

가축에 대한 보조사료 규산염제로서 포졸란의 *in vitro* 항균 효과

김창현^{1*} · 엄경환^{2†} · 박병성³

¹한경대학교 동물생명융합학부, 교수

²강원대학교 일반대학원, 박사과정생

³강원대학교 동물생명과학대학, 교수

(2020년 8월 1일 접수: 2020년 8월 19일 수정: 2020년 8월 20일 채택)

In vitro antibacterial activities of Pozzolan as a dietary silicate minerals supplementation to animals

Kim Chang-Hyun^{1*} · Um Kyung-Hwan^{2†} · Park Byung-Sung³

¹*School of Animal Life Convergence Science, Hankyong National University, 17579, Republic of Korea*

^{2,3}*College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, 24341, Republic of Korea*

(Received August 1, 2020; Revised August 19, 2020; Accepted August 20, 2020)

요 약 : 본 연구의 목적은 포졸란의 항생제 내성균과 장내 유해 미생물 억제에 관한 체외배양 항균 활성을 조사하는 것이었다. 대조군 (CON, 포졸란 무첨가 대조군)과 DP0.3 (증류수와 포졸란 분말 0.3%를 혼합하여 제조한 배지군), DP0.5 (증류수와 포졸란 분말 0.5%를 혼합하여 제조한 배지군), PE (포졸란 분말 추출물을 이용하여 제조한 배지군)으로 구분하였다. *Lactobacillus casei* 균수는 CON과 비교할 때 DP0.3 처리군에서 유의하게 높았으나 ($P < 0.05$) 기타 처리구 사이의 차이는 없었다. *Clostridium butyricum*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium* 균수는 CON과 비교할 때 포졸란 처리구가 유의하게 낮았다 ($P < 0.05$). *Clostridium butyricum*, *Salmonella typhimurium* 균수는 DP0.3, DP0.5와 PE 사이, *E. coli* 균수는 DP0.5와 PE 사이의 유의차가 있었다 ($P < 0.05$). MRSA와 VRE의 균수는 CON과 비교할 때 포졸란 처리구가 유의하게 낮았다 ($P < 0.05$). MRSA 균수는 DP0.5와 DP0.3, PE 사이의 차이가 있었고, VRE 균수는 PE > DP0.3 > DP0.5 > CON 처리구 순서로 유의하게 높았다 ($P < 0.05$). 이와 같은 결과를 통해 포졸란의 항생제 내성균 및 장내 유해 미생물에 대한 항균활성이 확인됨에 따라 가축용 천연항균제, 보조사료 규산염제로써의 활용이 가능할 것으로 보인다.

주제어: 포졸란, 장내미생물, 항생제 내성균, MRSA, VRE, 항균활성, 체외배양

†Corresponding author
(E-mail: acopop9969@kangwon.ac.kr)

Abstract : The purpose of this study was to investigate *in vitro* antibacterial activities of pozzolan against super bacteria and intestinal bacteria. There were four treatment groups: 1) CON, pozzolan free control group; 2) DP0.3, microbial culture medium prepared by mixing distilled water and 0.3% of pozzolan powder; 3) DP0.5, microbial culture medium prepared by mixing distilled water and 0.5% of pozzolan powder; and 4) PE, microbial culture medium prepared with pozzolan powder extracts without adding distilled water. The count of *Lactobacillus casei* was significantly higher in the DP0.3 group compared to CON ($P<0.05$). However, it showed no significant difference compared to other treatment groups. Numbers of *Clostridium butyricum*, *Escherichia coli*, and *Salmonella typhimurium* were significantly lower in pozzolan treatment groups compared to CON ($P<0.05$). *Clostridium butyricum* and *Salmonella typhimurium* counts were significantly different among DP0.3, DP0.5, and PE groups ($P<0.05$). Counts of *E. coli* were also significantly between DP0.5 and PE groups ($P<0.05$). Counts of MRSA and VRE were significantly lower in pozzolan treatment groups compared to CON ($P<0.05$). MRSA counts were significantly different among DP0.5, DP0.3 and PE groups. VRE counts were significantly higher in the order of PE > DP0.3 > DP0.5 > CON ($P<0.05$). These results suggest that pozzolan could be used as a dietary silicate supplement and a natural antibacterial agent for livestock if its antimicrobial activity against super bacteria and harmful bacteria in the intestine is confirmed.

