



УДК 619:615.33:591.1

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА СЕРЕБРЯНОЙ ФОРМЫ МОНТМОРИЛЛОНИТ СОДЕРЖАЩЕЙ ГЛИНЫ

В.Д. Буханов¹,
А.И. Везенцев¹,
П.В. Соколовский¹,
Т.А. Савицкая²

¹ Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

E-mail: vesentsev@bsu.edu.ru

² Белорусский государственный университет, Белоруссия, 220006, г. Минск, ул. Ленинградская, 14

E-mail: savitskayaTA@bsu.by

В статье приведены результаты исследований антибактериальных свойств монтмориллонит содержащих глин, модифицированных азотнокислым серебром. Установлено, что модифицированные формы сорбента обладают выраженным бактериостатическим действием, подавляют рост и образование колоний *Salmonella dublin*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus hyicus* на поверхности МПА и *Proteus vulgaris* на кровяном агаре. Полученная модифицированная монтмориллонит содержащая глина с содержанием серебра (от 0.1 до 4.35 масс. %) обладает эффективными антимикробными свойствами, является менее затратным способом по использованию реактивов, оборудования и продолжительности процесса.

Ключевые слова: монтмориллонит содержащая глина, антибактериальные свойства, гнойные раны.

Введение

Существуют лекарственные средства, изготовленные на основе серебра (колларгол, протаргол, ляпис и др.) – они применяются в медицине не одну сотню лет, тем не менее, до настоящего времени, препараты серебра и его соединений не получили достаточно широкого распространения ни в медицине, ни в ветеринарии. Отчасти это связано с существующим предубеждением, что препараты серебра, рекомендуемые для специфической этиотропной терапии, достаточно дорогостоящие. В действительности это не так, поскольку цена одной лечебной или профилактической дозы серебросодержащего препарата не превышает или даже меньше стоимости аналогичной дозы современных антибиотиков.

В то же время широкое использование антибиотиков при лечении ран различной этиологии, профилактике раневой инфекции и гнойно-септических осложнений привело к появлению и распространению устойчивых штаммов микроорганизмов. Кроме того, антибиотики отрицательно влияют на микробиоценоз и макроорганизм, приводят к развитию иммунодефицитов, не обладают противовирусной активностью и снижают качество животноводческой продукции. В связи с этим у специалистов возрос интерес к препаратам широкого спектра антимикробного действия, являющихся альтернативой антибиотикам.

Помимо приведенных аргументов решающим является механизм комплексного бактерицидного, вирулицидного, фунгицидного и противовоспалительного действия ионов серебра. При этом терапевтическая эффективность на рубль затрат возрастает в пользу серебросодержащих препаратов [1, 2].

Поэтому на фоне переоценки места антибиотиков возродился интерес к антисептикам. Последние представляют химические вещества (независимо от источника получения и состава), обладающие противомикробным действием и используемые для нанесения на поврежденную и неповрежденную кожу, слизистые оболочки, полости и раны в целях лечения и предупреждения развития местных инфекционных поражений и сепсиса.

Целью нашего исследования явилось изучение антибактериальных свойств серебряной формы монтмориллонит содержащей глины.

Задачами исследования являлись:

- разработка материальноберегающего способа получения композиционной серебряной формы монтмориллонит содержащей глины;
- изучение антимикробной активности серебряной формы монтмориллонит содержащей глины к широкому спектру микроорганизмов.

Материал и методы исследований

Для достижения поставленной цели группой ученых под руководством профессора А.И. Везенцева на базе ФГАОУ ВПО «Белгородского государственного национального исследовательского университета» (НИУ «БелГУ») было произведено обогащение монтмориллонит



содержащей глины нитратом серебра. Исследование антибактериальных свойств монтмориллонит содержащей глины модифицированной нитратом серебра проводилось в Белгородском филиале ВИЭВ.

Известен способ получения антимикробного препарата [3], согласно которому 1% масс. суспензию из наносиликатных пластин обрабатывают раствором нитрата серебра (AgNO_3) (1% по масс.) при соотношении Ag^+ : глина равном 7:93. Добавляют 6~8 мл метанола. Химическое взаимодействие проводят с помощью ультразвукового перемешивания на водяной бане при 70~80°C. Недостатком данного способа является предварительное получение наносиликатных пластин из слоистых глинистых минералов, что значительно влияет на продолжительность процесса. Также используют метанол, который является ядовитым веществом. Содержание серебра в образцах, определенное масс-спектрометрическим методом (ICP-MS), соответствует примерно 120 до 190 частей на миллиард.

