

# Antimikrobiese nanovesels vir waterbehandeling: poli(vinielalkohol)- en poli(akrielonitriël)-nanovesels met silwer-nanopartikels

Danielle du Plessis, Marelize Botes, Leon Milner Theodore Dicks, Thomas Eugene Cloete

Danielle du Plessis: Departement Biochemie, Universiteit Stellenbosch

Marelize Botes, Leon Milner Theodore Dicks en Thomas Eugene Cloete: Departement Mikrobiologie, Universiteit Stellenbosch

## Opsomming

Daar moet verbeter word op bestaande watersuiweringsmetodes ten einde mikrobiologies veilige en bekostigbare drinkwater te verskaf. Nanovesels word reeds gebruik in waterfiltrasiesisteme en nanofiltrasie mag selfs as 'n alternatief vir biosiede gebruik word. Verskeie variasies van nanovesels met biosiede is in die onlangse literatuur omskryf. Omdat nanovesels met antimikrobiese aktiwiteit 'n relatief nuwe studieveld is, is nog weinig studies gewy aan die uiteensetting van praktiese standaardmetodes vir antimikrobiese-aktiwiteitsbepaling. Die aktiwiteit van antimikrobiese vesels word oor die algemeen met plaattellings van kolonievormende eenhede (KVE) bepaal. Hierdie metode bepaal 'n afname in die getal kweekbare patogeniese selle teenwoordig. Die hoofdoel van hierdie studie was om 'n vinnige, maklik uitvoerbare en akkurate toets te ontwikkel om die aktiwiteit van antimikrobiese nanovesels te bepaal.

**Trefwoorde:** Watersuiwering, antimikrobies, nanotegnologie, nanovesels, filtrasie

## Uitgebreide Opsomming

In die moderne ontwikkelde lande word gesuiwerde, veilige drinkwater wat maklik bekombaar is, as vanselfsprekend aanvaar. Antieke beskawings was lank reeds bewus van metodes om ontslae te raak van die ongewenste reuke, geure en voorkoms van besoedelde water. Antieke Sanskrit- en Griekse rekords van so vroeg as 4 000 v.C. dui op die gebruik van filtrasie deur koolstof, blootstelling aan sonlig en die kook van water om dit veilig te maak vir gebruik. Aanvanklik was die hoefdryfkrag agter watersuiwering die verwydering van sigbare troebelheid. Dit was eers eeue later, in 1855, dat die epidemioloog John Snow bewys het dat 'n cholera-uitbraak sy oorsprong gehad het in 'n waterput in Londen wat met riool besoedel was. Hierna het Louis Pasteur in 1880 verklaar dat mikroskopiese organismes siektes deur water kan oordra. In die vroeë 1900's was die meeste watersuiweringsmetodes op filtrasie gebaseer, maar dit was eers in 1908, toe chloor vir die eerste keer as 'n ontsmettingsmiddel in water gebruik is, dat daar 'n merkbare afname in die aantal uitbrake van waterverwante siektes was.

Moderne waterbehandeling verg groot aanlegte wat in ontwikkelende lande dikwels tot groot stede beperk is. Meer as 1,1 miljard mense wêreldwyd het nie toegang tot veilige drinkwater nie. Landelike gebiede het grotendeels nie toegang tot behandelde water nie, en waterpunte is skaars en dikwels verafgeleë. In ontwikkelende lande sterf 4 900 mense daagliks aan waterverwante siektes soos E.coli en cholera, en 90% van hulle is kinders onder die ouderdom van vyf jaar.

In sulke gemeenskappe is daar 'n groot behoefte aan watersuiweringstegnologie wat op 'n goedkoop, maklik uitvoerbare manier skoon drinkwater kan voorsien – ideaal gesproke 'n draagbare apparaat wat met minimale opleiding gebruik kan word om drinkwater skoon te maak waar en wanneer dit benodig word.

Filtrasie is 'n ideale metode om in sulke apparaat te gebruik om troebelheid fisies uit water te verwyder. Afhangende van die grootte van die porieë van die filtermateriaal kan verskillende grade van watersuiwering behaal word.

Nadat troebelheid uit water verwyder is, is dit steeds nodig om die water te ontsmet om dit veilig te maak om te drink. Algemene kiemdoders in water sluit ontsmettingsmiddels soos chloor in wat met langdurige gebruik nadelig vir die mens se gesondheid is.

Die huishoudelike gebruik van silwer vir die preserving van kos en die stoor van water dateer terug na die antieke beskawings van die Grieke, die Romeine, Venesiërs en Masedoniërs. Alexander die Grote het reeds in 334 v.C. sy water in silwer houers gestoor en dit voor gebruik gekook. In 1869 het die eerste navorsing aangedui dat silwer giftig is vir bakterieë, en in die vroeë 20ste eeu word silwer in 'n poreuse mat vir die eerste keer in waterontsmetting gebruik. Dit is in die vorige eeu bewys dat edelmetale soos goud, silwer en koper kiemdodende eienskappe het.

Die koms van nanotegnologie het nuwe moontlikhede geskep op die gebied van watersuiwering. Nie net is dit moontlik om nou filters te vervaardig met nanogrootte-porieë (so klein as 'n duisendste van 'n millimeter) wat klein genoeg is om bakterieë uit te filtreer nie, maar metaal-nanopartikels kan ook vervaardig word. Metaal-nanopartikels het unieke chemiese eienskappe en is meer effektief as kiemdoders. In hierdie artikel beskryf ons hoe 'n filter vervaardig is om hierdie twee aspekte van nanotegnologie te kombineer om 'n nanofilter te skep met silwer-nanopartikels wat permanent binne-in die filter vasgevang is.

So 'n filter kan byvoorbeeld gebruik word om water wat met gevaarlike bakterieë besmet is, soos die water in die meeste van ons riviere in Suid-Afrika, te filtreer en ontsmet sodat dit veilig vir menslike gebruik kan wees. Ons beskryf verder maklik uitvoerbare en akkurate metodes om die effektiwiteit van so 'n ontsmettingsfilter te toets.

Die doel van hierdie navorsing was om 'n bydrae te lewer tot bestaande kennis in waterfiltrasie en -ontsmetting en die ontwikkeling van nuwe tegnologie wat in die afsienbare toekoms toegepas kan word om verligting te bring aan gemeenskappe en gebiede wat nie toegang tot veilige drinkwater het nie.

### **Abstract**

Existing water purification methods need to be improved to provide microbiologically safe and affordable potable water. Nanofibres have been used in water filtration systems and when

antimicrobial, they may be an alternative to the use of biocides. Many variants of antimicrobial nanofibres containing biocides are described in recent literature. With nanofibres in the antimicrobial context being a relatively recent field, few studies have been dedicated to describing the activity of antimicrobial nanofibres. The antimicrobial activity of such fibres are most commonly determined by culturability tests. This main goal of this study was to describe a quick, easy and accurate protocol for determining activity of antimicrobial fibres.