Keywords : Pozzolan, intestinal bacteria, super bacteria, antibacterial activity, MRSA, VRE

1. 서론

인간과 동물에 대한 항생제 오남용으로 MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), VRE (vancomycin-resistant *enterococci*)와 같은 항생제 내성균, 슈퍼박테리아가 출현하여 심각한 현안으로 떠올랐다[1,2]. 그러므로, 이러한 문제를 해결하기 위해 항생제의 사용 규제와 함께 가축사료용 항생제를 대체할 수 있는 효과적인 항균 활성제의 개발이 필요하다[3]. 기존의 항생제와는 서로 다른 작용 메커니즘을 통하여 유해세균에 대한 항균효과를 나타냄과 동시에 생분해성과 자연계에서 잔류 위험성이 없는 친환경적인 천연물질의 개발이 필요하다[4,5].

장내 미생물의 균형은 동물의 면역력, 건강 및 생산성 향상을 위해 매우 중요하다. 장내 미생물은 유익균 *Lactobacillus*의 증식이 많고 *E. Coli*, *Clostridium*, *Salmonella*를 비롯한 유해균이 적은 상태로 유지하는 것이 좋다[1,5]. 장내 미생물의 불균형은 장내 세균 군집의 비가역적 변화, 대사산물의 변화와 함께 장 세포의 반응 및 면역계의 교란을 일으킬 수 있다[6]. 유해세균의 장 정착을 억제하는 방법은 유익한 미생물에 의한 유해세균과의 직접적인 충돌과 장내 영양소에 대한 경쟁

적 배제이다[5,7].

무기 항균제는 유기 항균제에 비해 사료 가공 조건에서 안정하기 때문에 천연 광물질, 특히 규산염 점토광물질에 속하는 지올라이트, 벤토나이트, 고령토 등에 관한 사료첨가제 연구가 진행되었다[8,9]. 이 가운데, 포졸란은 강력한 항균활성을 갖는 것으로 알려져 있기 때문에 무기 항균제로써 특히 관심을 받고 있다[10]. 포졸란은 게르마늄, 이산화규소, 음이온을 함유함과 동시에 원적외선을 방출하기 때문에 동물영양, 항균활성을 갖는 친환경적 사료첨가제로써 이용할 수 있다[10,11]. 본 연구는 포졸란 분말과 열수 추출물의 항생제 내성균과 장내 유해 미생물 억제에 관한 *in vitro* 조건에서 항균활성을 조사하여 가축에 대한 보조사료 규산염제로써 개발을 위한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

2. 실험

2.1. 실험설계

포졸란 분말 (Pozzolan powder, PP, 600 mesh)은 (주)모닝스타 (강원도, 원주시)로부터 공급 받았다. 포졸란 분말과 열수 추출물에 대한 항균

활성을 측정하기 위하여 대조군 (CON, 포졸란 무첨가 대조군)과 DP0.3 (증류수와 포졸란 분말 0.3%를 혼합하여 제조한 배지군), DP0.5 (증류수와 포졸란 분말 0.5%를 혼합하여 제조한 배지군), PE (포졸란 분말 추출물을 이용하여 제조한 배지군)으로 구분하였다. 예비실험 결과, 배양배지의 무게에 대한 포졸란 0.3% 내지 0.5% 수준을 벗어났을 때 장내 유해세균 군주와 항생제 내성균주의 성장은 더 이상 변화가 없는 일정한 균수를 유지하는 범위에 도달하였기 때문에 포졸란의 첨가 수준을 0.3%와 0.5%로 설정하였다.

