

## АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МОНТМОРИЛЛОНИТ СОДЕРЖАЩИХ СОРБЕНТОВ<sup>1</sup>

**В.Д. Буханов, А.И. Везенцев  
Н.Ф. Пономарева, Л.А. Козубова  
С.В. Королькова  
Н.А. Воловичева, В.А. Перистый**

*Белгородский государственный  
национальный исследовательский  
университет  
Россия, 308015,  
г. Белгород, ул. Победы 85*

*E-mail: bukhanov@bsu.edu.ru;  
vesentsev@bsu.edu.ru*

Представлены результаты экспериментальных исследований определения антибактериальной активности различных форм монтмориллонит содержащих сорбентов, полученных авторами статьи. Использование механизма их антиадгезивного действия является одним из наиболее перспективных направлений при разработке эффективных методов лечения и профилактики инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: нативная, обогащённая монтмориллоновая глина, наноструктурные унифицированные формы сорбента, комплексные препараты, бактериальные инфекции.

Сорбенты используемые в традиционной и ветеринарной медицине предназначены для выведения из организма различные токсические вещества. Еще во времена Гиппократ активированным углем присыпали раны, применяли его внутрь. Затем об этом забыли, и только в 50-х годах XIX века начался новый виток развития этого направления. Сорбенты, применяемые для профилактики и лечения различных желудочно-кишечных заболеваний, называются энтеросорбентами (энтеро - кишечник и сорбео - поглощать). Энтеросорбенты широко применяются как в медицинской, так и в ветеринарной практике. Особенно при нарушении функции пищеварения инфекционной этиологии. Потенциально-опасные микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности, локализуясь в желудочно-кишечном тракте, наносят огромный вред здоровью людей и животных. Традиционно применяемое в таких случаях специфическое лечение, основанное на применении биологически активных препаратов или химиотерапевтических средств, не всегда оправдывает себя и является крайне затратным.

В тоже время такие негативные факторы как: быстро развивающаяся резистентность возбудителей к антибактериальным соединениям, иммунодепрессивные свойства лекарственных препаратов, нарушения микроэкологии и возрастание этиологической роли условно-патогенных микроорганизмов под влиянием терапевтических средств – побуждают исследователей к поиску новых путей оптимизации лечебного процесса [1, 2].

Для решения этих проблем наиболее эффективным методом является применение натуральных энтеросорбентов, которые безопасны для организма. Они инактивируют патогенные микроорганизмы и выводят из него продукты их жизнедеятельности, а также продукты нарушенного метаболизма и токсичные соединения, полученные из внешней среды. Энтеросорбенты эффективно применяются как для лечения, так и для профилактики инфекционных желудочно-кишечных заболеваний.

1. В последнее время появились сообщения об использовании монтмориллонит содержащих глин при такого рода заболеваниях. Не хуже современных антибиотиков они справляются с болезнетворными микроорганизмами. Но, в отличие от лекарств, сама глина остается химически инертной, а, следовательно, абсолютно безвредной для организма. Лечебное действие глинистых природных материалов типа монтмориллонов (смектитов), объясняется их сорбционно-адгезивными и ионоселективными свойствами, а также насыщенностью разнообразными химическими элементами,

<sup>1</sup> Научные исследования, опубликованные в этой статье, выполнены в соответствии с государственным контрактом № 16.740.11.0168 и грантом РФФИ 09-03-97545.



часть из которых находится в биологически доступной форме. Адсорбционная способность глинистого минерала обусловлена его трехслойной структурой несовершенных кристаллов типа 2:1. Связь между пакетами слаба, межпакетное расстояние велико и в него могут внедряться молекулы воды или другие полярные молекулы, а также обменные катионы и анионы [3–5].

2. Если увеличить расстояние между элементарными структурными пакетами монтмориллонита, можно существенно повысить удельную поверхность глины (до нескольких сотен м<sup>2</sup>/г) и тем самым ее адсорбционные свойства.

Группе исследователей БелГУ под руководством профессора А.И. Везенцева удалось изменить структуру глинистого минерала. В процессе комплексного переупорядочивания монтмориллонитовых глин месторождений Белгородской области, включающего: обогащение, кислотную обработку и внедрение между слоями монтмориллонита ионов металлов:  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Li^+$ ,  $Ag^+$  и  $K^+$  – были получены новые с улучшенной адсорбционной способностью наноструктурные формы монтмориллонита. Также на основе обогащённой формы монтмориллонитовой глины доцентом БелГУ В.А. Перистым были разработаны комплексные препараты, обладающие сорбционными и антибактериальными свойствами. Один из них был получен обработкой исходного сырья параами тимола, а второй – раствором тимола.