**Keywords:** Water purification, antimicrobial, nanotechnology, nanofibres, filtration

### *Extended Abstract*

Nanotechnology has been identified as a tool with many applications in the water industry (Bottero et al. 2006, Cloete et al. 2010). One of these applications involves the use of nanofibres for water filtration (Cloete et al. 2010). Nanoparticles or scaffolds thereof often possess novel biological, physical or chemical properties (Theron et al. 2008).

Nanofibres are solid fibres with diameters within the nanoscale with a large surface to volume ratio, and when assembled in a non-woven mat have a small pore size, in the order of 5-50nm<sup>2</sup> (Gule et al. 2011). Furthermore, the specific physical properties of nanofibres, such as strength, porosity and surface activity, are determined by the polymer and additional non-soluble particles used in the synthesising process (Frenot and Chronakis 2003). These qualities make nanofibres extremely versatile and more effective than conventional polymer membranes used in liquid filtration (Theron et al. 2008; Yoon et al. 2006).

Electrospinning can produce nanofibres from a range of electrospinnable polymers. In the process of needle electrospinning, a high-voltage electric field is generated between a charged source of polymer solution and an earthed metal collector plate. An electrostatically driven jet of polymer solution gives rise to nanofibres, which are collected on the plate.

A variation of conventional needle-based electrospinning, known as bubble electrospinning, allows much more rapid production of nanofibres. The process involves the formation of multiple electrostatically driven jets of polymer from a charged bubble of polymer solution (Yang et al. 2009). The electric field is of a much higher voltage than used in conventional needle spinning, and fibres generated from polymer jets are collected on a negatively charged metallic collector plate positioned above the bubble.

In recent literature many studies have focused on the added value of incorporating biocides into nanofibre filtration membranes with the aim of removing pathogens from water. Commonly, these biocides are incorporated into the nanofibre matrix by adding the biocide to the spinning solution before electrospinning. The synthesis of nanofibres containing metal nanoparticles is a well-researched field (Botes and Cloete, 2010), largely because of the advantages associated with combining the functional properties of metal nanoparticles with the widely applicable properties of nanofibres (Niu and Crooks 2003). These properties include biocidal activity. Metal nanoparticles can be incorporated into polymer nanofibres by physically blending the nanoparticles with the polymer before electrospinning, by in situ polymerisation of a monomer in the presence of metal nanoparticles, or by incorporation of metal salts into the polymer with subsequent in situ reduction of metal ions to nanoparticles

(Lala et al. 2007). In the present study, poly(vinyl alcohol) (PVA) and poly(acrylonitrile) (PAN) nanofibres were synthesised by bubble electrospinning, incorporating silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) into the polymer solutions. In situ reduction of silver ions in  $\text{AgNO}_3$  to silver nanoparticles was achieved by exposing the nanofibres to ultraviolet (UV) irradiation.

Nanofibres containing biocides are currently under investigation as more cost-effective alternatives to conventional water sanitation methods such as chlorination. Since antimicrobial nanofibre research is a relatively new field, not much research has been devoted to antimicrobial testing methodology. Most commonly, colony-forming unit (CFU) determination is used to determine the efficacy of antimicrobial nanofibres, but this disregards the occurrence of viable but non-culturable cells, which can have an influence on results. The main objective of this study was to develop a protocol to determine the antimicrobial efficacy of nanofibres containing a biocide that is easily executable, sensitive to viable and culturable cells and accurate.

PVA and PAN nanofibres containing silver nanoparticles were successfully fabricated by bubble electrospinning. This was confirmed by EDX/SEM analysis. When inspected visually by SEM, PVA and PAN nanofibres containing silver nanoparticles appeared morphologically similar. Back-scattering electron images revealed that silver nanoparticles in PVA nanofibres were more evenly dispersed than in PAN nanofibres, but that PAN nanofibres had higher silver nanoparticle content. This was confirmed by EDX analysis.

Cells of three pathogens, namely *Pseudomonas aeruginosa* (Xen 5), *Escherichia coli* (Xen 14) and *Klebsiella pneumoniae*, stably transfected with the lux operon, allowing emission of light as long as the cells are metabolically active, were used in this study.

The antimicrobial activity of nanofibres containing silver nanoparticles was tested by immobilising nanofibres on 0.22  $\mu\text{m}$  pore filters (Durapore, Millipore). Contaminated water was filtered through the filters with immobilised nanofibres, bringing the pathogens into contact with the nanofibres. The 0.22  $\mu\text{m}$  pore size of the filters excluded bacteria, causing bacteria to remain behind on the filter surface in contact with the fibres. This allowed the investigation of the effect of nanofibres containing silver nanoparticles on bacteria. A negative control, namely nanofibres without silver nanoparticles that were immobilised on to filters, were subjected to the same tests.

The cells remained bioluminescent and thus viable when in contact with plain PVA fibres not containing silver nanoparticles. However, when these cells are in contact with PVA nanofibres containing silver nanoparticles, between 96% and 98% of bioluminescence was lost in all three pathogens tested.

After filtration through membranes with plain PVA nanofibres on the surface, the number of viable cells that remained behind on the filter surface immediately after filtration, increased 100-fold as opposed to the number of CFUs before filtration, indicating the potential for biofilm formation, should the fibre surface remain moist. However, when filtered through membranes with PVA nanofibres containing silver nanoparticles on their surface, there was a reduction of between 91% and 99% in CFUs in the cells that remained behind on the filter surface for all three pathogens tested as opposed to the number of CFUs before filtration. This confirmed that the observed decrease in bioluminescence correlated with a decrease in viable cells.

Due to the larger prevalence of silver nanoparticles in PAN nanofibres, a greater antimicrobial effect could be expected. In all three pathogens tested, there was a decrease in bioluminescence of between 98% and 100% in cells that were in contact with PAN nanofibres containing silver nanoparticles, as opposed to cells in contact with plain PAN nanofibres.

Similar to plain PVA fibres, filtration through membranes with plain PAN nanofibres on the surface led to roughly a 100-fold increase in viable cell numbers as opposed to the number of CFUs before filtration. When filtered through a filter with PAN nanofibres containing silver nanoparticles on the surface, there was a 100% reduction in CFUs in all three pathogens tested, as opposed to the number of CFUs before filtration. This showed that PAN nanofibres containing 5% (wt/v) AgNO<sub>3</sub> not only had higher silver nanoparticle content, but also had a higher antimicrobial efficacy than PVA nanofibres containing 5% (wt/v) AgNO<sub>3</sub>.

When considering that PVA nanofibres with silver nanoparticles are fabricated from a water-soluble, non-toxic and biodegradable polymer, and have excellent antimicrobial activity, such fibers can be highly applicable in water sanitation, especially in an environment-conscious milieu. On the other hand, the fabrication process of PAN nanofibres is more conducive to the formation of silver nanoparticles, leading to a higher silver nanoparticle content, allowing the complete sanitation of pathogenically contaminated water samples. Furthermore, these fibres are strong and very durable in water, making them ideal for use in high-throughput systems. The mechanism of antimicrobial action here and in other studies has, however not been elucidated to indicate specifically whether it is direct contact of bacterial cells with silver in its immobilised state that is responsible for the antimicrobial activity, or ions that leach out.

The methods used to test the antimicrobial activity of these fibres in this study were easily executable, accurate and quick to perform.