2.2. 실험 균주

장내 미생물 군주 4개와 항생제 내성균주 2개로 총 6개의 균주를 포졸란의 항균활성을 평가하기 위해 사용하였다. 장내 균주는 한국식품연구원에서 분양받은 *Lactobacillus casei* (KFRI 00129), *Escherichia coli* (KFRI 00242), *Salmonella typhimurium* (KFRI 00250), *Clostridium butyricum* (KFRI 01064)를 이용하였다. 항생제 내성균주는 서울여자대학교 내성균주은행으로부터 분양받은 MRSA (*Staphylococcus aureus*, CCARM 3089), VRE (*Enterococcus*, CCARM 5203)를 이용하였다.

2.3. 사용배지

균주배양을 위해 배지로써 *Lactobacillus casei* (MRS ager, Difco 288210), *Salmonella typhimurium* (Nutrient ager, Difco 213000), *E. coli* (Nutrient ager, Difco 213000), *Clostridium butyricum* (Differential Reinforced Clostridial ager, Difco 264120), MRSA (Nutrient ager, Difco 213000), VRE (Nutrient ager, Difco 213000)를 각각 사용하였다.

2.4. 배양조건

장내 미생물 및 항생제 내성균에 대한 포졸란 분말과 추출물의 항균활성을 평가하기 위해 한천 평판배양법 (agar plate count method)를 이용하였다. 예비실험 결과, 포졸란 분말 및 열수추출물을 이용한 최소억제농도 (minimal inhibitory concentration, MIC)는 측정할 수 없었기 때문에 한천평판배양법을 적용하였다[12]. 모든 균주는 상기 기술한 해당 고체배지에서 성장 및 유지시켰다. CON은 PP를 혼합하지 않고 배지원료와 증류수를 이용하여 제조한 고체배지에 균주를 배

양하였다. 고체배지는 포졸란 분말 (PP) 3 g 또는 5 g, 배지원료 20 g 및 증류수 1 L로 각각 구성하였다. 이를 121°C에서 15분 동안 멸균하여 고체 배지를 제조하였다. 처리군으로써 DP0.3과 DP0.5는 배지원료와 PP 0.3% 및 0.5%를 각각 혼합하여 증류수로써 제조한 고체배지에 균주를 배양하였다. PE는 PP:증류수 1:5의 비율로 혼합 후 배양기 (1550 Shaking incubator, VorTemp™, Labnet USA)에서 50°C, 8 h 섞음 처리 후 얻어진 포졸란 열수추출물을 이용하여 제조한 고체배지에 균주를 배양하였다. 균주 접종은 1×10^7 CFU (colony forming unit)/mL의 밀도로 표준화하고 적절한 고체배지에 접종하였다. 혐기성 박테리아를 함유하는 평판은 혐기성 챔버 (수소 5%, CO₂ 5%, 질소; Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, UK)에서 제조 하였다. 접종된 한천평판을 호기성, 혐기성 또는 미호기성 조건 하에서 37 °C, 24-48 시간 동안 배양하였다. 혐기성 균주는 Gas-Pak®시스템 (BBL microbiology system, Cockeysville, USA)을 사용하여 혐기성 조건 하에서 배양하였다. 미생물 배양 후 콜로니 수 (CFU) 및 희석 계수를 곱하여 박테리아 수를 계산하였다. 결과는 배양배지 플레이트 당 박테리아 수 (log₁₀ CFU/plate)로써 제시하였다.

