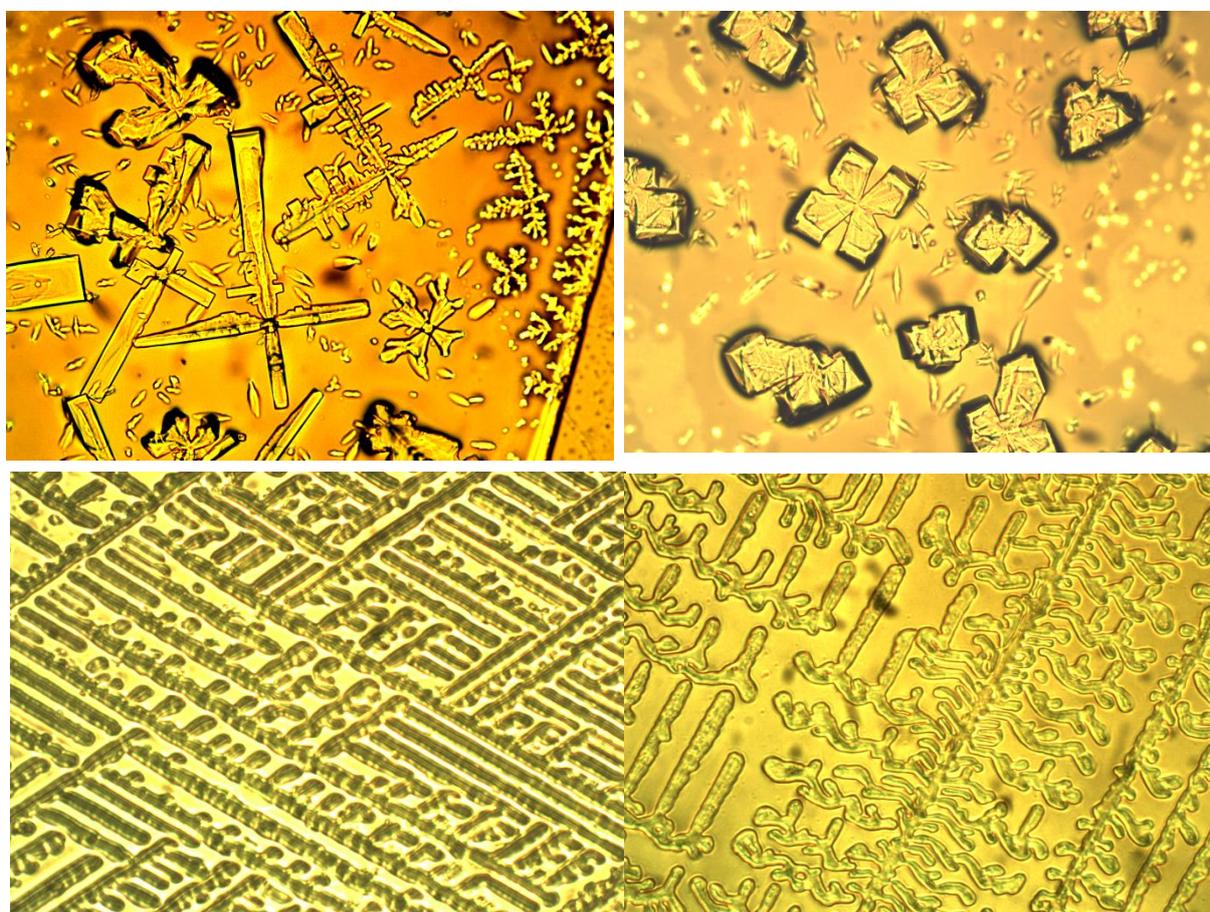


Владимирский государственный университет

А. П. ПОНОМАРЕВ

**ГОРНАЯ ПОРОДА ШУНГИТ –
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ
И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА**



Монография

Владимир 2020

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Владимирский государственный университет
имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых»

А. П. ПОНОМАРЕВ

ГОРНАЯ ПОРОДА ШУНГИТ –
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ
И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Монография

Электронное издание



Владимир 2020

ISBN 978-5-9984-1264-6
© Пономарев А. П., 2020

УДК 552.08
ББК 26.3

Рецензенты:

Доктор биологических наук, доцент
профессор кафедры технологии пищевых производств и биотехнологии
Самарского государственного технического университета
Е. Ю. Руденко

Доктор технических наук, профессор
главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории
биомониторинга Института биологии Коми научного центра Уральского
отделения Российской академии наук
Т. Я. Ашихмина

Пономарев, А. П.

Горная порода шунгит – физико-химические и биологические свойства [Электронный ресурс] : монография / А. П. Пономарев ; Владим. гос. ун-т им. А. Г. и Н. Г. Столетовых. – Владимир : Изд-во ВлГУ, 2020. – 179 с. – ISBN 978-5-9984-1264-6. – Электрон. дан. (8,69 Мб). – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – Систем. требования: Intel от 1,3 ГГц ; Windows XP/7/8/10 ; Adobe Reader ; дисковод CD-ROM. – Загл. с титул. экрана.

Представлены результаты исследований автора по проблеме уникальной горной породы – шунгиту. Известно, что данная порода является носителем широкого спектра микроэлементов и биологически активных веществ, интенсифицирующих биологические процессы в организме человека и животных. Установлено, что в составе органоминерального комплекса присутствуют фуллерены, с которыми исследователи связывают все положительные свойства шунгитовой воды. Исследованиями водных экстрактов шунгита методом масс-спектропии было показано, что помимо фуллеренов, макро- и микроэлементов в составе щебня шунгита присутствуют редкоземельные ультрамикроэлементы – лантаноиды. Совершенно очевидно, что широкий спектр биологической активности шунгита обусловлен не только фуллеренами, но и присутствующими в его составе – лантаноидами.

Адресована широкому кругу научных сотрудников, аспирантов, студентов, специалистов в области медицины, ветеринарии и биологии.

Табл. 32. Ил. 41. Библиогр.: 93 назв.

УДК 552.08
ББК 26.3

ISBN 978-5-9984-1264-6

© Пономарев А. П., 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
Глава 1. ШУНГИТ – ПРИРОДНАЯ УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩАЯ НАНОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПОРОДА	9
1.1. Общие сведения о природе шунгитовой углеродсодержащей породе и её свойствах.....	9
1.2. Шунгит – природный источник фуллеренов	15
1.3. Извлечение фуллеренов из шунгита с использованием бромбензола.....	20
Глава 2. ПОЛУЧЕНИЕ ШУНГИТОВОЙ ВОДЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕЁ МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА	23
2.1. Содержание минеральных веществ в воде в зависимости от массы навески щебня шунгита	25
2.2. Влияние режима подготовки щебня шунгита на выход химических элементов.....	30
2.3. Выход химических элементов при использовании родниковой воды в качестве экстрагента	36
2.4. Выход редкоземельных элементов при кипячении щебня шунгита в родниковой воде	38

Глава 3. КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ РАСТВОРОВ ШУНГИТОВОЙ ВОДЫ	41
3.1. Концентрирование методом выпаривания свободной воды	41
3.2. Концентрирование с помощью вакуумного роторного испарителя	44
Глава 4. ВЛИЯНИЕ ШУНГИТОВОЙ ВОДЫ НА ОТДЕЛЬНЫЕ ВИДЫ МИКРООРГАНИЗМОВ	50
4.1. Изменение морфологии бактериальных клеток при воздействии шунгитовой воды.....	50
4.2. Влияние шунгитовой воды на клетки нанобактерий	56
4.3. Морфологические признаки воздействия шунгитовой воды на вирионы вируса ящура.....	59
4.4. Влияние шунгитовой воды на наноструктуры, выделенные из воды.....	62
Глава 5. СВОЙСТВА РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ УЛЬТРАМИКРОЭЛЕМЕНТОВ – ЛАНТАНОИДОВ, ВЫЯВЛЯЕМЫХ В ШУНГИТОВОЙ ВОДЕ	68
5.1. Лантаноиды в медицине	72
5.2. Лантаноиды в ветеринарии	74
Глава 6. ИЗВЛЕЧЕНИЕ ЛАНТАНОИДОВ ИЗ ШУНГИТОВОЙ ПОРОДЫ, ИХ ОЧИСТКА И АНАЛИЗ	79
6.1. Анализ биохимического состава водного экстракта шунгита	88
6.2. Метод кристаллоскопии при исследовании водного экстракта шунгита.....	93
6.3. Кристаллоскопия экстрактов шунгита, полученных при использовании различных подкислителей.....	94
6.4. Комплексообразование лантаноидов с ЭДТА105	
Глава 7. БИОЛОГИЧЕСКИЕ С	

ШУНГИТА.....	112
7.1. Водный экстракт шунгита как питательная среда для репродукции плесневых грибов	112
7.2. Удаление из воды бактериальной микрофлоры с помощью водного экстракта шунгита	116
 Глава 8. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВОДНОГО ЭКСТРАКТА ШУНГИТА ДЛЯ ЦЕЛЕЙ БИОТЕХНОЛОГИИ	134
8.1. Сыворотка крови в биотехнологии и её варианты	134
8.2. Оптимизация режима получения водного экстракта шунгита..	137
8.3. Очистка сыворотки крови крупного рогатого скота от контаминирующих микроорганизмов.....	142
8.4. Сравнительные исследования культивирования клеток ВНК-21 с использованием заменителя сыворотки Fetal Clone II и сыворотки крови, очищенной лантаноидами	151
8.5. Культивирование клеточных линий человека и животных с использованием сыворотки крови, очищенной лантаноидами	156
 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	163
 БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	167

ПРЕДИСЛОВИЕ

Представленная читателям книга посвящена наиболее интересному и уникальному дару природы – горной породе шунгиту. Повышенный интерес к шунгиту обусловлен его широким экологическим потенциалом, реализуемым в процессах очистки воды и воздуха, способствующим повышению защитных и лечебных свойств человека и животных по отношению к широкому ряду заболеваний. Эффективность использования шунгита обусловлена целым спектром ценных свойств: сорбционных, каталитических, восстановительных, бактерицидных, электропроводных. Невысокая стоимость и доступность делает привлекательным к его широкому использованию. В то же время литературные сведения отмечают, что все положительные биологические эффекты обусловлены присутствием в шунгите фуллеренов. На начальном этапе наших исследований экспериментально было подтверждено присутствие в шунгите не только фуллеренов, но редкоземельных ультрамикроэлементов – лантаноидов. Исследования были проведены на базе химической лаборатории ФГБУ «ВНИИЗЖ» в период работы автора в данном учреждении при активном участии доктора химических наук, профессора Амелина В. Г. и послужили основой для дальнейшей продолжительной работы по проблеме изучения лантаноидов. Неоценимая помощь в проведении масс-спектрометрических и хроматографических исследований была оказана кандидатами химических наук И. В. Подколзиным и Д. С. Большаковым. Автор выражает им искреннюю благодарность и признательность.

Глубокую благодарность автор выражает руководству ООО НПП «БИОХИМРЕСУРС» Е. В. Белику, Г. П. Плохову и М. М. Коган за предоставленную возможность в проведении исследований по разработке и использованию шунгита для очистки сыворотки крови крупного рогатого скота для целей биотехнологии.

ВВЕДЕНИЕ

Монография посвящена изучению уникальной горной породы – шунгиту Зажогинского месторождения Республики Карелии. Из литературы известно, что экологический потенциал шунгита реализуется в процессах очистки воды, повышения иммунных характеристик человека и животных, лечебных свойствах по отношению к широкому ряду заболеваний. Это свойства обусловлены тем, что данная горная порода является носителем широкого спектра микроэлементов и биологически активных веществ, интенсифицирующих биологические процессы в организме человека и животных. Известно, что одним из свойств шунгита является способность сорбировать вещества как органической, так и неорганической природы. Эту способность шунгита следует рассматривать как положительный фактор, например при очистке различных видов воды. Предполагается, что механизм очистки обусловлен адсорбцией органических веществ на твердой поверхности щебня шунгита.

В биотехнологическом плане препараты шунгита интересны тем, что обладают выраженным бактерицидным эффектом, обновляют клетки, обогащая их необходимыми веществами, обладают исключительными антиоксидантными свойствами, что может способствовать решению проблемы защиты организма человека и животных [29, 31, 37, 79].

Однако, несмотря на длительный период использования, шунгит остается загадкой для ученых. Исследователи отмечают, что органоминеральный комплекс шунгита представлен разнообразной смесью сложных веществ, которые выходят в раствор вместе с фуллеренами и определяют их свойства [8, 30, 36].

В связи с этим главными задачами исследований, стоящими перед автором работы, были следующие:

- определить современными методами качественный и количественный состав химических элементов, экстрагируемых в водную среду при использовании воды в качестве основного экстрагента;
- на основе таких методов, как электронная микроскопия, масс-спектрометрия и хроматография выяснить механизм действия шунгитовой воды на отдельные виды микроорганизмов;
- с использованием шунгитовой воды отработать метод получения водного экстракта, содержащего редкоземельные элементы – лантаноиды;
- методами кристаллоскопии и хелатирования с использованием ЭДТА провести обоснование присутствия лантаноидов в составе водного экстракта;
- в модельных опытах с бактериальными клетками показать комплексообразующую способность лантаноидов как основополагающего механизма бактериостатического действия экстракта шунгита;
- для целей биотехнологии отработать методику очистки сыворотки крови крупного рогатого скота от контаминирующих агентов бактериальной и вирусной этиологии.

Глава 1. ШУНГИТ – ПРИРОДНАЯ УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩАЯ НАНОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПОРОДА

1.1. Общие сведения о природе шунгитовой углеродсодержащей породе и её свойствах

Шунгит – одна из древнейших горных пород нашей планеты, геологический возраст которой составляет более 2 млрд лет. Свое название шунгит получил в 1887 году, когда в южнокарельском поселке Шуньга впервые были обнаружены единственные в мире крупные месторождения этой углеродсодержащей породы.

В 1714 году Петр I основал в здешних краях курорт, который получил название «Марциальные воды». Считается, что узнав об уникальных антисептических свойствах, которым обладал камень, Петр приказал каждому из своих солдат носить кусочек шунгита (в те времена он назывался аспидным камнем) в походных ранцах. Опуская в котелки с водой кусочки камня, солдаты получали свежую, обеззараженную воду [84].

В наше время в окрестностях села Толвуя Карельской республики разрабатывается единственное в мире Зажогинское промышленное месторождение шунгита, из которого, собственно, и делаются все шунгитовые продукты - от магических шунгитовых пирамидок до шунгитовой крошки для фильтров и минерализованной шунгитовой воды.

До настоящего времени исследователи не могут окончательно определиться с происхождением шунгита. По мнению одних – это минерал, по мнению других – это горная порода. Директор Научно-производственного предприятия «КАРЕЛИЯ-ШУНГИТ» В.А. Крутоус отмечает, что шунгит – единственный в мире минерал с природными фуллеренами, лечебные свойства которого известны более 400 лет. Лечебные свойства шунгита были скрыты от людей тысячелетиями и изучались методом проб и ошибок. Шунгит – это лекарство, созданное природой.

По поводу происхождения шунгита В. А. Крутоус не вдаваясь в дебри геологии и минералогии о составе шунгита, говорит следующее: шунгит ошибочно называют камнем - это не горная порода, а отложной минерал, образовавшийся из ила мелководного древнего моря в бескислородной атмосфере Земли 2,2 –2,4 млрд. лет назад. Это время зарождения жизни на Земле [37].

Огромный вклад в научное изучение и становление использования шунгита в промышленности внес основатель предприятия «Карбон-Шунгит», доктор технических наук Юрий Клавдиевич Калинин. С начала основания в 1964 и по 1991 год он руководил лабораторией шунгитов Института геологии Карельского научного центра РАН. В своих высказываниях он отмечал, что различие между обычным углеродом и шунгитом – значительно. Из графита можно получить алмаз, из алмаза – графит. Но из графита нельзя получить шунгит и из шунгита – графит. Шунгит Зажогинского месторождения состоящий из 30% шунгитового углерода и 68% силикатов представляет собой наноструктурированный природный композит. Шунгит образовался из органических донных отложений — сапропеля. Эти органические осадки, прикрываемые сверху всё новыми наслоениями, постепенно уплотнялись, обезвоживались и погружались в глубины земли. Под влиянием сжатия и высокой температуры шёл медленный процесс метаморфизации. В результате этого процесса образовался расплывённый в минеральной матрице аморфный углерод в виде характерных именно для шунгита глобул [30, 31]. К основным перспективам практического использования шунгита в экологическом плане относятся способность глубоко чистить воду от различных органических и некоторых неорганических веществ. Известно использование шунгита в бытовых приборах, фильтрах при очистке сточных вод, в сельском хозяйстве как удобрение и как кормовая добавка к пище пушных зверей, свиней и птицы [32].

Последний, мощный всплеск интереса к этому уникальному минералу произошел в начале XXI века после обнаружения в его составе фуллеренов [36]. Установлено, что в составе шунгита наряду с большей частью химических элементов таблицы Д.И. Менделеева присутствует особая форма углерода - фуллерен.

Минеральный состав (% масс): шунгитовый углерод -28; кварц -48; сложные силикаты (слюды, хлорит) -17; сульфиты -2. Шунгитовый углерод обладает аморфной структурой, устойчивой против графитации, характеризуется высокой реакционной способностью в термических процессах, высокими сорбционными и каталитическими свойствами, электропроводностью и химической стойкостью.

Основные свойства этой горной породы:

- плотность 2,1- 2,4 г/см³;
- пористость до 5%;
- прочность на сжатие 1000-1200 кгс/см³;
- электропроводность 1500 сим/м;
- развитая внутренняя поверхность до 20 м²/г;
- адсорбционноактивен по отношению к клеткам бактерий, фагам, патогенным сапрофитам;
- обладает бактерицидными свойствами.

Необычна структура шунгита. Порода представляет собой композит, матрицу которого образует углерод. В углеродной матрице равномерно распределены высокодисперсные частицы силикатов. Кроме углерода в состав шунгита входят другие химические элементы, данные приведены в табл. 1. Минеральный состав (% масс): шунгитовый углерод -30; кварц - 48; сложные силикаты (слюды, хлорид) -17; сульфиты -2 [30].

Таблица 1 - Средний химический состав (%)

C	SiO ₂	TiO ₂	Al ₂ O ₃	FeO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	S	P	П.п.п.
---	------------------	------------------	--------------------------------	-----	-----	-----	-------------------	------------------	---	---	--------

29,0	60	0,2	3,8	2,5	1,1	0,6	0,2	1,5	1,1	0,01	4,0
------	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	-----

Как следует из табл. 2 в шунгите Зажогинского месторождения содержание микроэлементов заметно выше, чем в среднем в земной коре.

Таблица 2 - Содержание микроэлементов в породах (%) [29]

Породы	Cu	Zn	Ag	Ni	V	Co	As	Y	Yb	Cd	Sb
Шунгит	15	40	8	20	20	40	50	20	20	0,5	3
Земная кора	5	8	0,7	6	9	18	2	3	0,3	0,01	0,05

В аннотации к сборнику статей «Шунгиты и безопасность жизнедеятельности человека» среди перечня уникальных свойств шунгита следует выделить указание на то, что шунгит это - «носитель широкого спектра микроэлементов и биологически активных веществ, интенсифицирующих биологические процессы в организме человека и животных» [32, 37]. Многочисленные сведения о свойствах шунгита более соответствуют рекламной информации и не всегда научно обоснованы. Так, например, говорится о том, что шунгит – это камень, забирающий в себя негатив. Отличный материал для очистки воды. Он избавляет её от фенолов, гуминов, жирных кислот, пестицидов, хлорорганики и фосфоорганики, нефтепродуктов, кишечной палочки. Кроме того, шунгит способствует оптимальной минерализации воды, продлевает срок её хранения.

Шунгит удаляет из воды механические примеси, тяжелые металлы, вредные органические вещества, уничтожает неприятные запахи и привкусы, делает мутную воду прозрачной. Настоянная на шунгите вода становится не только лучше по качеству, но и обретает лечебные свойства. Шунгитовые настои очень полезны и, в то же время, просты в приготовлении, поэтому их полезно иметь в каждом доме. Многие книги по народной

медицине советуют применять воду, настоянную на шунгите, для питья, полива растений, ежедневного умывания и принятия ванн.

Можно найти сведения о том, что шунгитовая вода поглощает и убивает все ненужное, а также «добавляет» и восстанавливает те элементы, в которых организм человека нуждается. Кроме того, шунгит придает воде уникальные целебные свойства. Шунгитовая вода лечит, защищает и омолаживает организм. Более того у специалистов есть все основания полагать, что именно в шунгитовой воде возникла жизнь, поскольку её природные структуры и комплексы близки к ферментам, присутствующим во всех живых клетках, и даже к гемоглобину. Долгие годы «шунгитовой водой» и препаратами на основе шунгитовой породы лечат весьма широкий спектр заболеваний. Однако до настоящего времени практически отсутствует объяснение причины биологически активных свойств шунгитовой породы. Одним из основных объяснений является ссылка на присутствие в их составе фуллеренов. Но, приняв во внимание незначительное содержание фуллереновых структур в составе органической массы шунгитовой породы, трудно объяснить наблюдаемые эффекты препаратов только на основе присутствия фуллеренов. Д.В. Прокопченков в своей работе отмечает, что следует учитывать весь комплекс биологически активных соединений, входящих в состав органической массы и минеральной составляющей шунгитовой породы [72].

Поскольку основным компонентом при использовании шунгита является шунгитовая вода – это вода, находившаяся в соприкосновении со щебнем или порошком шунгита, то наше основное внимание было акцентировано на бактерицидных свойствах шунгитовой воды.

Некоторые свойства шунгитовой породы в биологическом аспекте, подтвержденным экспериментальным путем:

- адсорбционно активна по отношению к клеткам бактерий, фагам, патогенным сапрофитам;

- обладает бактерицидными свойствами.

Лабораторные исследования показали, что 2-3-х суточный шунгитовый водный настой обладает выраженной бактерицидной активностью. Настой заражали следующими микробами: стрептококк группы А – основной возбудитель острых и хронических стрептококковых инфекций (скарлатина, ангина, импетиго, ревматизм, нефрит и т.п.) и стрептококк группы D (энтерококк) условно-патогенный микроб характеризующий пригодность воды для питьевых целей. В испытуемых образцах через 30 минут концентрация стрептококка группы D снижалась до 135 раз, а стрептококка группы А до 900 раз по сравнению с контрольными образцами.