Композиционные препараты, отличающиеся неодинаковым содержанием серебра, получали на основе недефицитной глины, включающей в себя неорганический минерал – монтмориллонит. Данный минерал в различных глинах содержится в натрий-кальциевой, кальциевой или железистой форме. Минералогический состав такого рода глин: монтмориллонит, кварц, иллит, каолинит, мусковит, кальцит и полевые шпаты, где основным сорбционным материалом является монтмориллонит. Исходную обогащенную глину, содержащую 65–70 масс. % монтмориллонита, обрабатывали несколькими способами с разной концентрацией растворов нитрата серебра и неодинаковым температурным режимом: 1) 0.16–9.9 масс. %, перемешивали при температуре от 10°C до температуры кипения; 2) 3.2 масс. %, перемешивали при температуре кипения смеси; 3) 0.16 масс. %, перемешивали при температуре 10–30°C; 4) 0.16 масс. %, перемешивали при температуре кипения смеси; 5) 9.9 масс. %, перемешивали при температуре 10–30°C. Во всех вариантах соотношение глины и раствора нитрата серебра было 1:5, а продолжительность обработки при постоянном перемешивании – 3–7 часов. Далее, с целью удаления избытка нитрата серебра, модифицированный продукт промывали дистиллированной водой ($\text{pH} \approx 5-6$). Затем отстаивали при комнатной температуре с ограничением доступа прямых солнечных лучей, декантировали и высушивали при температуре 20–160°C, в результате чего получали мягкий, легко измельчаемый глинистый материал от светло- до темно-коричневого оттенка [4]. Образцы получены аспирантом Пономаревой Надеждой Федоровной.

Химический состав обогащенной глины и модифицированных композиционных образцов определяли методом рентгенофлуоресцентного анализа на рентгеновском спектрометре ARL OPTIM'X. В изготовленных селективных серебряных формах сорбционных препаратов содержание серебра определяли методом количественного и титрометрического анализа.

Вышеуказанные исследования проводили на кафедре общей химии Белгородского государственного национального исследовательского университета (БелГУ), а выяснение антибактериальных свойств изготовленных композиций осуществляли на базе Белгородского филиала Всероссийского института экспериментальной ветеринарии.

Определение чувствительности грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также дрожжеподобных грибов к монтмориллонит содержащим глинам, модифицированных ионами серебра, проводили в стерильных условиях на плотных питательных средах с pH 7.2–7.4. Культивирование *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella dublin*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus aureus* осуществляли на мясопептонном агаре (МПА), а *Proteus vulgaris* и *Candida albicans* – на кровяном агаре. В питательную среду, охлажденную до 45–48°C, вносили взвесь исследуемого микроорганизма из расчёта $1 \cdot 10^7$ КОЕ (Колониеобразующих единиц) на 1 мл МПА или кровяного агара и быстро разливали по чашкам Петри, в которые предварительно были помещены стерильные навески исследуемого композиционного препарата. После тщательного перемешивания диапазон концентрации изучаемого образца в 1 мл питательной среды колебался от 1.56 до 100 мг.

Испытания проводились в стерильных условиях с использованием стерильного оборудования и материалов. Для испытаний были использованы: чашки Петри (ЧП), содержащие стерильный мясопептонный агар (МПА) или кровяной агар с pH 7.2–7.4. Толщина слоя охлажденного МПА (или кровяного агара) – 2.5–3.0 мм.

В питательные среды, охлажденные до 45–48°C, вносили навески стерильного сорбента в диапазоне от 1.56 до 100 мг на 1 мл питательной среды и взвесь исследуемых штаммов микроорганизмов. В контрольные чашки с питательной средой вносили только взвесь исследуемых микроорганизмов.

Учет результатов определения чувствительности микроорганизмов к глинистым образцам в зависимости от их концентрации в МПА и кровяном агаре проводили после их культивирования в термостате при температуре 37°C в течение 16–18 часов.



