

УДК 619:615.012:615.326:553.611.6

**ПОЛУЧЕНИЕ МАТЕРИАЛА С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ
НА ОСНОВЕ МОНТМОРИЛЛОНИТ СОДЕРЖАЩИХ ГЛИН****Буханов В.Д.***Белгородский государственный национальный исследовательский университет***Зуев Н.П.***Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I***Тучков Н.С.***Белгородский государственный аграрный университет имени В.Я. Горина*

В статье рассмотрен способ получения материала с антибактериальными свойствами на основе монтмориллонитсодержащих глин. Неорганическую глину, представленную натрий-кальциевой, и/или кальциевой, и/или железистой формой монтмориллонита, модифицировали водным раствором нитрата серебра с концентрацией 0,16-9,9 масс.% в массовом соотношении глина: водный раствор нитрата серебра 1:5. Модифицирование проводили при перемешивании в течение от 3 до 7 часов при температуре в интервале от 10°C до температуры кипения. Полученный материал промывали дистиллированной водой до pH≈6-5, до удаления избытка нитрата серебра. Отстаивали при комнатной температуре и декантировали. Высушивали материал при температуре 20-160°C.

Ключевые слова: монтмориллонит, глина, антибактериальные свойства, нитрат серебра.

**OBTAINING A MATERIAL WITH ANTIBACTERIAL PROPERTIES BASED
ON MONTMORILLONITE CONTAINING CLAYS****Bukhanov V.D.***Belgorod State National Research University***Zuev N.P.***Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter I***Tuchkov N.S.***Belgorod State Agrarian University named after V.Ya. Gorin*

The article describes a method for obtaining a material with antibacterial properties based on montmorillonite-containing clays. Inorganic clay, represented by sodium-calcium, and/or calcium, and/or ferruginous form of montmorillonite, was modified with an aqueous solution of silver nitrate with a concentration of 0.16-9.9 wt.% in the mass ratio clay: aqueous solution of silver nitrate 1:5. Modification was carried out with stirring for 3 to 7 hours at a temperature in the range from 10 ° C to boiling point. The resulting material was washed with distilled water to a pH of 6-5, until excess silver nitrate was removed. They were maintained at room temperature and decanted. The material was dried at a temperature of 20-160 °C.

Key words: montmorillonite, clay, antibacterial properties, silver nitrate.

Известно много способов получения антибактериальных материалов. Например, способ, в котором предлагается на первом этапе бентонит Na-формы активировать раствором хлористого натрия с последующим удалением анионов хлора при промывке и фильтровании, на втором этапе полученный полуфабрикат интеркалируют ионами металлов бактерицидного действия, например Ag^+ , путем обработки в водных растворах неорганических солей этих металлов [2]. Удаляют соли натрия при промывке продукта деионизованной водой, фильтруют, сушат и измельчают до дисперсности частиц 20-150 нм, где согласно методу процессы активации и интеркаляции бентонита осуществляют при использовании ультразвука с частотой 20-50 кГц и интенсивностью 10-100 Вт/см², а процесс очистки интеркалированного продукта от солей натрия производят в два этапа, на первом - продукт декантируют, а на втором этапе промывают в деионизованной воде, содержащей 30 ppm - 100 ppm комплексообразователя ионов щелочных металлов на основе краун-эфиров с молекулярной массой не более 264. При этом полученный материал содержит 2,35 и 2,95 масс.% серебра.

Также известен способ получения антимикробного препарата, согласно которому 1% масс. суспензию из наносиликатных пластин обрабатывают раствором нитрата серебра (AgNO_3) (1% 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 [5]. 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 от 120 до 190 частей на миллиард.

Но наиболее близким является способ, 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 методу 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) [3].

Недостатком прототипа, как и вышеуказанных аналогов, является то, что в них используется только Na-форма монтмориллонита, что ограничивает сырьевую базу, т.к. чаще встречаются монтмориллонитовые глины, представленные натрий-кальциевой, и/или кальциевой, и/или железистой формой монтмориллонита. Также к недостаткам прототипа можно отнести длительность процесса и использование при модификации высоких концентраций нитрата серебра.

Объекты и методы исследования

Задачей являлось создание материала с антибактериальными свойствами на основе недефицитных монтмориллонит содержащих глин, который может эффективно подавлять рост патогенных микроорганизмов.

Техническим результатом метода являлось получение эффективного антибактериального материала на основе недефицитных натрий-кальциевых, и/или кальциевых, и/или железистых монтмориллонитов за счет менее затратного по используемым ингредиентам и продолжительности технологического процесса модифицирования ионами серебра с использованием растворов AgNO_3 более низких концентраций [6].