В работе М.Д. Дриаевой и соавт. [28] приведены данные по влиянию шунгита на различные виды микроорганизмов. Объектом исследования служили представители различных семейств патогенных, условно-патогенных и непатогенных микроорганизмов. Растворы на основе шунгита авторы получали путем внесения в стерильный физиологический раствор в объёме 100 мл по 5 и 10 г шунгитовой крошки, которая предварительно стерилизовалась при 1 атм. 30 мин. Опыты показали выраженное ингибирующее воздействие на микроорганизмы. Установлено, что наибольшие бактерицидные свойства шунгита проявляются в 10% концентрации через 48 часов инкубации на *E.coli*, *Salm. enteridis* и *C. diphteria*. Наиболее устойчивыми оказались условно-патогенные микроорганизмы *St. aureus* и *C. albicans*.

Учитывая массовость различных рекомендаций по применению шунгитовой воды с акцентированием внимания на её бактерицидные свойства, простоту и доступность её получения, возникает необходимость более детального изучения минерального состава шунгитовой воды с про-

веркой способности её воздействия на биологические объекты. Кроме того, в литературе акцентируется внимания на ведущей роли фуллеренов в придании шунгитовой воде биологической активности.

1.2. Шунгит – природный источник фуллеренов

В настоящее время большое внимание уделяется перспективам развития нанотехнологий, получению наноматериалов и одно из ведущих мест здесь занимают фуллерены [36]. В 1992 году в Шуньгских антраксолитах Карелии были впервые обнаружены фуллерены. Это событие было воспринято с большим энтузиазмом, поскольку появилась надежда на получение природного источника фуллеренов [47]. Значимость открытия фуллеренов подтверждается тем фактом, что в 1996 году Ричард Смолли, Роберт Керл и Харольд Крото были удостоены Нобелевской премии по химии за открытие фуллеренов [90].

Фуллерены - молекулярные соединения, принадлежащие классу аллотропных форм углерода (другие - алмаз, карбин и графит) и представляют собой выпуклые замкнутые многогранники, составленные из четного числа трехкоординированных атомов углерода. Эти соединения, образованные только атомами углерода, могут быть получены при помощи вольтовой дуги, лазерной абляции («выжиганием»), химическим осаждением из газовой фазы, а также в процессе горения. Известно, что фуллерены хорошо растворимы в органических растворителях - бензоле, толуоле, четыреххлористом углероде, что с успехом используется для отделения фуллеренов из сажи [36]. Впервые молекулы фуллеренов, состоящие из полиэдрических C_{60} и C_{70} атомов углерода были обнаружены в 1985 году при лазерном облучении твёрдого графита. Позже фуллерено-подобные структуры были обнаружены не только в графите, но и в образующейся в дуговом

разряде на графитовых электродах саже, а также в природном минерале шунгите (0,001%). Кристалл, образованный молекулами фуллеренов (фуллерит) является молекулярным кристаллом; переходной формой между органическим и неорганическим веществом. Плотность фуллерита составляет $1,7 \text{ г/см}^3$, что значительно меньше плотности графита ($2,3 \text{ г/см}^3$), шунгита ($2,1 - 2,4 \text{ г/см}^3$) и алмаза ($3,5 \text{ г/см}^3$).

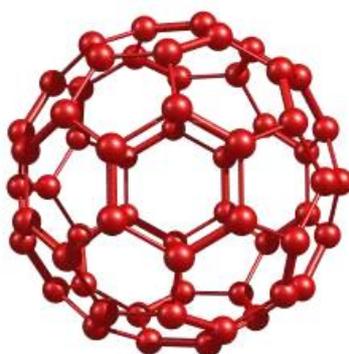


Рис. 1. Молекула фуллерена C_{60}

Характерной особенностью структуры фуллеренов является то, что атомы углерода расположены в вершинах правильных шести- пятиугольников, покрывающих поверхность формирующейся графитовой сферы или эллипсоида и составляют замкнутые многогранники, состоящие из чётного числа трёхкоординированных атомов углерода (рис. 1). Атомы углерода, образующие сферу, связаны между собой ковалентной связью.

Докт физ.-мат. наук Мастеров В.Ф. в 1998 г., завершив научную работу по изучению свойств фуллерена, опубликовал свои выводы и заключения:

- фуллерен является четвёртой аллотропной формой углерода;
- фуллерен C_{60} имеет очень прочную сферическую форму – тетраэдр (внутри полый) и размер около 10 нм;
- все 60 атомов расположены на поверхности сферы имея между собой связи в виде пятиугольников и шестиугольников;

- «...молекула C₆₀ содержит фрагменты с пятикратной симметрией, которые «запрещены» природой для неорганических молекул. В связи с этим мы должны признать, что молекула фуллерена является органической молекулой, а сам фуллерен представляет собой молекулярный кристалл, являющийся связующим звеном между органической и неорганической материей» [45]. Этими выводами Мастеров В. Ф. подтвердил гипотезу доктора Бусека, открывшего наличие природных фуллеренов в Максовите о том, что фуллерен – это протобактерия, с которой началась вся жизнь на Земле. Позже эта гипотеза была подтверждена и в других странах.

Известны химические способы выделения фуллерена, основанные на измельчении шунгитовой породы, а затем воздействию на нее кипящего сероуглерода в течение 18 часов. После этого из раствора путем выпаривания получают осадок, который растворяют в толуоле и используют для анализа присутствия фуллерена с помощью жидкостной хроматографии высокого давления [36].

В биотехнологическом плане препараты шунгита интересны тем, что они обладают выраженным бактерицидным эффектом, обновляют клетки, обогащая их необходимыми веществами, обладают исключительными антиоксидантными свойствами, что может способствовать решению проблемы антиоксидантной защиты организма человека и животных [29, 32, 37, 79].

Несмотря на длительный период использования шунгита остается много неизвестного об этой горной породе. Исследователи отмечают что, органоминеральный комплекс шунгита представлен разнообразной смесью сложных веществ, которые выходят в раствор вместе с фуллеренами и определяют их свойства [5, 30, 36]. Установлено, что фуллерены хорошо растворяются в органических растворителях – бензоле, толуоле, четыреххлористом углероде, то есть в физиологически неприемлемых условиях.

Проблема растворимости фуллерена стоит особенно остро в связи с его потенциальным применением в медицине, в водной среде он практически нерастворим ($<10^{-11}$ г/л) [5, 71, 79]. При этом все положительные свойства шунгитовой воды исследователи неизменно связывают именно с присутствием в ее составе гидратированных молекул фуллеренов C₆₀, заключенных в объемную оболочку из молекул воды. Отмечено, что гидратированные фуллерены проявляет широкий спектр биологического действия как *in vivo*, так и *in vitro* даже в крайне низких дозах, при полном отсутствии токсичности [14, 49, 83]. Однако по нашему мнению это несколько односторонняя трактовка, так как один элемент – фуллерен в водной оболочке не может быть причастен к целому спектру уникальных свойств шунгитовой породы.

Согласно исследованиям вода, настоянная на шунгите, становится молекулярно-коллоидным раствором, с многоплановым биологическим действием благодаря естественному выходу из шунгита в воду фуллеренов (наномолекул). Следует отметить, что механизм взаимодействия шунгита с водой окончательно не изучен [86].

Известный метод получения гидратированных фуллеренов заключается в переносе фуллеренов C₆₀ из растворов в органическом растворителе в водную фазу с использованием ультразвуковой обработки смеси с последующим удалением органического растворителя. В результате получается истинный молекулярно-коллоидный раствор фуллеренов.

Уникальные свойства фуллеренов обусловлены их высокой реакционной способностью за счет большого количества свободных валентностей углерода. Одним из способов введения фуллеренов в организм - инкапсуляция в липидную везикулу. Фуллерен C₆₀ может быть доставлен в раковые клетки человека *HeLa* в сферических липидных оболочках. Однако для

применения в биомедицине чистые фуллерены малопригодны в силу их нерастворимости в водных растворах и, как следствие, ограничений по используемым концентрациям [42].

К основному недостатку фуллеренов, как уже было сказано выше, относится то, что они растворяются в органических растворителях, а в воде - с большим трудом. Но если они растворены в воде, вокруг каждого шара образуется многослойная оболочка из правильно расположенных молекул воды, примерно в десять молекулярных слоев. Эта водная или гидратная оболочка молекулы фуллерена и есть структурированная вода.

Поскольку диаметр гидратной оболочки десятикратно превышает поперечник углеродной сферы, ее объем, а, соответственно, и масса структурированной фуллереном воды будет пропорциональна кубу линейного размера - и превысит массу фуллерена примерно в тысячу раз. Таким образом, фуллерен структурирует в сотни раз большую массу воды, что придает ей существенные отличия от обычной. В частности, она замерзает не при 0, а при $-2,8^{\circ}\text{C}$. В шунгитовом растворе выделяется два сорта воды: структурированная вода, окружающая фуллерен и биомолекулы, и свободная вода. При выпаривании растворов в первую очередь испаряется именно свободная вода. Присутствие в растворе фуллерена повышает устойчивость биомолекул - белков, ДНК к тепловым воздействиям [13, 14].

Широкое использование фуллеренов открывает не только новые перспективы в различных отраслях промышленности, но и может представлять опасность загрязнения ими воды и пищевых продуктов. Последствия воздействия фуллеренов на живые организмы недостаточно изучено [85].

Актуальность настоящей работы значима в плане современных нанотехнологий для выявления и создания новых материалов для биологии и медицины, среди которых значительное место занимают наноуглеродные наноструктуры, присутствующие в минерале – шунгите. Кроме того, шун-

гит обладает свойствами антиоксиданта, способного повысить иммунитет человека по отношению ко многим серьезным заболеваниям. Необходимо также более детально провести изучение минерального состава шунгитовой воды в плане её воздействия на биологические объекты в связи с появлением различной информации о полезных свойствах шунгита и бактерицидных свойствах шунгитовой воды. В целях подтверждения присутствия фуллеренов в составе щебня шунгита в лаборатории химического анализа ФГБУ «ВНИИЗЖ» с участием доктора химических наук, профессора Владимирского государственного университета В.Г. АМЕЛИНА были проведены соответствующие исследования.

1.3. Извлечение фуллеренов из шунгита с использованием бромбензола

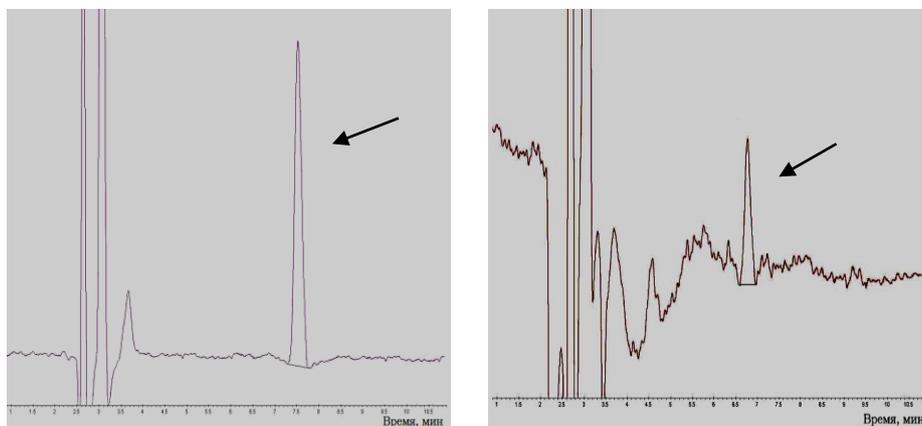
Известно, что фуллерены нерастворимы в полярных растворителях, но растворяются в галогенароматических соединениях и могут быть извлечены из различных объектов путем экстракции неполярными органическими растворителями. В качестве растворителя авторами был выбран бромбензол, поскольку в нём C_{60} и C_{70} имеют достаточно высокую растворимость (3,3 мг/мл и 2,8 мг/мл соответственно). Использовали бромбензол, ос.ч. по ТУ 6-09-3774-74, ацетонитрил для хроматографии (Merck, Германия) [2, 62].

Растворы фуллеренов в бромбензоле имеют максимумы поглощения в области 320 – 350 нм. Установлено, что хроматографическое определение фуллеренов с детектированием при длине волны 340 нм обладает большей чувствительностью, поскольку для обоих компонентов: интенсивность сигнала и площадь хроматографического пика превосходят соответствующие показатели при длине волны 320 нм.

Пробоподготовка при анализе шунгита. Навеску порошка шунгита массой 5г помещали в колбу вместимостью 50 мл и добавляли 30 мл бромбензола. Колбу плотно закрывали и оставляли на 2 недели. Затем отбирали около 4 мл бромбензольного экстракта, фильтровали через целлюлозно-ацетатный фильтр с размером пор 0,22 мкм и переносили в виалу с пластиковой вставкой и хроматографировали.

В работе использовали высокоэффективный жидкостной хроматограф Varian 940-LC, включающий систему подачи растворителей (два насоса высокого давления, смеситель), секцию ввода образцов (автосемплер и ручной инжектор), хроматографическую колонку (Pursit XRs, C₁₈ 250 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм), спектрофотометрический детектор и компьютерную систему обработки хроматографических данных (Galaxie Chromatography Data System).

Выявление фуллерена C₆₀ в шунгите. Хроматограммы бромбензола, которым проводили извлечение фуллерена из шунгита в течение двух недель и бромбензольного экстракта из воды, настоянной на шунгите, приведены на рис. 2. Установлено, что при экстракции бромбензолом из порошкообразного шунгита извлекается 0,008 масс. % фуллерена C₆₀. Фуллерен C₆₀ переходит из измельченного шунгита в воду в количестве 0,06 мкг/г, что составляет $6 \cdot 10^{-6}$ масс. %. Фуллерен C₇₀ в шунгите не обнаружен.



а)

б)

Рис. 2. Хроматограммы бромбензольного экстракта из шунгита (а) и бромбензольного экстракта из воды, настоянной на шунгите (б)

Приведенные хроматограммы позволяют визуально наблюдать значительные преимущества экстракции фуллеренов бромбензолом по сравнению с водой. К недостаткам данного метода относится то, что бромбензол является физиологически неприемлемым для использования при работе с живыми биосистемами.

Таким образом, результаты проведенных исследований подтверждают известные сведения о присутствии фуллеренов в составе горной породы – шунгит. Кроме того, известно, что данная порода содержит практически все химические элементы таблицы Д.И. Менделеева. Поэтому следующий раздел монографии посвящен исследованию минерального состава шунгитовой воды, получаемой в статическом режиме настаивания.

Глава 2. ПОЛУЧЕНИЕ ШУНГИТОВОЙ ВОДЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕЁ МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА

Предваряя изложение результатов исследований, следует отметить, что в выполнении экспериментов активно участвовали студенты–биологи кафедры биологии и экологии ВлГУ, по итогам которых ими оформлялись выпускные квалификационные работы (ВКР), успешно защищаемые на

комиссии ГАК. Благоприятным совпадением послужил тот факт, что в период 2008-2012 гг. кафедра биологии ВлГУ существовала на базе Федерального центра охраны здоровья животных («ВНИИЗЖ») и автор настоящей работы был задействован в качестве преподавателя. Это позволяло студентам под его руководством активно заниматься исследованиями в научных лабораториях института.

В целях расширения научных контактов в 2010 году был заключен договор с Ивановской государственной медицинской академией (ГОУ ВПО ИвГМА Росздрава) и ФГБУ «ВНИИЗЖ» о проведении совместных исследований по проблеме нанобактерий. В плане исторической справедливости следует отметить, что благодаря студентам Ивановской медицинской академии и заведующей кафедрой вирусологии и микробиологии Е.В. Гарасько были инициированы первые опыты по исследованию шунгита в лабораториях ВНИИЗЖ по воздействию шунгитовой воды на микроорганизмы. К сожалению, со сменой руководства в ФГБУ «ВНИИЗЖ» совместные исследования были прекращены, но работы были продолжены с участием студентов ВлГУ.

Первоначально нам необходимо было знать какие элементы экстрагируются из щебня шунгита в водную среду. Для этих целей готовили шунгитовую воду в различных вариантах и исследовали минеральный состав методом масс-спектропии.

Для исследований использовали покупной камень природный шунгит в виде щебня, изготовленный в соответствии с ТУ 5714-007-12862296-01 «Дробленые и молотые шунгиты Зажогинского месторождения». Отправной точкой исследований послужила сопроводительная инструкция изготовителя по использованию камня, из содержания которой следует, что горная порода – шунгит не токсична, экологически безопасна, не тре-

бует утилизации. В качестве экстрагента использовали бидистиллированную воду.

Контроль минерального состава водного экстракта проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS) на приборе Elan DRCII (PerkinElmer SCIEX Instruments, USA). Исследуемый водный раствор с помощью перистальтического насоса подается в распылитель, в котором потоком аргона превращается в аэрозоль. Через центральный канал плазменной горелки аэрозоль попадает в плазму, где под воздействием высокой температуры (7 000 – 8 000 К) вещества, содержащиеся в пробе, диссоциируют на атомы, которые затем ионизируются. Образовавшиеся положительно заряженные ионы проходят через систему ионной оптики в анализатор, где происходит фильтрация ионов по массе и детектирование ионного потока. К основному достоинству масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой относится высокая чувствительность. Для масс-спектрометров с индуктивно связанной плазмой чувствительность выражается в $\text{имп}/(\text{сек} \cdot \text{ppm})$ как интенсивность сигнала ($\text{имп}/\text{сек}$), генерируемого детектором при анализе образца с содержанием аналита 1 ppm ($\text{мкг}/\text{л}$). Заявляемая чувствительность современных ИСП-МС в зависимости от производителя колеблется в пределах порядков $10^5 - 10^7$ $\text{имп}/\text{сек}$ на легких массах (${}^7\text{Li}$), $10^6 - 10^8$ на средних и тяжелых массах (${}^{59}\text{Co}$, ${}^{115}\text{In}$, ${}^{238}\text{U}$). Кроме того, простота пробоподготовки и обслуживания, высокая скорость анализа: время измерения на все элементы ~ 3 минуты, а также большой динамический диапазон измеряемых концентраций (7-8 порядков) и небольшое количество анализируемого раствора – 3 - 5 мл [43].

Масс-спектрометрический анализ был проведен на базе ФБГУ «ВНИИЗЖ» в лаборатории химического анализа в исполнении кандидата химических наук И.В. Подколзина.

2.1. Содержание минеральных веществ в воде в зависимости от массы навески щебня шунгита

Для определения оптимального соотношения «твердая фаза- бидистиллированная вода» по выходу химических элементов использовали щебень шунгита, из которого готовили навески 10, 20, 30, 40 и 50 г. При проверке по электропроводности было установлено, что все используемые камешки показали высокую проводимость, то есть соответствовали по физическим свойствам шунгитовой породе. Промытые и просушенные навески щебня помещали в отдельные флаконы с бидистиллированной водой. Экспозиция при комнатной температуре при периодическом перемешивании составляла 5 суток. Затем отбирали пробы шунгитовой воды и передавали для контроля минерального состава. Значение водородного показателя – рН раствора во всех пяти образцах находилось в пределах 2,8-3,5. Результаты исследований приведены в табл. 3.

Образцы шунгитовой воды и контрольный образец воды, взятой в качестве экстрагента, исследовали методом масс-спектрометрии на наличие минеральных составляющих. На основании анализа была получена качественная и количественная характеристики водных растворов по химическим элементам. В процессе контактирования твердой (шунгит) и жидкой фаз (вода) экстрагировалось в среднем до 60 химических элементов в различных концентрациях, которые в соответствие с биогенной классификацией химических элементов А.В. Бгатова [4] разделяли на две основные группы: биогенные, т.е. участвующие в метаболизме живых форм, и абиогенные, т.е. все остальные. Из биогенных элементов в таблице 3 представлены макроэлементы, эссенциальные микроэлементы, условно эссенциальные и брэйи-элементы. Абиогенные элементы подразделены на три

группы: нейтральные, конкуренты и агрессивные по отношению к живым организмам.

