i> DH10B	Glukoz (%0,5 w/v)	1, 60, 240, 360



Şekil 3.23 : Bakteri kontakt testi deney seti.

3.7.5 CLSM ile antibakteriyel etkinin tespiti

Bu deneyde, mikroskopik boyama ve görüntüleme yöntemi ile üretilen filtrelerin gerçek zamanlı olarak bakteriler üzerinde gösterdiği öldürme etkisi hakkında fikir elde edilmiştir. Filtre yüzeyindeki hem biyofilm yapısı hem de hücre canlılığı, konfokal lazer taramalı mikroskopi (CLSM) ile görsel olarak incelenmiştir.

PAN30, PAN30_GOx, PAN-GNP30 ve PAN-GNP30_GOx filtreleri deneyde kullanılmıştır. PAN30_GOx ve PAN-GNP30_GOx filtrelerinin kontrollerine glukoz (%0,5 w/v) ilavesi ile toplam 6 farklı numune hazırlanmıştır. 6 filtre örneğine *E.coli* DH10B stok solüsyonu (5×10^8 kob/mL) damlatılmıştır. Numunelerin 0, 30, 60, 120 ve 180 dak. zaman aralıklarında görüntülenmesi planlanmıştır.

Numuneler, bakteri canlılığının belirlenebilmesi için "LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit" (ThermoScientific, L7012) ile üretici firmanın önerdiği protokole uygun olarak boyandı. Kısaca, kit içeriği (propidyum iyodürün, SYTO13) örnekler üzerine damlatılarak 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi, pozitif şarjlı

lam üzerine yerleştirilen membran örnekler lamel ile kapatılarak invert konfokal mikroskop (LSM 880, Zeiss) ile incelendi.

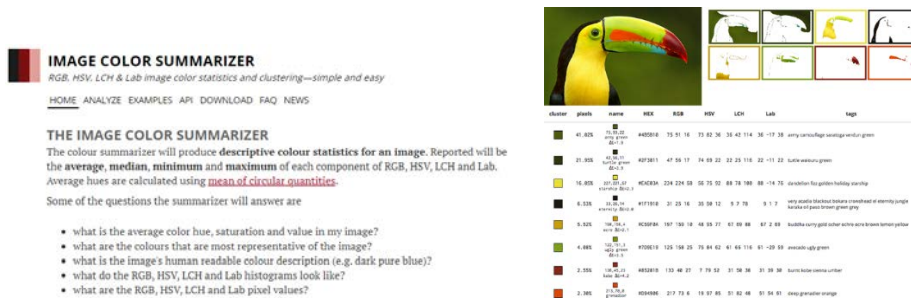
Mikroskobik incelemede, 2048x2048 xy çözünürlüğündeki görüntüler 488nm (SYTO13 için) ve 543nm (propidyum iyodürün) dalga boylarında lazerler kullanılarak, 2 farklı PMT dedektörü ile 2 ayrı kanaldan aynı anda alındı. Tüm örnekler 20x/0.8 NA kuru objektif kullanılarak görüntüldü. Boyama sonucunda örneklerdeki canlı (yeşil) ve ölü (kırmızı) bakteriler ayrı ayrı görüntüldü. İstanbul Medipol Üniversitesinde gerçekleştirilen deneyde kullanılan cihaz ve malzemeler Şekil 3.24'te görülmektedir.



a) LSM 880, Zeiss lazer taramalı konfokal mikroskopi (CLSM) cihazı b) Propidyum iyodürün, SYTO13 floresan boya ve numuneler

Şekil 3.24 : Mikroskobik boyama ve görüntüleme yöntemi deney cihaz ve malzemeleri.

Görüntülemeye 6 farklı filtre numunesinden elde edilen CLSM görüntüleri Image J programında renklendirilmiştir. Şekil 3.25'te Martin Krzywinski tarafından sağlanan Image Color Summarizer isimli bağımsız, güncel ve açık kaynak olan yazılım aracılığıyla renklendirilmiş CLSM görüntülerinin renk yüzde oranları elde edilmiştir. Bu sayede bakteri canlılık ve ölümlük oranları nicelleştirilerek yorumlanması hedeflenmiştir.



Şekil 3.25 : Martin Krzywinski tarafından sunulan Image Color Summarizer.

Krzywinski, (2016) bir yayınında, herhangi iki renk arasındaki algısal farkın renk, ton, canlılık ve parlaklık gibi yönleri ile ölçülebilir olduğunu ve bunun nicel bilgiyi kodlamak için kullanılabileceğini bildirir. Renklerden nicel sonuçlar elde etmek için araçlara ihtiyaç olduğuna ve bu tarz araçların geliştirilmesinin önemine değinmektedir (Krzywinski, 2016).

3.7.6 Biyoaerosol tutunum ve antibakteriyel etkinlik testi (Akış hücresi seti-2)

Akış hücresi seti düzeneğinde, test mikroorganizmaları bir nebulizör ile aerosol haline getirilir. Deney, standart iç ortam hava koşulları altında gerçekleştirilmiştir; 20-25,5 °C sıcaklık ve %30-60 bağıl nem. Akış hücresi sistemi laminar bir hava akışına, eşit parçacık dağılımına ve 15,9 cm²'lik (4,5 cm çapında) bir filtre test alanına sahiptir. Test organizması olarak 1 mL *E.coli* DH10B stoğu (3×10^8 kob/mL) kullanılmıştır ve 0,2 mL/dak biyoaerosol akış hızında çalıştırılmıştır.

Akış hücresi seti-2 deney düzeneğinde biyoaerosol haline getirilen bakteri, GOx immobilize edilmiş nanolif filtrelerce tutulmuş ve ardından antibakteriyel etkinlik değerlerine bakılmıştır. Deney için PAN30, PAN30_GOx ve PAN-GNP30_GOx filtreleri kullanılmıştır. Ayrıca, PAN30_GOx ve PAN-GNP30_GOx filtrelerinin glukoz (%0,5 w/v) eklenmiş kontrolleri test edilmiştir. Böylece 6 deney seti oluşturulmuştur.

İlk olarak akış hücresine nebulizatör kısmına *E.coli* DH10B stok solüsyonundan (3×10^8 kob/mL) 1 mL kadar yerleştirilip ardından ilgili filtreler sırası ile aynı başlangıç konsantrasyonu bakteri ile muamele olacak şekilde deney seti devam etmiştir. Filtreden çıkan/kaçan bakteriler gaz yıkama şişesinin bulunduğu 50 mL salin çözeltisinde toplanmıştır. Nebulizatörün bir filtre için çalışma döngüsü yaklaşık 10 dak. bir süre aralığında planlanmıştır. Bu süre aralığında 1 mL bakteri solüsyonunun nebulizatörde tamamıyla bitmiş olmasına dikkat edilmiştir.

Akış hücresinde üzerinden bakteri aerosolünün geçtiği filtreler 1×1 cm² olacak şekilde eşit ölçülerde kesilmiştir. Ayrıca, PAN30_GOx ve PAN-GNP30_GOx filtrelere glukoz (%0,5 w/v) damlatılmıştır. Belli zaman aralıkları (1, 60, 120, 240 ve 360 dak.) ile örnekler 10 mL'lik yıkama solüsyonuna alınmış ve seyreltme yapılarak LB agar petriye yayılmıştır. Bir gece 37 °C derecede inkübe edilip, ertesi gün koloni sayım işlemleri gerçekleştirilmiştir. Akış hücresinin gaz yıkama şişesinden de örnek alınarak

aynı işlemler uygulanmıştır. Çizelge 3.10'da akış hücresi seti-2 testinde kullanılan filtreler, parametreleri ve örnekleme zamanları özet halinde görülmektedir.

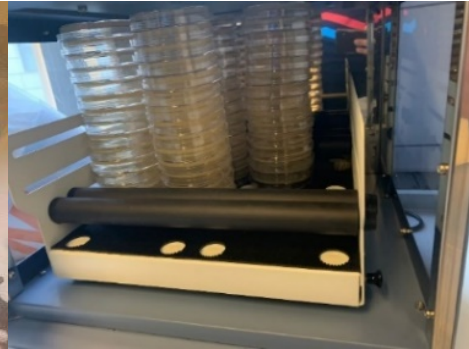
Çizelge 3.10 : Akış hücresi seti-2 parametreleri.

Deney No	Nanolif Filtre Kodu	Filtre Parametreleri	Örnekleme (dak.)
1	PAN30	<i>E.coli</i> DH10B	1, 60, 120, 240, 360
2	PAN30_GOx	<i>E.coli</i> DH10B	1, 60, 120, 240, 360
3	PAN30_GOx	<i>E.coli</i> DH10B Glukoz (%0,5 w/v)	1, 60, 120, 240, 360
4	PAN-GNP30	<i>E.coli</i> DH10B	1, 60, 120, 240, 360
5	PAN-GNP30_GOx	<i>E.coli</i> DH10B	1, 60, 120, 240, 360
6	PAN-GNP30_GOx	<i>E.coli</i> DH10B Glukoz (%0,5 w/v)	1, 60, 120, 240, 360

Deney aşamalarına ait görseller Şekil 3.26'da verilmiştir.



a) Akış düğresi deney seti b) Numuneler



c) Seri dilüsyon seti ve inkübasyon

Şekil 3.26 : Biyoaerosol tutunum ve antibakteriyel etkinlik testi deneyleri.



4. SONUÇLAR

4.1 Nanolif Filtrelere GOx Enzimi İmmobilizasyon Değerlendirmesi

PAN ve PAN-GNP nanoliflerin ilk etapta 15, 30 ve 45 dak. üretim yapılan örneklerinin “akış hücresi seti-1” ile ön karakterizasyon sonuçlarına göre 30 dak. üretim yapılan filtrelerin uygunluğuna karar verilmiştir. PAN30 ve PAN-GNP30 nanolif filtrelere iki farklı enzim immobilizasyon tekniği uygulanmıştır. Birinci teknik Apetrei & Camurlu (2020) makalesinden yararlanılan çapraz bağlama ile GOx enzim immobilizasyonudur. İkinci teknik ise Dayal & Godjevargova (2005) makalesinden yararlanılan modifikasyon ardından difüzyonla GOx enzim yüklemidir. Çizelge 4.1’de immobilize edilmiş filtrelerdeki spektrofotometrede OD660 ölçümü ile tespit edilmiş enzim kayıp miktarlarının mg/L cinsinde konsantrasyonları verilmiştir.

Çizelge 4.1 : GOx enzimi bağlanmış nanolif filtrelerin OD660 ölçüm sonuçları.

Nanolif Filtre Kodu	GOx Enzim İmmobilizasyon Teknik ve Yöntemi	24 saat sonra enzim kaybı (mg/L)	1 hafta sonra enzim kaybı (mg/L)
PAN30_GOx	I kimyasal	44,44	45,20
PAN-GNP30_GOx	I kimyasal	45,12	46,48
PAN30_GOx	I fiziksel	17,02	19,29
PAN-GNP30_GOx	I fiziksel	15,58	19,06
PAN30_GOx	II kimyasal	38,38	45,95
PAN-GNP30_GOx	II kimyasal	46,79	63,30
PAN30_GOx	II fiziksel	19,59	24,14
PAN-GNP30_GOx	II fiziksel	17,85	50,27

İmmobilizasyonda kullanılan GOx enzim solüsyonu konsantrasyonu: 378,53 mg/L

I: Çapraz bağlama (Apetrei & Camurlu, 2020)

II: Modifikasyon+Difüzyonla enzim yükleme (Dayal & Godjevargova, 2005)

GOx enzim immobilizasyonu deney sonuçlarının verimliliği aşağıdaki Çizelge 4.2’de görülmektedir.