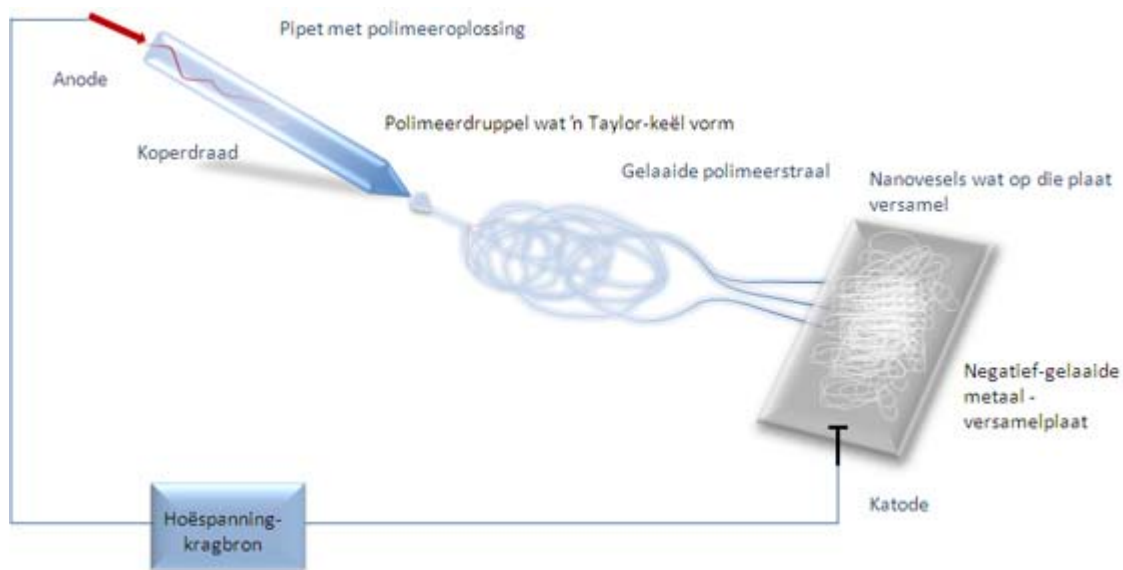
## 1. Inleiding

Wêreldwyd het ongeveer een miljard mense nie toegang tot veilige drinkwater nie. Die bevolkings van ontwikkelende lande en afgeleë gebiede word die swaarste getref (WHO 2004). Daar bestaan dus 'n groot behoefte aan watersuiweringsmetodes wat koste-effektief, maklik bekombaar en effektief is (Theron et al. 2008). Konvensionele watersuiweringsmetodes sluit die gebruik van chemiese biosiede in, soos vrye chloor, chlooramiene en osoon. Neweprodukte wat deur chemiese ontsmettingsmiddels gevorm word, het kankerwekkende eienskappe (Krasner et al. 2006). Verder is daar ook 'n toename in die voorkoms van patogene wat weerstandbiedend is teenoor antibiotika en biosiede, en daarom is dit belangrik dat alternatiewe ontsmettingsmetodes nagevors word (Sondi en Salopek-Sondi 2004).

Nanotegnologie is geïdentifiseer as 'n hulpbron met verskeie moontlike toepassings in die waterbedryf (Bottero et al. 2006; Cloete et al. 2010). Een moontlike toepassing is die gebruik van nanovesels in waterfiltrasie (Cloete et al. 2010).

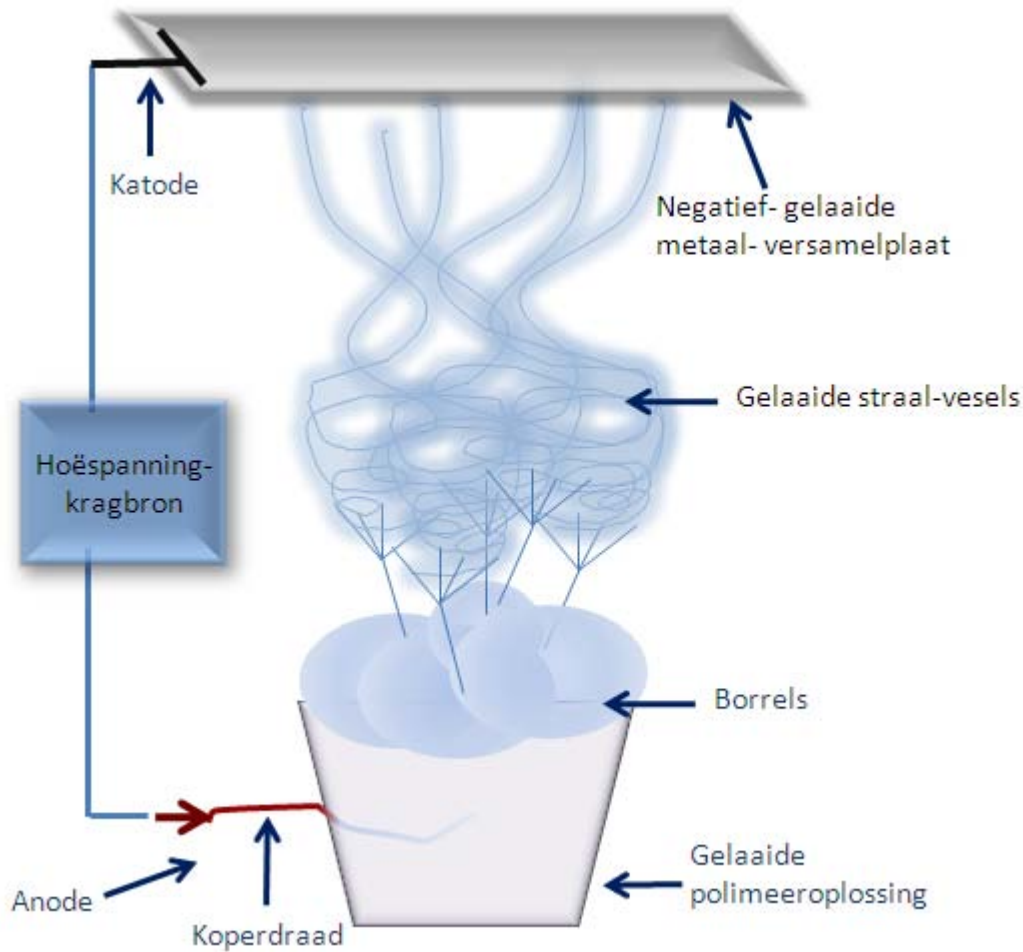
Nanopartikels of raamwerke daarvan beskik dikwels oor nuwe biologiese, fisiese of chemiese eienskappe, byvoorbeeld spesiale termiese weerstandigheid, sterkte en chemiese reaktiwiteit, wat dit bruikbaar maak vir 'n baie groot verskeidenheid toepassings (Theron et al. 2008). Nanovesels is soliede vesels met 'n nanoskaal-deursnee en 'n baie groot oppervlakte-tot-volume-verhouding. Wanneer hulle as 'n ongeweeftde mat saamgestel word, word 'n materiaal met baie fyn porieë geskep. In 'n onlangse publikasie deur Gule et al. (2011), is poriegroottes van tussen 5 en 50 nm<sup>2</sup> gemeet, wat dus die uitsluiting van bakterieë verseker. Verder word die spesifieke eienskappe van nanovesels, soos sterkte, deurlaatbaarheid en oppervlak-aktiwiteit, bepaal deur die polimeer waaruit die vesels bestaan en bykomende onoplosbare partikels wat tydens die sintetiseringsproses ingesluit word (Frenot en Chronakis 2003). Hierdie eienskappe maak nanovesels meer effektief en veelsydig as vesels wat tans in vloeistoffiltrasie gebruik word (Theron et al. 2008; Yoon et al. 2006).