Следует отметить, что в биогенной классификации А.В. Бгатова отсутствуют редкоземельные ультрамикроэлементы – лантаноиды и, по логике вещей, они должны завершать данный вариант классификации химических элементов (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты экстрагирования химических элементов в зависимости от массы щебня шунгита

Химич. элементы	Концентрация мг/л					
	Н ₂ О	Щебень шунгита в граммах на 100 мл Н ₂ О				
		10	20	30	40	50
Биогенные макроэлементы						
Ca	0	0,51	1,20	1,71	1,38	4,95
Na	0	0	0,444	0,680	0,417	1,190
Mg	0	7,13	33,87	6,96	5,78	17,83
K	0	0,020	0,224	0,351	0,532	1,259
Биогенные эссенциальные микроэлементы						
Fe	0	2,95	40,28	9,96	3,92	7,58
Cu	2×10^{-3}	0,140	1,007	0,536	0,280	0,331
Zn	1×10^{-2}	2,86	5,38	3,13	3,73	12,51
Mn	0	0,073	0,242	0,135	0,065	0,357
Se	0	0	0	0,005	0	0,038
Mo	0	1×10^{-4}	2×10^{-4}	7×10^{-5}	5×10^{-6}	2×10^{-4}
Co	0	0,259	0,242	0,106	0,050	0,290
Биогенные условно эссенциальные микроэлементы						
Ni	1×10^{-4}	4,83	6,02	2,83	2,75	8,26
As	0	7×10^{-3}	6×10^{-3}	8×10^{-3}	4×10^{-3}	$1,4 \times 10^{-2}$
Br	0	5×10^{-3}	$1,6 \times 10^{-2}$	2×10^{-3}	0	$1,4 \times 10^{-2}$

Pb	0	4×10^{-3}	$1,2 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-2}$	0.12
Cd	0	0.022	0.045	0.0231	0.028	0.074
Биогенные брэйн-элементы						
Sn	0	2×10^{-5}	2×10^{-3}	1×10^{-4}	4×10^{-5}	6×10^{-3}
Ga	0	6×10^{-5}	3×10^{-4}	1×10^{-4}	0	5×10^{-5}
Ge	0	1×10^{-4}	3×10^{-4}	1×10^{-4}	5×10^{-5}	7×10^{-5}
Te	0	2×10^{-5}	1×10^{-4}	2×10^{-4}	1×10^{-5}	1×10^{-4}
Ta	0	5×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-5}	2×10^{-6}	6×10^{-6}
Абиогенные нейтральные микроэлементы						
Al	8×10^{-4}	2,91	13,71	2,33	1,26	3,52
Rb	0	0.0	2×10^{-3}	2×10^{-3}	2×10^{-3}	4×10^{-3}
Абиогенные конкурентные микроэлементы						
Ba	7×10^{-3}	4×10^{-3}	8×10^{-3}	1×10^{-2}	1×10^{-2}	2×10^{-2}
Sr	0	0	7×10^{-3}	2×10^{-3}	5×10^{-3}	3×10^{-2}
Cs	3×10^{-4}	1×10^{-2}	1×10^{-2}	1×10^{-2}	3×10^{-2}	2×10^{-2}
Неклассифицированные ультрамикроэлементы						
Sc	0	7×10^{-3}	2×10^{-2}	7×10^{-3}	0	4×10^{-3}
Zr	0	3×10^{-5}	8×10^{-5}	3×10^{-5}	2×10^{-5}	6×10^{-5}
Y	0	2×10^{-2}	$3,3 \times 10^{-2}$	2×10^{-2}	8×10^{-3}	$2,7 \times 10^{-2}$
In	0	1×10^{-5}	2×10^{-4}	7×10^{-5}	0	2×10^{-5}
Sb	0	3×10^{-5}	3×10^{-4}	2×10^{-4}	4×10^{-5}	8×10^{-4}
I	0	0	5×10^{-3}	4×10^{-4}	7×10^{-4}	0
Hf	0	2×10^{-5}	4×10^{-5}	2×10^{-5}	6×10^{-6}	3×10^{-5}
W	7×10^{-5}	6×10^{-5}	1×10^{-4}	5×10^{-5}	6×10^{-5}	8×10^{-5}
Re	0	7×10^{-7}	6×10^{-6}	1×10^{-6}	4×10^{-6}	5×10^{-5}
Tl	0	7×10^{-5}	2×10^{-4}	2×10^{-4}	3×10^{-4}	7×10^{-4}

Th	0	6×10^{-5}	8×10^{-4}	3×10^{-4}	8×10^{-6}	2×10^{-5}
U	0	9×10^{-3}	2×10^{-2}	2×10^{-2}	7×10^{-3}	1×10^{-2}
Редкоземельные ультрамикроэлементы						
La	0	3×10^{-3}	$1,2 \times 10^{-2}$	5×10^{-3}	2×10^{-3}	4×10^{-3}
Ce	0	9×10^{-3}	3×10^{-2}	$1,3 \times 10^{-2}$	4×10^{-3}	$1,1 \times 10^{-2}$
Pr	0	2×10^{-3}	5×10^{-3}	2×10^{-3}	6×10^{-4}	2×10^{-3}
Nd	0	$1,1 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-2}$	3×10^{-3}	1×10^{-2}
Sm	0	3×10^{-3}	7×10^{-3}	3×10^{-3}	1×10^{-3}	3×10^{-3}
Eu	0	8×10^{-4}	2×10^{-3}	8×10^{-4}	3×10^{-4}	8×10^{-4}
Gd	0	4×10^{-3}	8×10^{-3}	4×10^{-3}	2×10^{-3}	5×10^{-3}
Tb	0	6×10^{-4}	1×10^{-3}	6×10^{-4}	2×10^{-4}	6×10^{-4}
Dy	0	3×10^{-3}	5×10^{-3}	3×10^{-3}	1×10^{-3}	4×10^{-3}
Ho	0	6×10^{-4}	1×10^{-3}	6×10^{-4}	2×10^{-4}	8×10^{-4}
Er	0	1×10^{-3}	2×10^{-3}	1×10^{-3}	4×10^{-4}	2×10^{-3}
Tm	0	1×10^{-4}	2×10^{-4}	1×10^{-4}	4×10^{-5}	2×10^{-4}
Yb	0	8×10^{-4}	1×10^{-3}	8×10^{-4}	2×10^{-4}	1×10^{-3}
Lu	0	1×10^{-4}	2×10^{-4}	1×10^{-4}	3×10^{-5}	2×10^{-4}

Из данных таблицы следует, что в процессе экстрагирования отсутствует четкая зависимость между массой шунгита и выходом химических элементов. Это объясняется гетерогенностью щебня шунгита в каждой навеске, что является существенным недостатком при работе с данным минералом. Так, например, визуально было отмечено явно выраженное присутствие включений железа в составе отдельных частиц щебня.

Из таблицы 3 следует, что наряду с биогенными макро- и микроэлементами в водных экстрактах присутствуют биогенные условно эссенциальные микроэлементы, стабильно выявляемые в микроколичествах в организме человека и животных. По классификации А.В. Бгатова имеются

микроэлементы с неизведанными функциями, объединенные в группу под общим названием «брэйн-элементы». В группу нейтральных элементов включены микроэлементы, относительно высокие концентрации которых живой организм переносит достаточно безболезненно [4].

Неклассифицированные в биологическом плане ультрамикроэлементы, такие как цирконий, индий, сурьма, йод, гафний, вольфрам, рений, таллий, торий и уран в шунгитовой воде выявляются в концентрации от 10^{-6} до 10^{-2} мг/л.

К главным особенностям шунгитовой воды относится то, что в её минеральный состав включено семейство редкоземельных ультрамикроэлементов - лантаноидов, которые сходны между собой по химическим свойствам и физическому строению. В таблице 3 приведены данные по содержанию лантаноидов в водном экстракте шунгита. В контрольном образце воды отмечается их полное отсутствие.

По результатам повторных опытов было установлено, что оптимальное соотношение экстрагент/шунгит составляет: на 1 литр бидистиллированной воды 200 г щебня среднего размера, который проходит через горлышко стеклянных лабораторных флаконов. Использование порошка шунгита при получении шунгитовой воды не показало существенного отличия в выходе минеральных элементов.

Резюмируя результаты проведенных исследований следует отметить, что в процессе экстрагирования из твердого природного материала – шунгита в водную среду переходят макро-, микро- и редкоземельные ультрамикроэлементы, следствием чего является образование водного раствора с рН 2,8-3,5 или так называемой «шунгитовой воды».

2.2. Влияние режима подготовки щебня шунгита на выход химических элементов

В соответствии с инструкцией изготовителя шунгита подготовка щебня шунгита для использования должна проводиться следующим образом. Щебень весом 1,5 кг промыть проточной водой до тех пор, пока вода не станет чистой. Прокипятить щебень в течение 10-15 мин в 3-5 л воды. Затем поместить шунгит в стеклянную или эмалированную посуду и заполнить 7-10 л воды. Настаивать воду не менее суток, затем слить и использовать для питья, приготовления чая, пищи. По мере загрязнения, выделяющимися из воды осадками, шунгит следует промыть и просушить. После длительного использования, для восстановления свойств щебня, его необходимо подержать на солнечном свете (например, на подоконнике) Для лучшего эффекта очистки, замену щебня производят каждые полгода.

В нашей работе предварительная подготовка шунгита к использованию была выполнена в двух вариантах. Средняя масса кусочков щебня составляла $14 \pm 2,7$ г., характерным признаком которых являлось отчетливо наблюдаемые включения цвета ржавчины, по-видимому, вследствие присутствия железа (рис. 3). Вторым существенным фактором являлось то, что при контакте с данным видом щебня в водной среде изменялся водородный показатель до pH 2,5-3,0.



Рис. 3. Образцы щебня шунгита с конкрециями железа

Это обусловлено тем, что кислотность водных растворов с шунгитом обусловлена образованием серной кислоты. Поверхность шунгита Зажонгинского месторождения покрыта сернистыми соединениями и когда его погружают в воду, образуется кислота. Эта серная кислота в воде начинает разрушать сам шунгит и выделяет из него практически всю таблицу Д.И. Менделеева с образованием концентрированного шунгитового настоя с рН 2,5-3,0 [31].

В работе Булаева А.Г. и Пименова Н.В. [9] отмечается, что «сульфидные минералы, содержащиеся в рудах, начинают активно контактировать с водой и кислородом воздуха. В результате происходит образование серной кислоты и снижение рН среды». Минералы подвергаются растворению под воздействием серной кислоты. Итогом является извлечение химических элементов и переходом в раствор ионов металлов. Экспериментами было показано, что при длительной промывке шунгита водопроводной водой кислотность снижается, но может быть восстановлена при предварительной термообработке шунгита при температуре 200-300°C в течение 2 часов [93].

По первому варианту навески щебня шунгита массой по 100 г последовательно промывали в водопроводной, дистиллированной и бидистиллированной воде. По второму варианту идентичные навески шунгитового щебня промывали в проточной воде и затем кипятили 15 мин в дистиллированной воде.

Затем щебень просушивали в сушильном шкафу при температуре 80С в течение 30-50 мин и использовали для собственно процесса экстрагирования. В качестве экстрагента использовали бидистиллированную воду, которую заливали по 0,5 л в стеклянные флаконы и вносили подготов-

ленные навески шунгита. Последовательно через 42 и 120 часов экстрагирования отбирали образцы шунгитовой воды по 100 мл и помещали на +4°C [62].

В табл. 4 приведены данные по содержанию в шунгитовой воде наиболее распространенных в живой природе химических элементов, которые формируют группу макроэлементов.

Таблица 4 - Содержание макроэлементов в шунгитовой воде в зависимости от условий подготовки и времени экстрагирования

№№ п/п	Образцы шунгитовой воды	Концентрация макроэлементов (мг/л)					Отношение Na/K
		Na	K	Ca	Mg	Si	
1	Промывка щебня и 42 часа экстракции	0,44	0,07	1,52	6,64	0,37	6,28
3	Кипячение щебня и 42 часа экстракции	0,38	0,19	3,86	4,15	1,12	2,0
2	Промывка щебня и 120 часов экстракции	0,63	0,08	6,86	13,8	0,93	7,8
4	Кипячение щебня и 120 часов экстракции	0,52	0,19	4,63	6,15	1,75	2,7
5	Контрольный образец - вода	0,1	7×10^{-4}	6×10^{-2}	8×10^{-3}	1×10^{-2}	-

Из данной таблицы следует, что между промывкой и кипячением камней с заливкой их бидистиллированной водой существенные различия по выходу макроэлементов натрия, калия и кальция отсутствуют. Усредненные данные по содержанию магния свидетельствуют о большем выходе данного элемента из промытых камней по сравнению с кипяченными, со-

ответственно - 10,2 и 5,15 мг/л. А по выходу кремния картина обратная - 0,65 и 1,43 мг/л.

В табл. 5 приведены данные выхода из щебня шунгита эссенциальных микроэлементов в зависимости от времени экстракции.

Таблица 5 - Содержание жизненно необходимых микроэлементов в экстрактах шунгитовой воды

№ п/п	Образцы шунгитовой воды	Эссенциальные микроэлементы (мг/л)						
		Fe	Cu	Zn	Mn	Cr	Mo	Co
1	Промывка щебня и 42 часа экстракция	6,03	0,24	1,9	0,12	4×10^{-3}	1×10^{-4}	0,06
3	Кипячение щебня и 42 часа экстракция	0,22	0,048	1,05	0,05	0,0	6×10^{-5}	0,03
2	Промывки щебня и 120 часов экстракция	15,4	0,52	4,12	0,28	0,02	2×10^{-4}	0,13
4	Кипячение щебня и 120 часов экстракция	1,31	0,24	2,52	0,13	4×10^{-4}	1×10^{-5}	0,07
5	Контрольный образец- вода	0,0	6×10^{-4}	8×10^{-3}	2×10^{-4}	0,0	0,0	0,0

Опыт показал, что наиболее высокий выход микроэлементов получен после промывки щебня. Например, увеличение времени экспозиции в 2,8 раза дает прирост содержания железа в 2,6 раза. По выходу условно эссенциальных элементов отмечено присутствие так называемой «узко специализированной группы элементов»: литий $1-2 \times 10^{-2}$ мг/л; никель из просто промытых камней – 1,5 и 3,6 мг/л и кипяченных – 0,4 и 1,0 мг/л; кадмий – $1-3 \times 10^{-2}$ мг/л и свинец 1×10^{-3} мг/л

Из группы нейтральных абиогенных элементов при увеличении времени экстрагирования с 42 до 120 часов отмечается интенсивный выход алюминия из промытых камней соответственно – 5,8 и 13,5 мг/л, и гораздо

меньший выход после обработки камней кипячением – 0,4 и 2,2 мг/л. Выход рублидия независимо от режима подготовки составляет 1×10^{-3} мг/л и титана $-2-6 \times 10^{-3}$ мг/л.

Из опытов следует, что предварительное кипячение уменьшает экстракцию химических элементов в 2-3 раза по сравнению с простой промывкой, то есть на этапе кипячения происходит интенсивная диффузия части химических элементов. При контроле воды по водородному показателю установлено, что в шунгитовой воде отмечается снижение рН до 3,3-3,5 от значения рН 7,5 исходной воды. Рожкова В.С. и соавт. указывают на колебания рН – водных вытяжек в зависимости от месторождения шунгита [76].

В табл. 6 приведены данные по экстракции редкоземельных ультрамикрорэлементов в зависимости от времени настоя щебня шунгита. Из таблицы следует, что экстракция редкоземельных элементов характеризуется повышенными концентрациями в среднем на один порядок при идентичном времени экстрагирования из промытых камней по сравнению с камнями после кипячения.

Таблица 6 - Содержание в шунгитовой воде ультрамикрорэлементов – лантаноидов

№№ п/п	Содержание редкоземельных элементов (мг/л)													
	La	Ce	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
1	9×10^{-3}	2×10^{-2}	4×10^{-3}	2×10^{-2}	4×10^{-3}	1×10^{-3}	5×10^{-3}	6×10^{-4}	3×10^{-3}	4×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-4}	6×10^{-4}	1×10^{-4}
2	2×10^{-2}	5×10^{-2}	8×10^{-3}	4×10^{-2}	1×10^{-2}	2×10^{-3}	1×10^{-2}	1×10^{-3}	7×10^{-3}	1×10^{-3}	2×10^{-3}	3×10^{-4}	2×10^{-3}	2×10^{-4}
3	2×10^{-3}	3×10^{-3}	5×10^{-4}	2×10^{-3}	4×10^{-4}	1×10^{-4}	6×10^{-4}	8×10^{-5}	4×10^{-4}	6×10^{-5}	1×10^{-4}	2×10^{-5}	8×10^{-5}	1×10^{-5}

4	7× 10 ⁻³	2× 10 ⁻²	2× 10 ⁻³	1× 10 ⁻²	2× 10 ⁻³	6× 10 ⁻⁴	4× 10 ⁻³	4× 10 ⁻⁴	2× 10 ⁻³	4× 10 ⁻⁴	8× 10 ⁻⁴	9× 10 ⁻⁵	4× 10 ⁻⁴	7× 10 ⁻⁵
---	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------

Примечание: №1 и №2 – экстрагирование из образцов шунгитовой воды после промывки щебня в проточной воде; №3 и №4 – после кипячения щебня шунгита в воде в течение 15 мин.

Определившись с тем, что наиболее высокий выход химических элементов отмечается при подготовке камней шунгита обычной промывкой против кипячения, все последующие опыты проводились без кипячения. Для более детального понимания процесса экстрагирования при простом настаивании были проведены опыты по последовательному получению водных экстрактов из одной партии щебня шунгита (табл. 7).

Таблица 7 – Выход лантаноидов при последовательном их экстрагировании из щебня шунгита

Элементы	1 экстракт		2 экстракт		3 экстракт	
	Мг/л	Относит. содерж. (%)	Мг/л	Относит. содерж. (%)	Мг/л	Относит. содерж. (%)
Y	4,4	18,7	1,4	14,3	0,36	11,6
La	3,12	13,3	1,35	13,8	0,37	11,9
Ce	7,22	30,8	3,26	33,4	1,13	36,4
Pr	1,06	4,5	0,46	4,7	0,15	4,8
Nd	3,98	17	1,84	18,8	0,69	22,2
Pm	0,87	3,7	0,41	4,2	0,16	3,9
Sm	0,25	1,0	0,1	1,0	0,03	1,0
Eu	1,12	4,8	0,48	4,9	0,16	5,2
Gd	0,14	0,6	0,05	0,5	0,02	0,6
Tb	0,65	2,8	0,22	2,2	0,06	1,9
Dy	0,12	0,5	0,04	0,4	0,01	0,3
Ho	0,27	1,2	0,08	0,8	0,02	0,6
Er	0,03	0,1	0,009	0,1	0,002	0,06
Tm	0,18	0,8	0,05	0,5	0,01	0,3
Yb	0,025	0,1	0,007	0,1	0,002	0,06
Lu						

Из табл. 7 следует, что процесс последовательного экстрагирования сопровождается истощением десорбирующей способности щебня шунгита, так как в водную среду с рН 2,0-2,5 из щебня шунгита переходят лантаноиды в уменьшающейся концентрации при сохранении относительного процентного содержания в экстракте каждого из элементов.

2.3. Выход химических элементов при использовании родниковой воды в качестве экстрагента

Учитывая массовость предложений по бытовому использованию шунгитовой воды логическим продолжением опытов с шунгитом послужили эксперименты по использованию в качестве экстрагента родниковой воды, которая содержит определенное количество заложенных природой растворенных минеральных солей. Для очистки от взвешенных частиц и возможных примесей органической природы образцы воды предварительно очищали пропуском через микрофильтр с диаметром пор 450 нм и ультрамикрофильтр с диаметром пор 15 нм. Ультрафильтрат (УФЛ) использовали в качестве экстрагента минеральных составляющих из щебня шунгита (табл. 8).

Таблица 8. Выход химических элементов из щебня шунгита при использовании в качестве экстрагента родниковой воды очищенной методом ультрафильтрации

Хим. Элем.	Родник «Зелени»				Родник «Никольское»			
	Исх. H ₂ O	УФЛ	УФЛ+ шунгит	Прирост	Исх. H ₂ O	УФЛ	УФЛ+ шунгит	Прирост
Биогенные макроэлементы (мг/л)								
Ca	115,7	109,6	129,7	+20,1	43,2	42,4	117,5	+75,1
Mg	19,74	18,94	23,6	+4,66	10,91	10,54	15,2	+4,66
K	12,54	11,30	14,6	+3,3	3,40	3,40	4,42	+1,02

Na	23,20	21,88	26,01	+4,13	11,62	11,52	12,32	+0,8
Si	9,50	9,13	8,8	-0,33	8,72	10,7	3,5	-7,2
P	0,18	1×10^{-3}	0	-1×10^{-3}	0,12	8×10^{-2}	0	$+8 \times 10^{-2}$
Эссенциальные или жизненно необходимые микроэлементы (мг/л)								
Fe	0,385	0,302	0,63	+0,33	0,12	0,10	2,71	+2,61
Cu	2×10^{-2}	2×10^{-2}	1×10^{-2}	-1×10^{-2}	2×10^{-3}	5×10^{-3}	0,13	+0,125
Zn	1×10^{-2}	2×10^{-2}	0,1	+0,08	5×10^{-3}	2×10^{-2}	0,8	+0,8
Mn	8×10^{-4}	9×10^{-4}	6×10^{-3}	$+2 \times 10^{-3}$	3×10^{-3}	4×10^{-3}	0,1	+0,1
Mo	2×10^{-4}	2×10^{-4}	1×10^{-2}	$+1 \times 10^{-3}$	2×10^{-4}	0,0	9×10^{-4}	$+9 \times 10^{-4}$
Cr	1×10^{-2}	1×10^{-2}	2×10^{-3}	-7×10^{-3}	3×10^{-3}	3×10^{-3}	0	-3×10^{-3}
Co	1×10^{-4}	5×10^{-4}	0,01	$+1 \times 10^{-3}$	5×10^{-5}	2×10^{-4}	3×10^{-2}	$+3 \times 10^{-2}$
Условно эссенциальные микроэлементы (мг/л)								
Ni	0,0	1×10^{-3}	0,22	+0,22	3×10^{-3}	1×10^{-3}	0,7	+0,7
As	4×10^{-4}	5×10^{-4}	0,01	$+1 \times 10^{-2}$	7×10^{-4}	6×10^{-4}	6×10^{-3}	$+5 \times 10^{-3}$
Cd	0	0	2×10^{-3}	$+2 \times 10^{-3}$	0	0	2×10^{-2}	$+2 \times 10^{-2}$
Li	3×10^{-2}	3×10^{-2}	3×10^{-2}	0	2×10^{-2}	2×10^{-2}	4×10^{-2}	$+2 \times 10^{-2}$
Pb	1×10^{-4}	2×10^{-3}	4×10^{-4}	-2×10^{-3}	3×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-3}	0
Брэйн-элементы (мг/л)								
Sn	1×10^{-2}	4×10^{-3}	2×10^{-3}	-2×10^{-3}	5×10^{-3}	3×10^{-3}	2×10^{-3}	$+0,1 \times 10^{-3}$
Ga	6×10^{-4}	0,0	5×10^{-5}	$+5 \times 10^{-5}$	0,0	0,0	0,0	0,0
Ge	4×10^{-5}	0,0	5×10^{-5}	$+5 \times 10^{-5}$	2×10^{-5}	0,0	4×10^{-5}	$+4 \times 10^{-5}$
Нейтральные абиогенные микроэлементы (мг/л)								
Rb	5×10^{-4}	7×10^{-4}	0,01	$+1 \times 10^{-2}$	3×10^{-4}	2×10^{-4}	6×10^{-3}	
Al	0,202	0,025	0,1	$+8 \times 10^{-2}$	0,02	0,02	0,4	+0,38
Ti	4×10^{-2}	8×10^{-3}	0,01	$+2 \times 10^{-3}$	4×10^{-3}	4×10^{-3}	0,01	$+6 \times 10^{-3}$
Абиогенные конкуренты (мг/л)								
Cs	1×10^{-4}	2×10^{-3}	8×10^{-4}	-1×10^{-3}	5×10^{-4}	6×10^{-3}	4×10^{-3}	$+2 \times 10^{-3}$
Ba	5×10^{-3}	5×10^{-3}	2×10^{-3}	-5×10^{-3}	7×10^{-3}	7×10^{-3}	2×10^{-2}	$+1 \times 10^{-2}$
Sr	0,311	0,300	0,26	0	0,16	0,16	0,18	+0,02
Редкоземельные ультрамикроэлементы (мг/л)								
Y	4×10^{-5}	4×10^{-5}	8×10^{-4}	$+8 \times 10^{-4}$	2×10^{-4}	4×10^{-4}	4×10^{-3}	$+4 \times 10^{-3}$
La	8×10^{-5}	3×10^{-5}	5×10^{-4}	$+5 \times 10^{-4}$	9×10^{-5}	1×10^{-4}	3×10^{-3}	$+2 \times 10^{-3}$
Ce	1×10^{-4}	0,0	1×10^{-3}	$+1 \times 10^{-3}$	6×10^{-5}	6×10^{-5}	6×10^{-3}	$+1 \times 10^{-2}$
Pr	2×10^{-5}	2×10^{-5}	2×10^{-4}	$+2 \times 10^{-4}$	5×10^{-5}	3×10^{-5}	9×10^{-4}	$+8 \times 10^{-4}$
Nd	1×10^{-5}	2×10^{-5}	7×10^{-4}	$+7 \times 10^{-4}$	1×10^{-4}	1×10^{-4}	4×10^{-3}	$+4 \times 10^{-3}$
Sm	0	0	1×10^{-4}	$+1 \times 10^{-4}$	4×10^{-5}	2×10^{-5}	1×10^{-3}	$+9 \times 10^{-4}$
Eu	8×10^{-6}	4×10^{-6}	5×10^{-5}	$+4 \times 10^{-5}$	0,0	0,0	2×10^{-4}	$+2 \times 10^{-4}$
Gd	0,0	1×10^{-5}	2×10^{-4}	$+2 \times 10^{-4}$	3×10^{-5}	4×10^{-5}	1×10^{-3}	$+1 \times 10^{-4}$
Tb	7×10^{-6}	2×10^{-6}	3×10^{-5}	$+3 \times 10^{-5}$	2×10^{-6}	7×10^{-6}	1×10^{-4}	$+1 \times 10^{-4}$
Dy	0,0	0,0	1×10^{-4}	$+1 \times 10^{-4}$	2×10^{-5}	9×10^{-6}	6×10^{-4}	$+6 \times 10^{-4}$
Ho	0,0	0,0	4×10^{-5}	$+4 \times 10^{-5}$	7×10^{-6}	7×10^{-6}	1×10^{-4}	$+1 \times 10^{-4}$

Er	0,0	0,0	1×10^{-5}	$+1 \times 10^{-5}$	0,0	0,0	2×10^{-4}	$+2 \times 10^{-4}$
Tm	0,0	0,0	1×10^{-5}	$+1 \times 10^{-5}$	2×10^{-5}	2×10^{-6}	3×10^{-5}	$+3 \times 10^{-5}$
Yb	0,0	0,0	2×10^{-5}	$+2 \times 10^{-5}$	0,0	0,0	1×10^{-4}	$+1 \times 10^{-4}$
Lu	0,0	0,0	1×10^{-5}	$+1 \times 10^{-5}$	0,0	2×10^{-6}	2×10^{-5}	$+2 \times 10^{-5}$
U	5×10^{-4}	4×10^{-4}	4×10^{-4}	0	4×10^{-4}	0,0	2×10^{-3}	$+2 \times 10^{-3}$

Из табл. 8 следует, что технология очистки воды методами микро- и ультрафильтрации позволяет сохранить солевой баланс по растворенным химическим элементам. Исходная родниковая вода, содержащая в своем составе макро- и микроэлементы, в процессе экстрагирования дополнительно обогащается химическими элементами, включая и редкоземельные ультрамикрэлементы – лантаноиды. В воду переходит большая часть химических элементов, данные по которым приведены в графе «прирост». Присутствия в исходной воде элементов группы лантаноидов, таких как Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu не выявлено, но они были выявлены в шунгитовой воде в концентрации от 1×10^{-5} до 2×10^{-4} мг/л.