2.5 통계처리

자료는 IBM SPSS Statistics for Windows, version 19.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA)를 사용하여 분석하였으며 평균±표준오차로서 나타냈다. 변수에 대한 통계적인 유의차는 95% 신뢰수준 (P<0.05)에서 결정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 포졸란의 성분

본 연구에 사용된 포졸란은 주성분으로써 게르마늄 23.72 ppb, 이산화규소 (silicon dioxide, SiO₂) 51.62%, 산화알루미늄 (aluminium oxide, Al₂O₃) 14.21%, 산화철분 (iron oxide, Fe₂O₃) 5.84%, 불소(F⁻) 2.40 ppm과 염소산 (ClO₂⁻, ClO₃⁻) <1.00 ppm을 비롯한 여러 음이온을 함유하였고 원적외선 (파장 5-20 μm 범위에서 원적외선 방사율 0.925, 방사에너지 3.82x10² W/m²·μm, 37°C)을 방출하는 제품이었다[10]. 규산염

암석에서 게르마늄 농도는 0.5-3 mg/kg으로 알려졌으나 포졸란은 이에 비해 낮게 나타났다[13]. 포졸란의 이산화규소, 산화알루미늄 및 산화철분 함량은 Cobirzan 등(2015)에 의해 보고된 천연 포졸란의 성분과 비슷하였으나[14], Sturz 등(1998)이 보고한 점토광물질 보다 높았고 산화철분은 낮았다[15]. 이산화염소, 브롬 및 불소를 비롯한 음이온은 시멘트 재료에서 포졸란의 활성화 반응, 미생물의 살균 및 소독작용을 하는 것으로 알려졌다[16,17]. 게르마늄은 지구상에 분포하는 희귀 원소로써 Si, C, Zn, Cu, Fe, Sn 및 Ag와 무기질 결합을 이루며 산화철분이 풍부한 광물질이다. 또한, 지질 화학적으로 유사한 Si_4^+ 를 Ge_4^+ 으로 대체한 규산염 광물로서 분포되어있다[18]. 게르마늄과 이산화규소는 공기 중 음이온과 원적외선을 방출하여 다양한 생물학적 효능을 갖는 것으로 알려졌다[18,19]. 원적외선은 50-1,000 μm 파장을 갖는 방사선으로 인체 유익한 범위는 5-20 μm 로 알려져 있다. 산화알루미늄이나 이산화규소 구조체로 이루어져 있는 규산염 광물질은 원적외선의 방사율이 높은 대표적인 물질이다. 원적외선은 생체 내부에 열전달이 용이하고 항균작용을 비롯한 다양한 생체효능을 갖는 것으로 보고되었다[20].

3.2. 장내 미생물 균주

장내 미생물 균주에 대한 포졸란 분말과 열수 추출물의 항균활성을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. *Lactobacillus casei* 균수 (\log_{10} CFU/plate)는 7.55-7.64 범위였으며 CON (7.55 ± 0.04)과 비교할 때 DP0.3 (7.64 ± 0.05)가 유의하게 높았으나 ($P < 0.05$) 기타 처리구와 사이에 차이는 없었다. *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, 그리고 *Clostridium butyricum* 균수는 CON과 비교할 때 포졸란 처리구에서 유의하게 낮았다 ($P < 0.05$). *Salmonella typhimurium* 균수 (\log_{10} CFU/plate)는 7.67-8.29로 나타났으며 CON (8.29 ± 0.05)과 비교할 때 PE (8.09 ± 0.06) > DP0.3 (7.86 ± 0.10) > DP0.5 (7.67 ± 0.13) 순서로 유의하게 낮게 나타났다 ($P < 0.05$). *E. coli* 균수 (\log_{10} CFU/plate)는 7.43-8.03 이었으며 CON (8.03 ± 0.09)과 비교할 때 PE (7.87 ± 0.05), DP0.3 (7.76 ± 0.13) > DP0.5 (7.43 ± 0.13) 순서로 유의하게 낮았다 ($P < 0.05$). *Clostridium butyricum* 균수 (\log_{10} CFU/plate)는 7.93-8.38 이었으며 CON (8.38 ± 0.04)과 비교할 때 DP0.5