Çizelge 4.2 : GOx enzimi bağlanmış nanolif filtrelerin immobilizasyon verim sonuçları.

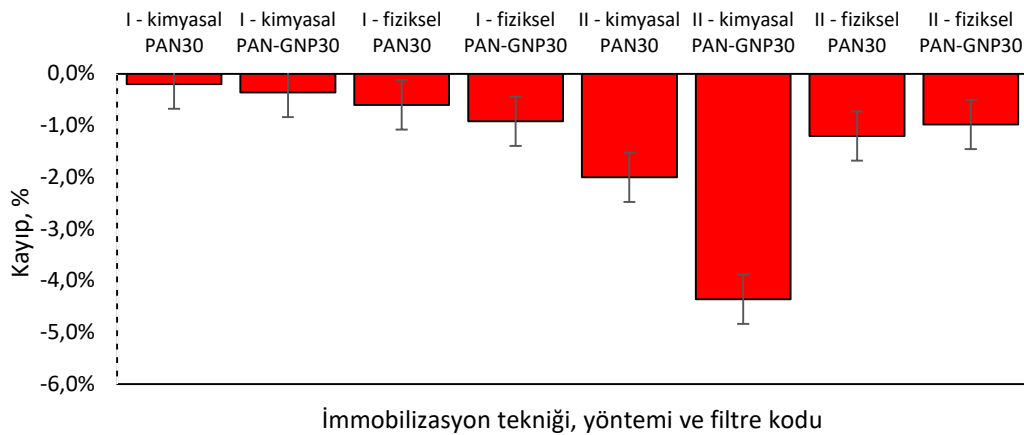
Nanolif Filtre Kodu	GOx Enzim Immobilizasyon Teknik ve Yöntemi	1 gün sonra tutunum	1 hafta sonra tutunum	Değişim/ Kayıp, Δ
PAN30_GOx	I kimyasal	% 88,3	% 88,1	% 0,20
PAN-GNP30_GOx	I kimyasal	% 88,1	% 87,7	% 0,36
PAN30_GOx	I fiziksel	% 95,3	% 94,9	% 0,60
PAN-GNP30_GOx	I fiziksel	% 95,9	% 95,0	% 0,92
PAN30_GOx	II kimyasal	% 89,9	% 87,9	% 2,00
PAN-GNP30_GOx	II kimyasal	% 87,6	% 83,3	% 4,36
PAN30_GOx	II fiziksel	% 94,8	% 93,6	% 1,20
PAN-GNP30_GOx	II fiziksel	% 95,3	% 94,3	% 0,98

I: Çapraz bağlama tekniği (Apetrei & Camurlu, 2020)

II: Modifikasyon+Difüzyonla enzim yükleme tekniği (Dayal & Godjevargova, 2005)

Ölçüm sonuçlarından, immobilize edilmiş filtrelerin sodyum fosfat tampon solüsyonlarında bekleme esnasında filtreye immobilize edilmiş GOx enzimdeki kayıp oranları gözlemlenmiştir. En çok kayıp PAN-GNP30 filtresinde %4,36 ile II. tekniğin kimyasal uygulamasında gerçekleşmiştir. En az kayıp ise PAN30 filtresinde %0,20 ile I. tekniğin kimyasal uygulamasında gerçekleşmiştir. GOx enzimi kayıp yüzdeleri Çizelge 4.3'te görüldüğü üzere, I. teknikte kayıplar II. tekniğe göre daha azdır. I. tekniğin kimyasal yönteminin daha başarılı, II. tekniğin ise fiziksel yönteminin daha başarılı sonuç verdiği görülmektedir.

Çizelge 4.3 : GOx enzim immobilizasyon kayıp oranları.



Bayramoğlu vd. (2010) benzer bir çalışmada, serbest ve immobilize glukoz oksidazları, 4 °C derecede fosfat tampon çözeltisi içinde saklamış ve immobilize edilen enzimin raf ömrünü iki ay boyunca aktivite ölçümleri yaparak incelemiştir.

Serbest enzimin üçüncü hafta içinde tüm aktivitesini kaybettiği gözlemlenmiştir. İmmobilize glukoz oksidazın aktivite kaybı, iki aylık depolama süresinde yaklaşık %34 olarak raporlanmıştır. Böylece, immobilize enzimin, serbest enzime kıyasla yüksek depolama kararlılığı sayesinde daha yüksek raf ömrü sağladığı görülmüştür (Bayramoğlu vd., 2010).

Bu sonuçlar doğrultusunda, Apetrei & Camurlu, (2020) makalesinden yararlanılan, I. tekniğin kimyasal immobilizasyon yönteminin daha verimli sonuçlar vermesine istinaden PAN ve PAN-GNP filtreleri için en uygun teknik olduğuna karar verilmiştir.

4.2 Nanolif Filtrelerin Karakterizasyon Sonuçları

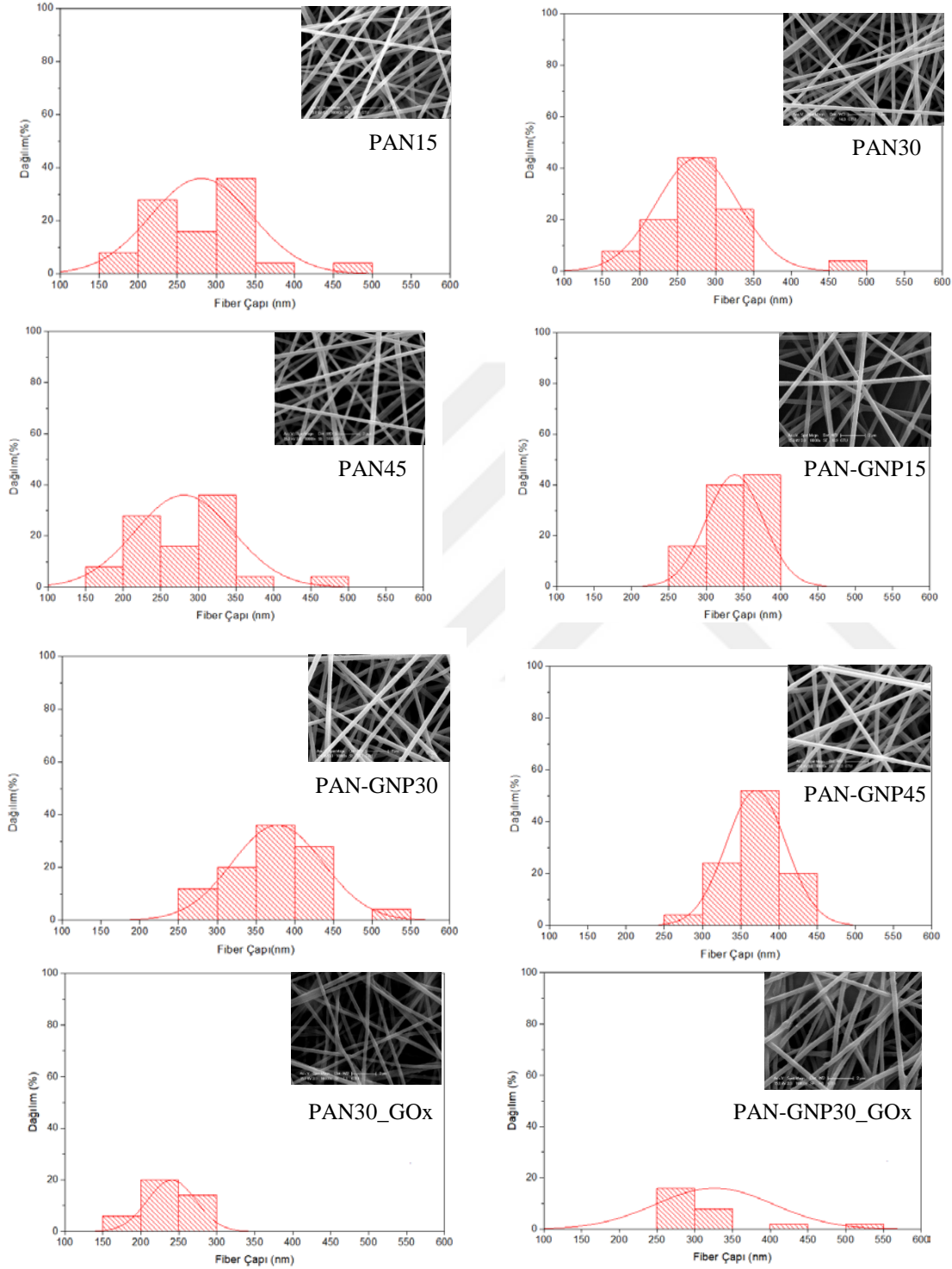
Nanolif filtrelerin üretiminde optimizasyon parametresi olarak elektroçirme süresi çalışılmış ve ilk olarak 15, 30 ve 45 dak. sürelerinde üretimler yapılmıştır. Elektroçirme süresinin üretilen nanolif özelliklerine etkisi literatürde yorumlanmıştır. Üretim süresi arttıkça, nanoliflerin kalınlığının arttığı ve optik geçirgenliğinin azaldığı raporlanmıştır. Elektroçirme süresinin optimizasyonu, optimum kalınlıkta ve uygun şeffaflıkta nanolifler elde etmek için önemli olduğu belirtilmiştir (Zhang vd., 2019). Üretim süresinin artması nanolif filtrenin kalınlık ve ağırlığını artırıp gözenek boyutlarını küçültür ve filtre verimliliğini artırır. Ancak, gözenek boyutunun küçülmesi ve kalınlığın artması filtrenin kullanım süresini azaltarak yüksek enerji tüketimine ve yüksek basınç düşüşüne sebep olur (Z. Wang vd., 2016). Böylece, elektroçirme süresinin optimizasyonu filtre verimliliğini artırırken enerji tüketiminde azalma sağlayacaktır.

Ayrıca, elektroçirme ile nanolif üretiminde kullanılan destek tabakasının basınç düşüşü üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını ve filtrenin performansını etkilemediği raporlanmıştır (Bortolassi vd., 2019). Nanolif filtrelerin filtrasyon verimliliği, hava basıncı düşüşüyle doğru orantılıdır. Bu nedenle, nanolif filtrelerde yüksek filtrasyon verimliliği, büyük enerji kayıplarına neden olan bir etkidir (Bortolassi vd., 2019).

4.2.1 SEM analizi sonuçlarının değerlendirilmesi

PAN15, PAN30, PAN45, PAN-GNP15, PAN-GNP30, PAN-GNP45, PAN30_GOx ve PAN-GNP30_GOx kodlu nanoliflerin Image J programıyla 25 farklı noktadan alınan fiber çap ölçüm sonuçları sırasıyla $280,7 \pm 63$ nm, $275,9 \pm 52,9$ nm, $261,9 \pm 48,4$ nm,

338,3±37,1 nm, 377,7±57,4 nm, 370,1±38,4 nm, 240,6±14,8 nm ve 326,2±11,7 nm olarak ölçülmüştür. Nanolif filtre numunelerine ait SEM görüntüleri ve fiber çaplarının Gauss dağılım grafikleri Şekil 4.1 ve Çizelge 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.1 : Nanolif filtrelerin SEM görüntüleri ve fiber çaplarının Gauss dağılım grafikleri.