2.4. Выход редкоземельных элементов при кипячении щебня шунгита в родниковой воде

Принимая во внимание рекомендации источников литературы по приготовлению на основе шунгитовой воды чая и других продуктов питания, были проведены исследования по выходу химических элементов в процессе кипячения щебня шунгита в родниковой воде. В таблице 8 представлены результаты масс-спектрометрического контроля шунгитовой воды, полученной путем кипячения ультрафильтрата родниковой воды со щебнем шунгита в соотношении 200 г на 1 литр воды. В процессе кипячения проводили последовательно отбор проб через 5, 15 и 30 мин.

Установлено, что при кипячении щебня шунгита макро-, микро- и ультрамикроэлементы экстрагируются в водную среду. Отмечен наиболее эффективный переход в воду минеральных веществ щелочного действия: кальция, магния, калия и кремния. По натрию отмечается уменьшение содержания на 30-40% против содержания в исходной воде и по фосфору на 100%.

Из данных табл. 9 следует, что с увеличением времени кипячения по отдельным ультрамикроэлементам отмечается прирост их содержания на 1 порядок.

Таблица 9. Выход редкоземельных элементов при кипячении родниковой воды со щебнем шунгита

Элементы	Опыт №1, содержание (мг/л)			Опыт №2, содержание (мг/л)	
	Время кипячения				
	5 мин	15 мин	30 мин	15 мин	30 мин
Y	5×10^{-4}	6×10^{-4}	9×10^{-4}	2×10^{-3}	8×10^{-3}
La	5×10^{-4}	$6,6 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-3}$	2×10^{-3}	8×10^{-3}
Ce	1×10^{-3}	1×10^{-3}	2×10^{-3}	$3,4 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-2}$
Pr	1×10^{-4}	1×10^{-4}	$2,8 \times 10^{-4}$	5×10^{-4}	$2,2 \times 10^{-3}$
Nd	6×10^{-4}	$4,6 \times 10^{-4}$	$8,8 \times 10^{-4}$	2×10^{-3}	1×10^{-2}
Sm	1×10^{-4}	1×10^{-4}	1×10^{-4}	4×10^{-4}	2×10^{-3}
Eu	3×10^{-5}	2×10^{-5}	3×10^{-5}	2×10^{-4}	5×10^{-4}
Gd	2×10^{-4}	1×10^{-4}	2×10^{-4}	5×10^{-4}	$2,4 \times 10^{-3}$
Tb	2×10^{-5}	2×10^{-5}	3×10^{-5}	7×10^{-5}	3×10^{-4}
Dy	6×10^{-5}	8×10^{-5}	1×10^{-4}	3×10^{-4}	1×10^{-3}
Ho	1×10^{-5}	2×10^{-5}	3×10^{-5}	6×10^{-5}	$2,4 \times 10^{-4}$
Er	3×10^{-5}	3×10^{-5}	2×10^{-5}	$1,2 \times 10^{-4}$	6×10^{-4}
Tm	6×10^{-6}	6×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-5}	8×10^{-5}
Yb	8×10^{-6}	2×10^{-5}	1×10^{-5}	8×10^{-5}	$2,7 \times 10^{-4}$
Lu	4×10^{-6}	4×10^{-6}	7×10^{-6}	5×10^{-6}	5×10^{-5}

Резюмируя результаты исследований при использовании воды в качестве экстрагента, следует отметить эффективный процесс извлечения химических элементов из природного нанотехнологического минерала – шунгита. Обогащение питьевой воды редкоземельными ультрамикрорезультатами, которые придают водному раствору биологическую активность, является известным, но недостаточно изученным фактом. Из достаточно большой информации по шунгиту наиболее активно обсуждается вопрос присутствия и выделения из состава шунгита фуллеренов, обладающих физико-химическими и биологическими свойствами [13, 36, 49, 71]. При этом все полезные свойства шунгитовой воды относили за счет присутствия именно фуллеренов. Выявление лантаноидов является относительно новым фактом, на который следует обратить самое пристальное внимание.

Результаты проведенных исследований достаточно убедительно свидетельствуют об экстрагировании в водную среду редкоземельных ультрамикрорезультатов – лантаноидов. Кроме фуллеренов наибольший интерес у исследователей и практиков вызывает шунгитовый углерод, представленный в концентрированном виде в высокоуглеродистых (до 98% углерода) шунгитовых породах. Данные обстоятельства вызывают необходимость более основательного и детального исследования присутствия редкоземельных ультрамикрорезультатов – лантаноидов в составе минерала шунгита, также обладающих уникальными свойствами.

Глава 3. КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ РАСТВОРОВ ШУНГИТОВОЙ ВОДЫ

3.1. Концентрирование методом выпаривания свободной воды

Относительно низкие концентрации химических элементов в составе растворов шунгитовой воды вызывают необходимость проведения допол-

нительного их концентрирования. Наиболее простым и доступным методом концентрирование является выпаривание кипячением.

Для приготовления экстракта щебень шунгита после промывки водопроводной водой помещали в пластиковую емкость и заливали дистиллированной водой из расчета 200 г щебня на 1 л. В процессе экстракции при комнатной температуре в течение 72 часов рН водного раствора изменялась до значений 2,5-3,0. Затем водный экстракт концентрировали выпариванием свободной воды последовательно в 10 и 20 раз относительно исходного объёма. Результаты масс-спектрометрического контроля по содержанию лантаноидов до и после концентрирования представлены в табл. 10.

Таблица 10. Концентрирование шунгитовой воды испарением при кипячении в объёмном соотношении 2000/200/100 мл

Химич. элементы	Концентрация элементов (мг/л)				Фактическая кратность концентрирования
	Размерность	Вода исходная	Первое испарение	Второе испарение	
Ca	Мг/л	5,96	52,84	106,16	8,8/17,7
Na	Мг/л	0,76	10,14	21,68	13,3/28,5
Mg	Мг/л	15,97	120,02	257,62	7,5/16,0
K	Мг/л	0,52	4,31	9,76	8,2/18,8
Si	Мг/л	2,17	19,94	42,30	9,06/19,2
Fe	Мг/л	3,34	33,96	79,19	10,1/23,6
Cu	Мг/л	0,60	5,02	10,94	8,4/18,2
Zn	Мг/л	3,73	32,41	66,70	8,8/18,0
Mn	Мг/л	0,29	2,61	5,40	8,7/18,0
Cr	Мг/л	$1,5 \times 10^{-3}$	0,02	0,05	13,3/33,3
Mo	Мг/л	3×10^{-5}	5×10^{-4}	1×10^{-3}	-
Co	Мг/л	0,13	1,06	2,44	7,8/18,0
Li	Мг/л	24	191	378	7,8/15,4
Ni	Мг/л	260	2296	4560	8,8/17,5
As	Мг/л	0,2	1,0	2,0	5,0/10,0

Cd	Мг/л	35	220	540	6,2/15,4
V	Мг/л	0,0	0,003	0,007	-
Pb	Мг/л	0,0004	0,002	0,008	-
Ga	Мг/л	0,00003	0,0004	0,001	-
Al	Мг/л	873	6568	13764	7,5/15,8
Rb	Мг/л	0,002	0,02	0,04	-
Ti	Мг/л	0,005	0,04	0,07	-
Cs	Мг/л	302	2458	4782	8,2/15,8
Sr	Мг/л	0,013	0,113	0,242	8,0/17,2
Ba	Мг/л	0,0005	0,004	0,009	8/18
La	Мкг/л	14	109	210	7,5/14,4
Ce	Мкг/л	34	251	472	7,5/14,1
Pr	Мкг/л	0,005	0,04	0,08	8/16
Nd	Мкг/л	29	218	413	7,5/14,2
Sm	Мкг/л	3,65	52	102	14,0/27,6
Eu	Мкг/л	0,75	12	25	15/31,2
Gd	Мкг/л	4,75	69	132	14,4/27,5
Tb	Мкг/л	0,001	0,008	0,02	8/20
Dy	Мкг/л	0,005	0,04	0,07	8/14
Ho	Мкг/л	0,0009	0,007	0,01	8/11
Er	Мкг/л	0,002	0,02	0,03	10/15
Tm	Мкг/л	0,0002	0,002	0,004	10/20
Yb	Мкг/л	0,001	0,01	0,02	10/20
Lu	Мкг/л	0,0002	0,001	0,003	5/15
Sc	Мкг/л	0,0004	0,004	0,007	10/17,5
Y	Мкг/л	0,03	0,258	0,501	8,6/16,7

Из данных таблицы 10 следует, что в процессе испарения свободной воды из экстракта шунгита фактическая кратность концентрирования большей части минералов меньше расчетной объёмной кратности (1:10 и 1:20). Потери макро и микроэлементов обусловлены образованием осадка в виде накипи, которую удаляли по окончании процесса кипячения. В то же время кратность концентрирования таких элементов как натрий, железо, хром, самарий, европий и гадолиний выше расчетного значения, что трудно объяснить.

В этой связи были выполнены дополнительные исследования процесс концентрирования методом выпаривания. В табл. 11 и 12 представле-

ны данные по содержанию химических элементов до и после 10–кратного концентрирования (для уменьшения объёма таблиц приведены данные по макро- и микроэлементам).

Таблица 11. Содержание макро- и микроэлементов в шунгитовой воде до и после концентрирования (n=3)

Водные экстракты	Содержание макро- и микроэлементов в (мг/л)													
	Ca	Mg	Na	K	Si	Fe	Cu	Zn	Mn	Li	Ni	Al	Cs	Sr
Исходный	6,0	16	0,8	0,4	2,2	3,3	0,6	3,7	0,3	0,025	2,6	8,7	3,0	0,014
10-крат. концентрат	52,4	118	9,4	4,4	20	34	5,2	34	2,6	0,2	23	67	24	0,11

При суммировании содержания макро- и микроэлементов до и после испарения следует, что фактическая средняя кратность концентрирования составляет 8,3 раза (потери 17%). В таблице 12 приведены данные масс-спектрометрического контроля содержания ультрамикроэлементов до и после выпаривания при кратности концентрирования 1:10 (объём/объём).

Таблица 12. Содержание ультрамикроэлементов – лантаноидов в шунгитовой воде до и после концентрирования (n=3)

Водные растворы	Содержание редкоземельных элементов (мкг/л)													
	La	Ce	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
Исходный	12	24	4	18	4	1	5	0,6	3	0,6	1	0,1	0,8	0,1
10-крат. концентрат	95	197	30	144	33	7	43	5	23	4	10	1	6	0,8

Подсчет значений выхода ультрамикроэлементов до и после выпаривания свидетельствует о фактической кратности концентрирования в 7,6 раза (потери $\geq 24\%$). В процессе экстрагирования выход лантаноидов существенно различается: относительное максимальное процентное содержание по исходному экстракту составляет для церия – 32,6%, неодиму – 24,4% и лантану – 16,3%.

3.2. Концентрирование с помощью вакуумного роторного испарителя

В целях получения более концентрированных растворов экстракта проводили выпаривание простым кипячением, а также с использованием вакуумного роторного испарителя типа RE-52AA с объёмом колбы 2 л. Действие роторного испарителя основано на понижении температуры кипения растворителя за счёт создания в его системе пониженного давления при помощи водоструйного насоса. Данный подход позволяет удалять растворитель из раствора при более низкой температуре, избегая побочных реакций, которые могут протекать при нагревании смеси. Испарение растворителя происходит из тонкой плёнки на внутренней поверхности колбы. За счёт вращения колбы эта поверхность постоянно обновляется, что значительно увеличивает скорость упаривания. Вращением колбы также достигается эффективное перемешивание раствора, снижающее вероятность его выбрасывания из колбы. Нагрев при помощи водяной бани увеличивает давление пара растворителя и также ускоряет испарение. В целях получения более концентрированных препаратов проводили испарение жидкости путем простого кипячения в объёмном соотношении 1:10 и с помощью роторного испарителя в соотношении 1:40.

Из данных табл. 13 следует, что процесс концентрирования водного экстракта шунгита на роторном испарителе при объёмной кратности 40 раз позволяет получить концентрат с фактической кратностью концентрирования 36,7, что в среднем позволяет сохранить 89,5% ультрамикрорезультатов. Концентрирование простым кипячением при объёмной кратности 10 позволяет получить фактическую среднюю кратность концентрирования 7,9 и выход по лантаноидам составляет 79%.

Таблица 13. Данные по концентрированию лантаноидов на роторном испарителе и простым выпариванием

Лантаноиды	Концентрация элементов (мкг/л)			Фактическая кратность концентрирования
	Водный экстракт шунгита	Роторный испаритель	Испарение кипячением	
Лантан	12	416	95	36,6/7,9
Церий	24	894	197	37,2/8,2
Празеодим	4	134	30	33,5/7,5
Неодим	18	631	144	35,0/8,0
Самарий	4	151	33	37,8/8,25
Европий	1	38	7	38,0/7,0
Гадолиний	6	200	43	33,3/7,2
Тербий	0,7	24	5	34,2/7,1
Диспрозий	3	112	23	37,3/7,6
Гольмий	0,6	20	4	33,3/6,6
Эрбий	1	40	10	40/10
Тулий	0,1	4	1	40/10
Иттербий	0,8	30	6	37,5/7,5
Лютеций	0,1	4	0,8	40,0/8,0

Водородный показатель концентрированных растворов сохраняет значение рН 2,3-2,6. Ю.К. Калинин отмечает, что поверхность шунгита покрыта сернистыми соединениями и при его погружении в воду, образуется

кислота. Эта серная кислота в воде начинает разрушать сам шунгит и, как результат, из него выделяется практически вся таблица Д.И. Менделеева [31, 93].

Жёсткость воды – совокупность химических и физических свойств воды, связанных с содержанием в ней растворённых солей щёлочноземельных металлов, главным образом, кальция и магния. Сравнительный анализ показывает, что в процессе выпаривания кипячением соли жесткости кальций и магний переходят в осадок, тогда как при роторном испарении они остаются в растворе. Несмотря на несколько большие потери ультрамикрорезультатов элементов в процессе кипячения был оставлен именно этот метод из соображений уменьшения содержания солей жесткости.

Принимая во внимание то, что лантаноиды относятся к тяжелым металлам, была проверена вероятность их расслоения и сохраняемость при длительном хранении. Концентрированные растворы оставляли на хранение при температуре 4°C в плоских 1,5 л матрасах в вертикальном положении. Через 7 месяцев хранения для контроля минерального состава провели отбор проб растворов в следующем порядке. Стеклопипеткой брали раствор с верхней части матраса (образец - "верх"). Затем второй пипеткой со дна матраса (образец - "низ"). Содержимое матраса перемешивали и брали усредненную пробу (образец - "сред."). В таблице 14 приведены результаты масс-спектрометрического контроля образцов водных экстрактов.

Таблица 14. Результаты контроля содержания ультрамикрорезультатов после хранения водных экстрактов в течение 7 месяцев

Лантаноиды (мкг/л)	Опыт №1			Опыт №2			Опыт №3		
	Верх	Низ	Сред.	Верх	Низ	Сред.	Верх	Низ	Сред.
Лантан	114,0	114,0	113,9	64,4	63,4	54,5	46,3	56,5	49,4
Церий	254,6	252,7	254,2	144,0	142,3	122,2	100,5	126,4	107,5

Празеодим	37,5	37,2	37,4	21,8	21,6	18,5	14,7	19,1	15,6
Неодим	170,6	169,2	169,8	100,3	99,2	85,4	67,6	87,7	71,3
Самарий	40,6	40,3	40,7	24,0	23,7	20,5	16,3	21,1	17,5
Европий	10,2	10,2	10,2	6,0	5,9	5,1	4,1	5,2	4,4
Гадолиний	45,1	45,1	45,5	26,8	26,4	22,8	18,7	23,7	20,1
Тербий	4,4	4,2	4,3	1,2	1,4	1,5	3,8	3,3	3,4
Диспрозий	29,4	28,9	29,0	17,5	17,1	14,6	12,1	15,1	12,8
Гольмий	5,3	5,2	5,3	3,2	3,1	2,6	2,2	2,7	2,3
Эрбий	12,8	12,7	12,8	7,6	7,4	6,3	5,3	6,6	5,6
Тулий	1,4	1,4	1,4	0,8	0,8	0,7	0,6	0,7	0,6
Иттербий	7,4	7,4	7,4	4,4	4,3	3,7	3,0	3,7	3,2
Лютеций	1,0	0,9	0,9	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4

Из данных табл. 14 следует, что в процессе хранения осаждения лантаноидов не происходит и концентрация их остается на исходном уровне. Эти данные свидетельствуют о том, что водные экстракты шунгита можно длительно хранить без потери их качественной и количественной характеристики.

При подведении итогов исследований по извлечению лантаноидов из щебня шунгита был проведен анализ результатов 11 опытов, выполненных в разное время с количественным контролем экстрактов методом масс-спектрологии.

Для анализа использовали данные по выходу только группы химических элементов из 15 лантаноидов. В табл. 15 включены данные, как исходных экстрактов, так и после их концентрирования выпариванием (номера опытов - 8-11). В каждом отдельном опыте определяли в процентах относительный выход каждого редкоземельного элемента, полученные данные затем суммировали и определяли среднее значение.

Таблица 15. Выход лантаноидов из щебня шунгита в процессе их экстрагирования в водную среду

Эле- мен- ты	Содержание лантаноидов в экстрактах от различных опытов (мг/л)											Отн. вых. (%)
	Оп.1	Оп.2	Оп.3	Оп.4	Оп.5	Оп.6	Оп.7	Оп.8	Оп.9	Оп.10	Оп.11	
Ce	0,11	0,16	0,24	0,3	0,33	1,13	0,5	0,532	1,01	3,26	7,22	28,0
Y	0,09	од	0,2	0,22	0,24	0,36	0,41	0,492	1,04	1,4	4,4	19,3
Nd	0,08	0,11	0,19	0,24	0,24	0,69	0,4	0,374	0,68	1,84	3,98	19,3
La	0,04	0,08	Од	0,13	0,16	0,37	0,22	0,24	0,52	1,35	3,12	12,0
Gd	0,02	0,03	0,05	0,06	0,06	0,16	0,01	0,116	0,21	0,48	1,12	5,1
Sm	0,02	0,02	0,04	0,05	0,05	0,15	0,09	0,09	0,41	0,41	0,87	4,2
Pr	0,02	0,02	0,04	0,04	0,05	0,15	0,07	0,08	0,14	0,46	1,06	4,0
Dy	0,02	0,02	0,03	0,04	0,04	0,06	0,011	0,07	0,13	0,22	0,65	3,1
Er	0,006	0,007	0,01	0,02	0,02	0,02	0,028	0,029	0,06	0,08	0,27	1,25
Eu	0,005	0,006	0,01	0,013	0,01	0,03	0,022	0,022	0,04	0,1	0,25	1,1
Yb	0,007	0,004	0,05	0,009	0,01	0,01	0,02	0,018	0,04	0,05	0,18	0,9
Tb	0,003	0,004	0,006	0,008	0,008	0,02	0,06	0,014	0,027	0,05	0,14	0,6
Ho	0,002	0,003	0,005	0,006	0,007	0,01	0,011	0,01	0,02	0,04	0,12	0,46
Tm	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002	0,002	0,003	0,003	0,006	0,009	0,03	0,12
Lu	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002	0,003	0,005	0,007	0,025	0,1

Исходя из значений плотности, лантаноиды разделяются на две группы: легкие и тяжелые. Из данных таблицы 15 следует, что максимальный выход имеют лантаноиды, относящиеся к первой легкой группе с плотностью ниже 8 г/см^3 и включающей: церий, неодим, лантан, гадолиний, самарий, празеодим и диспрозий, а также иттербий. Остальные элементы составляют вторую группу, в которых плотность, исклю-

чая иттербий, находится в промежутке между 8,272 (тербий) и 9,482 г/см³ (лютеций) [84, 85].