Целью работы является изучение ингибирующей активности образцов катионзамещенных форм монтмориллонит содержащих глин и двух комплексных препаратов по отношению к некоторым видам микроорганизмов. Для выполнения поставленной цели была сформулирована задача – определить чувствительность кишечной палочки, сальмонеллы и стафилококков к разработанным сорбентам и изучить возможность перспективной унифицированной формы сорбента подавлять способность сальмонелл проявлять болезнетворные свойства.

Объектами исследования служили: нативная, обогащённая монтмориллонит содержащая глина, наноструктурные унифицированные формы сорбентов, а также комплексные препараты приготовленные на основе монтмориллонит содержащей глины.

### Материал и методы исследований

Ингибирующее влияния исследуемых сорбентов и комплексных препаратов на такие микроорганизмы как: *Escherichia coli* 987 p, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus intermedius* 4432, *Staphylococcus hyicus* P2, *Staphylococcus aureus* (метициллин резистентный) определяли на мясопептонном агаре (МПА), содержащем 2 % агара. В одноразовые чашки Петри диаметром 40 мм вливали по 4 мл МПА. После его охлаждения до 45°C в него вносили необходимую навеску стерильного сорбента и взвесь исследуемых штамма бактерий из расчёта  $1,5 \cdot 10^7$  КОЕ (Колониеобразующих единиц) на 1 мл МПА.

В контрольные чашки с питательной средой вносили только взвесь исследуемых микроорганизмов. Содержимое каждой чашки тщательно перемешивали стерильным шпателем. Далее чашки ставили на горизонтальную поверхность. Когда содержимое чашек становилось плотным их помещали в термостат и культивировали при температуре 37°C в течение 16-18 часов. Затем из чашек, на поверхности которых отмечался или отсутствовал рост микроорганизмов, делали смывы. В каждом случае использовали 3 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия. Количество микробных клеток в смывах определяли с помощью шкалы стандарта мутности McFarland. Со смывов из чашек, где отсутствовал рост бактерий, производили посевы на МПА. Результативность исследуемых сорбентов сравнивали с широко распространёнными в ветеринарной и медицинской практике препаратами (активированный уголь, неосмектин, смекта), а также с нативной и обогащённой глиной. Определение чувствительности микроорганизмов к исследуемым сорбентам проводили 3-кратно, до получения сопоставимых результатов.

Выяснение эффективности литиевой формы сорбента подавлять способность сальмонелл проявлять свои болезнетворные свойства проводили на трёх группах белых мышей (по 10 голов в каждой). Для заражения мышей на стерильном изотониче-

ском растворе хлорида натрия изготавливали соответствующие инокуляты. Первой группе приготовили стерильную суспензию сорбента в концентрации 50 мг/мл, второй – сорбента и *Salmonella enteritidis* в соответствующих концентрациях 50 мг/мл и  $0.5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл, в третьей – только взвесью сальмонелл в концентрации  $0.5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл. После тщательного суспендирования и 20-минутной экспозиции каждую суспензию фильтровали через стерильный бумажный фильтр «синяя лента». Затем мышам первой, второй и третьей групп внутрибрюшинно ввели по 0.5 мл соответствующих фильтратов.

### Результаты исследований и их обсуждение

Цинковая форма (табл. 1) сорбента в концентрациях 50 и 100 мг/мл цидно действовала на сальмонелл и эшерихий. Такой же эффект отмечается и у литиевой формы сорбента, но при дозе 25 и 50 мг/мл. На стафилококки данные формы сорбента при концентрациях 25-100 мг/мл оказывали только бактериостатическое действие, так как после посева из полученных смывов всегда отмечался рост используемых стафилококков.