Çizelge 4.4 : Nanolif filtrelerin SEM analizi ile elde edilen fiber çapları.

Nanolif Filtre Kodu	Fiber Çapı (nm)
PAN15	280,7 ± 63,7
PAN30	275,9 ± 52,9
PAN45	261,9 ± 48,4
PAN-GNP15	338,3 ± 37,1
PAN-GNP30	377,7 ± 57,4
PAN-GNP45	370,1 ± 38,4
PAN30_GOx	240,6 ± 14,8
PAN-GNP30_GOx	326,2 ± 11,7

Sonuçlar incelendiğinde, elektroçirime süresi arttıkça nanolif çapının azaldığı görülmektedir. Fakat Z. Wang vd. (2016) yayınında belirtildiği üzere, üretim süresinin artması nanolif filtrenin kalınlığını artırıp, filtrenin kullanım süresini azaltması ve yüksek basınç düşüşüne sebep olması nedeniyle tercih edilmez.

GNP eklentisinin fiber çaplarında bir artış meydana getirdiği gözlemlenmektedir. Scaffaro & Lopresti (2018) çalışmasında, GNP miktarının filtre morfolojisi üzerindeki etkisi kanıtlanmıştır. GNP miktarının artmasıyla fiber çaplarında bir miktar artış gözlemlenmiştir. Fiber çaplarındaki artışın sebebi, GNP'lerin işlem sırasında çözücü buharlaşma kinetiği üzerindeki etkisi ve çözeltinin viskozitesini artırmasıyla ilişkilendirilmiştir. Genel olarak, nanoparçacıkların varlığı polimerik çözeltinin viskozitesini artırdığı ve çözelti viskozitesindeki artışın daha büyük elektroçirilmiş fiber çaplarına neden olduğu, yapılan çalışmalar doğrultusunda bilinmektedir (Scaffaro & Lopresti, 2018).

Ayrıca, SEM analizi sonucunda GOx immobilizasyonunun fiber çaplarını bir miktar azalttığı görülmektedir. Aziz vd. (2022) çalışmasında, glukoz tespitinde kullanılmak üzere konik optik fiber üzerine GOx immobilize ettiğinde, konik optik fiber çaplarında düşüş meydana geldiğini raporlamıştır (Aziz vd., 2022).

Çizelge 4.5'te filtrelerin fiber çap oranları grafik üzerinde görülmektedir.

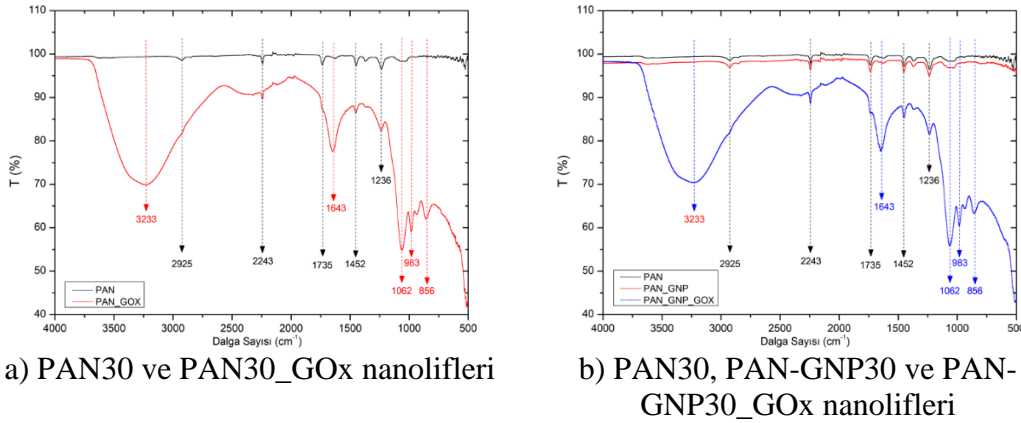
Çizelge 4.5 : Nanolif filtrelerin fiber çap dağılımları.



Küçük fiber çaplarının daha iyi filtrasyon verimliliği sağladığı literatür araştırmasından anlaşılmaktadır. Böylece, üretilen elektroğrılmış filtrelerin makul fiber çaplara sahip olduğunu varsayılabilir.

4.2.2 FTIR sonuçlarının değerlendirilmesi

PAN30, PAN30-GOx, PAN-GNP30 ve PAN-GNP30-GOx nanolif filtrelerin kimyasal bileşimi FTIR analizi ile doğrulanmıştır. Filtrelere ait FTIR spektrum sonuçları Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2 : Nanoliflere ait FTIR spektrumları.

Saf PAN ve PAN-GNP nanolif filtrelere göre GOx immobilize edilmiş filtrelerde enzimlere ait olduğu düşünülen 1643, 1062, 983 ve 856 cm^{-1} gruplarının varlığı görülmektedir. Bu GOx enziminin filtreye immobilize olduğuna dair önemli bir işaret olarak algılanabilir.

FTIR spektrumunda GNP yapısındaki pikler sırasıyla 3233 cm⁻¹'de O-H bağına, 2925 cm⁻¹'de C-H bağına, 1643 cm⁻¹'de C=C bağına, 1236 cm⁻¹, 1062 cm⁻¹ ve 983 cm⁻¹ pikleri ise C-O bağına ve 856 cm⁻¹ piki de C-H bağına aittir. Bu filtredeki GNP'nin varlığını kanıtlamaktadır.

4.3 Nanolif Filtrelerin Performans Sonuçları

4.3.1 Su buharı geçirgenliği sonuçları

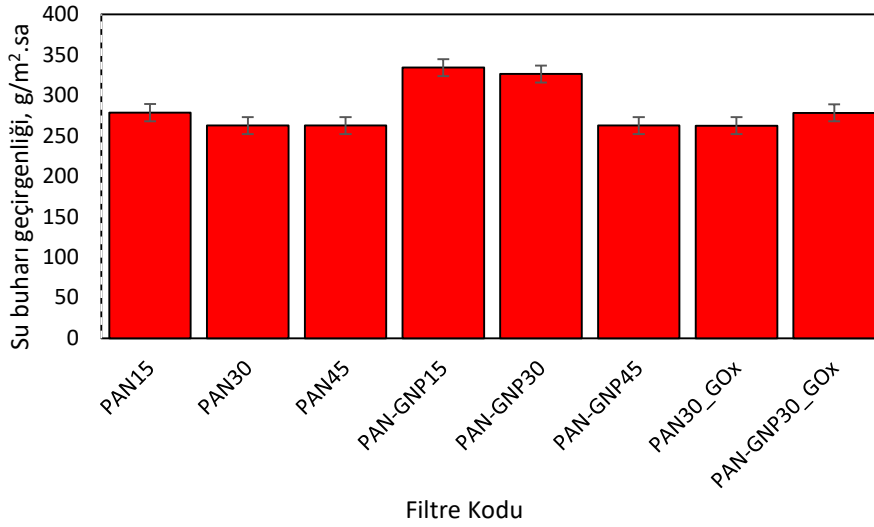
Üretilen nanolif filtrelerin su buharı geçişi değerleri Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7'de verilmiştir. PAN15, PAN30, PAN45, PAN-GNP15, PAN-GNP30, PAN-GNP45, PAN30_GOx ve PAN-GNP30_GOx kodlu nanoliflerin su buharı geçirgenlik değerleri sırasıyla 278,7 g/m²sa, 262,7 g/m²sa, 262,7 g/m²sa, 334,3 g/m²sa, 326,4 g/m²sa, 262,7 g/m²sa, 262,6 g/m²sa ve 278,5 g/m²sa olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.6 : Nanoliflerin su buharı geçirgenlik sonuçları.

Nanolif Filtre Kodu	Su Buharı Geçirgenlik Değeri (g/m ² sa)
PAN15	278,7
PAN30	262,7
PAN45	262,7
PAN-GNP15	334,3
PAN-GNP30	326,4
PAN-GNP45	262,7
PAN30_GOx	262,6
PAN-GNP30_GOx	278,5

Bu sonuçlar doğrultusunda, filtre üretim süresinin arttıkça su buharı geçirgenlik değerinin azaldığı görülmektedir. Ayrıca, GNP eklentisinin su buharı geçirgenliğini bir miktar artırdığı dikkat çekmektedir. GNP eklentisiyle gözeneklilikte artış ile beraber su buharı geçirgenlik değerlerinde artış olması muhtemeldir. Öte yandan, GOx immobilizasyonunun ardından su buharı geçirgenlik değerlerinde bir miktar düşüş gözlemlenmiştir. Bu düşüş filtre performansını büyük ölçüde etkilememekle beraber GOx'ın fiber çaplarında meydana getirdiği artıştan kaynaklı olabileceği düşünülmüştür.

Çizelge 4.7 : Elektroeğrilmiş nanolif filtrelerin su buharı geçirgenlik değerleri.



Membran filtreler, su buharının bir ortamdan diğerine geçişine izin veren gözenekli malzemelerdir. Su buharı geçirgenliği testi, iç ortam hava filtrelerinin performanslarını belirlemek için önemlidir. Mustapha vd. (2020), binalarda tüketilen enerjinin bir kısmının ısıtma, havalandırma ve iklimlendirme (HVAC) sistemlerinden kaynaklandığını ve iç ortam nemi sebebiyle enerji tüketiminde artışa sebep olduğunu bildirmiştir. Filtre geçirgenliğinin az olması su buharını malzeme içinde tutularak yoğuşmaya neden olur ve artan nem filtrenin kütle transferini engeller (Mustapha vd., 2020). Bu çalışmada üretilen ve yüksek gözenekliliğe sahip nanolif filtre ile kullanan hibrit iklimlendirme sistemleri enerji tüketimini azaltmak için uygun bir yöntem olabilir.

4.4 Antibakteriyel Etkinlik Testleri Sonuçları

Üretilen nanolif filtrelerde oluşan antibakteriyel etkinlik olması muhtemel 4 farklı mekanizma ile açıklanabilir; i) GOx enzimi ile glukozun bir araya gelerek hidrojen peroksit oluşturması (Lee vd., 2020), ii) GNP'nin hücre bütünlüğünü mekanik yolla parçalaması (Hu vd., 2010), iii) nano ölçekteki PAN ve GNP'nin küçük parçacık boyutları sayesinde hücre zarlarından kolayca penetrasyonu ile hücre içi süreçleri etkilemesi (Park vd., 2013) veya iv) hücre bütünlüğü bozulan bakteri sitoplazmasının dışarı akarak (Hu vd., 2010) GOx enzimi için glukoz kaynağı oluşturması.

Nanolif filtrelerin antibakteriyel etkinlik testlerinde model organizma olarak *E.coli* DH10B suşu kullanılmıştır. Lee vd. (2020) çalışmasına göre, gram-negatif *E.coli*'nin, gram-pozitif *S.aureus*'a göre daha dirençli olduğunu bildirmiştir ve H₂O₂'nin geçişine engel olmasının iki katmanlı zar sisteminin yapısal stabiliteyi arttırması ile açıklanmıştır (Lee vd., 2020). Buradan hareketle, üretilen filtrelerin antibakteriyel etkinlik testlerinde gösterdikleri başarı performanslarının % verim olarak değerlendirilmesinin yanı sıra hücre zarı stabilitesi sebebiyle daha kuvvetli olan bir bakteriye (*E.coli* DH10B) karşı da etki göstermiş olması diğer bir başarı kriteri olarak değerlendirilebilmektedir.