Результаты исследований

В результате проведенных исследований установлено содержание серебра (масс. %) в пробах 1-5, соответственно: 3.36; 3.61; 0.10; 0.20; 4.35.

При определении чувствительности микроорганизмов к глинистым формам сорбента, полученных по примерам 1–5, была установлена их минимальная бактериостатическая концентрация (табл. 1).

Таблица 1

Чувствительность микроорганизмов к активированным азотнокислым серебром формам сорбента, созданных на основе монтмориллонитовой глины

Микроорганизм	Концентрация сорбента, мг/мл	Количество КОЕ/ мл по McFarland					контроль
		пример 1	пример 2	пример 3	пример 4	пример 5	
<i>Salmonella dublin</i>	12.50	*	*			*	12×10 ⁸
	6.25	*	*	3×10 ⁸	2×10 ⁸	*	
	3.125	2×10 ⁸	1×10 ⁸	9×10 ⁸	8×10 ⁸	*	
	1.56	9×10 ⁸	6×10 ⁸	12×10 ⁸	15×10 ⁸	3×10 ⁸	
<i>Salmonella enteritidis</i>	12.50	*	*			*	22×10 ⁸
	6.25	*	*	2×10 ⁸	1×10 ⁸	*	
	3.125	2×10 ⁸	6×10 ⁸	18×10 ⁸	20×10 ⁸	*	
	1.56	18×10 ⁸	15×10 ⁸	22×10 ⁸	24×10 ⁸	2×10 ⁸	
<i>Staphylococcus hyicus</i>	25.00	*	*			*	36×10 ⁸
	12.50	*	*	3×10 ⁸	1×10 ⁸	*	
	6.25	*	*	9×10 ⁸	8×10 ⁸	*	
	3.125	6×10 ⁸	9×10 ⁸	33×10 ⁸	30×10 ⁸	*	
	1.56	15×10 ⁸	18×10 ⁸	39×10 ⁸	39×10 ⁸	2×10 ⁸	
<i>Proteus vulgaris</i>	12.50	*	*			*	36×10 ⁸
	6.25	*	*	6×10 ⁸	3×10 ⁸	*	
	3.125	2×10 ⁸	3×10 ⁸	30×10 ⁸	30×10 ⁸	*	
	1.56	18×10 ⁸	21×10 ⁸	36×10 ⁸	36×10 ⁸	3×10 ⁸	
<i>Staphylococcus aureus</i>	25.00	*	*			*	36×10 ⁸
	12.50	*	*	6×10 ⁸	2×10 ⁸	*	
	6.25	2×10 ⁸	1.5×10 ⁸	33×10 ⁸	30×10 ⁸	*	
	3.125	21×10 ⁸	15×10 ⁸	39×10 ⁸	36×10 ⁸	1.5×10 ⁸	
<i>Escherichia coli</i>	25.00	*	*			*	39×10 ⁸
	12.50	*	*	3×10 ⁸	1×10 ⁸	*	
	6.25	2×10 ⁸	1.5×10 ⁸	36×10 ⁸	30×10 ⁸	*	
	3.125	18×10 ⁸	9×10 ⁸	45×10 ⁸	39×10 ⁸	6×10 ⁸	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25.00	*	*			*	39×10 ⁸
	12.50	*	*	8×10 ⁸	6×10 ⁸	*	
	6.25	3×10 ⁸	6×10 ⁸	30×10 ⁸	21×10 ⁸	*	
	3.125	18×10 ⁸	15×10 ⁸	33×10 ⁸	33×10 ⁸	3×10 ⁸	
<i>Staphylococcus intermedius</i>	25.00	*	*			*	30×10 ⁸
	12.50	*	*	2×10 ⁸	1.5×10 ⁸	*	
	6.25	2×10 ⁸	3×10 ⁸	21×10 ⁸	18×10 ⁸	*	
	3.125	24×10 ⁸	18×10 ⁸	33×10 ⁸	30×10 ⁸	3×10 ⁸	
<i>Candida albicans</i>	25.00	*	*			*	39×10 ⁸
	12.50	*	*	6×10 ⁸	3×10 ⁸	*	
	6.25	8×10 ⁸	9×10 ⁸	33×10 ⁸	30×10 ⁸	*	
	3.125	15×10 ⁸	15×10 ⁸	45×10 ⁸	39×10 ⁸	6×10 ⁸	

Примечание: * – минимальная бактериостатическая концентрация.