Таблица 1

#### Зависимость концентрации микроорганизмов в смывах от природы и содержания сорбента на основе монтмориллонитовой глины

Микроорганизм	Содержание сорбента, мг/мл	Различные модификации сорбента							Контроль
		Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Li <sup>+</sup>	3Ag 10	D2Ag10T16	
		концентрация КОЕ 10 <sup>8</sup> /мл							
<i>Escherichia coli</i> 987 p	6.25	-	-	-	-	-	2	1.5	39
	12.5	-	-	-	-	24	0	0	
	25	-	-	-	12	0	0	0	
	50	-	-	-	1	0	-	-	
	100	-	-	-	0	0	-	-	
	200	18	18	33	0	0	-	-	
<i>Salmonella dublin</i>	3.125	-	-	-	-	-	3	2	12
	6.25	-	-	-	-	-	0	0	
	12.5	-	-	-	-	-	0	0	
	25	-	-	-	9	9	0	0	
	50	-	-	-	0	0	-	-	
	100	-	-	-	0	0	-	-	
<i>Salmonella enteritidis</i>	3.125	-	-	-	-	-	6	1	22
	6.25	-	-	-	-	-	0	0	
	12.5	-	-	-	-	6	0	0	
	25	-	-	-	8	0	-	-	
	50	-	-	-	0	0	-	-	
	100	20	18	18	0	0	-	-	
<i>Staphylococcus hyicus</i> p2	3.125	-	-	-	-	-	9	15	36 30
	6.25	-	-	-	-	-	0	2	
	12.5	-	-	-	33	30	0	0	
	25	-	-	-	2	2	0	0	
	50	-	-	-	0	0	-	-	
	100	-	-	-	0	0	-	-	
	200	33	30	45	0	0	-	-	
	3.125	-	-	-	-	-	18	20	
	6.25	-	-	-	-	-	2	1.5	
	12.5	-	-	-	-	-	0	0	
	25	-	-	-	-	21	0	0	
	50	-	-	-	18	3	-	-	
	100	36	36	33	1	0	-	-	
	200	21	18	20	0	0	-	-	
	3.125	-	-	-	-	-	30	30	
6.25	-	-	-	-	22	2	3		
12.5	-	-	-	30	20	0	0		

Окончание таблицы 1

<i>Staphylococcus aureus</i> , метициллин резистентный	25	-	-	-	15	2	0	0	36
	50	-	-	-	6	0	-	-	
	100	-	-	-	0	0	-	-	
	200	39	33	33	0	0	-	-	

Необходимо отметить и тот факт, что калиевая, натриевая и магниевая формы сорбента, при их содержании по 200 мг/мл МПА, не подавляли рост исследуемых микроорганизмов. В то же время калиевая и натриевая формы сорбента усиливали рост *Staphylococcus intermedius* и *Salmonella dublin*. По сравнению с контролем количество микробных клеток в 1 мл смыва было соответственно больше в 1.2 и 1.3 раза. Также сорбент, содержащий натрий, увеличивал число КОЕ *Staphylococcus aureus* в 1 мл смыва в 1.1 раза, а магниевая форма – повышала этот показатель для *Staphylococcus hyicus* в 1.3 раза.

Более эффективно сдерживали рост используемых микроорганизмов серебряные формы сорбента в концентрациях 6.25-12.5 мг/мл МПА. Наличие в питательной среде любой из этих форм в количестве 12.5 мг/мл действовало на бактерии цидно.

Нативная и обогащённая формы монтмориллонитовой глины при концентрации 100 мг/мл МПА не подавляли рост исследуемых микроорганизмов, а наоборот усиливали. При этом количество микробных клеток в смывах с поверхности плотной питательной среды опытных чашек Петри было в 1.1-1.9 раза больше, чем в контрольных (табл. 2).

Таблица 2

### Зависимость концентрации микроорганизмов в смывах от природы и содержания сорбента на основе монтмориллонитовой глины

Микроорганизм	Содержание сорбента, мг/мл	Сорбенты							Контроль
		экспериментальные		традиционные применяемые в медицинской и ветеринарной практике			комплексные препараты на основе обогащённой глины, полученные обработкой		
		нативная глина	обогащённая глина	активированный уголь	неомектин	смекта	парамитимола	раствором тимола	
количество КОЕ · 10 <sup>8</sup> /мл									
<i>Escherichia coli</i> 987 p	6.25	-	-	-	-	-	22	4	39
	12.5	-	-	-	-	-	20	0	
	25	-	-	-	-	-	19	0	
	100	2	5	45	45	45	-	-	
<i>Salmonella enteritidis</i>	6.25	-	-	-	-	-	4	3	22
	12.5	-	-	-	-	-	7	0	
	25	-	-	-	-	-	0	0	
	100	45	24	42	42	39	-	-	
<i>Staphylococcus hyicus</i> p2	6.25	-	-	-	-	-	5	1	36
	12.5	-	-	-	-	-	0	0	
	25	-	-	-	-	-	0	0	
	100	45	45	42	45	26	-	-	
<i>Staphylococcus intermedius</i> 4432	3.125	-	-	-	-	-	-	4	30
	6.25	-	-	-	-	-	4	0	
	12.5	-	-	-	-	-	7	0	
	25	-	-	-	-	-	4	0	
<i>Staphylococcus aureus</i> , метициллин резистентный	6.25	-	-	-	-	-	23	1	36
	12.5	-	-	-	-	-	26	0	
	25	-	-	-	-	-	21	0	
	100	45	45	45	45	19	-	-	