Erni (1989) çalışmasına göre, pek çok ökaryotik hücre için glukoz tek yararlı enerji kaynağıdır ve glukoz doğrudan glikolitik yola girebilmesiyle şekerler arasında öne çıkar. Bakteriler çeşitli şekerler kullanabilir, ancak seçenek sunulduğunda öncelikli olarak glukozu tercih eder. *E.coli*, şeker fosforilasyonu ile bir glukoz alım mekanizması kullanır. Şekerlerin alımı ve glikolizi arasında doğrudan bir bağlantı kuran fosfoenolpiruvata (PEP) bağlıdır. PEP ile şeker taşınması, çoğu fakültatif ve zorunlu anaerobik bakteride yaygın olan ve arkea ve ökaryotik organizmalarda bulunmayan karmaşık bir protein sistemidir. *E.coli*'de glukoz, fosfoenolpiruvat (PEP):şeker fosfotransferaz sistemi (PTS) tarafından sitoplazmaya içselleştirilir. PEP ile şeker taşınması, çoğu fakültatif ve zorunlu anaerobik bakteride yaygın olan karmaşık bir protein sistemidir (Erni, 1989).

Postma vd. (1993) çalışmasında, PEP:PTS, çok sayıda şekerin, şeker alkollerinin ve diğer şeker türevlerinin eşzamanlı alımını ve fosforilasyonunu katalize ettiği ve dışarıdan gelen glukozun, sitoplazmada glukoz-6-fosfat (G6P) olarak görüldüğünü raporlamıştır. G6P, karbon 6 üzerindeki hidroksi grubunda fosforile edilmiş bir glukoz şekeridir (Postma vd., 1993). Glukoneogenez, glukoz-6-fosfatın, fosfatın hidrolizi ile glukozla çevrilmesidir.

4.4.1 Biyoaerosol tutunum testi (Akış hücresi seti-1) sonuçları

Çizelge 4.8 'de nanolif filtrelerin akış hücresi sistemi sonucunda kob biriminde bakteri giriş miktarı ve çıkış miktarları görülmektedir. Sonuçlarda görüldüğü üzere filtrelerin bakteri aerosolünü tutma verimleri oldukça yüksektir.

Çizelge 4.8 : Biyoaerosol tutunum testi (akış hücresi seti-1) sonuçları.

Nanolif Filtre Kodu	Giriş (kob)	Çıkış (kob)
PAN15	9,20E+08	3,95E+06
PAN30	9,20E+08	5,00E+03
PAN45	9,20E+08	0,00
PAN-GNP15	9,20E+08	2,00E+04
PAN-GNP30	9,20E+08	5,00E+03
PAN-GNP45	9,20E+08	0,00

Deneylerin gerçekleştirildiği esnada PAN45 ve PAN-GNP45 filtrelerinde akış hücresinde zorlanma görülmüştür. Bunun nanoliflerin yüzeyinin ıslanmasından ve hava geçirgenliklerinin diğer nanoliflere göre daha düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu sebeple çalışmalara nebulizator başlığının nanolif yüzeyinin hemen ıslanmasına sebep olmayacak şekilde kullanımı optimize edilmiş ve deneylere bu şekilde devam edilmiştir. Ayrıca, PAN45 ve PAN-GNP45 filtrelerinde zorlanma ile birlikte çıkış numunesinde bakteri gözlemlenmemiştir.

PAN15 ve PAN-GNP15 filtrelerinde, PAN30 ve PAN-GNP30 filtrelerine kıyasla bakteri tutma kapasitesinde düşüş gözlemlenmiştir. PAN15 numunesinde 10^6 kob bakteri çıkışının oluşu tutuculuğunun düşük olduğunu, PAN-GNP15 numunesinde çıkışta 10^4 kob bakteri olması GNP katkısının filtrenin tutunum oranının arttığını göstermektedir.

Bu deney sonucunda, filtrelerin geçirgenlik ve bakteri tutma performansı dikkate alınarak, tutunum verimi bakımından yüksek ve deneysel akışta sorun yaratmayan PAN30 ve PAN-GNP30 filtrelerin uygunluğuna karar verilmiştir ve ilerleyen aşamalarda enzimin immobilize edileceği baz nanolif olarak belirlenmiştir.

4.4.2 Dinamik kontakt koşullarda antibakteriyel etkinlik testi sonuçları

Enzimin immobilize olduktan sonra bakteri çoğalmasına olası olumlu veya olumsuz etkisi ve aynı zamanda bakterisidal (öldürücü) etkisi bu deneyde araştırılmıştır. Miktarı önceden kob/mL olarak belirlenmiş bakteri ve nanolif filtreler, sıvı bir ortamda inkübe edilmiştir. Sıvı ortam bakteri için besiyeri içermemektedir, yalnızca ilgili tüplerin kontrollerine glukoz (%0,5 w/v) eklemeleri yapılmıştır.

İmmobilize GOx enziminin olduğu nanolif filtreler çeşitli varyasyonlardaki deney tüplerinde yüksek bakteri miktarı ile başlanan deneyde (25 saatlik bekleme

sonuçlarında) GOx immobilize filtre içerenlerde bakteri sayısında logaritmik olarak anlamlı azalışı Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9 : Dinamik kontakt koşullarda antibakteriyel etkinlik testi sonuçları.

Zaman (sa.)	Deney Tüpü No ve İçeriği						Birim
	1 PAN30	2 PAN30_GOx	3 PAN30_GOx +Glukoz	4 PAN- GNP30	5 PAN- GNP30_GOx	6 PAN- GNP30_GOx +Glukoz	
0	2,00E+08	1,60E+08	1,04E+08	1,32E+08	1,08E+08	1,60E+08	kob/mL
0,5	1,60E+08	1,20E+08	1,64E+07	1,20E+08	3,60E+07	2,38E+08	kob/mL
1	1,00E+08	7,60E+07	7,40E+07	1,36E+08	8,00E+07	1,52E+08	kob/mL
2	2,30E+07	4,00E+07	4,20E+07	4,20E+07	1,87E+06	7,30E+07	kob/mL
4	1,35E+07	6,50E+05	2,60E+07	2,60E+07	1,10E+05	2,80E+07	kob/mL
20,3	3,20E+07	1,40E+05	8,00E+06	3,60E+07	1,20E+05	6,80E+07	kob/mL
25,8	4,40E+07	5,60E+05	8,00E+06	2,60E+07	1,10E+04	2,80E+07	kob/mL

(Giriş bakteri konsantrasyonu: 1,00E+08 kob/mL)

Sıfırinci saatte, giriş bakteri konsantrasyonu ile uyumlu şekilde, tüm deney tüplerinde 10^8 mertebesinde bakteri konsantrasyonu gözlemlenmektedir. İkinci saatte 2 logluk (%98,13) düşüş ile PAN-GNP30_GOx öne çıkmaktadır. Dördüncü saate gelindiğinde 3 logluk düşüş ile PAN30_GOx (%99,35) ve PAN-GNP30_GOx (%99,89) filtreleri dikkat çekmektedir.

PAN30_GOx’un (2 nolu tüp) PAN30’a (1 nolu tüp) göre daha başarılı bir sonuç verdiği görülmektedir. Benzer şekilde, PAN-GNP30_GOx’un (5 nolu tüp) PAN-GNP30’a (4 nolu tüp) göre daha başarılı bir sonuç verdiği görülmektedir. Bu sonuçlardan, GOx enziminin filtrelerdeki etkisi anlaşılmaktadır.

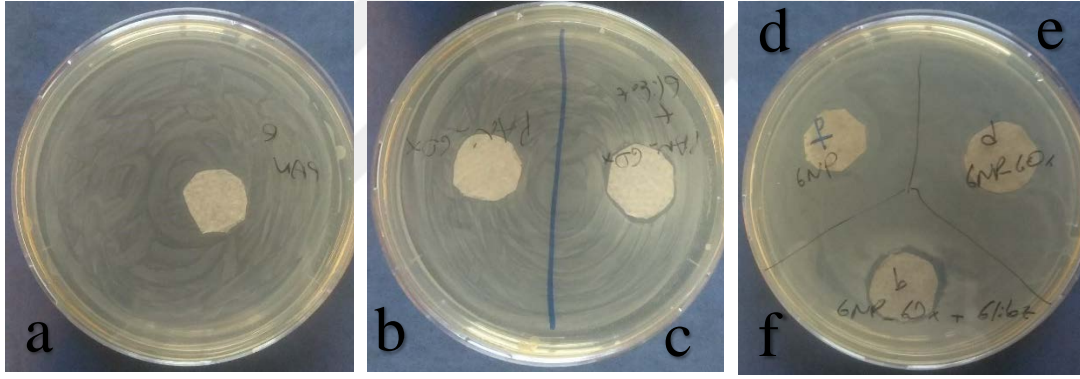
Glukoz eklentili 6 nolu tüpte 1 logluk düşüş (%72) ile antibakteriyellikte önemli bir etki yaratmadığı görülmektedir. Bir diğer glukoz eklentili 3 nolu tüpte ise 2 logluk düşüş (%92) ile 6 nolu tüpe kıyasla daha iyi olduğu görülmektedir.

Buna göre en anlamlı bakteri sayısı azaltımı PAN-GNP30_GOx filtresinin olduğu 5 numaralı deney tüpünde gerçekleşmiştir, yaklaşık 10^8 giren bakteri sayısı 10^4 (%99,989) seviyelerine düşmüştür. Bu 4 log değerinde anlamlı azalışı, 3 logluk (%99,44) diğer bir anlamlı sonuç olan eklentisiz PAN nanolifine immobilize edilmiş GOx enziminin bulunduğu 2 numaralı tüpte gözlemlenmektedir. Dinamik koşullarda GNP’nin mekanik etkisi devreye girerek PAN-GNP30_GOx’un daha başarılı bir sonuç vermesine bir sebep gösterilebilir.

Öte yandan, eklentisiz PAN filtrenin olduğu 1 numaralı tüpte 1 logluk azalım görülmektedir. Tek başına PAN'ın bakterisidal aktiviteye sahip olduğu bildirilmemesine rağmen, Bortolassi vd. (2019) çalışmasında yalnızca PAN'ın koloni azalttığı kanıtlanmıştır. PAN parçaları üzerine bakteriyel adsorpsiyonun koloni azaltımına sebep olduğu varsayılmıştır (Bortolassi vd., 2019). Buna göre 1 nolu tüpteki PAN30 filtresinin bakteri azaltımı ile bağdaştırılabilir.

4.4.3 Agar difüzyon test yöntemi (Zon testi) sonuçları

Üretilen nanofiber filtrelerin birebir bakteri ile temasına dayanan bu yöntem yarı kantitatif bir yöntem olmakla birlikte salınma dayalı bir bakterisidal etkinin varlığını ölçmek için kullanılmıştır. Bakterisidal etki göstereceği düşünülen malzeme nanolif filtreler 1,5 cm çapında kesilmiş ve uygun agar üzerine yayılmış bakteri ile temasa bırakılmıştır. Yeterli inkübasyon süresinin ardından oluşan zonlara ait fotoğraflar Şekil 4.3'te verilmiştir.



a) PAN30, b) PAN30_GOx, c) PAN30_GOx+Glukoz, d) PAN-GNP30,
e) PAN-GNP30_GOx, f) PAN-GNP30_GOx+Glukoz

Şekil 4.3 : Nanolif filtrelerin çevresinde oluşan antibakteriyel etkiye bağlı inhibisyon zonları.