Удивительным совпадением данных по выходу лантаноидов в процессе экстракции из щебня шунгита в водную среду оказалось полное соответствие данным по относительному процентному содержанию группы редкоземельных элементов в земной коре: церий - 28,6%, неодим - 15,9%, лантан - 11,40%, иттербий - 17,8%, празеодим - 4,45%, самарий - 4,45% [78]. Кроме того, выявленное соответствие является подтверждением достоверности полученных экспериментальных данных, а также указывает на то, что горная порода шунгит содержит концентрированные скопления редкоземельных ультрамикроэлементов.

Из анализа результатов многочисленных научных и околонаучных сообщений и экспериментов различных авторов следует, что шунгитовая вода обладает рядом уникальных физико-химических и биологических свойств. Для автора настоящей работы наиболее близки сведения о бактерицидных свойствах воды, настоянной на щебне шунгита. Это определило ход дальнейших исследований по проверке воздействия шунгитовой воды с полным набором макро-, микро- и ультрамикроэлементов на отдельные виды микроорганизмов.

Глава 4. ВЛИЯНИЕ ШУНГИТОВОЙ ВОДЫ НА ОТДЕЛЬНЫЕ ВИДЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

4.1. Изменение морфологии бактериальных клеток при воздействии шунгитовой воды

Для проверки воздействия шунгитовой воды использовали бактерии типа *Pasteurela multocida* и *Escherichia coli*. Для получения суспензии бактериальных клеток проводили посев бактерий на среду Эндо и бульон по Хоттингеру. Чашки Петри с бактериями помещали в термостат при температуре 37°C и выдерживали в течение 24 часов. После этого из чашек Петри бактерии смывали буферным раствором в стерильные флаконы. Затем бактериальные клетки осаждали при 3 000 об/мин на лабораторной центрифуге ОПн-8 УХЛ 4.2.

Для экспериментов готовили 4 образца шунгитовой воды из щебня различных партий. На момент проведения опытов были получены данные по содержанию макро-, микро- и ультрамикроэлементов, которые приведены в табл. 16. Из данных таблицы по содержанию макро- и микроэлементов сделать какие-то определенные выводы затруднительно. Сравнительная оценка присутствия редкоземельных элементов в образцах шунгитовой воды показывает максимальное содержание лантаноидов при идентичном времени экстрагирования в образце №1 и минимальное в образце №4, что объясняется непостоянством химического состава твердой фазы в виде щебня из различных партий шунгита [76].

Таблица 16. Минеральные элементы в водных экстрактах шунгита

Хим. элементы	Содержание макро-, микро и ультрамикроэлементов (мг/л)			
	Образец №1	Образец №2	Образец №3	Образец №4
Биогенные макроэлементы				
Кальций	49,70	30,33	55,34	87,98
Магний	32,58	6,35	12,40	18,55
Натрий	0,73	0,84	10,33	21,64
Калий	0,27	0,48	3,54	10,70

Кремний	2,32	2,38	13,10	7,62
Эссенциальные или жизненно необходимые микроэлементы				
Железо	2,86	0,11	0,33	0,25
Медь	1,16	0,04	0,06	0,02
Цинк	6,53	1,15	0,78	0,10
Хром	0,03	0,0	5×10^{-4}	0,0
Марганец	0,48	0,10	0,08	0,003
Кобальт	0,29	0,06	0,03	0,008
Молибден	4×10^{-5}	3×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-2}
Условно эссенциальные микроэлементы				
Мышьяк	2×10^{-4}	0,0	2×10^{-4}	4×10^{-3}
Литий	0,045	0,015	0,018	0,011
Никель	5,67	1,16	0,58	0,15
Ванадий	0,0	0,0	2×10^{-5}	2×10^{-3}
Кадмий	0,066	0,011	8×10^{-3}	3×10^{-3}
Свинец	0,0	0,0	0,0	3×10^{-4}
Абиогенные нейтральные				
Алюминий	24,00	0,50	0,03	0,01
Титан	0,011	2×10^{-3}	2×10^{-3}	5×10^{-3}
Рубидий	4×10^{-3}	2×10^{-3}	5×10^{-3}	8×10^{-3}
Абиогенные конкуренты				
Барий	6×10^{-3}	7×10^{-3}	8×10^{-3}	3×10^{-3}
Стронций	0,047	0,028	0,157	0,209
Цезий	6×10^{-3}	1×10^{-2}	2×10^{-2}	3×10^{-2}
Редкоземельные ультрамикроэлементы - лантаноиды				
Иттрий	0,06	6×10^{-4}	1×10^{-4}	2×10^{-4}
Лантан	0,06	3×10^{-4}	6×10^{-5}	7×10^{-6}
Церий	0,129	7×10^{-4}	1×10^{-4}	1×10^{-5}
Празеодим	0,018	1×10^{-4}	2×10^{-5}	6×10^{-6}
Неодим	0,079	4×10^{-4}	7×10^{-5}	1×10^{-5}
Самарий	0,018	1×10^{-4}	2×10^{-5}	1×10^{-6}
Европий	5×10^{-3}	3×10^{-5}	1×10^{-5}	0,0
Гадолиний	0,023	1×10^{-4}	2×10^{-5}	5×10^{-6}
Тербий	3×10^{-3}	2×10^{-5}	3×10^{-6}	1×10^{-6}
Диспрозий	0,012	1×10^{-4}	2×10^{-5}	2×10^{-5}
Гольмий	2×10^{-3}	2×10^{-5}	3×10^{-6}	6×10^{-6}
Эрбий	5×10^{-3}	5×10^{-5}	6×10^{-6}	3×10^{-5}
Тулий	6×10^{-4}	5×10^{-6}	1×10^{-6}	3×10^{-6}
Иттербий	3×10^{-3}	3×10^{-5}	2×10^{-6}	1×10^{-5}
Лютеций	4×10^{-4}	4×10^{-6}	1×10^{-6}	4×10^{-6}

Для проверки возможного воздействия шунгитовой воды на клетки бактерий в пробирки типа Эппендорф отдельно заливали по 1 мл буфера STE pH 7,3-7,4 (контроль) и образцы шунгитовой воды (опыт). Затем в каждую пробирку вносили по три капли концентрированной суспензии бактериальных клеток. Образцы перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 24 часа.

Выдержанные образцы центрифугировали при 3 000 об/мин в течение 20 мин. Из пробирок удаляли надосадочную жидкость, а осадки ресуспендировали в буфере STE pH 7,3-7,4 в объёмах по 200 мкл. Подготовленные таким образом препараты использовали для электронной микроскопии и для посева на питательные среды.

После экспозиции в шунгитовой воде бактерии отделяли на центрифуге при 3 000 об/мин в течение 20 мин. Из пробирок удаляли надосадочную жидкость, а осадки ресуспендировали в буфере STE pH 7,3-7,4 в объёме 100-200 мкл. Бактериальные препараты для электронной микроскопии наносили на угольно-парлодионовые пленки-подложки. Нанесение препаратов осуществляли методом флотации с последующим контрастированием 4% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты pH 6,8. Собственно электронную микроскопию проводили на электронном микроскопе JEM-100CX (Япония) при инструментальном увеличении 10 000 – 40 000. Электронно-микроскопические исследования проводились в лаборатории электронной микроскопии ФГБУ «ВНИИЗЖ».

На рис. 4 представлены электронные микрофотографии клеток *E. coli* из контрольного и опытных образцов. Результаты электронно-микроскопических исследований показали, что морфология интактных бактерий *E. coli* представлена палочковидными клетками с закругленными концами с размерами $0,4 \div 0,8 \times 1 \div 3$ мкм. Наиболее выраженные изменения в морфологии бактерий наблюдаются при воздействии шунгитовой воды образца №1: клетки изменяют свою форму и размеры, при идентичных условиях контрастирования с контролем становятся более прозрачными, то есть теряют контраст.

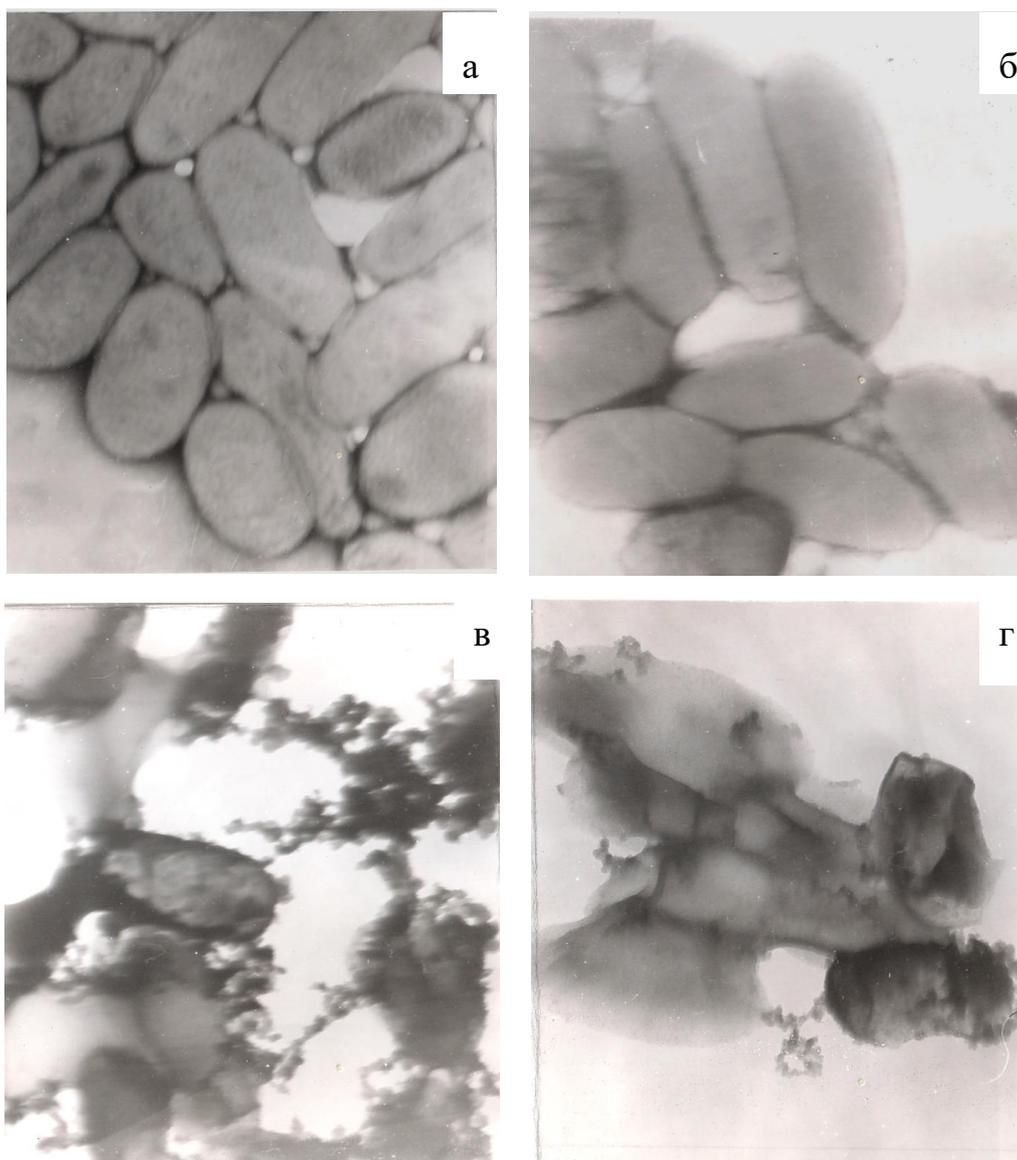


Рис. 4. Морфология бактерий *E. coli*: контроль буферный раствор STE – (а); шунгитовая вода образец №4 – (б); шунгитовая вода образец №1 – (в, г). Увеличение 40 000

Кроме того, отмечается образование неупорядоченных агрегатов путем слияния нескольких клеток. При визуальной оценке в сравнительном аспекте изображений бактериальных клеток следует, что воздействие *in vitro* на морфологию клеток шунгитовой воды минимальны в образцах №3 и 4.

Результаты сравнительного опыта по посеву клеток на питательные среды показали, что только клетки *E. coli* после воздействия шунгитовой

образца №1 показали малый, рассредоточенный рост колоний. Все остальные образцы – контрольные и опытные не показали различий - наблюдали обильный рост колоний.

Сопоставляя результаты электронно-микроскопического контроля и данные по посеву с минеральным составом шунгитовой воды, следует отметить, что исходя из содержания макро- и микроэлементов сделать какие-то коррелятивные выводы затруднительно. Наибольшая вероятность заключается в том, что именно повышенное содержание лантаноидов в образце шунгитовой воды №1 является причиной деструктивного воздействия как на морфологию бактерий, так и на угнетение роста колоний на питательной среде.

На рис. 5 представлены электронные микрофотографии *Pasreurella multocida* из контрольного и опытного образцов. Из изображений на рис. 5а видно, что интактные клетки бактерий – это полиморфные короткие палочки с закругленными концами, у которых отсутствуют жгутики. Помимо эллипсоидных палочек отмечается присутствие клеток по форме близкой к сферической с губчатой поверхностью.

Результаты морфологических исследований показали, что воздействие шунгитовой воды образца №1 на клетки бактерий также сопровождается изменением поверхностной структуры клеток с потерей выраженного негативного контраста – они становятся более прозрачными, их форма явно отличается от интактных клеток. Бактерии становятся неузнаваемыми по морфологическим признакам: форме и размерам. На микрофотографиях видоизмененные бактериальные клетки просматриваются в смеси со структурами, по-видимому, полностью разрушенных клеток. Дополнительные исследования по посеву клеток до и после воздействия шунгитовой воды не проводились.

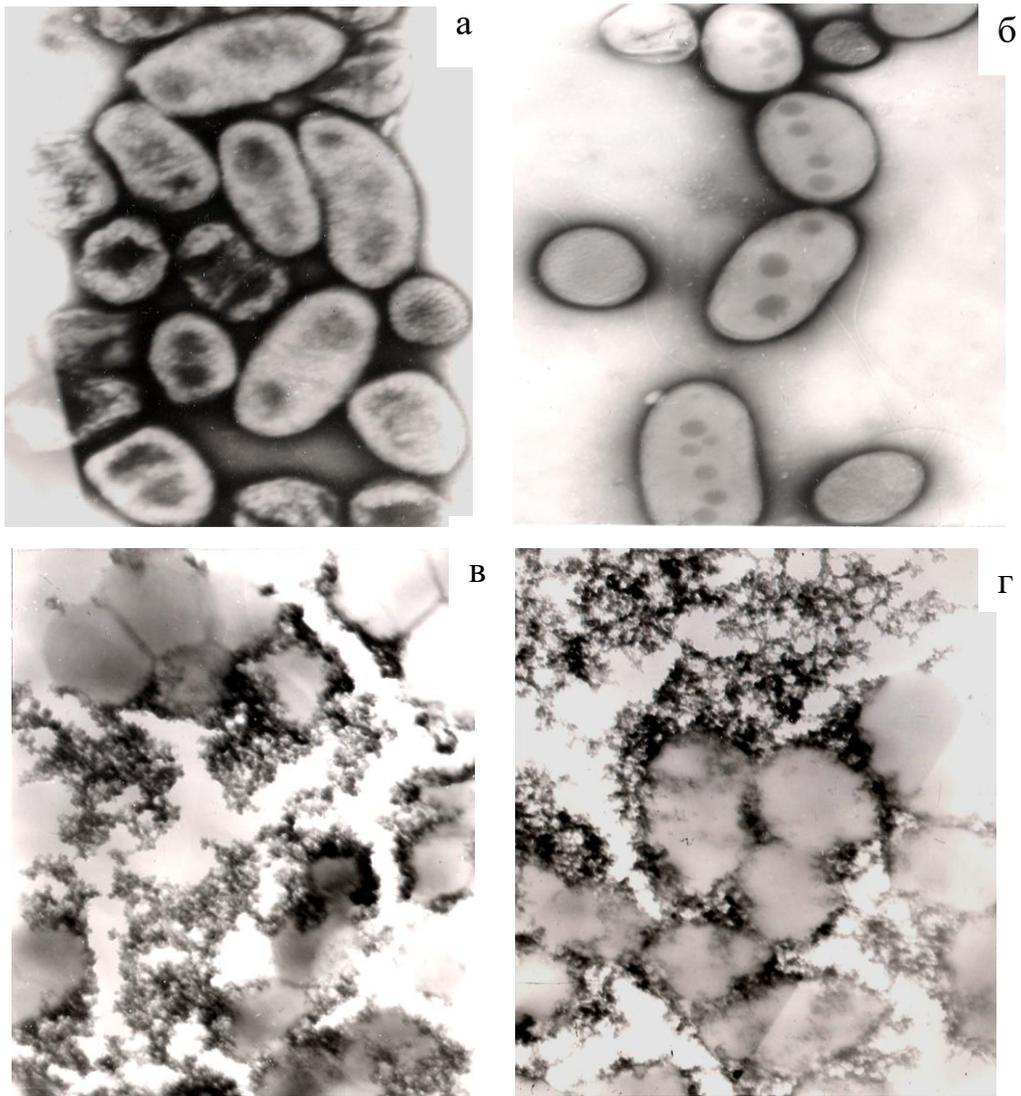


Рис. 5. Морфология бактерий *P. multocida* из контрольного образца (а, б) и после воздействия шунгитовой воды (в, г). Увеличение 40 000

Эффект деструкции и комплексобразование бактериальных клеток в конечном итоге соответствует известным сведениям из литературы о бактерицидных свойствах шунгитовой воды [64, 65]. Продолжением данных исследований послужили опыты с воздействием шунгитовой воды на клетки нанобактерий и на антиген вируса ящура с использованием шунгитовой воды из образца №1.

4.2. Влияние шунгитовой воды на клетки нанобактерий

Методика получения клеток нанобактерий и их электронно-микроскопические исследования детально изложена в монографии А.П. Пономарева [60]. Для проверки биологического воздействия *in vitro* на данный вид микроорганизмов из крови животных выделяли клетки нанобактерий, которые отдельно суспендировали в буферном растворе, дистиллированной воде и в образце шунгитовой воды №1. Для уменьшения воздействия теплового фактора экспозицию проводили в течение суток при температуре +4°C. Результаты оценивали по изменению морфологии клеток нанобактерий и по их количеству в контрольном и опытных образцах. Документирование проводили методом электронной микроскопии с получением электронных микрофотографий. На рис. 6 приведены изображения интактных клеток нанобактерий [61].

Вегетативные формы клеток нанобактерий представляют собой палочко - и нитевидные структуры с признаками бинарного деления. Выявляемые структуры по размерному критерию нами отнесены к нанобактериям, например, палочковидные клетки при диаметре 40-50 нм имеют длину 100-150 нм.

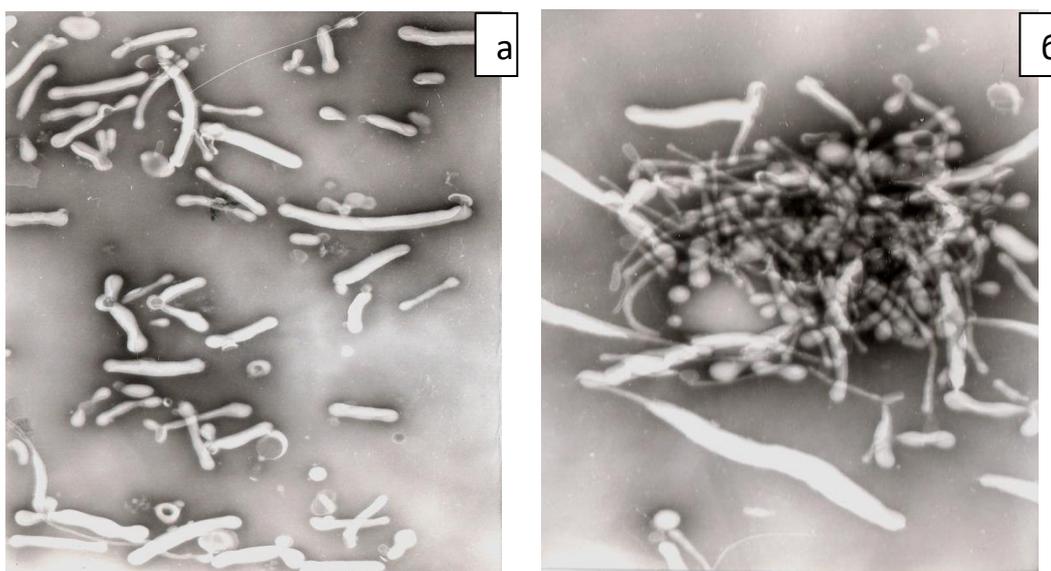


Рис. 6. Клетки нанобактерий суспендированные в бидистиллированной воде: рассредоточенные (а) и агрегированные (б). $\times 50\ 000$

У нитевидных клеток длина может достигать до 1 мкм при диаметре 40-50 нм. Второй разновидностью бесполого размножения клеток нанобактерий является почкование, когда от материнской клетки диаметром 300-500 нм отпочковываются дочерние элементарные тельца диаметром 50-60 нм [59, 60]. При суспендировании в бидистиллированной воде морфология клеток не изменяется по сравнению с буферным раствором. Следствием суспендирования клеток нанобактерий в шунгитовой воде с экспозицией в течение 18-24 часов явилось образование различных скоплений от небольших агрегатов до более крупных - агломератов из большого числа клеток (рис. 7). При этом свободных клеток не остается, практически все они включены в агрегаты. Кроме того, отмечено воздействие на их структуру, обусловленное образованием «пустых» капсул, то есть отмечается разрушение структуры интактных клеток.