Сорбенты, применяемые в ветеринарной и медицинской практике, при концентрации 100 мг/мл МПА не подавляли рост и развитие исследуемых штаммов микроорганизмов. Вместо торможения их роста и развития они наоборот стимулировали

их размножение. Менее результативными оказались активированный уголь и неосмектин, количество выросших на МПА микробных клеток в 1 мл смыва, по сравнению с контролем, где сорбент отсутствовал, была выше в 1.2-4.7 раза.

Комбинации обогащённой глины, обработанной парами тимола и раствором тимола, существенно отличались своей антибактериальной активностью. Так, например, сочетание обогащённой глины с раствором тимола угнетало рост микроорганизмов при содержании препарат 6.25-12.5 мг/мл. Механизм цидного действия этого препарата по отношению к кишечной палочке и стафилококкам регистрировался при концентрации 25 мг/мл питательной среды. В то время как комбинация из обогащённой глины и адсорбированных ею паров тимола в большинстве случаев не оказывала такого же действия при концентрации препарата 25 мг/мл МПА. Этот факт даёт основание полагать о низком уровне тимола в данном препарате.

Руководствуясь полученными результатами, следует отметить идентичную эффективность серебряной формы сорбента и сочетания обогащённой глины с раствором тимолом. Но если учитывать условия современных рыночных отношений, то себестоимость комплексного препарата гораздо ниже, чем вышеуказанной серебряной формы сорбента. Поэтому разработанный комплексный препарат может найти широкое применение в сельскохозяйственном производстве.

В опыте по выяснению эффективности литиевой формы сорбента подавлять способность сальмонелл проявлять болезнетворные свойства за период 10-дневного клинического наблюдения, после внутрибрюшинного введения белым мышам первой группы профильтрованной суспензии исследуемого сорбента, падежа, угнетённого состояния и других отклонений в состоянии их здоровья не отмечалось (табл. 3).

Таблица 3

**Влияние литиевой формы сорбента на способность *Salmonella enteritidis* вызывать заболевание и гибель белых мышей**

Группа, голов	Состав инокулята	Кратность и способ введения, доза	Пало мышей, голов										Выжило		Суммарная процентность дожития, суток	Критерий достоверности, Р	
			Сутки										Голов	%			
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10					
I 10	Суспензия сорбента в концентрации 50 мг/мл физ. ра-ра	Однократно в/б, 0,5 мл	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	100	100	<0,01
II 10	Суспензия сорбента в концентрации 50 мг/мл физ. ра-ра + <i>S. enteritidis</i>	Однократно В/б, 0,5 мл 1,5 10 <sup>8</sup> КОЕ	1	-	-	-	3	-	-	2	1	1	2	20	71	<0,01	
III 10	Взвесь культуры <i>S. enteritidis</i>	Однократно в/б, 0,5 мл 1,5 10 <sup>8</sup> КОЕ	3	2	1	2	2	-	-	-	-	-	0	0	28		

В связи с этим нельзя не заметить тот факт, что введение мышам в брюшную полость профильтрованной суспензии экспериментального препарата не способствовало раздражению и воспалению брюшины и серозных оболочек. По истечении 10 суток, во время вскрытия мышей данной группы, в брюшной полости отсутствовали признаки воспаления.



Во второй и третьей группах наблюдалась гибель мышей. Тем не менее, суммарная продолжительность жизни мышей второй группы в 2,5 раза была выше, чем в третьей. Приведенные в таблице результаты исследований достоверно свидетельствуют о снижении клинического проявления сальмонеллёза среди белых мышей второй группы. Отмеченное снижение заболеваемости обуславливается способностью экспериментального препарата препятствовать адгезии возбудителя сальмонеллёза на эпителиальных клетках брюшной полости мышей, что в свою очередь сдерживает их дальнейшее размножение.

У павших мышей во время их вскрытия обнаруживались патологоанатомические изменения характерные для сальмонеллёза. Произведённые посева на среду Эндо и висмут-сульфат агар из селезёнки павших мышей во всех случаях подтверждали сальмонеллёз.