Çizelge 4.10'da deney setinde kullanılan filtrelerin kodları, içerikleri ve gözlemlenen sonuçlar görülmektedir.

Çizelge 4.10 : Nanolif filtrelerin çevresinde oluşan antibakteriyel etkiye bağlı inhibisyon zonları.

Deney No	Nanolif Filtre Kodu	Filtre İçeriği	Gözlem Sonucu
1	PAN30	-	Zon gözlemlenmedi.
2	PAN30_GOx	-	Zon gözlemlenmedi.
3	PAN30_GOx	%0,5w/v Glukoz	1,9 cm çapında zon.
4	PAN-GNP30	-	Zon gözlemlenmedi.
5	PAN-GNP30_GOx	-	Zon gözlemlenmedi.
6	PAN-GNP30_GOx	%0,5w/v Glukoz	2 cm çapında zon.

İnhibisyon zonları bakteri ile birebir temas halinde nanolif malzemenin bakterisidal bir etki oluşturarak filtre çevresinde bakteri büyümesini engellemesi ile oluşmaktadır. Glukoz, bakteri hücrelerinin büyümesi için bir karbon kaynağı olarak veya GOx bağlanmış filtrede H₂O₂ üretimi için bir substrat olarak kullanılabilir. T. S. Kim vd. (2021) yaptığı çalışmada sıvı ortamda glukozun öncelikli olarak H₂O₂ üretimi için kullanıldığını raporlamıştır (Kim vd., 2021).

Bu deney sonucuna göre glukoz (%0,5 w/v) içeren PAN30_GOx ve PAN-GNP30_GOx numunelerinin olduğu petrilere sırası ile 1,9 cm ve 2 cm inhibisyon çapları ölçülmüştür. Bu sonuçlar bakterinin immobilize enzim ve glukoz varlığında birebir kontak durumunda oluşturduğu bakterisidal etkiyi belirlemiştir. Zon testi ile 6 farklı koşulda denenen nanolif filtreler üzerinde bakterinin GOx enzimi ile teması esnasında glukoz varlığında inhibisyon zonu oluşturabildiği, 24 saat süreli inkübasyonla anlaşılmıştır. Ayrıca GNP eklentili nanolif çap bakımından daha büyük bir inhibisyon zonu ile antibakteriyel etki bakımından GNP eklentisi olmayan nanolife göre daha etkili olduğu görülmüştür.

Hu vd. (2010) çalışması, benzer şekilde bakteri yayılmış LB agara grafen bazlı kağıtları yerleştirip 37 °C derecede bir gece inkübasyonundan sonra, grafen bazlı kağıtlar üzerinde bakteri büyümesine rastlamayarak antibakteriyel etkisini öne sürmüştür. Grafen bazlı kağıtların SEM analizlerinde *E.coli* hücre zarlarının bütünlüğünü kaybettiğini ve bakteri öldürme etkisini doğrulamıştır (Hu vd., 2010).

4.4.4 Bakteri kontakt testi sonuçları

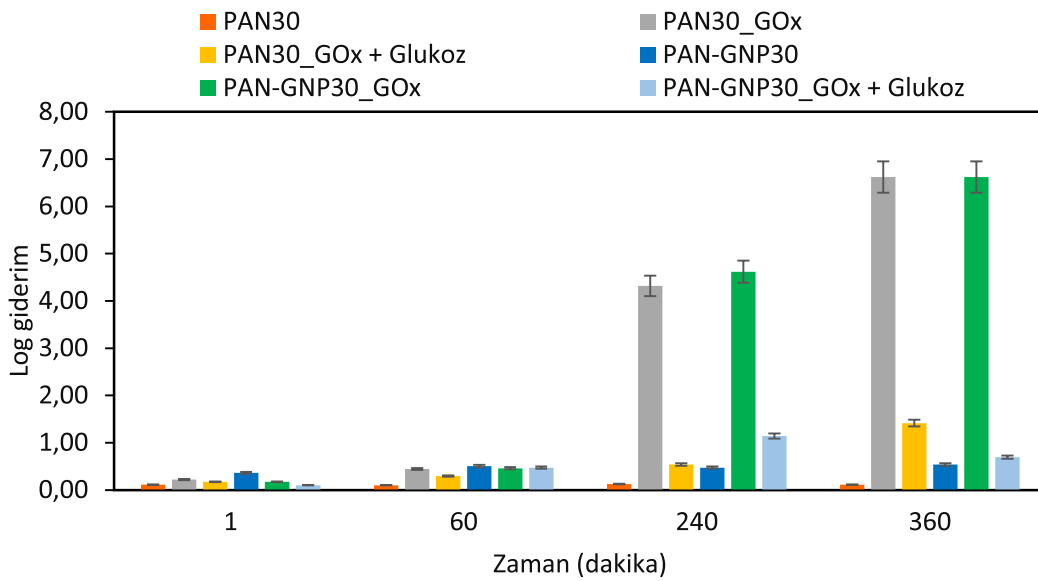
Filtrelere bakteri kontakt testi uygulandığında elde edilen bakteri sayım sonuçları Çizelge 4.11’de ve log giderimleri Şekil 4.4’te verilmiştir.

Çizelge 4.11 : Bakteri kontakt testi uygulanan filtrelerin zamana göre bakteri sayım sonuçları.

Zaman (dak.)	PAN30	PAN30_GOx	PAN30_GOx +Glukoz	PAN-GNP30	PAN-GNP30_GOx	PAN-GNP30_GOx +Glukoz	Birim
1	3,20E+06	2,50E+06	2,80E+06	1,80E+06	2,80E+06	3,30E+06	kob/mL
60	3,30E+06	1,50E+06	2,10E+06	1,30E+06	1,44E+06	1,40E+06	kob/mL
240	3,10E+06	2,00E+02	1,20E+06	1,40E+06	1,00E+02	3,00E+05	kob/mL
360	3,20E+06	0	1,60E+05	1,20E+06	0	8,40E+05	kob/mL

(Yıkama solüsyonu bakteri konsantrasyonu: 4,17E+06 kob/mL)

Yıkama solüsyonundaki başlangıç bakteri konsantrasyonu $4,17 \times 10^6$ kob/mL olarak hesaplanmıştır. Sonuçlara göre PAN30_GOx ve PAN-GNP30_GOx filtrelerinin glukoz eklentisi olmadan başarılı bir antibakteriyel etki çıkardıkları görülmektedir. PAN30_GOx ve PAN-GNP30_GOx filtrelerinin, başlangıçta 10^6 olan bakteri miktarlarını 240. dakika itibari ile 10^2 seviyesine 4 log düşürerek bir bakteri giderimi (%99,998) verdiği belirlenmiştir.



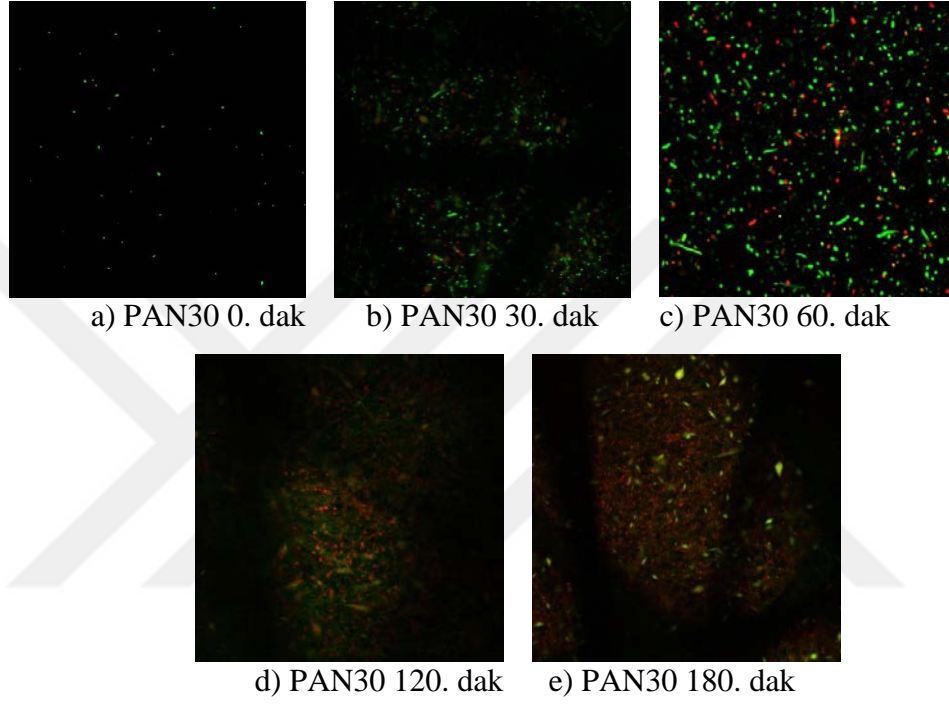
Şekil 4.4 : Bakteri kontakt testi uygulanan filtrelerin zamana göre bakteri log giderim grafiği.

Birinci dakikada, giriş bakteri konsantrasyonu ile uyumlu şekilde, tüm deney tüplerinde 10^6 mertebesinde bakteri konsantrasyonu gözlemlenmektedir. 60. dakikada tüm deney tüplerinde 10^6 mertebesinde bakteri konsantrasyonu aynı kalmıştır. 240. dakikada PAN30_GOx ve PAN-GNP30_GOx filtreleri 4 logluk düşüş ile öne çıkmaktadır. 360. dakikada ise PAN30_GOx ve PAN-GNP30_GOx filtrelerinde bakteri gözlemlenmemiştir. 360. dakikada glukoz eklentili PAN30_GOx ve PAN-

GNP30_GOx filtrelerinde ise 1 logluk düşüş görülmektedir. Enzim bağlanmış filtreler, enzim bağlanmamış kontrollerine göre oldukça başarılı sonuç vermişlerdir.

4.4.5 CLSM ile antibakteriyel etkinin tespiti sonuçları

Şekil 4.5'te görülen konfokal mikroskobundan elde edilen renklendirilmiş görüntülerden Image Color Summarizer programı aracılığıyla renk yüzde oranları elde edilmiştir.



Şekil 4.5 : Renklendirilmiş CLSM görüntüleri.

Renklerin yüzdesel oranlarına göre Çizelge 4.12'de filtre numunelerindeki canlılık oranları ifade edilmektedir. Yeşil renkler canlı bakterinin çoğunlukta, kırmızı renkler ise ölü bakterilerin çoğunlukta olduğunu ifade etmektedir.

Çizelge 4.12 : Nanolif filtre numunelerinin CLSM görüntülerine göre bakteri canlılık sonuçları.

Zaman (dak)	PAN30	PAN30_GOx	PAN30_GOx + Glukoz	PAN-GNP30	PAN-GNP30_GOx	PAN-GNP30_GOx + Glukoz
0	92%	93%	88%	99%	98%	98%
30	79%	85%	80%	88%	90%	78%
60	74%	60%	71%	40%	9%	61%
120	45%	11%	18%	21%	5%	38%
180	4%	1%	2%	2%	2%	7%

91-100%	81-90%	71-80%	61-70%	51-60%	41-50%	31-40%	21-30%	11-20%	0-10%
← Canlı					Ölü →				

Numuneler birbirleri ile karşılaştırıldığında PAN-GNP30_GOx nanolif filtresinde 60 dak. bekleme süresi sonunda %9 ile kırmızı rengin çoğunlukla ölü parametresine denk geldiği görülmektedir. 60. dakikada bir diğer bakteri canlılığının az olduğu filtre %40 ile PAN-GNP30 olmuştur. Enzim bağlanmış filtreler, enzim bağlanmamış kontrollerine göre başarılı sonuçlar vermiştir.