Nanovesels kan deur middel van die elektrospintegniek uit 'n verskeidenheid polimere vervaardig word. In die naaldbemiddelde elektrospintegniek word 'n hoëspanning elektriese veld geskep tussen 'n gelaaide polimeeroplossing en 'n aardgekoppelde metaalversamelplaat. 'n Polimeerdruppel aan die punt van die naald wat onderhewig is aan oppervlakspanning, vorm onder invloed van die elektriese veld 'n Taylor-keël (Taylor 1969) wat dan, by 'n drempelspanning, oorsprong gee aan 'n elektrostatis gedrewe straal polimeeroplossing wat nanovesels vorm, wat dan op die metaalplaat versamel word (Figuur 1).



**Figuur 1. Elektrospintegniek**

**Klik hier om die figuur om 'n groter weergawe van hierdie figuur te sien.**



**Figuur 2. Borrelbemiddelde elektrospinningsproses**

'n Variasie op die konvensionele naaldbemiddelde elektrospintegniek, wat bekend staan as die borrelbemiddelde elektrospintegniek (Figuur 2), maak dit moontlik om nanovesels vinniger te vervaardig. Die proses behels die skepping van veelvoudige elektrostaties-aangedrewe polimeerstrale op die oppervlak van 'n gelaaide polimeerborrel (Yang et al. 2009). Die elektriese veld het 'n hoër spanning as dié wat in die naaldbemiddelde elektrospintegniek gebruik word, en vesels word op 'n negatief-gelaaide metaalplaat wat bo die borrel geposisioneer is, opgevang.

In die onlangse literatuur is baie studies gewy aan die waarde van biosiedtoevoeging tot nanovesel-filtrasiemembrane met die oog op patoëenverwydering uit water. Oor die algemeen word biosiede ingesluit in die nanoveselmatriks deur die biosied by die polimeeroplossing te voeg voordat nanovesels vervaardig word. Baie navorsing is reeds gedoen oor die sintese sintetisering van nanovesels wat biosiede bevat (Botes and Cloete 2010), en dit kan toegeskryf word aan die voordelige kombinasie van die funksionele eienskappe van metaal-nanopartikels en nanovesels. (Niu en Crooks 2003). Dit sluit ontsmettingseienskappe in. Metaal-nanopartikels kan by polimeer-nanovesels ingesluit word deur die nanopartikels fisies by die polimeeroplossing te voeg voor nanoveselvervaardiging,

of om metaalsoute by die polimeeroplossing te voeg wat dan ná nanovesel-sintese gereduseer word na metaalione (Lala et al. 2007).

Nanovesels wat biosiede bevat, word tans ondersoek as 'n meer koste-effektiewe alternatief tot huidige watersanitasiemetodes. Omdat antimikrobiese nanovesels 'n relatief nuwe navorsingsveld is, is daar nog nie baie navorsing gepubliseer wat gewy is aan die antimikrobiese toetse vir sulke produkte nie. Oor die algemeen word kolonievormende-eenheid- (KVE-) plaattellings gebruik om antimikrobiese aktiwiteit te bepaal. Hierdie metode is nie noodwendig voldoende toereikend nie, omdat slegs kweekbare selle getel word, en daar lewensvatbare selle mag wees wat nie kweekbaar is nie, wat dan buite rekening gelaat word. Uit die literatuur, sowel as in hierdie studie, is dit nog nie duidelik of die antimikrobiese aktiwiteit van silwer toe te skryf is aan fisiese kontak van die bakterieë met die geïmmobiliseerde nanopartiekels in die vesels, of aan silwer-ione wat uitloog nie. Die hoofdoel van hierdie studie was om 'n protokol te ontwerp om die antimikrobiese effektiwiteit van nanovesels wat biosiede bevat, te toets op 'n maklik uitvoerbare, akkurate manier wat sensitief is teenoor kweekbare en lewensvatbare selle. Poli(vinielalkohol)- (PVA-) en Poli(akrielonitriël)- (PAN-) nanovesels is vervaardig deur die borrelbemiddelde elektrospintegniek, en AgNO<sub>3</sub> is by die polimeeroplossing gevoeg. Silwer-ione in AgNO<sub>3</sub> is tot silwer-nanopartikels gereduseer deur die vesels bloot te stel aan ultraviolet- (UV-) bestraling.

## 2. Metodiek

### 2.1. Materiale

Poli(vinielalkohol) (PVA; Mr 146 000–186 000 Dalton, 87–89% hidrouliese), gliksaal-(40% waterige oplossing) gekonsentreerde HCl, en silwer-nanopartikels (10 wt%-dispersie in etileenglikol), poli(akrielonitriël)- (PAN-) en JSYK-silikoonbenatter is aangekoop by Sigma-Aldrich (Aston Manor, Suid-Afrika). Silwernitrat was van BDH (Poole, Engeland).

### 2.2. Sintese van kruisgekoppelde PVA-nanovesels met silwer-nanopartikels

'n Polimeeroplossing van 8 wt%-PVA is voorberei deur PVA-poeier geleidelik in water op te los teen 90°C terwyl dit liggies geroer word. Die polimeeroplossing is toegelaat om af te koel en daarna is 8% gliksaal bygevoeg as kruisbindingsmiddel. Die pH is met gekonsentreerde HCl aangepas tot 5.0 om die kruisbindingsproses moontlik te maak. Daarna is 5% (wt/v) AgNO<sub>3</sub> by die polimeermengsel gevoeg en deeglik deurgemeng.

Die borrelbemiddelde elektrospinningsproses is soos in Figuur 2 opgestel. 'n Apparaat wat spesifiek vir nanoveselsintese in die laboratorium geskik is, is deur Eugene Smit (Departement Polimeerwetenskap, Universiteit Stellenbosch) ontwerp. Vyf mL van die polimeeroplossing is in die apparaat geplaas. 'n Koperdraadjie, gekoppel aan die positiewe elektrode van 'n hoëspanningskragbron, is in die polimeeroplossing geplaas, terwyl die



negatiewe elektrode aan 'n metaal-versamelplaat gekoppel is, wat 20 cm bo die apparaat geplaas is. 'n Stroom van 50 kV is vir 20 minute aangewend, en dit lewer benaderd 0.003 g vesels/cm<sup>2</sup>. PVA-nanovesels wat AgNO<sub>3</sub> bevat, het op die metaalplaat versamel, en is daarna by 60°C geplaas vir 4 d om kruisbinding te laat plaasvind. Daarna is die vesels aan UV-straling blootgestel vir een uur om sodoende die silwer-ione in die vesels na silwer-nanopartikels te reduseer.