Материал, заключающийся в модифицировании глины, включающей неорганический минерал - монтмориллонит, раствором нитрата серебра, промывке и последующей сушке, включает следующие новые признаки:

- глина, включающая неорганический минерал - монтмориллонит, представлена натрий-кальциевой, и/или кальциевой, и/или железистой формой монтмориллонита;
- массовое соотношение глина: модифицирующий агент составляет 1:5;

- процесс модифицирования глины водным раствором нитрата серебра AgNO_3 с концентрацией 0,16-9,9 масс.% проводят при температуре в интервале от 10°C до температуры кипения, продолжительность обработки от 3 до 7 часов;

- полученный модифицированный материал промывают дистиллированной водой до тех пор, пока не будет удален избыток нитрата серебра до $\text{pH}\approx 5-6$;

- отстаивают при комнатной температуре и декантируют;

- материал высушивают при температуре $20-160^\circ\text{C}$, в результате чего получают мягкий, легко измельчаемый глинистый материал от светло-коричневого до темно-коричневого цвета.

Способ реализуют следующим образом.

Минералогический состав исходной недефицитной натрий-кальциевой, и/или кальциевой, и/или железистой глины: монтмориллонит, иллит, каолинит, кварц, мусковит, кальцит, полевые шпаты, где основным сорбционным материалом является монтмориллонит.

Исходную глину заливают модифицирующим раствором нитрата серебра с концентрацией 0,16-9,9 масс.% в соотношении глина:модифицирующий агент, равном 1:5. Перемешивают в течение от 3 до 7 часов при температуре от 10°C до температуры кипения. По завершении процесса полученный продукт промывают до $\text{pH}\approx 5-6$ для удаления избытка нитрата серебра и высушивают при температуре $20-160^\circ\text{C}$. Сушка при температуре менее 20°C происходит в значительном интервале времени и требует использования охлаждающего оборудования, что экономически нецелесообразно. Материалы, высушенные при температуре более 160°C , имеют более низкое антибактериальное действие [4].

Проведенные исследования.

Исследование 1. Исходную глину заливали модифицирующим раствором нитрата серебра с концентрацией 3,2 масс.% в соотношении глина:модифицирующий агент, равном 1:5. Перемешивали в течение 3 часов при температуре $20-30^\circ\text{C}$. По завершении процесса полученный материал промывали для удаления избытка нитрата серебра до $\text{pH}\approx 5-6$, высушивали при температуре $20-40^\circ\text{C}$.

Исследование 2. Исходную глину заливали модифицирующим раствором нитрата серебра с концентрацией 3,2 масс.% в соотношении глина: модифицирующий агент, равном 1:5. Перемешивали в течение 3 часов при температуре кипения смеси. По завершении процесса полученный материал промывали для удаления избытка нитрата серебра до $\text{pH}\approx 5-6$, высушивали при температуре $80-105^\circ\text{C}$.

Исследование 3. Исходную глину заливали модифицирующим раствором нитрата серебра с концентрацией 0,16 масс.% в соотношении глина: модифицирующий агент, равном 1:5. Перемешивали в течение 7 часов при температуре $20-30^\circ\text{C}$. По завершении процесса полученный материал промывали для удаления избытка нитрата серебра до $\text{pH}=5-6$, высушивали при температуре $100-160^\circ\text{C}$.

Исследование 4. Исходную глину заливали модифицирующим раствором нитрата серебра с концентрацией 0,16 масс.% в соотношении глина:модифицирующий агент, равном 1:5. Перемешивали в течение 7 часов при температуре кипения смеси. По завершении процесса полученный материал промывали для удаления избытка нитрата серебра до $\text{pH}\approx 5-6$, высушивали при температуре $100-160^\circ\text{C}$.

Исследование 5. Исходную глину заливали модифицирующим раствором нитрата серебра с концентрацией 9,9 масс.% в соотношении глина:модифицирующий агент, равном 1:5. Перемешивали в течение 3 часов при температуре 10-15°C. По завершении процесса полученный материал промывали для удаления избытка нитрата серебра до $pH \approx 5-6$, высушивали при температуре 100-160°C.

В образцах материалов по исследованиям 1-5 определяли содержание серебра. Для исследований использовался метод количественного анализа, основанный на измерении объема или массы реагента, требующегося для реакции с исследуемым веществом, - титрометрический анализ.