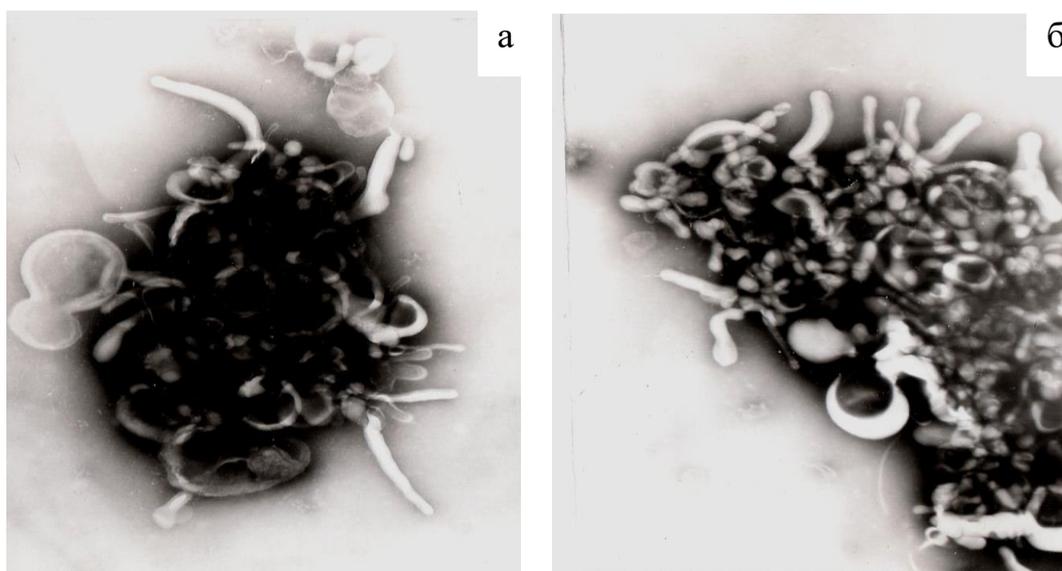


Рис. 7. Агрегирование клеток нанобактерий как следствие их экспозиции в шунгитовой воде, $\times 50\ 000$

Наиболее вероятной гипотезой воздействия шунгитовой воды на клетки нанобактерий является присутствие в её составе лантаноидов, обладающих способностью к комплексобразованию биоструктур. Это обусловлено тем, что катионы лантаноидов образуют химические связи с отрицательно заряженными фосфатными остатками в составе клеточных мембран и нуклеиновых кислот [39]. Следует отметить, что ранее нами было установлено присутствие ДНК в составе клеток нанобактерий [60]. Кроме того, факт нарушение структуры клеток нанобактерий, которые содержат в своем составе до 50% кальция, также возможно связать с действием лантаноидов, обладающих способностью замещать Ca^{+2} , что сопровождается образованием пустых оболочек [59].

4.3. Морфологические признаки воздействия шунгитовой воды на вирионы вируса ящура

Для проведения данных исследований из вирусологической лаборатории ФГБУ "ВНИИЗЖ" получали концентрированные с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ) препараты вируса ящура, которые необходимо было очистить от сопутствующих белков и примесей в виде растворенного ПЭГ. Методика воздействия на вирионы вируса ящура сохранялась, как и в случае и с бактериальными клетками.

Вирусы - особая группа микроорганизмов, не имеющих клеточного строения. Размеры вирионов вируса ящура измеряются в нанометрах (20-30 нм), поэтому их можно увидеть только с помощью электронного микроскопа. Вирусная природа ящура установлена Ф. Леффлером и П. Фрошем в 1898 г. Возбудитель ящура относится к семейству *Picornaviridae*, роду *Aphthovirus*.

Вирионы вируса ящура состоят только из белка и нуклеиновой кислоты - РНК. Принципиальным отличием вирусных частиц или вирионов, от клеток прокариот является то, что они обладают свойствами живого в потенциале. Другими словами, вирионы относятся к метаболически инертной форме существования вируса и способны к размножению только в составе живых клеток. Вне клетки признаков живого они не проявляют [57].

Вирусы культивируют в культуре клеток с цитопатическим эффектом, а также на лабораторных животных. Вирус длительно (в течение нескольких недель) может выживать в объектах окружающей среды, пищевых продуктах, устойчив к действию многих химических веществ, инактивируется при воздействии щелочей, кислот, пастеризации и кипячении. В опытах очищенные и концентрированные препараты вируса ящура смешивали с шунгитовой водой (образец №1), экспонировали в течение 24 часов при температуре +4°C. При исследовании контрольных и опытных образцов методом электронной микроскопии было установлено, что в составе шунгитовой воды из вирионов вируса ящура формируются конгломераты (рис. 8б). В контрольном препарате вирионы равномерно распределены на поверхности пленки-подложки (рис. 8а).

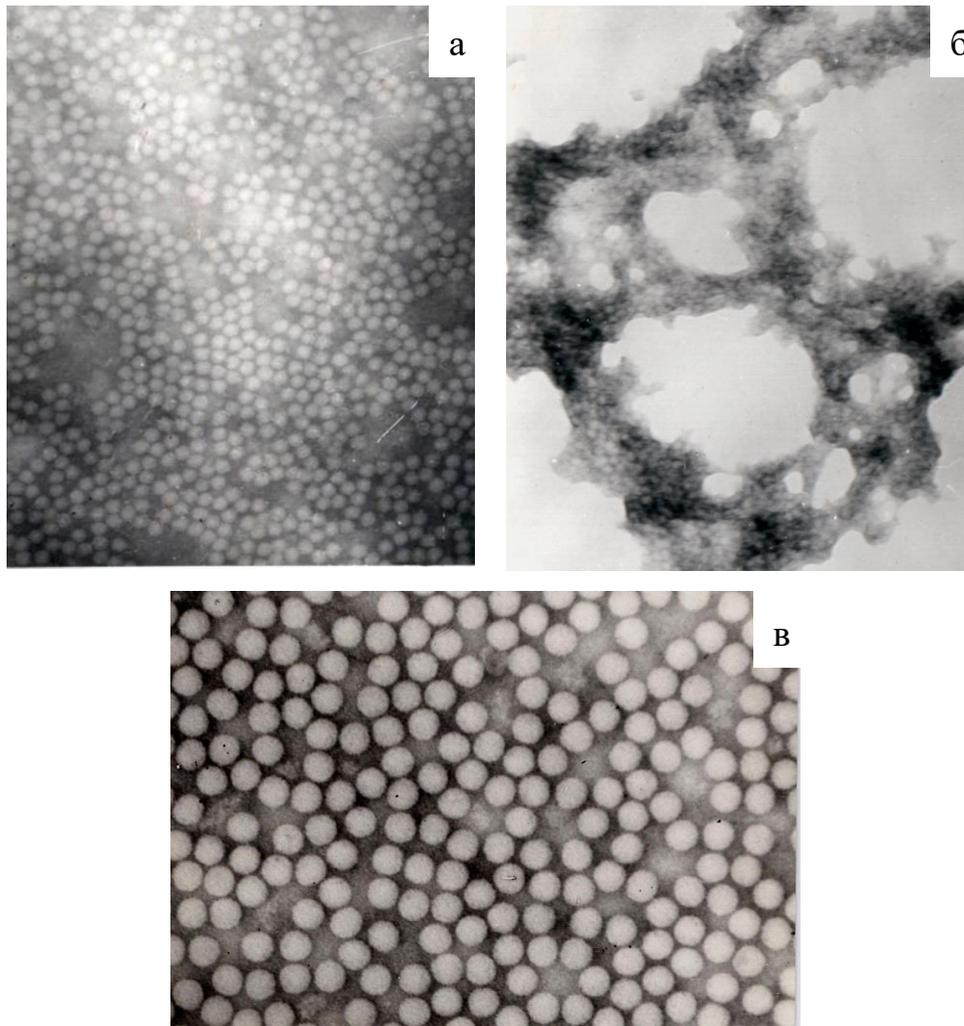


Рис. 8. Вирионы вируса ящура в исходном препарате (а), $\times 90\ 000$; в составе агрегатов после смешивания с шунгитовой водой (б), $\times 70\ 000$; после очистки с использованием раствора шунгитовой воды, $\times 120\ 000$

Из шунгитовой воды образовавшиеся конгломераты из вирусных частиц отделяли центрифугированием при $8\ 000$ об/мин в течение 20 мин на лабораторной центрифуге ОПн-8 УХЛ 4.2. Надосадочную жидкость из центрифужных пробирок удаляли, а осадки суспендировали в буфере STE рН 7,4. Последующая электронная микроскопия суспендированных образцов вируса показала отсутствие конгломератов, то есть произошел их распад, свидетельством чему наличие морфологически полноценных вирионов вируса ящура (рис. 8в). Фактически показан способ очистки концен-

трированного препарата вируса ящура без использования высокоскоростных центрифуг. Из личного опыта работы автора по получению концентрированных и очищенных препаратов вируса ящура с помощью градиента хлористого цезия ультрацентрифугирование проводили при 32 000 об/мин в течение 3 часов в центрифуге VAK-601. В данном случае избирательное комплексообразование вирионов вируса ящура, обусловленное взаимодействием отрицательно заряженных фосфатных групп РНК вирионов с лантаноидами, позволяет отделить их от белковой составляющей вирусосодержащей суспензии и перевести в осадок в условиях низкоскоростного центрифугирования. Фактор очистки следует из того, что все сопутствующие структуры, не содержащие нуклеинового компонента, и растворенный ПЭГ удаляются при сливе надосадочной жидкости.

Примечательным фактом выполненных исследований явилось то, что очищенный и концентрированный с помощью шунгитовой воды антиген вируса ящура успешно использовался в специализированной лаборатории ФГБУ «ВНИИЗЖ» для диагностических целей в течение 3 лет.

Таким образом, выполненные исследования позволяют заключить, что основой бактерицидного действия шунгитовой воды является присутствие в её составе редкоземельных ультрамикрорэлементов – лантаноидов, катионы которых эффективно взаимодействуют с противоположно заряженными группировками в структуре бактериальных клеток, нанобактерий и вирусов.

4.4. Влияние шунгитовой воды на наноструктуры, выделенные из воды

Для животных и человека существует один общий пищевой компонент – это вода. Присутствие наноструктур в питьевой воде создает прецедент попадания их в живой организм и, как следствие, создавать угрозу для здоровья человека и животных [1, 16]. В качестве получения дополни-

тельных сведений о способности к комплексобразованию экстрактов шунгита нами проведены опыты с наноструктурами из воды. Методами микро- и ультрафильтрации были выделены наноструктуры или нанобактерии из питьевой воды, минеральной воды «Ессентуки», «Нарзан» и «Рычал-Су».

«Ессентуки № 4» — лечебно-столовая хлоридно-гидрокарбонатная натриевая, борная (соляно-щелочная) природная питьевая минеральная вода средней минерализации (7,0–10,0 г/л). Источник — Ессентукское месторождение, город Ессентуки, Ставропольский край.

«Нарзан» — лечебно-столовая сульфатно-гидрокарбонатная магниевая-кальциевая природная минеральная вода, разливается в городе Кисловодск с 1 июня 1894 года. Обладает природной газацией (смесь углекислого газа и инертных газов). Общая минерализация — 2,0—3,0 г/л. Кроме того, содержание таких важных элементов как магний и кальций. В одном литре Нарзана столько же кальция, сколько в двух стаканах молока.

«Рычал-Су» — лечебно-столовая хлоридно-гидрокарбонатная натриевая природная питьевая минеральная вода малой минерализации. Источник (№ 3) — самовытекающий, слаботермальный, расположен на высоте 1120 м в селе Цмур Сулейман-Стальского района республики Дагестан. Минеральная вода Рычал-Су представляет собой экологически чистую воду, прошедшую естественную фильтрацию путем прохождения сквозь горные породы со слабым уровнем минерализации. Самоизливающаяся вода «Рычал-Су» имеет температуру от 31,5 до 36,5°C. Общая минерализация воды «Рычал-Су» — от 4,0 до 5,0 г/л.

В опытах использовали вышеуказанные виды минеральных вод в объеме 1 л, а питьевую колодезную воду в объеме 1,5 и 6,0 л. Органические наноструктуры выделяли из содержимого образцов воды методами микро- и ультрафильтрации, которые являются разновидностями методов очистки и концентрирования биологических объектов. Основное

преимущество мембранных методов очистки состоит в том, что в данных процессах исключены химические реагенты. Кроме того, эти методы позволяют проводить очистку и концентрирование биомакромолекул без изменения их химического состава и агрегатного состояния. Главное отличие мембранной фильтрации от обычного объёмного фильтрования в том, что подавляющее большинство всех задерживаемых веществ накапливается на поверхности мембраны, образуя дополнительный фильтрующий слой осадка, который обладает своим сопротивлением.

Процесс получения концентрированных препаратов их воды осуществляли на модулях типа ФМ-02-1000 с полезным объёмом стакана 1000 мл (рис. 9). Образцы питьевой воды объёмом от 1,0 до 6,0 л предварительно пропускали через микрофильтры типа Millipore с диаметром 220 нм для удаления взвешенных частиц и бактериальной микрофлоры.

Собственно процесс ультрафильтрации проводили на полупроницаемых ацетатцеллюлозных мембранах «Владипор» типа УАМ-150 с диаметром пор 15 нм. Фильтрационный модуль предварительно заполняли 70% раствором этилового спирта для целей стерилизации внутренней полости, давали 30 минутную экспозицию и спиртовой раствор пропускали под давлением через мембрану. После этого модуль заполняли профильтрованной водой, создавали избыточное давление и вели процесс до полного перехода воды в ультрафильтрат. При активной поверхности мембраны, помещенной в модуль для ультрафильтрации, 95 см² и давлении воздуха, создаваемого воздушным компрессором, в установке 2 атм скорость фильтрации 8-10 мл/мин в начале и 6-8 мл/мин при окончании процесса. В среднем 1 л воды в данном режиме проходил за 2,5 часа. После этого с установки снимали давление воздуха и мембрану, без признаков влаги с концентратом органоминеральных комплексов на её поверхности, обозна-

чаемого по легкому матовому окрашиванию поверхности мембраны, извлекали и сворачивали концентратом внутрь.



Рис. 9. Модули для микро- и ультраfiltrации типа ФМ02 – 1000

На следующем этапе проводили криогенное измельчение мембраны. С этой целью мембрану помещали в фарфоровую чашку, приливали жидкий азот и с помощью пестика растирали остекленевшую мембрану до порошкообразного состояния в течение 2-3 мин. После этого порошок переносили в пенициллиновый флакон и заливали 10 мл бидистиллированной воды. Для более эффективной элюции органоминеральных наноструктур взвесь порошка обрабатывали в 3-4 приема на ультразвуковом дезинтеграторе в течение 1-2 мин. После отстаивания отбирали надосадочную жидкость и использовали для анализа методом масс-спектрометрии и электронной микроскопии. Более детально сущность и анализ выделенных из воды наноструктур изложен в работе А.П. Пономарева и соавт. [63].

Для проверки влияния экстрактов шунгита суспензии УФ-концентратов смешивали в соотношении 1:1 с шунгитовой водой (образец №1). В результате смешивания и последующей экспозиции в течение 24

часов в пробирках визуально было отмечено образование осадков. При дополнительном осаждении на центрифуге при 7 000 об/мин 30 мин получили более плотные осадки. Из пробирок удаляли надосадочную жидкость, а осадки суспендировали в бидистиллированной воде и использовали для электронно-микроскопических исследований. При контроле содержимого осадков методом электронной микроскопии были выявлены рассредоточенные наночастицы в образце до обработки шунгитовой водой и плотные скопления из наночастиц в образце, обработанном шунгитовой водой (рис. 10).

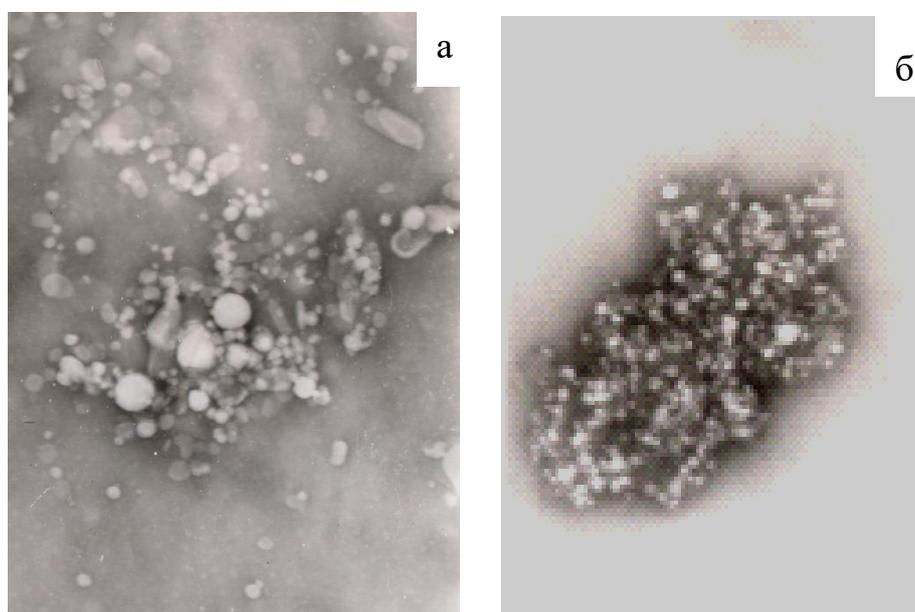


Рис. 10. Морфология наноструктур из питьевой воды: контрольный образец (а), опытный образец (б). Увеличение $\times 50\,000$

Исследования также показали образование идентичных по морфологии конгломератов, образованных наноструктурами из минеральной воды «Есентуки», «Нарзан» и «Рычал-Су» после смешивания и экспозиции с шунгитовой водой. УФ-концентраты минеральной воды и шунгитовой воды в соотношении 1:1 экспонировали 18-20 часов при комнатной температуре. При центрифугировании при 7 000 об/мин в течение 30 мин в про-

бирках типа Эппендорф формировались осадки, распределенные примерно на $\frac{1}{2}$ высоты пробирки. Осадки ресуспендировали как в буферном растворе, так и в дистиллированной воде. В зависимости от среды суспендирования различий в морфологии у конгломератов не было выявлено. Если в образцах УФ-концентратов не обработанных шунгитовой водой были трудности в адсорбции наночастиц поверхностью пленки-подложки из-за низкой смачиваемости их поверхности, то в случае работы с осадками после шунгита конгломераты хорошо адсорбировались и контрастировались фосфорно-вольфрамовой кислотой pH 6,8 (рис. 11).

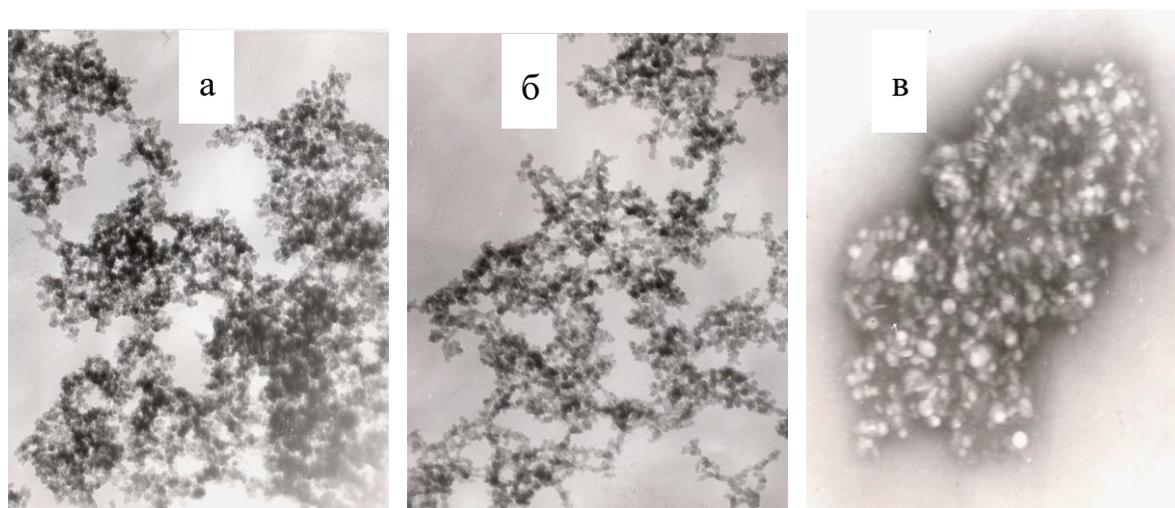


Рис. 11. Агрегирование наноструктур в шунгитовой воде из УФ-концентратов минеральной воды: «Нарзан» (а) и «Рычал-Су» (б), «Эссентуки» (в); х 50 000

При взаимодействии с шунгитовой водой изменяется структура наночастиц, по-видимому, это обусловлено сменой знака заряда. Можно заметить, что происходит смена негативного контраста на позитивный. Фактически были воспроизведены результаты опытов с бактериальными клетками и нанобактериями [65].

Резюмируя результаты проведенных исследований, следует отметить, что процесс экстрагирования из твердого природного материала – шунгита сопровождается образованием биологически активного водного раствора, содержащего не только макро- и микроэлементы, но ультрамикрорэлементы – лантаноиды. Образование конгломератов из бактериальных клеток, нанобактерий, вирионов вируса ящура, наноструктур из минеральной и питьевой воды свидетельствует о наличии в их составе одинаковых структурных составляющих органической природы, имеющих отрицательную электрическую полярность. Эффект воздействия *in vitro* на микроорганизмы обусловлен физико-химическими свойствами катионов лантаноидов – их способностью к комплексобразованию и замещению кальция в биологических системах. Это обстоятельство вызывает необходимость более детального рассмотрения сведений о лантаноидах на основании известных источников литературы, чему и посвящается содержание следующей главы.

Глава 5. СВОЙСТВА РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ УЛЬТРАМИКРОЭЛЕМЕНТОВ – ЛАНТАНОИДОВ, ВЫЯВЛЯЕМЫХ В ШУНГИТОВОЙ ВОДЕ

В современном мире сохраняется устойчивый рост потребления и производства редкоземельных элементов (РЗЭ). Уровни производства и потребления РЗЭ в промышленно развитых странах служат четкими индикаторами экономического развития и национальной безопасности. Как отмечают В.Д. Косынкин и В.А. Глебов в своей работе «редкоземельные элементы – это настоящее золото XXI (а возможно, XXII) века» [38]. .

Факт выявления лантаноидов в шунгитовой воде менее известен по сравнению со сведениями по фуллеренам. Количественная и качественная характеристики по содержанию данных элементов в водных экстрактах шунгита, приведенная в главе 2 данной работы подтверждается результатами исследований других авторов [54, 62, 83]. Не исключая взаимосвязи между положительными свойствами шунгита и присутствием в их составе фуллеренов, действительные причины, объясняющие уникальные свойства данного минерала, до настоящего времени отсутствуют.

Химический элемент Лантан, по своим свойствам сходен с 14 следующими за ним элементами группы лантаноидов (церий, празеодим, неодим, прометий, самарий, европий, гадолиний, тербий, диспрозий, гольмий, эрбий, тулий, иттербий, лютеций). Лантан и лантаноиды встречаются в природе всегда в смеси и практически невозможно выделить какой-либо элемент без примесей других. Лантаноиды применяют в различных областях производства, так как они характеризуются рядом уникальных свойств. Широкое применение лантаноиды нашли в металлургии, в химической, нефтяной промышленности, лазерной, ракетной и космической технике, ядерной энергетике, катализе, производстве обычной и сверхпроводящей керамики, красок, пигментов.