Gewone PVA-nanovesels sonder silwer-nanopartikels is as die negatiewe kontroles gebruik in antimikrobiële toetse. Hierdie vesels is op dieselfde manier gesintetiseer as PVA-nanovesels wat silwer-nanopartikels bevat, maar die AgNO<sub>3</sub> is weggelaat uit die polimeeroplossing.

### **2.3. Sintese van PAN-nanovesels**

'n Polimeeroplossing van 6% (wt/v) PAN in dimetielformamied (DMF) (Sigma Aldrich) is voorberei. Die DMF is verhit tot 90°C en is geroer terwyl PAN geleidelik bygevoeg is. Die mengsel is by 90°C vir vyf uur geroer totdat 'n deurskynende donkergeel oplossing gevorm het. 'n Silikoonbenatter, JSYK L580, is by die oplossing gevoeg (0.95 g/l) om borrelvorming te stabiliseer tydens die borrelbemiddelde elektrospinningsproses. Daarna is 5% (wt/v) AgNO<sub>3</sub> bygevoeg en deeglik ingemeng in die polimeeroplossing. Vyf mL van die polimeeroplossing is in die apparaat geplaas. 'n Koperdraadjie, gekoppel aan die positiewe elektrode van 'n hoëspanningskragbron, is in die polimeeroplossing geplaas, terwyl die negatiewe elektrode aan 'n metaal-versamelplaat gekoppel is, wat 20 cm bo die apparaat geplaas is. 'n Stroom van 50 kV is gebruik. Die stroom is vir 15 minute aangewend en dit het benaderd 0.003 g vesels/cm<sup>2</sup> PAN nanovesels gelewer wat AgNO<sub>3</sub> en reeds gereduseerde silwer-nanopartikels bevat. Hierna is die vesels aan UV-bestraling blootgestel vir een uur om enige oorblywende silwer-ione na silwer-nanopartikels te reduseer. Gewone PAN-nanovesels sonder silwer-nanopartikels is as negatiewe kontroles gebruik in die antimikrobiële toetse. Hierdie vesels is op dieselfde manier vervaardig as PAN-nanovesels met silwer-nanopartikels, maar die AgNO<sub>3</sub> is weggelaat uit die polimeeroplossing. Die filters is bedek met benaderd 0,003 g vesels/cm<sup>2</sup>.

### **2.4. Karakterisering van PVA- en PAN-nanovesels wat silwer-nanopartikels bevat deur middel van SEM en EDX**

Die morfologie van PVA- en PAN-nanovesels met silwer-nanopartikels is bestudeer met die Zeiss Evo MA 15-skandeer-elektronmikroskoop (SEM) en energie-dispersiewe X-straal-analise (EDX). Die fisiese verspreidingspatroon van silwer-nanopartikels in die nanovesels is besigtig deur middel van SEM met 'n terugverstrooiingsdetektor (BSE). Verdere elementalanalise en kwantifisering van silwer in die vesels is met behulp van EDX gedoen.

### **2.5. Antimikrobiële aktiwiteit van PVA- en PAN-nanovesels met silwer-nanopartikels.**

Die antimikrobiële aktiwiteit van nanovesels wat silwer-nanopartikels bevat, is getoets deur nanovesels op 0.22 µm porieë filters (Durapore, Millipore) te immobiliseer. Patogeniese selle

is in kontak gebring met die nanovesels deur patogeen-gekontameneerde water deur die filters met die geïmmobiliseerde nanovesels te filtreer. Die filterporiegrootte van 0.22  $\mu\text{m}$  sluit bakterieë uit, wat veroorsaak dat die selle op die vesels agterbly. Dit het dit moontlik gemaak om die effek van die nanovesels wat silwer-nanopartikels bevat, op bakterieë selle bakterieselle te bestudeer. 'n Negatiewe kontrole, naamlik nanovesels sonder silwer-nanopartikels wat ook op die filters geïmmobiliseer is, is aan dieselfde toetse onderwerp is.

Vir hierdie toetse is *Pseudomonas aeruginosa* (Xen 5), *Echerichia coli* (Xen 14) and *Klebsiella pneumonia* (Xen 39) gebruik. Elke patogeen is oornag in 10 mL brein-hart-groeimedium ("brain heart infusion") (BHI, Biolab Diagnostics) gekweek wat met antibiotika aangevul is, op 'n roterende wiel by 37°C. Die doel van die antibiotika hier is om te selekteer vir 'n reinkultuur van die inokulum deur kontaminasie te voorkom.

Die Xen-kulture is geneties getransformeer om weerstandig te wees teen 'n spesifieke antibiotikum. Die *P.aeruginosa*-inokulum is met 0,5% (v/v) tetrasiklien aangevul, terwyl *E.coli* en *K. Pneumonia* met 0,3% (v/v) kanamysien aangevul is.

Selle is geëes (10 min., 1 000 x g) van elke groeikultuur, en is drie keer gewas met steriele fisiologiese soutoplossing om enige oorblywende nutriënte van die groeimedium te verwyder.

Water-inokulum is van elkeen van die patogene voorberei deur 106 selle/mL in 250 mL steriele gedistilleerde water te inokuleer. Die inokulum is dan deur 0.22  $\mu\text{m}$ -filters, met óf skoon PVA-nanovesels óf PVA-vesels wat silwer-nanopartikels bevat, gefiltreer met behulp van 'n Sartorius-Stedim-filterhouer. Dieselfde eksperimente is herhaal met 0.22  $\mu\text{m}$ -filters met óf skoon PVA-vesels óf PAN-nanovesels met silwer-nanopartikels wat op die oppervlak van die filter geïmmobiliseer is.

Na filtrasie is die lewensvatbaarheid van die selle wat agtergebly het op die nanovesels, met silwer-nanopartikels ondersoek, eerstens deur kwantifisering van bioliggewendheid as gevolg van die teenwoordigheid van die *lux*-operon in die patogene, as 'n indikasie van lewensvatbaarheid met IVIS-visualisering ("In vivo imaging system", Caliper life sciences), en tweedens deur die getal lewensvatbare selle te bepaal wat van die vesels afkom deur middel van plaattelling. Dit is gedoen deur herhaaldelik die filteroppervlak met steriele fosfaat-gebufferde soutwateroplossing te spoel en dan 'n verdunningsreeks op selektiewe BHI-agarplate uit te plaat. Kolonievormende eenhede is na 'n oornag-inkubasie by 37°C bepaal.