Из приведенной таблицы установлено, что модифицированные формы сорбента, полученные по примерам 1, 2 и 5 обладали более выраженным бактериостатическим действием, чем формы сорбента, которые были получены по примерам 3 и 4. Рассматриваемая таблица хорошо иллюстрирует неодинаковое проявление чувствительности исследуемых микроорганизмов к различным формам сорбента, полученным по примерам 1–5, так как в данных формах соответственно содержится 3.36; 3.61; 0.10; 0.20 и 4.35 масс. % серебра.

Исследуемые формы сорбента, полученные по примерам 1 и 2, подавляли рост и образование колоний *Salmonella dublin*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus hyicus* на поверхности МПА и *Proteus vulgaris* на кровяном агаре при концентрации 6.25 мг сорбента на 1 мл питательной среды.



Более эффективное бактериостатическое действие на эти же бактерии оказывала форма сорбента, полученная по примеру 5, при концентрации 3.125 мг/мл питательной среды.

В то же время минимальная бактериостатическая концентрация изучаемых форм сорбента, полученных по примерам 1 и 2, для *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* на поверхности МПА и *Candida albicans* на кровяном агаре составила 12.50 мг сорбента на 1 мл питательной среды. Форма сорбента, полученная по примеру 5, угнетала рост данных микроорганизмов при концентрации 6.25 мг/мл питательной среды.

С целью определения бактерицидной концентрации глинистых образцов, полученных по примерам 1–5, со смывов из чашек, где отсутствовал рост исследуемых микроорганизмов, производили посеvy на плотные питательные среды (МПА и кровяной агар), которые не содержали изучаемого сорбента. После культивирования этих посевов в термостате при температуре 37°C, в течение 16–18 часов, отсутствовал рост микроорганизмов со смывов МПА и кровяного агара, в которых минимальная бактериостатическая концентрация серебряной формы монтмориллонит содержащей глины составляла 3.125; 6.25 и 12.50 мг/мл питательной среды.

Такое же бактериостатическое действие модифицированные ионами серебра формы сорбента, полученные по примерам 3 и 4, проявили по отношению к *Salmonella dublin*, *Salmonella enteritidis* и *Proteus vulgaris*, но при концентрации 12.50 мг/мл. На *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius* и *Candida albicans* данные формы сорбента влияли бактериостатически в концентрации 25.00 мг/мл.

Нативная форма монтмориллонитовой глины при концентрации 100 мг/мл МПА и кровяного агара не подавляла рост исследуемых микроорганизмов, а наоборот усиливала. При этом количество колониеобразующих единиц в смывах с поверхности плотной питательной среды опытных чашек Петри было в 1.1–1.9 раза больше, чем в контрольных, то есть не содержащих нативной формы глины.

Таким образом, при реализации изобретения, путем модифицирования монтмориллонит содержащей глины серебром, отмечается проявление её антибактериальных свойств. Полученная модифицированная монтмориллонит содержащая глина с содержанием серебра (от 0.1 до 4.35 масс. %) обладает эффективными антимикробными свойствами, является менее затратным способом по использованию реактивов, оборудования и продолжительности процесса.

Наиболее близким по существу является изобретение, заключающийся в модифицировании неорганического минерала – монтмориллонита неорганическими солями металла в полярном растворителе, и последующей выдержке бентонита в растворе соли, в удалении продуктов модифицирования бентонита из раствора с последующей сушкой при температуре не выше 100°C, при этом согласно изобретению перед модифицированием бентонит обогащают ионами Na⁺ путем обработки его 3–10 масс. % водным раствором хлористого натрия с последующей промывкой и фильтрованием полученного полуфабриката, который затем модифицируют 10–20 масс. % раствором неорганических солей металла, в качестве которых используют нитрат серебра или сульфат меди, производят выдержку модифицируемого бентонита в указанных солевых растворах в течение 12–24 час, а затем очистку промодифицированного бентонита от солей натрия путем его промывки и фильтрации. После сушки полученный препарат измельчают до дисперсности частиц 20–150 нм, при этом обработку неорганического минерала названными растворами производят при соотношении, масс. ч. – бентонит : раствор как 1:(10–40) [5]. Изобретение [4] позволяет снизить продолжительность химической обработки и количество используемого нитрата серебра, значительно повысить антибактериальные свойства глины по отношению к бактериям *Escherichia coli*, *Salmonella dublin*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus aureus*, а так же дрожжеподобным грибкам – *Candida albicans*.