Еще в 1924 году Гаммерстен наблюдал, что соли лантана и трехвалентного железа осаждают ДНК из раствора. Максимальное осаждение происходило при рН 2,5–4,0. Эти наблюдения позднее подтвердились.

Фосфатные группы полинуклеотидной цепи находятся на расстоянии 6 ангстрем друг от друга. Предположено что ионы лантана могут соединять фосфатные группы соседних нуклеотидных цепей, образуя сетку сцементированных друг с другом нитей различных молекул ДНК [39].

Являясь хорошими комплексообразователями, лантаноиды связываются многими органическими лигандами (углеводами, аминокислотами, оксикислотами, нуклеотидами, фосфатидами, витаминами). Выяснено, что лантаноиды могут повышать фагоцитарную активность лейкоцитов крови, что обусловлено магнитными микрополями f-электронов. Известно, что биологическая функция химических элементов в живом организме связана главным образом с процессами комплексообразования.

По физико-химическим и химическим свойствам ионы лантана сходны с ионами кальция, что следует из близости значений ионных потенциалов. Имея сходный с Са и Mg ионный радиус, но более высокую константу устойчивости, лантаноиды вступают в конкурентное взаимодействие с ионами кальция, магния и переходных металлов (Mn, Co, Cu, Zn) за места связывания в молекулах биополимеров, изменяя их свойства и конформацию, что влияет на выполнение белками той или иной специфической функции. Замена ионов эссенциальных элементов лантаноидами может приводить к ингибции ферментов обмена Са, АТФ, АДФ, нуклеиновых кислот и нарушению энергетического статуса и обмена нуклеиновых кислот.

В этой связи в наших исследованиях основное внимание акцентируется на редкоземельных ультрамикрорезультатах – лантаноидах, представляющих большой интерес для биологии и медицины, что связано с возможностью замены некоторых жизненно необходимых металлов на редкоземельные. Например, сходство химических свойств лантаноидов и кальция позволяет заменять ионы кальция на ионы редких земель. Лантаноиды

могут образовывать прочные соединения с фосфатами (в том числе входящими в состав мембран и нуклеотидов), что дает основания для объяснения бактерицидных свойств шунгитовой воды по отношению к патогенной микрофлоре. Следует подчеркнуть, что данный феномен наиболее выражен в кислой зоне рН.

Литературные данные свидетельствуют о том, что в медицинской и ветеринарной практике находят применение препараты, содержащие лантаноиды. Установлено их влияние на различные процессы, необходимые для нормального развития и функционирования организма [27, 29, 79].

Детальный и обстоятельный анализ химизма человеческого тела приведен в докторской диссертации Н.В. Барановской и коллективной монографии ученых Томского политехнического университета [3, 53]. Методами нейтронно-активационного и масс-спектрометрического анализа с индуктивно связанной плазмой авторы провели исследования распределения химических элементов по функциональным системам организма жителей Томского района. Рассмотрены особенности распределения 60 элементов таблицы Д.И. Менделеева с акцентом на редкие, редкоземельные и естественно радиоактивные элементы. В монографии Н.В. Барановской и соавт. [53] представлены 17 графиков распределения в органах мужчин и женщин элементов от лития до урана, из которых следует, что наряду с макро- и микроэлементами в организме человека регулярно присутствуют и редкоземельные ультрамикроэлементы. Минимально и максимально возможные содержания редкоземельных элементов в органах и тканях человека приведены в табл. 17.

Таблица 17. Пределы накопления элементов в органах и тканях человека (сырая масса, мг/кг) [53]

№ п/п	Элемент	Минимум	Максимум
1	Лантан	8×10^{-4} (12-ти перстная кишка)	0,05 (легкие)
2	Церий	6×10^{-4} (молочная железа)	0,13 (легкие)
3	Празеодим	1×10^{-4} (пищевод)	8×10^{-3} (легкие)
4	Неодим	5×10^{-4} (пищевод)	0,02 (бронхи)
5	Самарий	$5,9 \times 10^{-5}$ (пищевод)	3×10^{-3} (бронхи)
6	Европий	$7,0 \times 10^{-5}$ (толстый кишечник)	9×10^{-4} (трахея)
7	Гадолиний	9×10^{-6} (пищевод)	5×10^{-3} (бронхи)
8	Тербий	$6,3 \times 10^{-6}$ (матка)	6×10^{-4} (бронхи)
9	Диспрозий	$4,5 \times 10^{-6}$ (пищевод)	4×10^{-3} (бронхи)
10	Гольмий	$3,0 \times 10^{-6}$ (пищевод)	5×10^{-4} (бронхи)
11	Эрбий	$5,1 \times 10^{-5}$ (пищевод)	3×10^{-3} (12-и перстная кишка)
12	Тулий	$4,1 \times 10^{-6}$ (пищевод)	2×10^{-4} (бронхи)
13	Иттербий	$2,7 \times 10^{-6}$ (пищевод)	1×10^{-3} (бронхи)
14	Лютеций	$1,8 \times 10^{-6}$ (пищевод)	2×10^{-4} (бронхи)

Из табл. 17 следует, что в органах и тканях жителей Томского района уровень распределение лантаноидов неравномерный и колеблется от 0,00003-0,00004 до 0,13 мг/кг сырой массы и условно могут быть разделены на две группы. К первой группе следует отнести элементы с максимальным накоплением, такие как церий, лантан и неодим от 0,02 до 0,13 мг/кг. Вторую группу составляют все остальные элементы с накоплением от 1×10^{-4} до 9×10^{-3} мг/кг. Кроме того, обращает на себя внимание чередование максимального содержания четных и нечетных элементов, что соответствует закономерности относительного содержания РЗЭ в земной коре [85].

Н.В. Барановской и соавт. [53] было также детально проанализировано содержание каждого из 14 РЗЭ в 26 органах и тканях человека от языка до жировой ткани. Из 14 гистограмм представленных в монографии и характеризующих распределение лантаноидов отчетливо видно, что по всем элементам максимум содержания лантаноидов отмечается в печени,

трахеях, бронхах и легких. Минимальное содержание лантаноидов в пищеводе. Если повышенное содержание лантаноидов в органах дыхания обусловлено их доступностью при контакте с воздухом, а в других органах с водой и пищей, то несколько затруднительно понимание их относительно высокого содержания в головном мозге, наиболее защищенном органе человека. Кроме того, известно, что лантан обнаружен в небольших количествах в селезенке, дентите и эмали зубов (0,01 мк/кг).

Представленные авторами результаты исследований являются свидетельством того, что РЗЭ наряду с макро- и микроэлементами являются жизненно необходимыми для живого организма. В последние годы в медицинской и ветеринарной практике все чаще находят применение препараты, содержащие соли редкоземельных элементов, то есть лантаноиды. Эти биологически активные элементы просто необходимы для нормального развития организма, так как способны влиять на различные биохимические процессы [70].

5.1. Лантаноиды в медицине

Из области медицины известны работы по использовании лантаноидов при различных заболеваниях. Одно из специфических проявлений РЗЭ на организм – воздействие на кровь. Отмечается факт увеличения времени свертываемости крови при введении животным таких РЗЭ как неодим, празеодим и церий. Многие лантаноиды рассматриваются как антипро-тромбины и антикоагулянты крови [75].

Экспериментально установлено, что при ишемии головного мозга лантана ацетат оказывает антикоагулянтный эффект, заключающийся в снижении скорости агрегации тромбоцитов и подавлении активности плазменных факторов свертывания крови [18].

Относительно связи между присутствием лантаноидов в организме человека и заболеванием приведены сведения в сообщении З.К. Зангиевой и др. [79]. Авторами выполнен сравнительный анализ микроэлементного состава 10 отделов головного мозга пациентов с диагнозом ишемический инсульт и пациентов, у которых ишемический инсульт не диагностирован. Установлено, что ишемические очаги характеризовались снижением уровней всех элементов первой группы периодической системы начиная с меди. Обращает на себя внимание достоверное снижение содержания у пациентов четырех лантаноидов (La, Ce, Pr, Nd) в очагах ишемии в сравнении с составом зеркально соответствующих участков головного мозга пациентов контрольной группы. Авторы отмечают, что «лантаноиды могут оказывать нейропротекторное воздействие за счет антиоксидантного эффекта и модуляции активности кальциевых каналов, поэтому снижение уровней лантаноидов в ишемических очагах создает негативные условия для выживания нейронов».

В работе Цыдыпова В.И. [87] приведены результаты исследований влияния ацетата лантана при экспериментальных повреждениях почек. Установлено, что лантана ацетат способен препятствовать развитию острой почечной недостаточности при воздействии токсических агентов и острой ишемии почек.

При исследовании фармакотерапевтической эффективности лантана ацетата на модели ДВС-синдрома Доржиевым Ж.П. [23] установлено, что лантан ацетата в дозе 3 мг/кг снижает степень тромбообразования, улучшает кровоснабжение органов, способствуя обеспечению физиологического функционирования организма.

Другая важная область применения лантаноидов в медицине - это онкология. Известно, что около половины радиоактивных изотопов, ис-

пользуемых в лечении опухолей - лантаноиды. В последние годы обнаружена противоопухолевая активность у стабильных изотопов лантана.

В обзоре литературы, представленным Н.С. Рукк и соавт. [77], обобщены сведения за последние 30 лет по вопросу возможного применения в медицине комплексных соединений редкоземельных элементов с органическими лигандами, проявляющих противоопухолевую активность. Известно, что, попадая в организм человека, лантаноиды в большом количестве способны накапливаться в раковых опухолях и нарушать в них обмен кальция, магния и фосфора, с чем связано применение лантаноидов в онкологии в качестве радиоактивных изотопов.

Ионы лантаноидов обладают сродством к фосфолипидам, «стабилизируют» мембраны клеток, блокируют ионные каналы, что приводит к противовоспалительному и спазмолитическому эффекту, регулируют тромбоцитарное, коагуляционное и фибринолитическое звено системы гемостаза. Экспериментально установлено, что сульфат лантана обладает гепато- и кардиопротективными свойствами, а ацетат лантана нормализует морфофункциональное состояние головного мозга и оказывает нефропротективное действие. В медицинской практике препараты, на основе лантаноидов применяют для защиты кожи от всевозможных вредных факторов окружающей среды, для лечения и профилактики кожных повреждений, воспалительных процессов, зуда, ожогов разной этиологии, раневой и послеожоговой интоксикации и инфекции.

5.2. Лантаноиды в ветеринарии

Молочное скотоводство является одной из ведущих отраслей сельскохозяйственного производства, одной из актуальных проблем которой является повышение производства молока за счет уменьшения потерь в ре-

зультате болезней животных. В современном животноводстве около 15-25% коров болеют маститом, причем в наибольшей степени подвержены этой болезни высокоудойные животные. Потери молока от переболевших коров доходят до 20% общего надоя на ферме. Существующие методы контроля и лечения мастита неизбежно приводят к потерям животных и молока. Большой группой ученых ветеринарного профиля выполнены исследования и разработано профилактическое средство против мастита коров, действующим веществом которого является азотнокислый церий. Авторами доказана эффективность препарата в борьбе с многими заболеваниями, в том числе и с маститной инфекцией, что открывает большие возможности его использования в ветеринарной практике [70].

Во Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН изучали биологические свойства редкоземельных элементов и на их основе разработали ряд лечебно-профилактических препаратов для животных [74]. Исследования проводили *in vitro* (в культуре клеток), так и *in vivo* (на белых мышях, морских свинках, кроликах, собаках, крупном и мелком рогатом скоте, лошадях). Экспериментально установлено, что токсическая доза азотнокислого лантана для культуры клеток легкого плода коровы превышает 100 мкг/мл, а оптимальная концентрация, стимулирующая пролиферацию клеток, составляет 30-40 мкг/мл.

Под действием азотнокислого лантана изменялась чувствительность культуры к вирусам инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи — болезни слизистых оболочек КРС. При однократном внесении препарата в ростовую среду репродукция вирусов и проявление цитопатического действия замедлялось по сравнению с контролем, независимо от концентрации азотнокислого лантана. Динамика репродукции вируса также указывала на замедление этого процесса под влиянием азотнокислого лантана.

Обработанная азотнокислым лантаном культура клеток сохраняла пониженную чувствительность к вирусной инфекции и при последующих четырех пересевах без добавления испытуемого препарата. Полученные результаты свидетельствуют об определенном протективном действии азотнокислого лантана на модели возбудителей инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи — болезни слизистых оболочек КРС в клетках легких плода коровы. Вместе с тем, соль лантана в культуре клеток не оказывала влияния на жизнеспособность микоплазм. В результате изучения бактерицидных свойств лантаноидов установлено, что соли лантана обладают угнетающим действием на рост стафилококков, стрептококков, сальмонелл и бруцелл. При этом наиболее выраженное действие соли лантана оказывали на бруцеллы вакцинного штамма *Brucella abortus 19*. Другой представитель лантаноидов — азотнокислый церий — обладал более выраженными бактерицидными свойствами. Вместе с тем, бактерицидность лантаноидов менее значительна, по сравнению со многими химическими препаратами, обладающими антибиотическими и антисептическими свойствами. По-видимому, эффективность лантаноидов следует рассматривать в контексте его комплексообразующих свойств, учитывая выраженную способность лантаноидов связываться с различными лигандами и образовывать из органических элементов соединения, которые, собственно, и обуславливают тот или иной эффект. При дальнейшем исследовании воздействия солей лантана установлено, что обработка участка кожи белых мышей азотнокислым лантаном, сенсibilизированных аллергеном, снижает на 76% кожную реакцию гиперчувствительности замедленного типа при внутрикожном введении антигена. При накожном нанесении 0,1% раствора гистамина на скарифицированную кожу мышей, обработанных лантаном, отмечалось уменьшение кожной реакции немедленного типа на ги-

стамин до уровня 2 креста, по сравнению с реакцией на уровне 4 креста у животных, которых не подвергали обработке лантаном.

Определение раздражающего действия крема на основе азотнокислого лантана на роговицу и слизистую оболочку глаз проводили в опытах на кроликах. В результате отметили отсутствие выраженной эритемы, что свидетельствовало об отсутствии раздражающего действия. Местное действия крема с азотнокислым лантаном изучали так же в опытах на кроликах. Ежедневно на выбритую кожу спины кроликов наносили защитный крем. Раздражающее действие крема при многократной аппликации отсутствовало.

Кожно-резорбтивные свойства защитного крема на основе солей лантана изучали на белых мышах и крысах. После нанесения на стриженую кожу белых мышей 50000 мг/кг, а на кожу белых крыс 60000 мг/кг препарата, изменений в поведении животных в контрольной и опытной группах не наблюдали. В ходе опытов на лабораторных животных наблюдали ускоренное заживление повреждений кожи и интенсификацию репаративных процессов [74].

При оценке защитных свойств препарата из азотнокислого лантана на беспородных морских свинках установлена повышенная резистентность кожи к воздействию химических веществ (хлорид магния, хлорид кальция, хлорид натрия, солянка, гистамин) и аллергена – бруцеллина. В тоже время, лантан не препятствовал трансдермальному проникновению возбудителя бруцеллеза в организм восприимчивого животного.

Изучение антиген-стимулирующих свойств лантаноидов на линейных мышах Balb, выявило стимуляцию антителогенеза на антигены из убитых прогреванием вакцинных культур бруцелл, а также стафилококков и сальмонелл. При этом, в зависимости от интенсивности антителогенеза, отмечали увеличение относительной массы (коэффициента) селезенки, учитывая, что изменение массы органа, как правило, связано с изменением

его функциональных способностей. Положительный эффект крема на основе солей лантана наблюдали на собаках с повреждениями кожи различного происхождения: ушибы, укусы, обморожения, ожоги, муциноз и с воспалительными реакциями кожи не идентифицированной этиологии. Кроме того, положительный эффект отмечен при испытании препарата в качестве защитно-профилактического средства для предохранения лап собак от вредного воздействия окружающей среды, а также как средство от зуда, возникающего по разным причинам [74].

Сфера применения лантаноидов весьма обширна. Их уникальные свойства находят все новые области применения. Использование редкоземельных элементов, в частности, лантаноидов в качестве естественных регуляторов биохимических и иммунологических процессов, протекающих в живом организме, имеет широкие перспективы, как в научных исследованиях, так и в разработке новых лекарственных средств для ветеринарии.

Совершенно очевидно, что основным недостатком получаемой шунгитовой воды является присутствие в её составе макро- и микроэлементов, а концентрация РЗЭ находится на достаточно низком уровне. Для устранения данных недостатков нами были проведены исследования по получению водных экстрактов очищенных от макро- и микроэлементов и содержащих РЗЭ в более концентрированном виде.

Глава 6. ИЗВЛЕЧЕНИЕ ЛАНТАНОИДОВ ИЗ ШУНГИТОВОЙ ПОРОДЫ, ИХ ОЧИСТКА И АНАЛИЗ

Все предыдущие исследования, изложенные в разделах монографии, проводились с шунгитовой водой из щебня шунгита, в составе которого отчетливо наблюдались включения железа (рис. 3). При этом данный вид щебня при контакте с водой изменял рН раствора до сильнокислого значения рН 2,5-3,0. Это феномен обусловлен присутствием в шунгитовой руде сульфидов, при окислении которых образуется серная кислота.

Для продолжения исследований была приобретена крупная партия щебня шунгита, который отличался от предыдущего тем, что кусочки щебня были гораздо мельче и в их составе наблюдались блестящие включения напоминающие слюду и почти полное отсутствие видимых включений железа (рис. 12).



Рис. 12. Щебень шунгита с блестящими включениями, напоминающими слюду

Другим отличием было то, что при контакте с водой получали слабокислый раствор с рН 4,0-6,0. Попытка повторения экстрагирования минералов в водную среду оказалась неудачной. Все было восстановлено после подкисления водной среды одной из минеральных кислот до значения рН 2,0-2,5 [66]. Данные литературы свидетельствуют о том, что в этих условиях при контакте шунгита с водой в воду интенсивно переходят калий, железо, медь, никель, цинк, селен, кобальт и редкие земли (лантаноиды) [93].

При проведении исследований в пластиковую емкость помещали 1 кг щебня шунгита и заливали 5 л дистиллированной воды с показателем по электропроводности 5-7 мкСм/см. Водородный показатель экстрактов

шунгита контролировали на лабораторном рН-метре «рН-150 МП». Перед экстрагированием контролировали рН водной среды и, если водородный показатель превышал рН 3,0, снижали рН до 2,0-2,5 добавлением серной, азотной или соляной кислоты. Экстрагирование проводили при комнатной температуре в течение 72 часов. Затем с помощью сифона отбирали первую верхнюю порцию экстракта в объеме 700 мл, заполняли делительную воронку и изменяли рН водной среды добавлением щелочи. Процесс нейтрализации кислотности сопровождался образованием взвеси из солей, которые осаждались в процессе отстоя (рис. 13).



Рис. 13. Отделение взвеси с помощью делительной воронки

Основополагающей идеей очистки шунгитовой воды послужили известные из литературы сведения по очистке рудничных вод методом нейтрализации и осаждением металлов в виде гидроксидов с рН 8,5-10,5 [9]. В наших опытах нейтрализацию кислотности отобранных образцов шунгитовой воды с рН 2,0-2,5 проводили добавлением 10% раствора NaOH в делительную воронку с контролем величины рН. В процессе нейтрализации кислотности при достижении рН 4,0 и выше происходило образование взвеси по всему объёму водного раствора, которая быстро коагулировала и осаждалась.

Последовательно из общей емкости 5 л отбирали без перемешивания следующие порции по 700 мл - всего 6 образцов. Через 18-20 часов сконцентрированную в нижней части воронки взвесь от каждого образца собирали в отдельные тубы (рис. 14). Осадки, помещенные в пластиковые тубы с делениями, помещали на отстой при +4°C.. По истечению 20 часов в тубах образовались две области (зоны): I – область осветленного водного раствора, II – область уплотненного осадка: в первой тубе объем осадка равен 7 мл, а в предпоследней и последней — по 32 мл.



Рис. 14. Тубы с осадками после нейтрализации кислотности водных экстрактов щебня шунгита раствором NaOH

Это свидетельствует об образовании градиента концентрации из экстрагируемых компонентов минерала шунгита, которые в неподвижном сосуде сохраняются достаточно продолжительное время. Из результатов нейтрализации кислотности с образованием двухкомпонентной смеси в тубах следует, что концентрация экстрагируемых макро- и микроэлементов возрастает по направлению ко дну сосуда. При этом цвет осадков изменяется от светло-желтого до черного при сливе последней порции экстракта собственно уже со щебня шунгита. По-видимому, желтизна взвеси

обусловлена присутствием железа, а черный цвет — углеродом. Следует отметить, что при растворении железо выходит в двухвалентной форме и при pH 3,0 в водном растворе оно окисляется и выпадает в осадок.

Для объяснения механизма образования взвеси и формирования осадка следует указать на химический состав минерала шунгита, приведенный в таблице 1. Наряду с углеродом в составе шунгита присутствуют оксиды макро- и микроэлементов, которые взаимодействуют с разбавленными растворами HCl, HNO₃ и H₂SO₄. Подтверждением чему является эффективная экстракция минералов в сильноокислой среде. При взаимодействии со щелочами данные оксиды в процессе нейтрализации образуют соль и воду, что визуально отмечается по факту образования взвеси по всему объёму экстракта. В тоже время из данных литературы известно, что оксиды лантаноидов с растворами щелочей не взаимодействуют [85].