(8.26 ± 0.04) > DP0.3 (8.11 ± 0.04) > PE (7.93 ± 0.06) 순서로 유의하게 낮아졌다 ($P < 0.05$). 따라서, 포졸란이 장내 유해세균에 대한 강력한 억제 효과를 갖는다는 사실을 확인하였다. 이는 포졸란의 주성분인 게르마늄, 이산화규소, 산화알루미늄, 산화철분, 음이온 등의 상승작용, 그리고 원적외선 방출에 기인한 것으로 볼 수 있다. 그러나 포졸란의 이와 관련한 직접적인 보고는 알려진 것이 거의 없다[10,18,21]. 게르마늄, 철분 및 원적외선은 항균활성, 세포노화 방지와 면역조절에 관여하는 중요한 성분이다[19,22,23]. 또한, 박테리아 세포에 흡수되어 세균 세포막 단백질과 기타 고분자 역할을 억제하여 항균작용을 갖는다[21]. 공기 이온 중 음이온은 여러 음전하를 띠는 분자로서 몇 개 또는 20-30개의 물 분자와 결합하여 음이온 클러스터를 형성한다. 인간과 동물에서 게르마늄과 이산화규소는 공기 중 음이온 발생으로 항균활성을 갖는 것으로 알려졌다[24].

3.3. 항생제 내성균주

항생제 내성 균주에 대한 포졸란 분말과 열수 추출물의 항균활성을 측정된 결과는 Table 1과 같다. MRSA와 VRE의 균수는 CON과 비교할 때 포졸란 처리구가 유의하게 낮았다 ($P < 0.05$). MRSA 균수 (\log_{10} CFU/plate)는 7.56-7.96 범위였으며 CON (7.96 ± 0.04)과 비교할 때 PE (7.82 ± 0.05), DP0.3 (7.74 ± 0.05) > DP0.5 (7.56 ± 0.07) 순서로 유의하게 낮았다 ($P < 0.05$). VRE 균수는 (\log_{10} CFU/plate)는 7.42-7.91로 나타났으며 CON (7.91 ± 0.03)과 비교할 때 PE (7.79 ± 0.03) > DP0.3 (7.66 ± 0.04) > DP0.5 (7.42 ± 0.07) 순서로 유의하게 낮아졌다 ($P < 0.05$). 이와 같은 포졸란의 항생제 내성 균주에 대한 강력한 억제효과는 포졸란의 주성분인 이산화규소, 게르마늄, 음이온, 원적외선, 산화알루미늄, 및 산화철분에 의한 시너지 효과로 볼 수 있다. 그러나 포졸란의 이와 관련한 직접적인 보고는 알려진 것이 거의 없다[10,25-27]. 게르마늄은 강력한 항균효과가 있어 항생제 내성 균주인 MRSA와 VRE를 억제할 수 있음이 보고되었다[22,27]. 규소 및 음이온은 동물의 성장과 발육에 중요한 미량원소로서 뼈 형성 및 Ag-SiO₂ 복합체로써 MRSA, *E.coli*에 대한 강력한 항균효과를 갖는 것으로 알려졌다[29-30].