Canlılık oranları dikkate alındığında, antibakteriyellik etkisi bakımından en başarılı filtre PAN-GNP30_GOx olmuştur. Sırasıyla bu filtreden sonra PAN_GNP30 ve PAN30_GOx filtreleri antibakteriyel bir etki göstermişlerdir.

4.4.6 Biyoaerosol tutunum ve antibakteriyel etkinlik testi (Akış hücresi seti-2) sonuçları

Gerçek iç ortam havasında bakteri ve diğer biyolojik parçalar aerosol halinde insandan insana veya havalandırma sistemlerine taşınmaktadır. Gerçek iç ortam havasında oluşan bu aerosolleri taklit ederek, temsili bir bakteri kullanıp nanolif filtrelerin üzerine göndererek filtrelerin antibakteriyel etkinliği test edilmiştir. Nanolif filtrelerin bakteri tutunumlarının yanı sıra, zamana bağlı antibakteriyellik etkileri incelenmiştir. GOx enzimi immobilize edilmiş filtrelerin kontrolleri ve glukoz eklentisi ile tasarlandığı 6 farklı numune belirli aralıklarla taşıdıkları canlı bakteri konsantrasyonu (kob/mL) bakımından Çizelge 4.13'te ve log giderimleri Şekil 4.6'da verilmiştir.

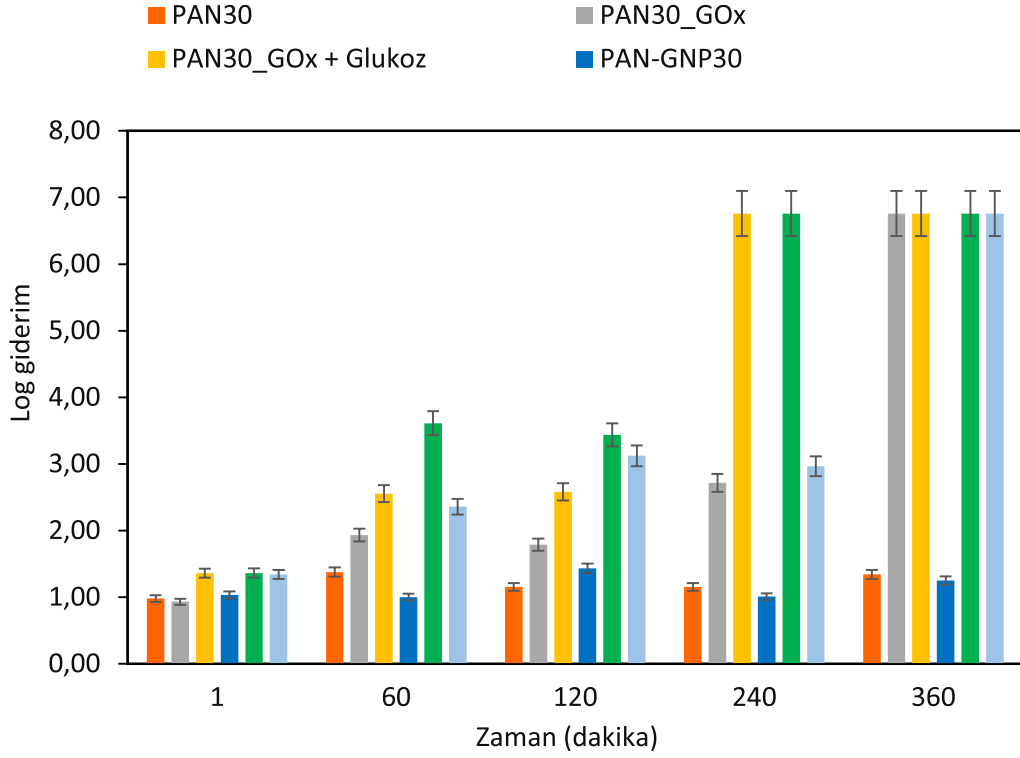
Çizelge 4.13 : Nanolif filtrelerin gerçek hava ortamında bakteri tutunum verimleri (akış hücresi seti-2).

Zaman (dak.)	PAN30	PAN30_GOx	PAN30_GOx +Glukoz	PAN-GNP30	PAN-GNP30_GOx	PAN-GNP30_GOx +Glukoz	Birim
1	6,0E+05	6,7E+05	2,5E+05	5,3E+05	2,5E+05	2,6E+05	kob/mL
60	2,4E+05	6,7E+04	1,6E+04	5,7E+05	1,4E+03	2,5E+04	kob/mL
120	4,0E+05	9,3E+04	1,5E+04	2,1E+05	2,1E+03	4,3E+03	kob/mL
240	4,0E+05	1,1E+04	0	5,6E+05	0	6,2E+03	kob/mL
360	2,6E+05	0	0	3,2E+05	0	0	kob/mL

(Yıkama solüsyonundaki bakteri konsantrasyonu: 5,7E+06 kob/mL)

Yıkama solüsyonundaki başlangıç bakteri konsantrasyonu $5,7 \times 10^6$ kob/mL olarak hesaplanmıştır. Akış hücresi seti-2 sonuçlarına göre, birinci dakikada başlangıçta oranla 1 logluk azalış, aerosol formunda filtreye muamale edilmiş bakterinin, filtreden bakteri salınımından kaynaklanmış olabilir. 60. dakikada numunelerden PAN-GNP30_GOx'un giren bakteri miktarına göre 3 log bakteri azaltımı yaptığı ve antibakteriyel verimin %99,9'a yaklaştığı görülmektedir. 240. Dakika itibariyle PAN-

GNP30_GOx ve PAN30_GOx+Glukoz filtrelerinin canlı bakteri sayısını neredeyse sıfıra düşürdüğü görülmektedir. Bu gibi sonuçlar antibakteriyel etkinlik yüzdesi olarak en yüksek değer olarak kabul edilmektedir. Enzim bağlanmış filtreler, enzim bağlanmamış kontrollerine göre başarılı sonuçlar göstermiştir.



Şekil 4.6 : Nanolif filtrelerin gerçek hava ortamında bakteri log giderim grafiği (akış hücresi seti-2).

Ayrıca filtrelerin çıkış kısmının toplandığı numune bölgesindeki bakteri sayımları sonucunda ise neredeyse hiç bakteri aerosolü kaçağının olmadığı ve filtrelerin etkili bir fiziksel tutunum yaptığı da söylenebilir.



5. GENEL DEĞERLENDİRME

- Başarılı bir filtre elde etmek için optimum elektroöğirme parametrelerinin uygulanması önem arz etmektedir. Optimum şartlarda üretilen filtrelere antibakteriyel etki kazandıracak GOx enziminin uygun yöntem ile immobilizasyonu gereklidir. Bu bağlamda farklı teknikler denenerek ön karakterizasyon çalışmaları yapıp PAN30 ve PAN-GNP30 filtrelerinin uygunluğuna, ardından Apetrei & Camurlu (2020) makalesindeki çapraz bağlama ile GOx enzim immobilizasyon tekniğine karar verilmiştir. Antibakteriyellik testleri öncesi baz filtre olarak kullanılacak temel filtrenin parametreleri belirlenip optimum koşullarda üretilmiştir. İç ortam hava filtrasyonunda kullanılması amaçlanan nanolif filtrelerin SEM, FTIR, su buharı geçirgenliği gibi karakterizasyonları da yapılmıştır.

- Antibakteriyel etki ilk olarak GOx enzimi bağlı nanolif filtrelerde dinamik kontakt koşullarda test edilmiştir. Burada çalkalamalı bir ortamda sıvı içerisinde bakteri ve nanolif filtre etkileşime geçmiştir. Ayrı şartlarda 6 farklı deney tüpünde PAN30 ve PAN-GNP30 nanolif filtrelerin enzim bağlanmış/bağlanmamış, glukoz eklenmiş/eklenmemiş formları bilinen sayıda bakteri ve glukoz olan tüpler dışında besleyici bir katkının olmadığı sıvı ortamlarda 24 saat boyunca izlenmiştir. Nanolif filtreler arasından PAN-GNP30_GOx'un antibakteriyel etkisinin ikinci saatten itibaren diğer koşullardaki filtrelere göre 2 log azaltım (%98,13 bakteri giderimi) ile yüksek giderim veriminde olduğu görülmüştür. İlerleyen sürede PAN-GNP30_GOx'tan alınan numunede, kalan bakteri sayısına bakıldığında 24 saatlik ölçüm süresince antibakteriyel etkinlik giderek artmış ve bakteri sayısını 4 log (%99,99 bakteri giderimi) kadar azaltan yüksek bir bakteri giderimi vermiştir.

- Bakterilerin GOx bağlanmış nanolif filtre ile direkt kontakına dayalı yapılan testte, PAN30_GOx ve PAN-GNP30_GOx numunelerinin glukoz varlığında oluşturduğu sırasıyla 1,9 cm ve 2 cm inhibisyon zonları enzim bağlanmış nanoliflerin antibakteriyel etkisini destekleyen sonuçlar vermiştir.

- Bakteri kontakt testi ve akış hücresi seti-2 filtrelerin gerçek ortamda bakteri ile karşılaşmasını simüle eden deney düzenekleridir. Bakteri kontakt testinde enzim bağlı

filtrelerin, PAN30_GOx ve PAN-GNP30_GOx filtrelerinin glukoz eklentisi olmadan başarılı bir antibakteriyel etki çıkardıkları, başlangıçta 10^6 olan bakteri miktarlarını dördüncü saat itibari ile 10^2 seviyesine düşürerek 4 log seviyesinde bir bakteri giderimi (%99,998) verdiği belirlenmiştir.

- CLSM analizinde gerçek zamanlı bakteri canlılığının azalışı ölü/canlı bakteri boyama yöntemi ile değerlendirmiş olup numuneler birbirleri ile karşılaştırıldığında PAN-GNP30_GOx nanofiber filtresinde 60 dak. bekleme süresinde bakteri canlılığının (%9) oldukça düştüğü görülmektedir. Canlılık oranlarına dikkate alındığında antibakteriyellik etkisi bakımından en başarılı filtre PAN-GNP30_GOx'tur. Bu filtreden sonra sırasıyla PAN_GNP30 ve PAN30_GOx filtreleri antibakteriyel etki göstermiştir.

- Antibakteriyel nanolif çalışmalarının son basamağı olan akış hücresi seti-2 sonuçlarına göre 60. dakika zaman numuneleri karşılaştırıldığında PAN-GNP30_GOx'un 3 log kadar bakteri sayısını azalttığı ve antibakteriyel verimin %99,9'a yaklaştığı görülmektedir. PAN30_GOx+Glukoz ve PAN-GNP30_GOx filtreleri dördüncü saatten itibaren canlı bakteri sayısını neredeyse sıfıra düşürmüştür. Gerçek hava koşullarını simüle etmesi planlanan bu deney, sonuçları bakımından bakteri kontakt testi ve konfokal analizi ile birbirlerini bunun yanı sıra tezin çıkış amacını da destekleyici sonuçlar içermektedir.