Работа выполнена в соответствии с государственным заданием № 4.3392.2011 «Разработка инновационных ветеринарных препаратов на основе наноструктурных сорбционно- и биологически активных монтмориллонит содержащих глин для лечения и профилактики желудочно-кишечных заболеваний сельскохозяйственных животных», 2012–2014 гг.

Список литературы

1. Кульский Л.А. Серебряная вода. – Киев: Наукова думка, 1982. – с. 136.
2. Лекарственные препараты серебра на органических и неорганических носителях / П.П. Родионов, Г.В. Одегова, В.А. Бурмистров и др. // Научно-практическая конференция с международным участием «Серебро и висмут в медицине», Новосибирск, Сибирский университет потребительской кооперации, 25–26 февраля 2005 г. – Новосибирск, 2005. – С. 87–104.
3. Абрамян А.А., Беклемышев В.И., Махонин И.И., Махонин П.И., Солодовников В.А. Способ получения антимикробного препарата. Описание изобретения к патенту RU 2330673 от 22.11.2006.



4. Byung Kyu Cho, Bum Gyu Choi, Jae Ho Jung, Dae Ho Kang, Min Kyoun Kim, Min Jin Ko, Myung Sun Moon. Composition durable. Описание изобретения к патенту USA 2012093907 от 6.01.2012 г.
5. Серебро в медицине / Е.М. Благитко, В.А. Бурмистров, А.П. Колесников и др. – Новосибирск: Наука-Центр, 2004 г. – 254 с.
6. Сорбционно-аппликационные и лимфотропные методы в комплексном лечении ожогов / Ю.И. Бородин, М.С. Любарский, А.Ю. Летягин и др. – Новосибирск: СибВО, 1995. – 142 с.
7. Специфические сорбенты для профилактики и лечения различных заболеваний / В.А. Бурмистров, Л.Н. Рачковская, М.С. Любарский и др. // Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины: материалы конференции, 11–12 октября 2007 г., Новосибирск. Ч. 2. – Новосибирск, 2007. – С. 23–36.
8. Preparation and characterization of antibacterial viscose-based activated carbon fiber supporting silver / Y.L. Wang, Y.Z. Wan, X.H. Dong et al. // Carbon. – 1998. – №2. Vol. 36. – Pp. 1567–1571.
9. Ямомото Тацуо, Угита Синси, Кукухара Ясуо, Накаямо Итиро. Получение дисперсии, содержащей бактерицид // Заявка на изобретение № 1-172301. Япония МКИ 4 Заявл. 26.12.87; опубл. 07.07.89.
10. Nanke Bernhard. Антимикробный продукт, предохраняющий тело. Пат. № 1-066825 Германия, МКИ А 01 К 7/48; заявл. 17.06.99; опубл. 20.01.01
11. Kerpet Bryan E., Mintz Eric A. Композиции, содержащие биоцидные соединения или адсорбент и/или катализатор и способы их получения. Пат. № 6-383273 США. Заявл. 1999.08.12; опубл. 2002.05.07.

ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF SILVER FORM OF MONTMORILLONIT CONTAINING CLAY

V.D. Buharov¹,
A.I. Vezentsev¹,
P.V. Sokolovskiy¹,
T.A. Savitskaya²

¹Belgorod State National Research University, 85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

E-mail: vesentsev@bsu.edu.ru

²Belarusian State University, 14 Leningrad St., Minsk, 220006, Belarus

E-mail: savitskayaTA@bsu.by

The results of studies of antibacterial properties of clays containing montmorillonite modified with silver nitrate are given in the paper. It was found that modified forms of sorbent have a pronounced bacteriostatic effect, inhibit the growth and colony formation of *Salmonella dublin*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus hyicus* on the surface of the IPA and *Proteus vulgaris* on blood agar. The resulting clay containing montmorillonite modified with a silver content (from 0.1 to 4.35 wt. %) has effective antimicrobial properties, is less costly method for the use of reagents, equipment and process duration.

Key words: montmorillonite containing clay, antibacterial properties, suppurating wounds.