### Выводы

1. Серебряная, литиевая и цинковая формы сорбента, приготовленные на основе монтмориллонит содержащей глины в соответствующих концентрациях 12,5; 25-50 и 50-100 мг/мл МПА цидно действуют на эшерихий и сальмонелл. Сочетание обогащённой глины с раствором тимола в концентрации 25 мг/мл питательной среды влияет бактерицидно по отношению к кишечной палочке и стафилококкам. Калиевая, натриевая и магниевая формы сорбента, а также активированный уголь, неосмектин и смекта при концентрации 100 и более мг/мл МПА не подавляют рост и развитие эшерихий сальмонелл и стафилококков.

2. Установлено, что разработанная литиевая форма монтмориллонитовой глины не вызывает воспаления и раздражения брюшины и серозных оболочек у белых мышей. В высокодисперсном состоянии сорбент легко адсорбируется на поверхности фимбрий и клеточной стенке сальмонелл, образуя конгломерат – «сорбент-микроорганизм», препятствующий её адгезии на эпителиальных клетках брюшины мышей, что в свою очередь сдерживает их дальнейшее размножение.

3. Создание препаратов антиадгезивного действия является одним из наиболее перспективных направлений при разработке эффективных методов лечения и профилактики инфекционных заболеваний. Антиадгезивное действие не синонимично понятию бактерицидность и нарушать адгезию микроорганизмов могут соединения, не обладающие антибактериальным действием в низких концентрациях. Примером таких веществ могут служить глины на основе монтмориллонита

4. Разработанные формы сорбента могут быть использованы при профилактике расстройств функции пищеварения и лечении животных, страдающих гастроэнтеритами инфекционной этиологии, это позволит снизить всасывание бактериальных токсинов, а также продуктов гнилостного распада содержимого кишечника, что в значительной мере ускорит процесс выздоровления больных животных, а также снизит их заболеваемость. Внедрение в практику перспективных монтмориллонитсодержащих сорбентов решит проблему производства экологически безопасной и биологически полноценной продукции животноводства в условиях техногенного загрязнения агроэкосистем.

### Список литературы

1. Любарский М.С., Летягин А.Ю., Габитов В.Х. Сочетанная лимфотропная и сорбционная терапия гнойных ран. - Бишкек - Новосибирск: «Илим», 1995. - 134 с
2. Семченко Л.Ю., Полуэктов В.Л., Степанов С.С. и др. Обоснование местного применения сорбционно-детоксикационной терапии при послеоперационных гнойно-септических осложнениях у больных колоректальным раком // Бюллетень СО РАМН. – 2002. - № 2. - С. 101 – 104.
3. Буханов В.Д., Скворцов В.Н., Везенцев А.И., Козубова Л.А., Королькова С.В., Воловичева Н.А. Химический состав и сорбционные свойства препаратов «Экос» и «Экос-О» Актуальные проблемы болезней обмена веществ у сельскохозяйственных животных в современных условиях // Материалы международной научно-практической конференции посвящённой 40-летию ГНУ ВНИВИПФиТ / Воронеж, 2010. – С. 64-68.

4. Везенцев А.И., Королькова С.В., Буханов В.Д. Текстурные характеристики и сорбционные свойства природной и магний-замещённой монтмориллонитсодержащей глины // Научные ведомости БелГУ. Серия естественные науки. – № 9 (80), 2010. – Выпуск 11. – С. 119-123.

5. Гроссер А.В., Матело С.К., Купец Т.В. Антиадгезивное действие средств гигиены как способ профилактики стоматологических заболеваний. (Электронный вариант <http://www.gradusnik.ru/rus/doctor/stomat/stomgig/>)

## **ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF SORBENTS CONTAINING MONTMORILLONIT**

**V.D. Bukhanov, A.I. Vezentsev**  
**N.F. Ponomareva, L.A. Kozubova**  
**S.V. Korolkova, N.A. Volovicheva**  
**V.A. Peristy**

*Belgorod State National Research  
University,  
Pobedy St. 85, Belgorod, 308015, Russia  
E-mail: ncpvbl@gmail.com*

The results of experimental studies determining the antibacterial activity of various forms of sorbents containing montmorillonite obtained by the authors of the article are presented. Using the mechanism of their anti-adhesive action is one of the most promising directions in the development of effective treatments and prevention of infectious diseases.

Key words: nativeenriched with montmorillonite clay, unified forms of nanostructured unified forms of sorbent, complex preparations, bacterial infections.