- PAN-GNP30_GOx filtrelerin antibakteriyel uygulamalarındaki avantajları GOx ve glukoz reaksiyonunun toksik etki yaratmadan bakterilerin çevre dostu bir şekilde nötralizasyonudur. Filtredeki GOx enziminin reaksiyona girip antibakteriyel etki sağlaması için gerekli olan oksijen iç ortam havasında mevcuttur. Reaksiyon için gerekli olan bir diğer madde glukoz, bakterinin nanoliflerde mekanik parçalanması ve içerisindeki glukoz-6-fosfatın glukoneogenez yoluyla glukozla dönmesi ile ortamda var olabilir. Hu vd., (2010) yaptığı çalışmada, GNP'nin *E.coli*'ye karşı güçlü bir inhibisyon kabiliyetinin olduğunu kanıtlamış ve hücre bütünlüğünün bozularak sitoplazmaların dışa aktığını gözlemlemiştir. Ayrıca, Park vd., (2013), nanoyapılı ajanların küçük parçacık boyutları sayesinde hücre zarlarından penetrasyonu kolaylaştırdığı ve hücre içi süreçleri etkileyerek antibakteriyel etki verdiğini raporlamıştır. Deney sonuçlarında da GNP içerikli ve glukoz olmayan setlerde daha yüksek antibakteriyel etkinin gözlemlenmesi bu fikirleri desteklemektedir. Gerçek ortamda nanolif filtreye temas

eden bakterileri simüle etmesi amacıyla tasarlanan 'bakteri kontakt testi' ve 'akış hücresi seti-2' belli bazı farklar içeren ek bilgiler sunmaktadır. Başlangıç bakteri sayımı (birinci dakika) sonuçlarına göre; biyoaerosol temelli akış hücresi seti-2'de, bakteri kontakt testine göre bakterilerin 1 log kadar nanolif filtreye daha iyi penetre oldukları görülmüştür.

Sonuç olarak, nanolif yapılı antibakteriyel hava filtreleri optimum koşullarda üretilmiş, antibakteriyel özelliği ile iç ortam havasından biyoaerosol giderimindeki etkisi test edilmiştir. Üretilen nanoliflere uygulanan farklı antibakteriyellik deneyleri birbirini destekleyici sonuçlar vermiş ve PAN-GNP30_GOx filtresinin başarısını ön plana çıkarmıştır. Bu çalışma kapsamında biyoaerosol giderimi sağlayan, nanolif yapılı, yenilikçi antibakteriyel hava filtreleri üretilip test edilmiştir.



6. KAYNAKLAR

- ACGIH. (1989). Guidelines for the Assessment of Bioaerosols in the Indoor Environment. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), Cincinnati, Ohio.
- Agarwal, S., Greiner, A., & Wendorff, J. H. (2013). Functional materials by electrospinning of polymers. *Progress in Polymer Science*, 38(6), 963-991. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.02.001>
- Apetrei, R. M., & Camurlu, P. (2020). The effect of montmorillonite functionalization on the performance of glucose biosensors based on composite montmorillonite/PAN nanofibers. *Electrochimica Acta*, 353. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136484>
- ASHRAE. (2017). ANSI/ASHRAE Standard 55-2017 : Thermal Environmental Conditions for Human Occupancy. ASHRAE Inc., 2017, 66.
- ASHRAE. (2019). ANSI/ASHRAE Standard 62.1-2019 : Ventilation for Acceptable Indoor Air Quality. ASHRAE Inc., 2019.
- Aziz, M. S., Shamsudin, M. S., Fahri, M. A. S. A., Syuhada, A., Raja Ibrahim, R. K., Bakhtiar, H., & Harun, S. W. (2022). Glucose oxidase-based enzyme immobilised on tapered optical fibre for reliability improvement in selective glucose sensing. *Optik*, 259, 168970. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2022.168970>
- Babu, A., Aazem, I., Walden, R., Bairagi, S., Mulvihill, D. M., & Pillai, S. C. (2023). Electrospun nanofiber based TENGs for wearable electronics and self-powered sensing. *Chemical Engineering Journal*, 452, 139060. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.139060>
- Badia, J. D., Teruel-Juanes, R., Echegoyen, Y., Torres-Giner, S., Lagarón, J. M., & Ribes-Greus, A. (2021). Effect of graphene nanoplatelets on the dielectric permittivity and segmental motions of electrospun poly(ethylene-co-vinyl alcohol) nanofibers. *Polymer Degradation and Stability*, 183, 109404. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2020.109404>
- Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., & Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase — An overview. *Biotechnology Advances*, 27(4), 489-501. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.003>
- Barhate, R., & Ramakrishna, S. (2007). Nanofibrous filtering media: Filtration problems and solutions from tiny materials. *Journal of Membrane Science*, 296(1-2), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.03.038>

- Bayramoğlu, G., Metin, A. Ü., Altıntaş, B., & Arıca, M. Y. (2010). Reversible immobilization of glucose oxidase on polyaniline grafted polyacrylonitrile conductive composite membrane. *Bioresource Technology*, *101*(18), 6881-6887. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.025>
- Borges, I., Henriques, P. C., Gomes, R. N., Pinto, A. M., Pestana, M., Magalhães, F. D., & Gonçalves, I. C. (2020). Exposure of Smaller and Oxidized Graphene on Polyurethane Surface Improves its Antimicrobial Performance. *Nanomaterials*, *10*(2), 349. <https://doi.org/10.3390/nano10020349>
- Bortolassi, A. C. C., Nagarajan, S., de Araújo Lima, B., Guerra, V. G., Aguiar, M. L., Huon, V., Soussan, L., Cornu, D., Miele, P., & Bechelany, M. (2019). Efficient nanoparticles removal and bactericidal action of electrospun nanofibers membranes for air filtration. *Materials Science and Engineering: C*, *102*, 718-729. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.094>
- Buyukada-Kesici, E., Gezmis-Yavuz, E., Aydin, D., Cansoy, C. E., Alp, K., & Koseoglu-Imer, D. Y. (2021). Design and fabrication of nano-engineered electrospun filter media with cellulose nanocrystal for toluene adsorption from indoor air. *Materials Science and Engineering: B*, *264*, 114953. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2020.114953>
- Cao, C., Jiang, W., Wang, B., Fang, J., Lang, J., Tian, G., Jiang, J., & Zhu, T. F. (2014). Inhalable Microorganisms in Beijing's PM_{2.5} and PM₁₀ Pollutants during a Severe Smog Event. *Environmental Science & Technology*, *48*(3), 1499-1507. <https://doi.org/10.1021/es4048472>
- Clark, L. C., & Lyons, C. (1962). Electrode Systems For Continuous Monitoring In Cardiovascular Surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *102*(1), 29-45. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>
- Dayal, R., & Godjevargova, T. (2005). Polyacrylonitrile enzyme ultrafiltration and polyamide enzyme microfiltration membranes prepared by diffusion and convection. *Macromolecular Bioscience*, *5*(3). <https://doi.org/10.1002/mabi.200400132>
- Dubey, M. K., Zehra, A., Aamir, M., Meena, M., Ahirwal, L., Singh, S., Shukla, S., Upadhyay, R. S., Bueno-Mari, R., & Bajpai, V. K. (2017). Improvement Strategies, Cost Effective Production, and Potential Applications of Fungal Glucose Oxidase (GOD): Current Updates. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01032>
- Erni, B. (1989). Glucose transport in Escherichia coli. *FEMS Microbiology Letters*, *63*(1-2), 13-24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb14096.x>
- Fazel, R., Torabi, S.-F., Naseri-Nosar, P., Ghasempur, S., Ranaei-Siadat, S.-O., & Khajeh, K. (2016). Electrospun polyvinyl alcohol/bovine serum albumin biocomposite membranes for horseradish peroxidase immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*, *93-94*, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.07.002>

- Fong, H., Chun, I., & Reneker, D. H. (1999). Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer*, *40*(16), 4585-4592. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00068-3](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00068-3)
- Geim, A. K. (2009). Graphene: Status and Prospects. *Science*, *324*(5934), 1530-1534. <https://doi.org/10.1126/science.1158877>
- Ge, L., Zhao, Y., Mo, T., Li, J., & Li, P. (2012). Immobilization of glucose oxidase in electrospun nanofibrous membranes for food preservation. *Food Control*, *26*(1), 188-193. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.022>
- Gollakota, A. R. K., Gautam, S., Santosh, M., Sudan, H. A., Gandhi, R., Sam Jebadurai, V., & Shu, C.-M. (2021). Bioaerosols: Characterization, pathways, sampling strategies, and challenges to geo-environment and health. *Gondwana Research*, *99*, 178-203. <https://doi.org/10.1016/j.gr.2021.07.003>
- Guo, K., Qian, H., Zhao, D., Ye, J., Zhang, Y., Kan, H., Zhao, Z., Deng, F., Huang, C., Zhao, B., Zeng, X., Sun, Y., Liu, W., Mo, J., Sun, C., Guo, J., & Zheng, X. (2020). Indoor exposure levels of bacteria and fungi in residences, schools, and offices in China: A systematic review. *Indoor Air*, *30*(6), 1147-1165. <https://doi.org/10.1111/ina.12734>
- Hanefeld, U., Gardossi, L., & Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. *Chem. Soc. Rev.*, *38*(2), 453-468. <https://doi.org/10.1039/B711564B>
- Hu, W., Peng, C., Luo, W., Lv, M., Li, X., Li, D., Huang, Q., & Fan, C. (2010). Graphene-Based Antibacterial Paper. *ACS Nano*, *4*(7), 4317-4323. <https://doi.org/10.1021/nn101097v>
- Iitani, K., Nakaya, M., Tomono, T., Toma, K., Arakawa, T., Tsuchido, Y., Mitsubayashi, K., & Takeda, N. (2022). Enzyme-embedded electrospun fiber sensor of hydrophilic polymer for fluorometric ethanol gas imaging in vapor phase. *Biosensors and Bioelectronics*, *213*, 114453. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114453>
- Jeong, S. Bin, Ko, H. S., Heo, K. J., Shin, J. H., & Jung, J. H. (2022). Size distribution and concentration of indoor culturable bacterial and fungal bioaerosols. *Atmospheric Environment: X*, *15*, 100182. <https://doi.org/10.1016/j.aeaoa.2022.100182>
- Jeong, G., Oh, J., & Jang, J. (2019). Fabrication of N-doped multidimensional carbon nanofibers for high-performance cortisol biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, *131*, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.01.061>
- Jett, B. D., Hatter, K. L., Huycke, M. M., & Gilmore, M. S. (1997). Simplified Agar Plate Method for Quantifying Viable Bacteria. *BioTechniques*, *23*(4), 648-650. <https://doi.org/10.2144/97234bm22>
- Jones, A. P. (1999). Indoor air quality and health. *Atmospheric Environment*, *33*(28), 4535-4564. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(99\)00272-1](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(99)00272-1)