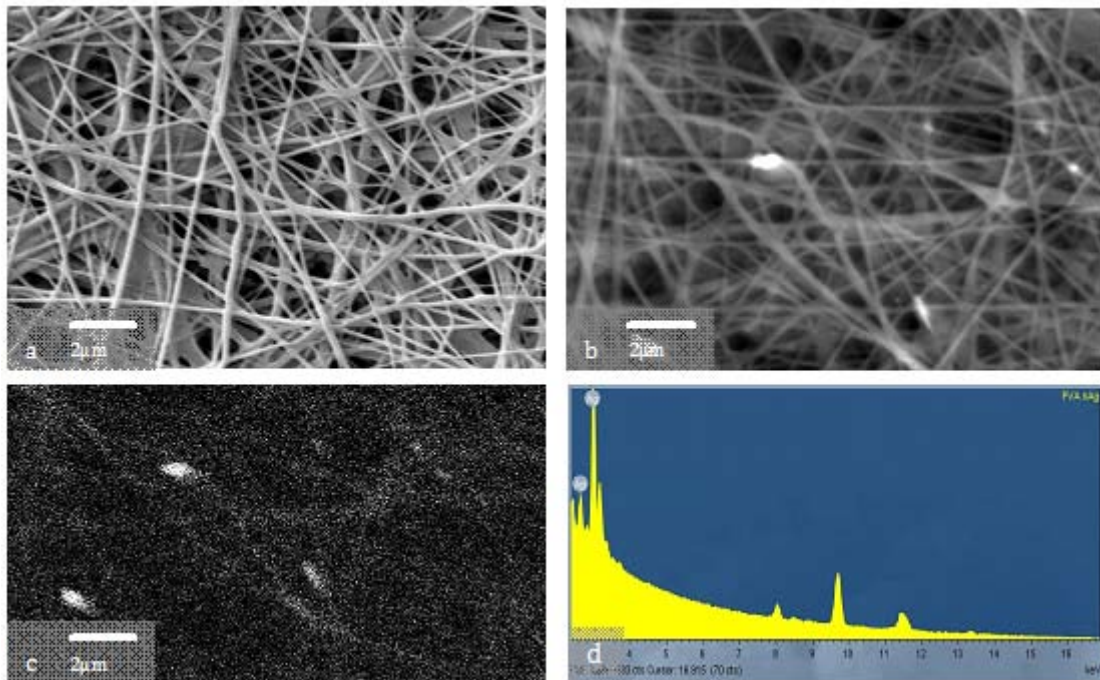
Met die bepaling van bioliggenwendheid as 'n indikasie van lewensvatbaarheid en die bepaling van KVE, het die selle wat op skoon nanovesels agter gebly het, as kontroles gedien. Alle eksperimente is in triplikaat uitgevoer.

### 3. Resultate en bespreking

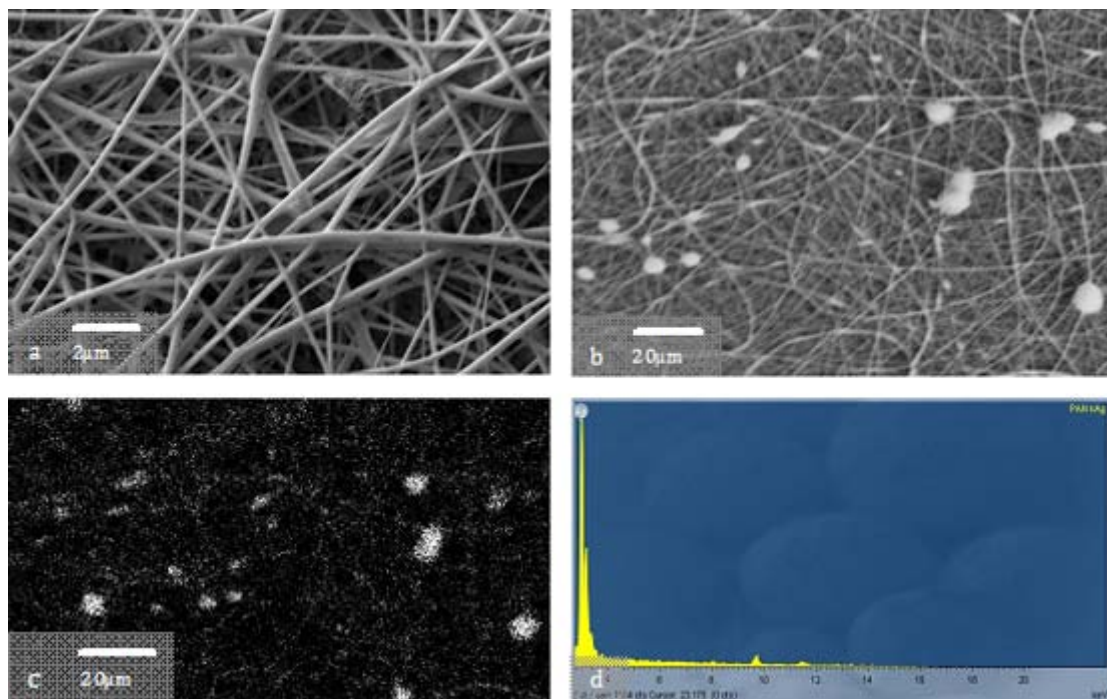
#### 3.1. Karakterisering van PVA- en PAN-nanovesels wat silwer-nanopartikels bevat met SEM en EDX

Geen strukturele verskille is waargeneem tussen kruisverbinde PVA-nanovesels met 5% (wt/v) AgNO<sub>3</sub> wat vir een uur aan UV-bestraling blootgestel is en PAN-nanovesels wat op dieselfde manier voorberei is nie. PVA-nanovesels was effens kleiner in deursnee (Figure 3a en 4a). Terugkaatsende elektronmikroskopie en kontrasvisualisering wys die posisie van silwer-nanopartikels op die nanoveselmembrane in wit, met elke spikkel as 'n aanduiding van die teenwoordigheid van silwer. As Figure 3b en 4b met mekaar vergelyk word, is 'n groter teenwoordigheid van silwer-nanopartikels sigbaar in wit. Klein spikkels silwer is sigbaar wyd verspreid in beide soorte vesels, met groter partikels silwer of areas van meer gekonsentreerde silwer voorkoms sigbaar as groter wit areas. Die EDX-analise van beide die PVA- en PAN-nanovesels met silwer-nanopartikels wys 'n kenmerkende energiepiek om en by 3 keV, wat eie is aan silwer. 'n Hoër x-straal-intensiteit is met PAN-nanovesels met silwer-nanopartikels waargeneem (Figuur 4d) en dit dui op 'n hoër silwerinhoud as in PVA-nanovesels met silwer-nanopartikels (Figuur 3d). Dit word duideliker gedemonstreer in die analise van die silwer-inhoud van die vesels met EDX. Die PVA-AgNO<sub>3</sub>-nanovesels het 49,9% (wt) silwer bevat.

Dit is toe te skryf aan die feit dat, bo en behalwe die UV-bestraling, die oplosmiddel, dimetielformamied, bydra tot die redusering van Ag<sup>+</sup>-ione in AgNO<sub>3</sub> om silwer-nanopartikels te produseer, en dus 'n hoër opbrengs van silwer-nanopartikels as in PVA-AgNO<sub>3</sub>-nanovesels tot gevolg het, waar UV-bestraling die enigste stap is wat silwer-ione na nanopartikels reduseer.