Результаты и их обсуждение

Титрометрический анализ по определению количества серебра в материалах, полученных по примерам 1-5, осуществляли с использованием индикаторов, фиксирующих точку эквивалентности титрования. При проведении титрометрического анализа по определению в исследуемых образцах содержания серебра (масс.%) использовали в качестве реагентов концентрированную азотную кислоту, в качестве раствора титранта - роданид аммония или калия, в качестве индикатора - раствор железозаммонийных квасцов. В результате проведенных исследований установлено, что исследуемый образец по примеру 1 содержит 3,36 масс.% серебра, исследуемый образец по примеру 2 содержит 3,61 масс.% серебра, исследуемые образцы по примеру 3 и 4 содержат серебро в количестве 0,10 и 0,20 масс.% соответственно, исследуемый образец по примеру 5 содержит 4,35 масс.% серебра. Кроме того, химический состав обогащенного и модифицированных образцов материалов по примерам 1-5 определяли методом рентгенофлуоресцентного анализа на рентгеновском спектрометре ARL OPTIM'X (таблица 1).

Таблица 1

Средний химический состав образцов материалов в пересчете на оксиды, масс.%

Образец материала	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	TiO ₂	MgO	CaO	K ₂ O	Na ₂ O	Ag ₂ O	Σ
Обогащенная глина	60,12	19,36	5,27	0,94	3,04	8,87	2,40	0,38	-	100,38
Исследование 1	59,37	13,40	4,37	0,89	2,05	8,28	4,05	0,26	6,99	99,60
Исследование 2	59,69	16,79	4,06	0,92	2,34	6,18	2,16		7,51	99,65
Исследование 3	59,87	18,90	4,38	0,85	3,03	8,70	3,76		0,21	99,09
Исследование 4	60,31	18,60	5,90	0,82	3,22	8,12	2,30		0,42	99,69
Исследование 5	58,78	13,05	4,26	0,83	2,30	7,78	3,33		8,67	100,00

Испытания эффективности бактерицидных свойств материала на основе монтмориллонитсодержащей глины модифицированной ионами серебра проводились в стерильных условиях с использованием стерильного оборудования и материалов. Для испытаний были использованы стерильные чашки Петри, 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 материала 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. Культивирование *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella dublin*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedium*, *Staphylococcus aureus* осуществляли на МПА, а *Proteus vulgaris* и *Candida albicans* - на кровяном агаре [1]. Определение чувствительности микроорганизмов к материалам, полученным по примерам 1-5, 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. Полученные результаты, приведенные в таблице 2, позволили установить их минимальную бактериостатическую концентрацию. Данные об эффективности бактерицидных свойств материала на основе монтмориллонит содержащей глины модифицированной ионами серебра, полученного по примерам 1-5, представлены в таблице 2.

Таблица 2

Чувствительность микроорганизмов к полученным материалам по примерам 1-5

Микроорганизмы	Концентрация материала, мг/мл	Количество КОЕ/мл по McFarland					
		пример 1	пример 2	пример 3	пример 4	пример 5	контроль **
<i>Salmonella Dublin</i>	12,50			*	*		
	6,25	*	*	3·10 ⁸	2·10 ⁸		12·10 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			*	*		
	6,25	*	*	2·10 ⁸	1·10 ⁸		22·10 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			*	*		
	12,50			3·10 ⁸	1·10 ⁸		
	6,25	*	*	9·10 ⁸	8·10 ⁸		36·10 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			*	*		
	6,25	*	*	6·10 ⁸	3·10 ⁸		36·10 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			*	*		
	12,50	*	*	6·10 ⁸	2·10 ⁸		36·10 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			*	*		
	12,50	*	*	3·10 ⁸	1·10 ⁸		39·10 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			*	*		
	12,50	*	*	8·10 ⁸	6·10 ⁸		39·10 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 intermedium</i>	25,00			*	*		
	12,50	*	*	2·10 ⁸	1,5·10 ⁸		30·10 ⁸

	6,25	$2 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$	$21 \cdot 10^8$	$18 \cdot 10^8$	*	
	3,125	$24 \cdot 10^8$	$18 \cdot 10^8$	$33 \cdot 10^8$	$30 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$	
<i>Candida albicans</i>	25,00			*	*		$39 \cdot 10^8$
	12,50	*	*	$6 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$		
	6,25	$8 \cdot 10^8$	$9 \cdot 10^8$	$33 \cdot 10^8$	$30 \cdot 10^8$	*	
	3,125	$15 \cdot 10^8$	$15 \cdot 10^8$	$45 \cdot 10^8$	$39 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^8$	

Примечание: * Минимальная бактериостатическая концентрация; ** При проведении контрольных экспериментов использовали стерильный мясопептонный или кровяной агар без введения глины.