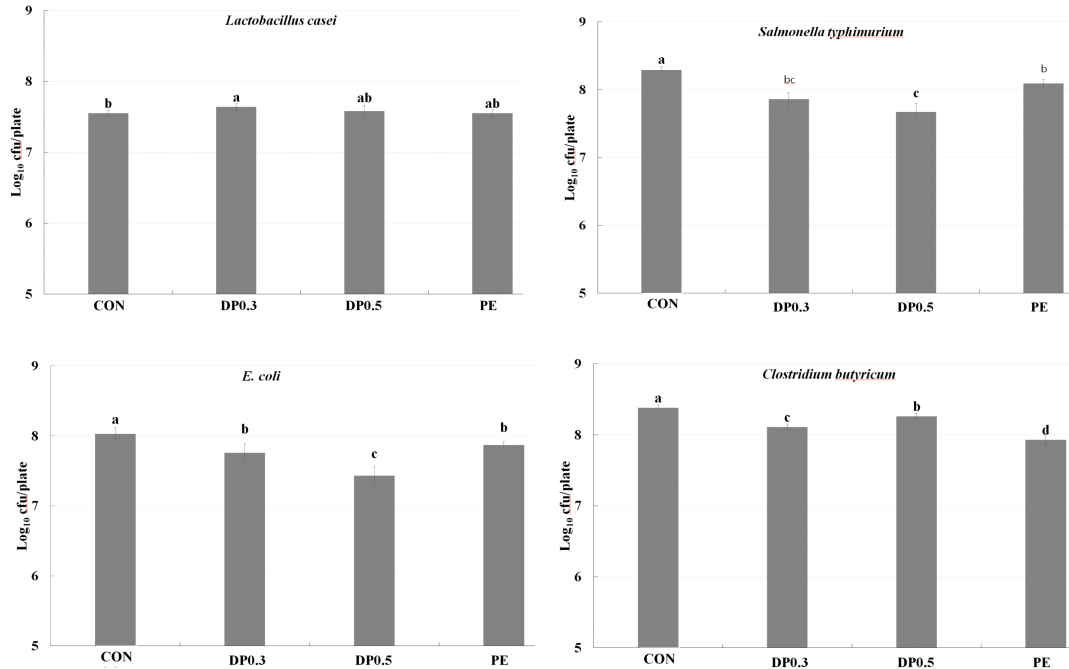


Fig. 1. Effect of pozzolan powder and hot water extracts on growth inhibition of intestinal bacteria. CON: pozzolan free control group, DP0.3: microbial culture medium prepared by mixing distilled water and 0.3% of pozzolan powder, DP0.5: microbial culture medium prepared by mixing distilled water and 0.5% of pozzolan powder, PE: microbial culture medium prepared with pozzolan powder extracts without adding distilled water. Error bars indicate 95% confidence intervals. ^{abcd}The values with different superscript letters in a column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 1. The numbers of cultured super bacteria in in a culture medium containing pozzolan powder and extracts¹ Unit : (log₁₀ CFU/plate)

	CON	DP0.3	DP0.5	PE
MRSA	7.96 ± 0.04 ^{a2)}	7.74 ± 0.05 ^b	7.56 ± 0.07 ^c	7.82 ± 0.05 ^b
VRE	7.91 ± 0.03 ^a	7.66 ± 0.04 ^c	7.42 ± 0.07 ^d	7.79 ± 0.03 ^b

¹CON: pozzolan free control group, DP0.3: microbial culture medium prepared by mixing distilled water and 0.3% of pozzolan powder, DP0.5: microbial culture medium prepared by mixing distilled water and 0.5% of pozzolan powder, PE: microbial culture medium prepared with pozzolan powder extracts without adding distilled water. ²MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, VRE: vancomycin-resistant *Enterococci*.

^{abcd}Mean values within a row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

4. 결론

규산염 광물질로써 포졸란 분말과 열수 추출물의 항생제 내성균과 장내 유해 미생물 억제에 대한 항균활성을 조사한 결과는 아래와 같다. *Lactobacillus casei* 균수는 대조군과 비교할 때 포졸란 처리군에서 정상 균수를 유지하거나 유의하게 높아지는 경향을 보였다 ($P < 0.05$). *Clostridium butyricum*, *E. coli*, 및 *Salmonella typhimurium* 균수는 대조군과 비교할 때 포졸란 분말 처리군과 포졸란 분말 추출물을 이용하여 제조한 배지 처리군과 포졸란 분말 처리구 및 포졸란 분말 처리구와 포졸란 분말 추출물을 이용하여 제조한 배지 처리구 사이의 유의차가 있었다 ($P < 0.05$). MRSA, VRE의 균수는 대조군과 비교할 때 포졸란 분말 처리구와 포졸란 분말 추출물을 이용하여 제조한 배지 처리구가 유의하게 낮았다 ($P < 0.05$). MRSA 균수는 증류수와 포졸란 분말 0.3%, 0.5%를 각각 혼합하여 제조한 배지군과 포졸란 분말 추출물을 이용하여 제조한 배지 처리구 사이의 유의차가 있었다 ($P < 0.05$). VRE 균수는 포졸란 분말 추출물을 이용하여 제조한 배지 처리구 > 증류수와 포졸란 분말 0.3% > 증류수와 포졸란 분말 0.5%를 각각 혼합하여 제조한 배지 처리구 순서로 유의하게 높았다 ($P < 0.05$). 결론적으로, 포졸란 분말 또는 열수 추출물이 항생제 내성균 및 장내 유해 세균에 대하여 강력한 항균활성을 갖는 보조사료 규산염제로서 사용할 수 있음을 시사해준다.