**Figuur 3. SEM/EDX van kruisverbinde PVA-nanovesels met 5% (wt/v) AgNO<sub>3</sub> na UV-bestraling: (a) SEM-mikrograaf (b) SEM/BSE (c) BSE (terugkaatsende beeld) van silwerpartikel-verspreiding (d) EDX-spektrum van silwer in PVA-nanovesels.**



**Figuur 4. SEM/EDX van PAN-nanovesels met 5% (wt/v) AgNO<sub>3</sub> na UV-bestraling: (a) SEM-mikrograaf (b) SEM/BSE (c) BSE (terugkaatsende beeld) van silwerpartikel-verspreiding (d) EDX-spektrum van silwer in PAN-nanovesels.**

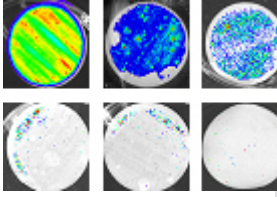
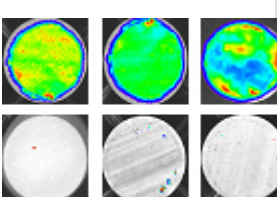
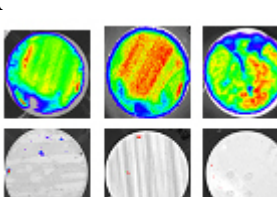
### 3.2. Antimikrobiële aktiwiteit van PVA- en PAN-nanovesels met silwer-nanopartikels.

Selle van elkeen van die drie patogene wat in die studie getoets is, het bioliggewend en dus lewensvatbaar gebly in kontak met PVA-vesels wat nie silwer-nanopartikels bevat nie. Kontak met PVA-vesels wat wel silwer-nanopartikels bevat, het egter 'n vermindering van tussen 96% en 98% in bioliggewendheid in al drie patogene veroorsaak.

Daarteenoor: as PVA-nanovesels met silwer-nanopartikels gebruik word vir filtrasie, is 'n vermindering van tussen 91% en 99% in KVE waargeneem vir al drie patogene wat getoets is, teenoor die KVE voor filtrasie. Dit het bevestig dat die vermindering in bioliggewendheid wat waargeneem is, ooreenstem met 'n vermindering in lewensvatbare selle (Tabel 1).

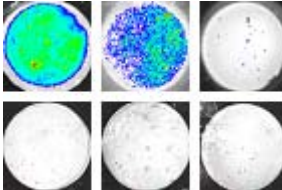
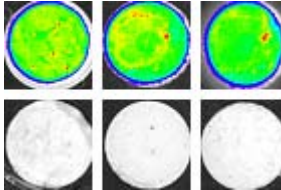
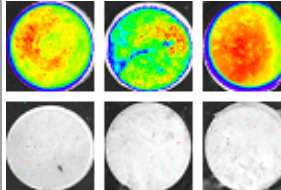



As gevolg van 'n hoër voorkoms van silwer-nanopartikels in PAN-nanovesels (Figuur 4) kan 'n groter antimikrobiële effek verwag word. Vir elk van die drie patogene wat getoets is, is 'n afname van tussen 98% en 100% van bioliggewendheid waargeneem in selle wat in kontak was met PAN-nanovesels wat silwer-nanopartikels bevat, teenoor selle wat in kontak was met PAN-nanovesels wat nie silwer-nanopartikels bevat nie. Na filtrasie deur 'n membraan met PAN-nanovesels wat silwer-nanopartikels bevat op die oppervlak, was daar 'n 100%-vermindering in KVE van al drie patogene wat getoets is, teenoor die KVE voor filtrasie (Tabel 2). Dit het getoon dat PAN-nanovesels wat 5% (wt/v) AgNO<sub>3</sub> bevat, nie net 'n hoër silwer-nanopartikel-inhoud het as PVA-nanovesels met 5% (wt/v) AgNO<sub>3</sub> nie, maar ook 'n hoër antimikrobiële aktiwiteit.

**Tabel 1. Opsomming van die antimikrobiële aktiwiteit van PVA-nanovesels met 5% (wt/v) AgNO<sub>3</sub>**

|   | <i>P.aeruginosa</i><br>(Xen 5)  | <i>E.coli</i><br>(Xen 14)  | <i>K.pneumonia</i><br>(Xen 3)   |
|---|---|--|---|
| IVIS-beelde van organisme in kontak met gewone PVA-vesels (A) en PVA-vesels met 5% (wt/v) AgNO <sub>3</sub> (B) | <p>A</p>  <p>B</p> | <p>A</p>  <p>B</p> | <p>A</p>  <p>B</p> |
| % Afname in fotone<br>Standaardfout van die gemiddelde (n=3)<br>$R\% = [(A-B)/A] \times 100$                    | 96,41% ± 1.7  | 98,59% ± 0.36  | 97,89% ± 1.4  |

|   |   |                       |                       |                       |
|---|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| KVE<br>(gemiddeld van triplikate)               | Voor filtrasie (A)                      | 3,6 x 10 <sup>4</sup> | 5,9 x 10 <sup>5</sup> | 4,7 x 10 <sup>5</sup> |
|   | Filtrasie met PVA                       | 9,2 x 10 <sup>6</sup> | 1,0 x 10 <sup>7</sup> | 1,2 x 10 <sup>7</sup> |
|   | Filtrasie met PVA+AgNO <sub>3</sub> (B) | 3,0 x 10 <sup>3</sup> | 1,0 x 10 <sup>4</sup> | 2,0 x 10 <sup>3</sup> |
| % Afname in KVE<br>$R\% = [(A-B)/A] \times 100$ |   | 91,67 %               | 98,39%                | 99,57%                |

**Tabel 2. Opsomming van die antimikrobiese aktiwiteit van PAN-nanovesels met 5% (wt/v) AgNO<sub>3</sub>**

|  | <i>P.aeruginosa</i><br>(Xen 5)   | <i>E.coli</i><br>(Xen 14)   | <i>K.pneumonia</i><br>(Xen 39)   |                       |
|--|--|---|--|-----------------------|
| IVIS-beelde van organisme in kontak met gewone PAN-vesels (A) en PAN-vesels met 5% (wt/v) AgNO <sub>3</sub> (B). | A<br>  | A<br>  | A<br>  |                       |
|  | B<br> | B<br> | B<br> |                       |
| % Afname in fotone<br>Standaardfout van die gemiddelde (n=3)<br>$R\% = [(A-B)/A] \times 100$                     | 98,49% ± 1.3   | 99,96% ± 0.03   | 99,99% ± 0.01  |                       |
| KVE<br>(gemiddeld van triplikate)  | Voor filtrasie (A)   | 3,0 x 10 <sup>2</sup>   | 6,4 x 10 <sup>5</sup>  | 1,1 x 10 <sup>6</sup> |
|  | Filtrasie met PAN  | 2,0 x 10 <sup>4</sup>   | 1,4 x 10 <sup>7</sup>  | 4,2 x 10 <sup>7</sup> |
|  | Filtrasie met PAN+AgNO <sub>3</sub> (B)  | 0   | 0  | 0                     |
| % Afname in KVE<br>$R\% = [(A-B)/A] \times 100$  |  | 100 %   | 100%   | 100%                  |