Из данных, приведенных в таблице 2, видно, что полученные материалы по примерам 1, 2 и 5 обладали более выраженным бактериостатическим действием, чем образцы материала, которые были получены по примерам 3 и 4. Рассматриваемая таблица иллюстрирует и объясняет неодинаковое проявление чувствительности исследуемых микроорганизмов к различным антибактериальным материалам, полученных 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 антибактериальные материалы, 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 уже при концентрации 6,25 мг на 1 мл питательной среды. Более эффективное бактериостатическое действие на эти же бактерии оказывал материал, полученный по примеру 5, при концентрации 3,125 мг/мл питательной среды. В то же время минимальная бактериостатическая концентрация изучаемых антибактериальных материалов, 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 материала на 1 мл питательной среды. Антибактериальный материал, полученный по примеру 5, угнетал рост данных микроорганизмов при концентрации 6,25 мг/мл питательной среды. С целью определения бактерицидной концентрации антибактериальных материалов, полученных по примерам 1-5, со смывов из чашек, где отсутствовал рост исследуемых микроорганизмов, производили посевы на плотные питательные среды МПА и кровяного агара, которые не содержали изучаемого материала. 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 антибактериального материала составляла 3,125; 6,25 и 12,50 мг/мл питательной среды. Такое же бактериостатическое действие антибактериальные материалы, 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 материалы влияли бактериостатически в концентрации 25,00 мг/мл.

В то же время обогащенная форма нативной 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, т.е. не содержащих нативной формы глины.

Выводы

Таким образом, поставленная задача по созданию материала с антибактериальными свойствами на основе натрий-кальциевых, и/или кальциевых, и/или железистых монтмориллонитсодержащих глин, который может эффективно подавлять рост патогенных микроорганизмов с использованием при модифицировании растворов AgNO_3 более низких концентраций по сравнению с прототипом, решена.

Список литературы

1. Клинико-экспериментальное обоснование применения сорбентов геологического происхождения в животноводстве и ветеринарии / М. П. Семенко, Н. П. Зуев, Л. А. Матюшевский [и др.]. – Белгород: Белгородский государственный аграрный университет им. В.Я. Горина, 2021. – 200 с. – ISBN 978-5-906643-47-6. – DOI 10.48612/5544-dvfn-ezm5. – EDN ODJXGL.
2. Патент № 2330673 С1 Российская Федерация, МПК А61К 33/38, А61К 33/34, А61К 47/02. способ получения антимикробного препарата : № 2006141279/15 : заявл. 22.11.2006 : опубл. 10.08.2008 / А. А. Абрамян, В. И. Беклемышев, И. И. Махонин [и др.] ; заявитель Закрытое акционерное общество "Институт прикладной нанотехнологии". – EDN LJAKBW.
3. Патент № 2429857 С2 Российская Федерация, МПК А61К 33/38, А61К 33/34, А61К 47/02. способ получения биоцида : № 2009145819/15 : заявл. 11.12.2009 : опубл. 27.09.2011 / В. И. Беклемышев, И. И. Махонин, У. О. Д. Мауджери [и др.] ; заявитель Закрытое акционерное общество "Институт прикладной нанотехнологии", Фонд Сальваторе Мауджери Клиника Труда и Реабилитации, СИБ Лэбортрис Лимитед. – EDN HKLFZL.
4. Патент № 2522935 С1 Российская Федерация, МПК А61К 33/06, А61К 33/38, А61Р 31/02. Способ получения материала с антибактериальными свойствами на основе монтмориллонит содержащих глин : № 2013107334/15 : заявл. 19.02.2013 : опубл. 20.07.2014 / В. Д. Буханов, А. И. Везенцев, Н. Ф. Пономарева, В. Н. Скворцов ; заявитель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Белгородский государственный национальный исследовательский университет". – EDN ZFQBDV.
5. Профилактическая эффективность композиционного препарата на основе наноструктурных монтмориллонит содержащих глин при Колибактериозном гастроэнтерите птиц / Н. П. Зуев, С. Н. Зуев, Е. Н. Девальд [и др.] // Мичуринский агрономический вестник. – 2022. – № 1. – С. 81-85. – EDN RSXCCF.
6. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Patent Summary for US-2012093907-A1; [cited 2024 June 10]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/US-2012093907-A1>

Буханов Владимир Дмитриевич, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры медико-биологических основ физической культуры, факультета физической культуры, Белгородский государственный национальный исследовательский университет

308015, Российская Федерация, Белгородская область, город Белгород, ул. Победы, д.85
Телефон: +7 (4722) 30-12-11
E-mail: Info@bsu.edu.ru

Зуев Николай Петрович, доктор ветеринарных наук, профессор кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы, эпизоотологии и паразитологии, Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I

394087, Российская Федерация, г. Воронеж, ул. Мичурина, д.1
Телефон: 89914057424,
E-mail: zuev_1960_nikolai@mail.ru

Тучков Никита Сергеевич, студент, Белгородский государственный аграрный университет имени В.Я. Горина

308503, Российская Федерация, Белгородская обл.,
Белгородский р-н, п. Майский, ул. Вавилова, 1
Телефон: 89202071546,
E-mail: nikitaytuchkov@gmail.com