감사의 글

본 연구는 2014년도 (주)모닝스타의 용역연구비 과제로 수행하였으며 이에 깊은 감사를 드립니다.

References

1. S. O. Park, J. H. Shin, W. K. Choi, B. S. Park, A. Jang, "Antibacterial activity of house fly-maggot extracts against MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) and VRE (Vancomycin-resistant *enterococci*)", *Journal of Environmental Biology*, Vol.31, No.5 pp. 865-871, (2010).
2. J. S. Lee, M. H. Lee, J. N. Lee, "Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* leaf extract", *Journal of Korean Applied Science and Technology*, Vol.37, No.1 pp. 56-65, (2020).
3. Z. X. Tang, B. F. Lv, "MgO nanoparticles as antibacterial agent: preparation and activity", *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Vol.31, No.03 pp. 591-601, (2014).
4. J. S. Eum, "Antimicrobial activity of medicinal plants extracts against *Streptococcus sobrinus* KCOM 1157", *Journal of Korean Applied Science and Technology*, Vol.37, No.2 pp. 279-286, (2020).
5. C. Mu, W. Zhu, "Antibiotic effects on gut microbiota, metabolism, and beyond", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol.103, pp. 9277-9285, (2009).
6. M. Rescigno, "Gut commensal flora: tolerance and homeostasis", *F1000 Biology Reports*, Vol.1, No.9 pp.1-6, (2009).
7. J. S. Frick, I. B. Autenrieth, "The gut microflora and its variety of roles in health and disease". In: Dobrindt U., Hacker J., Svanborg C. (eds) *Between Pathogenicity and Commensalism, Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol.358, Springer, Berlin, Heidelberg, (2012).
8. S. E. Haydel, C. M. Remenih, L. B. Williams, "Broad-spectrum *in vitro* antibacterial activities of clay minerals against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant bacterial pathogens", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol.61, No.2 pp. 353-361, (2007).
9. L. B. Williams, M. Holland, D. D. Eberl, "Killer clays! Natural antibacterial clay minerals", *Mineralogical Society Bulletin*, Vol. 139, No.139 pp. 3-8, (2004).
10. K. H. Lee, K. T. Choi, B. S. Park, S. O. Park, "Composition of animal feed additive