- Kim, T. S., Nam, J., Kim, D. W., Jung, H. T., Yeon, K. M., & Kim, J. (2021). Antifouling membranes employing a 2D planar nanobiocatalyst of crosslinked glucose oxidase aggregates wrapping extra-large graphene oxide. *Chemical Engineering Journal*, 424, 130343. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2021.130343>
- KME (2021). Enforcement Rules of the Indoor Air Quality Control Act. (Written in Korean; Partial Revision in 2021). Korean Ministry of Environment (KME), Seoul, Korea.
- Krzywinski, M. (2022) Image Color Summarizer. <http://mkweb.bcgsc.ca/color-summarizer/>
- Krzywinski, M. (2016). Visualizing Clonal Evolution in Cancer. *Molecular Cell*, 62(5), 652-656. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.025>
- Lee, I., Cheon, H. J., Adhikari, M. D., Tran, T. D., Yeon, K. M., Kim, M. Il, & Kim, J. (2020). Glucose oxidase-copper hybrid nanoflowers embedded with magnetic nanoparticles as an effective antibacterial agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 155, 1520-1531. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.11.129>
- Li, D., Wang, Q., Huang, F., & Wei, Q. (2019). Electrospun Nanofibers for Enzyme Immobilization. İçinde *Electrospinning: Nanofabrication and Applications* (ss. 765-781). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51270-1.00026-1>
- Li, M., Guo, Q., Chen, L., Li, L., Hou, H., & Zhao, Y. (2022). Microstructure and properties of graphene nanoplatelets reinforced AZ91D matrix composites prepared by electromagnetic stirring casting. *Journal of Materials Research and Technology*, 21, 4138-4150. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2022.11.033>
- Li, S.-F., Chen, J.-P., & Wu, W.-T. (2007). Electrospun polyacrylonitrile nanofibrous membranes for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 47(3-4), 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.04.010>
- Liu, C., Hu, G., & Gao, H. (2012). Preparation of few-layer and single-layer graphene by exfoliation of expandable graphite in supercritical N,N-dimethylformamide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 63, 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.01.002>
- Li, X., & Gong, Y. (2015). Design of Polymeric Nanofiber Gauze Mask to Prevent Inhaling PM2.5 Particles from Haze Pollution. *Journal of Chemistry*, 2015, 1-5. <https://doi.org/10.1155/2015/460392>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Manuel, J., Kim, M., Dharela, R., Chauhan, G. S., Fapyane, D., Lee, S.-J., Chang, I. S., Kang, S.-H., Kim, S.-W., & Ahn, J.-H. (2015). Functionalized Polyacrylonitrile Nanofibrous Membranes for Covalent Immobilization of Glucose Oxidase. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11(1), 143-149. <https://doi.org/10.1166/jbn.2015.2028>

- Matthias-Maser, S., Peters, K., & Jaenicke, R. (1995). Seasonal variation of primary biological aerosol particles. *Journal of Aerosol Science*, 26, S545-S546. [https://doi.org/10.1016/0021-8502\(95\)97180-M](https://doi.org/10.1016/0021-8502(95)97180-M)
- Mustapha, R., Zoughaib, A., Ghaddar, N., & Ghali, K. (2020). Modified upright cup method for testing water vapor permeability in porous membranes. *Energy*, 195, 117057. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117057>
- Owino, J. H. O., Arotiba, O. A., Baker, P. G. L., Guiseppi – Elie, A., & Iwuoha, E. I. (2008). Synthesis and characterization of poly (2-hydroxyethyl methacrylate)- polyaniline based hydrogel composites. *Reactive and Functional Polymers*, 68(8), 1239-1244. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2008.05.005>
- Park, H.-J., Park, S., Roh, J., Kim, S., Choi, K., Yi, J., Kim, Y., & Yoon, J. (2013). Biofilm-inactivating activity of silver nanoparticles: A comparison with silver ions. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19(2), 614-619. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2012.09.013>
- Postma, P. W., Lengeler, J. W., & Jacobson, G. R. (1993). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological Reviews*, 57(3), 543-594. <https://doi.org/10.1128/mr.57.3.543-594.1993>
- Putzbach, W., & Ronkainen, N. (2013). Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Sensors*, 13(4), 4811-4840. <https://doi.org/10.3390/s130404811>
- Rago, I., Bregnocchi, A., Zanni, E., D'Aloia, A. G., De Angelis, F., Bossu, M., De Bellis, G., Polimeni, A., Uccelletti, D., & Sarto, M. S. (2015). Antimicrobial activity of graphene nanoplatelets against *Streptococcus mutans*. *2015 IEEE 15th International Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO)*, 9-12. <https://doi.org/10.1109/NANO.2015.7388945>
- Rauf, S., Ihsan, A., Akhtar, K., Ghauri, M. A., Rahman, M., Anwar, M. A., & Khalid, A. M. (2006). Glucose oxidase immobilization on a novel cellulose acetate–polymethylmethacrylate membrane. *Journal of Biotechnology*, 121(3), 351-360. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.08.019>
- Rebollar-Perez, G., Carretier, E., Lesage, N., & Moulin, P. (2011). Volatile Organic Compound (VOC) Removal by Vapor Permeation at Low VOC Concentrations: Laboratory Scale Results and Modeling for Scale Up. *Membranes*, 1(1), 80-90. <https://doi.org/10.3390/membranes1010080>
- Russo, F., Castro-Muñoz, R., Santoro, S., Galiano, F., & Figoli, A. (2022). A review on electrospun membranes for potential air filtration application. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(5), 108452. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108452>
- Salam, A., Hassan, T., Jabri, T., Riaz, S., Khan, A., Iqbal, K. M., Khan, S. ullah, Wasim, M., Shah, M. R., Khan, M. Q., & Kim, I.-S. (2021). Electrospun Nanofiber-Based Viroblock/ZnO/PAN Hybrid Antiviral Nanocomposite for

- Personal Protective Applications. *Nanomaterials*, 11(9), 2208.
<https://doi.org/10.3390/nano11092208>
- Scaffaro, R., & Lopresti, F. (2018). Properties-morphology relationships in electrospun mats based on polylactic acid and graphene nanoplatelets. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 108, 23-29.
<https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2018.02.026>
- Serra, R., Grande, R., Butrico, L., Rossi, A., Settimio, U. F., Caroleo, B., Amato, B., Gallelli, L., & de Franciscis, S. (2015). Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 13(5), 605-613.
<https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1023291>
- Song, W., Zhao, B., Wang, C., & Lu, X. (2019). Electrospun nanofibrous materials: A versatile platform for enzyme mimicking and their sensing applications. *Composites Communications*, 12, 1-13.
<https://doi.org/10.1016/j.coco.2018.12.005>
- Tan, L.-L., Wong, V. L., & Phang, S. J. (2021). Recent advances on TiO₂ photocatalysis for wastewater degradation: fundamentals, commercial TiO₂ materials, and photocatalytic reactors. İçinde *Handbook of Nanotechnology Applications* (ss. 25-65). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821506-7.00002-8>
- Travnickova, E., Mikula, P., Oprsal, J., Bohacova, M., Kubac, L., Kimmer, D., Soukupova, J., & Bittner, M. (2019). Resazurin assay for assessment of antimicrobial properties of electrospun nanofiber filtration membranes. *AMB Express*, 9(1), 183. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0909-z>
- Tsuchiya, K., Cao, Y.-Y., Kurokawa, M., Ashino, K., Yomo, T., & Ying, B.-W. (2018). A decay effect of the growth rate associated with genome reduction in *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*, 18(1), 101.
<https://doi.org/10.1186/s12866-018-1242-4>
- Vanangamudi, A., Hamzah, S., & Singh, G. (2015a). Synthesis of hybrid hydrophobic composite air filtration membranes for antibacterial activity and chemical detoxification with high particulate filtration efficiency (PFE). *Chemical Engineering Journal*, 260, 801-808.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.08.062>
- Vanangamudi, A., Hamzah, S., & Singh, G. (2015b). Synthesis of hybrid hydrophobic composite air filtration membranes for antibacterial activity and chemical detoxification with high particulate filtration efficiency (PFE). *Chemical Engineering Journal*, 260, 801-808.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.08.062>
- Vasileva, N., Godjevargova, Tz., Konsulov, V., Simeonova, A., & Turmanova, S. (2006). Behavior of immobilized glucose oxidase on membranes from polyacrylonitrile and copolymer of methylmethacrylate-

- dichlorophenylmaleimide. *Journal of Applied Polymer Science*, 101(6), 4334-4340. <https://doi.org/10.1002/app.24221>
- Wang, Q., Peng, L., Du, Y., Xu, J., Cai, Y., Feng, Q., Huang, F., & Wei, Q. (2013). Fabrication of hydrophilic nanoporous PMMA/O-MMT composite microfibrillar membrane and its use in enzyme immobilization. *Journal of Porous Materials*, 20(3), 457-464. <https://doi.org/10.1007/s10934-012-9615-9>
- Wang, Z.-G., Wan, L.-S., Liu, Z.-M., Huang, X.-J., & Xu, Z.-K. (2009). Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56(4), 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.05.005>
- Wang, Z., Pan, Z., Wang, J., & Zhao, R. (2016). A Novel Hierarchical Structured Poly(lactic acid)/Titania Fibrous Membrane with Excellent Antibacterial Activity and Air Filtration Performance. *Journal of Nanomaterials*, 2016, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2016/6272983>
- Wei, G., Yu, X., Fang, L., Wang, Q., Tanaka, T., Amano, K., & Yang, X. (2022). A review and comparison of the indoor air quality requirements in selected building standards and certifications. *Building and Environment*, 226, 109709. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2022.109709>
- Wei, T., Yu, Q., & Chen, H. (2019). Responsive and Synergistic Antibacterial Coatings: Fighting against Bacteria in a Smart and Effective Way. *Advanced Healthcare Materials*, 8(3), 1801381. <https://doi.org/10.1002/adhm.201801381>
- WHO. (1988). World Health Organization Regional Publications European Series, No. 31: Indoor Air Quality: Biological Contaminants. Report on a WHO Meeting. WHO, Copenhagen, Denmark
- World Health Organization. (2011). Guidelines for Drinking-water Quality, Chapter 7 (Microbial Aspects).
- Zhang, C., Yao, L., Yang, Z., Kong, E. S. W., Zhu, X., & Zhang, Y. (2019). Graphene Oxide-Modified Polyacrylonitrile Nanofibrous Membranes for Efficient Air Filtration. *ACS Applied Nano Materials*, 2(6), 3916-3924. <https://doi.org/10.1021/ACSANM.9B00806>
- Zheng, Y., & Yao, M. (2017). Liquid impinger BioSampler's performance for size-resolved viable bioaerosol particles. *Journal of Aerosol Science*, 106, 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2017.01.003>



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Burçin Başşahinoğlu

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Yüksek Lisans:** 2023, İstanbul Teknik Üniversitesi, Çevre Bilimleri Mühendisliği ve Yönetimi
- **Lisans:** 2020, İstanbul Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği (%100 İng)
- **Lise:** 2015, GOP Mevlana Anadolu Lisesi

MESLEKİ DENEYİM

- **Ford Otosan:** Güvenlik&Sürdürülebilir Çevre Takım Üyesi (10/2022 – devam)
- **Semtrio Sustainability:** Sürdürülebilirlik Danışmanı (2022 – 8 ay)
- **CENSE - Center for Environmental and Sustainability Research:** Erasmus Stajyeri, Lizbon/Portekiz (2019 – 2 ay)
- **İTÜ Merkez Çevre Laboratuvarı:** Laboratuvar Stajyeri (2018 – 1 ay)

TEZDEN TÜRETİLEN SUNUMLAR:

- **2nd International Graduate Research Symposium (IGRS) 2023,** İstanbul Technical University, Fabrication of Glucose Oxidase-doped and Graphene Nanoplatelet Antibacterial Nanofiber Filter for Bioaerosol Removal from Indoor Air