Om op te som: PVA- en PAN-nanovesels wat silwer-nanopartikels bevat, is suksesvol gesintetiseer met behulp van die borrelbemiddelde elektrospintegniek. Dit is bevestig deur EDX/SEM-analise. SEM-visualisering het soortgelyke morfologiese voorkoms getoon vir PVA- en PAN-nanovesels wat silwer-nanopartikels bevat. Terugkaatsende elektronbeelde het gewys dat silwer-nanopartikels in PVA-vesels meer eweredig versprei is as in PAN-nanovesels, maar dat PAN-nanovesels 'n hoër silwerinhoud as PVA-nanovesels het. Dit is bevestig deur EDX-analise. Beide PVA- en PAN-nanovesels het uitstekende antimikrobiese

aktiwiteit, met PVA-nanovesels wat silwer-nanopartikels bevat wat tussen 91% en 99% van bakterieë in 'n besmette waterbron ontsmet het. PAN-nanovesels met silwer-nanopartikels het 'n hoër antimikrobiese aktiwiteit gehad, met 100%-ontsmetting van drie patogene. As daar in ag geneem word dat PVA-nanovesels met silwer-nanopartikels van 'n wateroplosbare, nietoksiene en bioafbreekbare polimeer vervaardig word, en dat dit uitstekende antimikrobiese aktiwiteit het, is dit hoogs toepasbaar in watersanitasie, veral in 'n omgewingsbewuste milieu. Aan die ander kant leen die sinteseproses van PAN-nanovesels dit beter tot die vorming van silwer-nanopartikels, en lewer dit dus nanovesels met 'n hoër silwer-nanopartikelinhoud wat patogenies gekontameneerde water volledig kan steriliseer. PAN-nanovesels het 'n beter langlewendheid en sterkte in water, wat dit ideaal maak vir waterfiltrasie en -sanitasie in hoër-deurvloei-sisteme. Die metode wat in hierdie studie gebruik is om die antimikrobiese aktiwiteit van hierdie vesels te bepaal, was akkuraat, maklik en vinnig uitvoerbaar.

## Erkenning

Ons bedank graag vir Eskom vir befondsing en Eugene Smit by die Departement van Polimeerwetenskap, Universiteit Stellenbosch vir sy tegniese bystand met die borrelbemiddelde elektrospintegniek.

## Bibliografie

- Balazs, D.J., K. Triandafillu, P. Wood, Y. Chevolot, C. van Delden, H. Harms, C. Hollenstein, H.J. Mathieu. 2004. Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments. *Biomaterials* 25:2139-151.
- Berger, T., J. Spadaro, R. Bierman, S.E. Chapin, R.O. Becker. 1976. Antifungal Properties of Electrically Generated Metallic Ions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10:856-60.
- Botes, M. en T. Eugene Cloete. 2010. The potential of nanofibres and nanobiocides in water purification. *Crit. Rev. Microbiol.* 36:68-81.
- Bottero, J.; Rose, J.; Wiesner, M.R. 2006. Nanotechnologies: Tools for sustainability in a new wave of water treatment processes. *Integrated Environmental Assessment and Management.* 2:391-395.
- Cho, K.; Park, J.; Osaka, T.; Park, S. 2005. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochim. Acta.* 51:956-960.
- Choi, O.; Deng, K.; Kim, N.; Ross, L.; Surampalli, R.; Hu, Z. 2008. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver colloids on microbial growth. *Water Research.* 42:3066-3074.

- Cloete, T.E.; Michele De Kwaadsteniet; Marelize Botes; Manuel Lopez-Romero. 2010. *Nanotechnology in Water Treatment Applications*. Caister Academic Press.
- Davies, R.L. and Etris, S.F. 1997. The development and functions of silver in water purification and disease control. *Catalysis Today*. 36:107-114.
- Feng, Q.L.; Wu, J.; Chen, G.Q.; Cui, F.Z.; Kim, T.N.; Kim, J.O. 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.* 52: 662-668.
- Frenot, A. and Chronakis, I.S. 2003. Polymer nanofibres assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 8:64-75.
- Golubovich, V.N. and Rabotnava, I.L. 1974. Kinetics of growth inhibition in *Candida utilis* by silver ions. *Microbiol.* 43:948-950.
- Gule, N.P.; de Kwaadsteniet, M.; Cloete, T.E.; Klumperman, B. 2011. Electrospun Poly(vinyl alcohol) Nanofibres with Biocidal Additives for Application in Filter Media, 1-Properties Affecting Fibre Morphology and Characterisation. *Macromol. Mater. Eng.* 296, DOI.
- Klasen, H.J. 2000. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns*. 26:131-138.
- Krasner, S.W.; Weinberg, H.S.; Richardson, S.D.; Pastor, S.J.; Chinn, R.; Sclimenti, M.J.; Onstad, G.D.; Thruston, A.D. 2006. Occurrence of a New Generation of Disinfection Byproducts *Environ. Sci. Technol.* 40:7175-7185.
- Lala, N.L.; Ramaseshan, R.; Bojun, L.; Sundarajan, S.; Barhate, R.; Ying-jun, L.; Ramakrishna, S. 2007. Fabrication of nanofibres with antimicrobial functionality used as filters: protection against bacterial contaminants. *Biotechnol. Bioeng.* 97:1357-1365.
- Maynard, A.D. and Michelson, E. 2006. The Nanotechnology Consumer Product Inventory.
- Melaiye, A. and Youngs, W.J. 2005. Silver and its application as an antimicrobial agent. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 15:125-130.
- Niu, Y. and Crooks, R.M. 2003. Preparation of Dendrimer-Encapsulated Metal Nanoparticles Using Organic Solvents. *Chemistry of Materials*. 15:3463-3467.
- Qian, X.; Yin, J.; Huang, J.; Yang, Y.; Guo, X.; Zhu, Z. 2001. The preparation and characterization of PVA/Ag<sub>2</sub>S nanocomposite. *Mater. Chem. Phys.* 68:95-97.
- Sondi, I. and Salopek-Sondi, B. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid Interface Sci.* 275:177-182.
- Stobie, N.; Duffy, B.; McCormack, D.E.; Colreavy, J.; Hidalgo, M.; McHale, P.; Hinder, S.J. 2008. Prevention of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol-gel coating. *Biomaterials*. 29:963-969.
- Taylor, G. 1969. Electrostatically driven jets. *Proc. Roy. Soc. London.* A313, 453-475.



Theron, J.; Walker, J.A.; Cloete, T.E. 2008. Nanotechnology and Water Treatment: Applications and Emerging Opportunities. *Crit. Rev. Microbiol.* 34:43-69.

WHO. 2004. Emerging Issues in Water and Infectious Disease.

WHO. 2006. Guidelines for drinking-water quality, 3rd ed. *Health criteria and other supporting information*. World Health Organization, Geneva.

Yang, R.; He, J.; Xu, L.; Yu, J. 2009. Bubble-electrospinning for fabricating nanofibres . *Polymer.* 50:5846-5850.

Yoon, K.; Kim, K.; Wang, X.; Fang, D.; Hsiao, B.S.; Chu, B. 2006. High flux ultrafiltration membranes based on electrospun nanofibrous PAN scaffolds and chitosan coating *Polymer.* 47:2434-2441.