- comprising pozzolan and use thereof", PCT/KR2015/003416 events, (2015).
11. D. A. Jana, "A new look to an old pozzolan: Clinoptilolite-A promising pozzolan in concrete", Proceedings of the twenty-ninth conference on cement microscopy Quebec city, PQ, Canada, May 20-24, (2007).
 12. E. R. Sanders, Aseptic laboratory techniques: Plating methods. 63, e3064. Doi: 10.3791/3064. 2012.
 13. H. J. M. Bowen, "Environmental chemistry of the elements", Academic Press, London, (1979).
 14. N. Cobirzan, A. A. Balog, E. Mosonyi, "Investigation of the natural pozzolans for usage in cement industry", *Procedia Technology*, Vol. 19, pp. 506-511, <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2015.02.072>, (2015).
 15. A. Sturz, M. Itoh, S. Smith, "Mineralogy and chemical composition of clay minerals, TAG hydrothermal mound", *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results*, Vol. 158, pp. 277-284, (1998).
 16. K. S. Hyun, Y. J. Kim, "Characteristics of intermediate THM and bromic reaction by chlorination", *Korean Society of Water Science and Technology*, Vol.14, No.1 pp. 97-104, (2006).
 17. A. Abdullah, M. S. Jaafar, Y. H. Taufiq-Yap, A. Alhozaimy, A. Al-Negheimish, J. Noorzaei, "The effect of various chemical activators on pozzolanic reactivity: A review", *Scientific Research and Essays*, Vol.7, No.7 pp. 719-729, (2012).
 18. R. Holl, M. Kling, E. Schrol, "Metallogenesis of germanium—A review", *Ore Geology Reviews*, Vol.30, No.3 pp. 145-180, (2007).
 19. J. Dyer, "Infrared functional textiles", In N. Pan & G. Sun (Eds.), *Functional Textiles for Improved Performance, Protection and Health*, pp. 184-197, Philadelphia: Woodhead Publishing Limited, (2011).
 20. S. R. Tsal, M. R. Hamblin, "Biological effects and medical applications of infrared radiation", *Journal of Photochemical Photobiology B*, Vol.170, pp. 197-207, (2017).
 21. L. Li, T. Ruan, Y. Lyu, B. Wu, "Advances in effect of germanium or germanium compounds on animals—a review", *Journal of Biosciences and Medicines*, Vol.5, No.7 pp. 56-73, (2017).
 22. T. J. Chen, C. H. Lin, "Germanium: Environmental pollution and health effects", *Encyclopedia of Environmental Health*, pp. 927-933, DOI:10.1016/B978-0-444-52272-6. 00477-3, (2011).
 23. H. G. Sun, X. M. Lu, P. J. Gao, "The exploration of the antibacterial mechanism of Fe³⁺ against bacteria", *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol.42, No.1 pp. 410-414, (2011).
 24. S. Y. Jiang, A. Ma, S. Ramachandran, "Negative air ions and their effects on human health and air quality improvement", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol.19, No.10 pp. 2966-2985, (2018).
 25. C. Londono, H. E. Hartnett, L. B. Williams, "Antibacterial activity of aluminum clay from the Colombian Amazon", *Environmental Science & Technology*, Vol.51, No.4. pp. 2401-2408. 2017.
 26. D. A. Mosselhy, H. Granbohm, U. Hynönen, Y. Ge, A. Palva, K. Nordstrom, S. P. Hannula, "Nanosilver-silica composite: Prolonged antibacterial effects and bacterial interaction mechanisms for wound dressings", *Nanomaterials (Basel)*, Vol.7, No.9 pp. 261-280. 2017.
 27. D. Dobrzyński, A. Boguszevska-Czubara, K. Sugimori, "Hydrogeochemical and biomedical insights into germanium potential of curative waters: a case study of health resorts in the Sudetes Mountains (Poland)", *Environmental Geochemistry and Health*, Vol.40, pp. 1355-1375, (2018).

28. R. Jugdaohsingh, M. R. Calomme, K. Robinson, F. Nielsen, S. H. C. Anderson, P. D'Haese, P. Geusens, N. Loveridge, R. P. H. Thompson, J. J. Powell, "Increased longitudinal growth in rats on a silicon-depleted diet", *Bone*, Vol. 43, No.3 pp. 596–606, (2008).
29. Z. Chen, J. Wang, J. Li, Y. Zhu, M. Ge, "Negative air ion release and far infrared emission properties of polyethylene terephthalate/germanium composite fiber", *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, Vol.12, No.1 pp. 59–65, (2017).
30. D. E. Camporotondi, M. L. Foglia, G. S. Alvarez, A. M. Mebert, L. E. Diaz, T. Coradin, M. F. Desimone, "Antimicrobial properties of silica modified nanoparticles", *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education, 2 Formatex Research Center*, pp. 283–290, (2013).