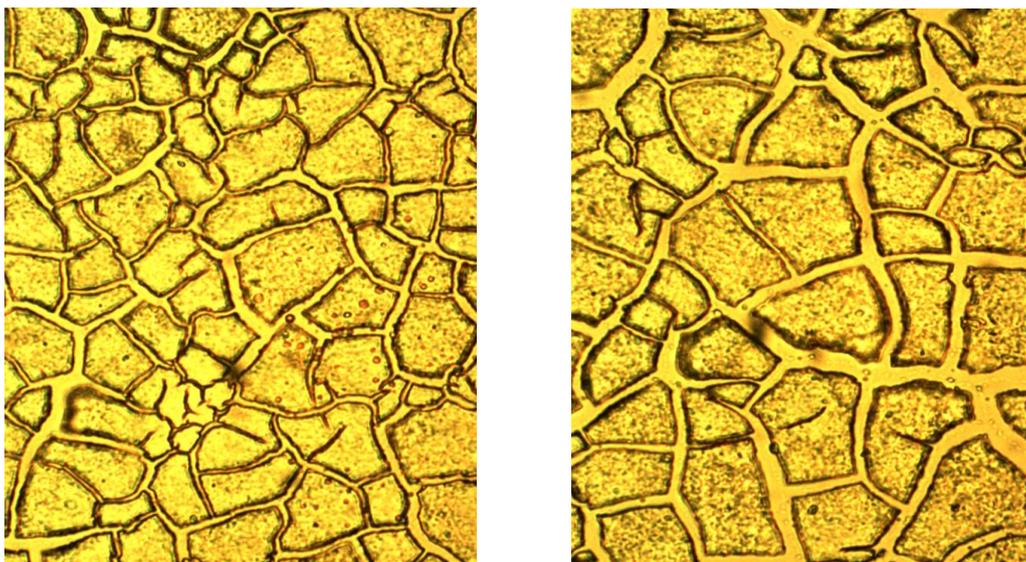
В обычном рабочем варианте получение водного экстракта проводили простым настаиванием щебня шунгита при комнатной температуре в течение 72 часов и более. Весь объём водного раствора сливали со щебня шунгита и проводили нейтрализацию кислотности. На рис. 15 приведена фотография мерного стакана с экстрактом после добавления раствора щелочи. Первоначально при перемешивании по всему объёму жидкости образуются хлопья темного, но чаще зеленоватого оттенка, что свидетельствует о присутствии двухвалентного железа. Через некоторое время в верхней части цилиндра появляется граница между осветленной водой и взвесью. Следует отметить эффективное протекание коагуляции: образование, укрупнение и оседание хлопьев. Затем происходит дальнейшее очень медленное осаждение и уплотнение осадка под давлением вновь оседающих частиц.



Рис.15. Отделение осадка в виде гидроокисей макро – и микроэлементов при нейтрализации кислотности экстракта шунгита

Феномен нейтрализации кислотности водного экстракта шунгита был воспроизведен в опытах при нейтрализации кислотности экстрактов 10% растворами NaOH и KOH с получением идентичных осадков. На рис. 17 приведены снимки кристаллограмм осадков после нейтрализации кислотности шунгитовой воды растворами NaOH и KOH.

Как видно на рис. 16 в процессе высыхания капли осадка на поверхности стекла образуется структура имеющая «квасиачеистую» форму. Дегидратация воды из капли сопровождается прилипанием пленки, содержащей органическую компоненту, к стеклянной подложке и, как следствие, возникают напряжения, приводящие к формированию ячеистой структуры. Отсутствие разницы в топологической структуре твердой фазы пленки свидетельствует об идентичности концентрации и состава осадков, образующихся при нейтрализации кислотности шунгитовой воды растворами NaOH и KOH [35].



а)

б)

Рис. 16. Кристаллограммы осадков, полученных при нейтрализации кислотности шунгитовой воды растворами щелочи: (а) – NaOH и (б) – KOH, х 400

7Данные одного из типовых опытов по проверке солесодержания шунгитовой воды концентрированной выпариванием и образцов экстракта после нейтрализации кислотности с удалением образовавшейся взвеси (конечный продукт), полученные с помощью прибора TDS/EC Meter, следующие:

№1 – исходный раствор шунгитовой воды рН 2,0 – 7750 мкСм/см;

№2 – экстракт после нейтрализации до рН 4,5 – 3100 мкСм/см;

№3 – экстракт после нейтрализации до рН 7,2 – 3050 мкСм/см;

№4 – экстракт после нейтрализации до рН 8,0 – 3150 мкСм/см;

№5 – экстракт после нейтрализации до рН 11,7 – 3400 мкСм/см.

Из приведенных данных следует, что процесс нейтрализации кислотности раствора шунгитовой воды завершается получением очищенных водных экстрактов с сохранением 41% от исходной концентрации минералов независимо от конечного значения рН. В табл. 18 приведены результа-

ты контроля остаточных количеств макроэлементов в составе очищенного экстракта.

Таблица 18. Содержание химических элементов в водном экстракте шунгита до и после нейтрализации кислотности

№№ п/п	Химические элементы	Водный экстракт шунгита (мг/дм ³)	
		(рН 2,0)	(рН 8,0)
1	Железо (общее)	46,6	Не обнаружено
2	Ионы меди	0,67	0,099
3	Ионы цинка	33,4	0,28

Следует отметить, что отстаивание, как частный случай разделения неоднородных жидких систем путем выделения твердых частиц под действием гравитационной силы, характеризуется низкой скоростью процесса и не позволяет полностью разделить неоднородную смесь на дисперсную и дисперсионную фазы. В этой связи нами для отделения взвеси был использован метод центрифугирования. Раствор осветляли при 2800 об/мин в течение 10 минут на рефрижераторной центрифуге ЦРЛ 6-01. Надосадочную водную фазу сливали в стерильные флаконы и хранили при температуре +4°С. При этом исходный раствор шунгитовой воды и надосадочная жидкость или водный экстракт шунгита после центрифугирования по прозрачности визуально были неразличимы.

В табл. 19 и 20 приведены данные по содержанию катионов и анионов до и после нейтрализации кислотности экстракта шунгита. Минеральный состав экстрактов шунгита определяли с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель-105М», оснащенной спектрофотомет-

рическим детектором, немодифицированным кварцевым капилляром внутренним диаметром 50 мкм и эффективной длиной 60 см.

Таблица 19. Содержание катионов в экстракте шунгита до и после нейтрализации

Катионы	Исх. образец водного экстракта (мг/л)	Нейтрализ. раствором NaOH (мг/л)	Процент удаления (%)	Нейтрализ. раствором KOH (мг/л)	Процент удаления (%)
Аммоний	18	0,2	98,9	0,2	98,9
Калий	60	3,3	94,5	11,8	80,4
Натрий	76	7,9	89,6	3,5	95,4
Литий	0,3	-	100	-	100
Магний	110	3,4	97,0	3,1	98,2
Стронций	1,2	1,3	0	1,3	0
Барий	4,6	-	100	-	100
Кальций	72	3,5	96,2	4,3	94,1

Таблица 20. Содержание анионов в экстракте шунгита до и после нейтрализации

Анионы	Исх. образец водного экстракта (мг/л)	Нейтрализ. раствором NaOH (мг/л)	Удаление (%)	Нейтрализ. раствором KOH (мг/л)	Удаление (%)
Хлорид	1,5	-	100	-	100
Нитрит	6	-	100	-	100
Сульфат	1760	19,9	98,9	22,2	98,8
Нитрат	2	-	100	-	100
Фторид	0,7	-	100	-	100
Фосфат	7,4	2,6	65	2,4	68

Определение содержания цинка, меди и железа проводили на атомно-абсорбционном спектрометре «Квант-Z.ЭТА» (Россия).

Таблица 21. Содержание химических элементов в водном экстракте шунгита до и после нейтрализации кислотности

№№ п/п	Образцы водных экстрактов шунгита	Содержание химических элементов (мг/л)			
		Железо	Медь	Цинк	Процент удаления
1.	Водный экстракт рН 2,8 (Опыт 1)	0,822	2,449	3,404	–
2.	Нейтрализация кислотности КОН рН 7,4 (Опыт 1)	0,009	0,129	0,528	Fe – 99% Cu – 95% Zn – 85%
3.	Водный экстракт рН 2,5 (Опыт 2)	2,596	9,099	44,260	–
4.	Нейтрализация кислотности КОН рН 8,0 (Опыт 2)	0,029	0,163	1,521	Fe – 99% Cu – 98,5% Zn – 96,6%
5.	Нейтрализация кислотности NaOH рН 8,0 (Опыт 2)	0,138	0,456	2,223	Fe – 95% Cu – 95% Zn – 95%

Данные опытов показали, что процесс нейтрализации кислотности шунгитовой воды сопровождается связыванием макро- и микроэлементов с переводом их в осадок, что позволяет получать очищенные водные экстракты шунгита. При этом лантаноиды сохраняются в содержимом экстрактов, так как известно, что оксиды лантаноидов с растворами щелочей не реагируют [85]. Для акцентирования значимости данного процесса следует привести высказывание Г.Г. Девярых и Ю.В.Еллиева о том, что ”вещества высокой чистоты имеют самостоятельное непреходящее значение в сугубо научном плане. Повышение степени чистоты часто приводило к открытию новых свойств веществ и новых явлений, то есть повышение уровня знаний о веществе как форме существования материи...» [22].

6.1. Анализ биохимического состава водного экстракта шунгита

Помимо определения минерального состава экстрактов шунгита была выполнена проверка их биохимического состава. Исследования проведены на приборе анализатор биохимический автоматический типа BioChemFC-360 («НТИ», США) канд. хим. наук Большаковым Д.С.

В опытах по приготовлению концентрированного и очищенного экстракта проводили выпаривание настоя щебня шунгита в соотношении 30/5 л (объём/объём) с рН 2,5. Взвесь, образующуюся в экстракте при выпаривании, отделяли на центрифуге при 2 800 об/мин в течение 10 мин. Из осветленного экстракта отбирали пробы для контроля, а весь объём 5л замораживали при минус 20°С. Результаты биохимического анализа трех типовых опытов с экстрактом шунгита рН 4,0 приведены в таблице 22.

Результаты анализов показали, что в экстрактах шунгита присутствуют: низкомолекулярные азотистые вещества (креатинин, мочевины и мочевиная кислота), ферменты (амилаза, креатинкиназа, щелочная фосфатаза, АлАТ- аспартатаминотрансфераза), общий белок. В небольших концентрациях отмечалось присутствие альбумина, общего билирубина, триглицеридов и холестерина.

Таблица 22. Биохимические компоненты в составе водного экстракта шунгита в трех типовых опытов

Биохимический показатель	Единицы измерения	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3
--------------------------	-------------------	--------	--------	--------

АСТ	Е/л	3,6	6,0	6
Альбумин	г/л	0,36	0,1	0,2
Амилаза	Е/л	0,3	0	0
Глюкоза	ммоль/л	0,3	0,6	0,6
Железо	мкмоль/л	586,2	5779	5806,4
Кальций общий	ммоль/л	1,65	3,2	3,06
Креатин	мкмоль/л	54	37	45
Креатинкиназа	Е/л	9,3	14,3	13
Мочевина	ммоль/л	8,3	8,3	8,6
Мочевая кислота	мкмоль/л	51	44,6	36
Общий белок	г/л	7,6	4,0	7
Общий билирубин	мкмоль/л	0,4	1,2	1,4
Триглицериды	ммоль/л	0,1	0,2	0,20
Хлориды	ммоль/л	5,3	3,3	2
Холестерин	ммоль/л	0,2	0,72	0,17
Фосфор	ммоль/л	0,01	0,15	0,09
Щелочная фосфатаза	Е/л	-	22,6	21

Факт присутствия в шунгитовой породе органических соединений ранее был установлен исследователем Прокопченковым Д.В., который получал экстракты методом окислительной деструкции шунгитовой породы с использованием органических растворителей. Полученные экстракты подтверждали наличие в их составе органических соединений, что по заключению автора обуславливают бактерицидное и бактериостатическое действие экстрактов. Автор также рекомендует метод экстракции шунгитовой породы органическими растворителями для получения перспективных антибактериальных препаратов, способных найти эффективное применение в профилактической и клинической медицине. Опытным путем установлено, что все исследованные экстракты бактерицидны по отношению к культу-

рам экспериментально использованных грамположительных бактерий, а также по отношению к культурам двух из экспериментально использованных грамотрицательных бактерий [72].

Дополнительным фактором в наших исследованиях, подтверждающим присутствие органики в составе экстракта, являлось образование осадка при его замораживании-оттаивании. Экстракты, замороженные в объеме 5 л при солесодержании 3450 мкСм/см, оттаивали при комнатной температуре и давали время на осаждение образовавшийся взвеси. По истечению 24 часов проводили декантацию надосадочной жидкости из емкости, оставляя придонную часть раствора в объеме около 100 мл. Осадок, отчетливо наблюдаемый на дне сосуда, перемешивали и проводили микрофотографирование по методу «раздавленная капля». На рис. 17 приведены микрофотографии структуры осадков. Кроме частиц с плотной консистенцией отмечается присутствие аморфных частиц с мелкими включениями.

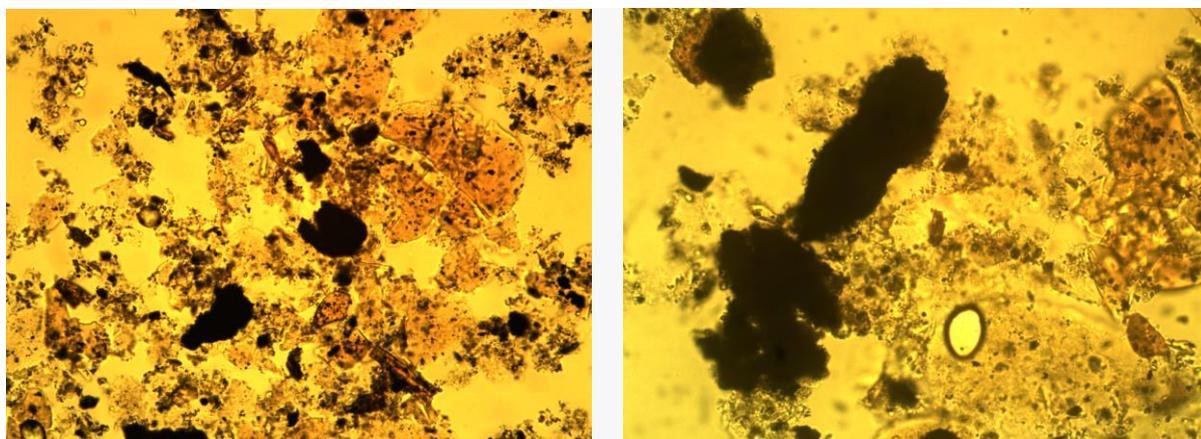


Рис. 17. Два вида частиц, имеющих различную окраску: аморфные частицы плотной консистенции черного и оранжевого цветов. x 400

Возможно предположить, что частицы черного цвета содержат углерод, а оранжевого – белки. Фактически используемый метод замораживания-оттаивания позволяет проводить очистку экстракта от органической

составляющей. Данный подход фактически повторяет известный способ очистки воды путем замораживания и оттаивания с образованием частиц осадка.

Таким образом, экстракт шунгита представляет собой систему: «вода – минеральные элементы - органические компоненты». Кроме того, данные биохимического контроля позволяют подтвердить гипотезу происхождения шунгита, согласно которой данный минерал представляет собой окаменевшее вещество органических донных отложений высокого уровня карбонизации углерода [32].

В настоящее время исследователи при изучении химического состава экстрактов сапропеля установили присутствие органических веществ, включающих ферменты, липиды, пептиды и аминокислоты [41]. Естественно, что в процессе образования шунгита как минерала остатки древней органики сохранились до настоящего времени.

Методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной аргоновой плазмой в экстрактах шунгита после нейтрализации кислотности и отделения осадка определяли содержание лантаноидов. На рис. 18 представлены в порядке убывания значения содержания лантаноидов.

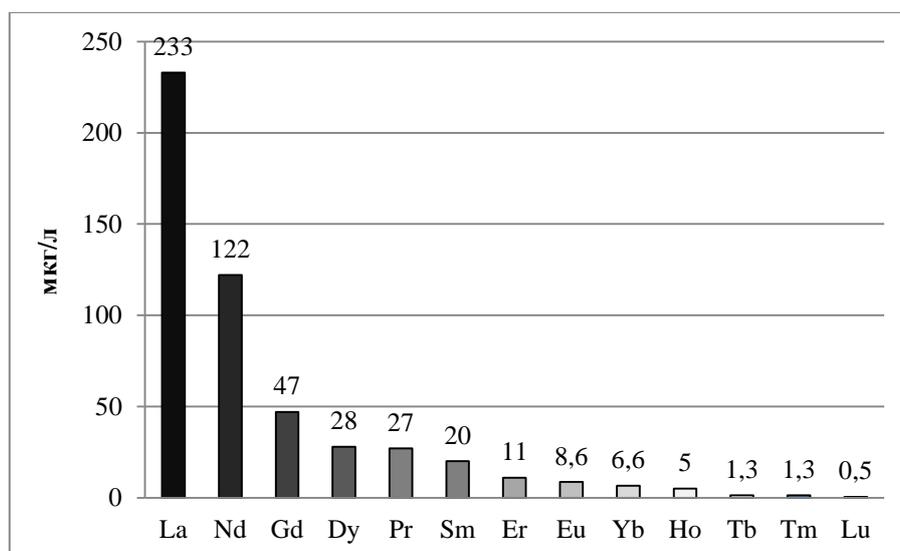


Рис. 18. Данные масс-спектрометрического анализа экстракта после
нейтрализации кислотности

Если принять во внимание выход, например, лантана в исходных концентрированных экстрактах равного в среднем 1,3 мг/л (таблица 1, опыты № 8-11) в процессе нейтрализации содержание лантана уменьшается в 5,6 раза. По другим элементам также происходит существенное уменьшение их концентрации относительно экстрактов, не подвергавшихся нейтрализации кислотности. Возможно, что частичное удаление лантаноидов обусловлено процессом их соосаждения вместе с гидроксидами макро- и микроэлементов.

Данный способ описан в литературе и используется для выделения редкоземельных ультрамикроэлементов. Феномен нейтрализации кислого раствора, настоящего на шунгите, с помощью доломита описан в литературе, когда при повышении рН с 3,0 до 7,4 изменяется состав раствора за счет перехода в осадок алюминия, железа, кобальта, меди, цинка и никеля, а также некоторого снижения в растворе концентрации редкоземельных элементов (лантаноидов) [93].

Для устранения этих противоречий в нашей работе на первом этапе экстракция минералов из шунгита осуществлялась в кислой водной среде. На втором этапе в процессе выпаривания экстрактов испаряется свободная вода с образованием сильнокислого концентрированного раствора. На третьем этапе нейтрализация кислотности экстракта растворами щелочи сопровождается интенсивным образованием хлопьевидной взвеси, из которой образуется осадок чаще всего черного цвета. Данный подход имеет два положительных качества: первый – это получение физиологически приемлемого в плане кислотности водного раствора и, второе, – это очистка экс-

тракта шунгита от основной массы макро- и микроэлементов при сохранении лантаноидов.

Фактически реакция нейтрализации кислотности водного экстракта шунгита позволяет провести его очистку от макро- и микроэлементов при сохранении большей части лантаноидов, которые всегда присутствуют вместе. Поскольку метод масс-спектрометрии для анализа не всегда доступен при рутинных исследованиях в плане дополнительного доказательства присутствия в экстрактах шунгита лантаноидов, нами был использован метод кристаллоскопии, дающей представление о фундаментальной картине структуры вещества.

6.2. Метод кристаллоскопии при исследовании водного экстракта шунгита

Метод качественного определения химических веществ по их кристаллографическим признакам впервые предложил Торий Егорович Ловиц – ученик М.В. Ломоносова, который в 1804 году описал два метода качественного анализа веществ – метод «выветренных налетов солей» и метод, основанный на изменении нормального образования кристаллов путем введения в раствор кристаллизующегося вещества другого ингредиента, заложив этим основу двух современных направлений кристаллографии [44].

Среди современных кристаллографических методов исследования одним из наиболее распространенных вариантов является метод классической кристаллоскопии, сущность которого состоит в свободной кристаллизации при высушивании анализируемого раствора.

Сущность метода кристаллоскопии проста и заключается в следующем. Водный экстракт минерала шунгита в объеме 100 мкл наносили на

обезжиренную поверхность чистого предметного стекла. Вследствие свободного растекания жидкости и последующего её высыхания за счет испарения водной фазы происходит образование твердой пленки. Испарение и сушку пленки проводили при комнатной температуре или в термостате при $+37^{\circ}\text{C}$. После высыхания раствора, полученные кристаллограммы регистрировали с помощью тринокулярного микроскопа «Olympus» (Япония) укомплектованного цифровой камерой, подключенной к персональному компьютеру с программой “Scopefoto”.

Физика данного процесса детально рассмотрена в работе С.П. Молчанова и соавт. [48] и схематично представлена на рис. 19. Капля, расположенная на подложке имеет две поверхности раздела: свободная верхняя поверхность – между раствором и воздушной средой (атмосферой) и вторая – между раствором и подложкой. Через верхнюю поверхность происходит испарение растворителя, что сопровождается уменьшением объёма капли и образованием твердой пленки солей при полном испарении растворителя. В процессе испарения происходит самоорганизация растворенного вещества и, как следствие, формируются кристаллические структуры дендритной формы. Известно, что дендритная форма кристаллов является наиболее общей формой затвердевания, наблюдаемой в природе.

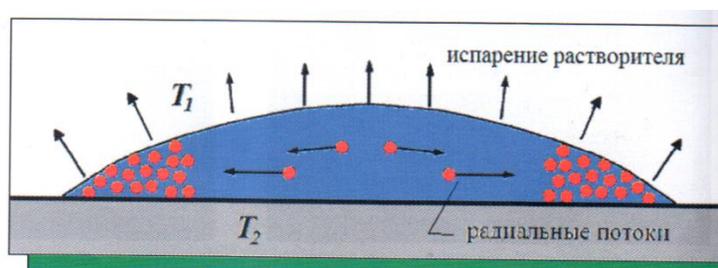


Рис. 19. Основные факторы и движущие силы самосборки наночастиц в микрокапле: T_1 – температура окружающей среды; T_2 – температура подложки [48]

Известно, что процесс испарения является основной движущей силой самоорганизации: происходит перемещение межфазных границ, интенсифицируются физико-химические процессы внутри и на поверхности капли, что сопровождается перемещением частиц. Скорость испарения, в свою очередь, зависит от внешних факторов: температуры окружающей среды, температуры подложки, давления паров растворителя в окружающей среде, а также некоторых дополнительных факторов – конвективных потоков в атмосфере, структурированности подложки, внешних силовых полей, действующих как на поверхности, так и в объёме капли [48].

Первоначально для кристаллоскопических исследований использовали водный экстракт, полученный на основе щебня шунгита с явно выраженными включениями железа и содержащего сульфиды, свидетельством чему являлось закисление водного раствора до рН 2,5-3,5. Результаты кристаллоскопических исследований экстрактов шунгита представлены на рис. 20. Известно, что при кристаллизации металлов и солей часто образуются древовидные кристаллы – дендриты. Из снимка на рис 20а видно, что на основной оси линейного кристалла асимметрично расположены

а

б

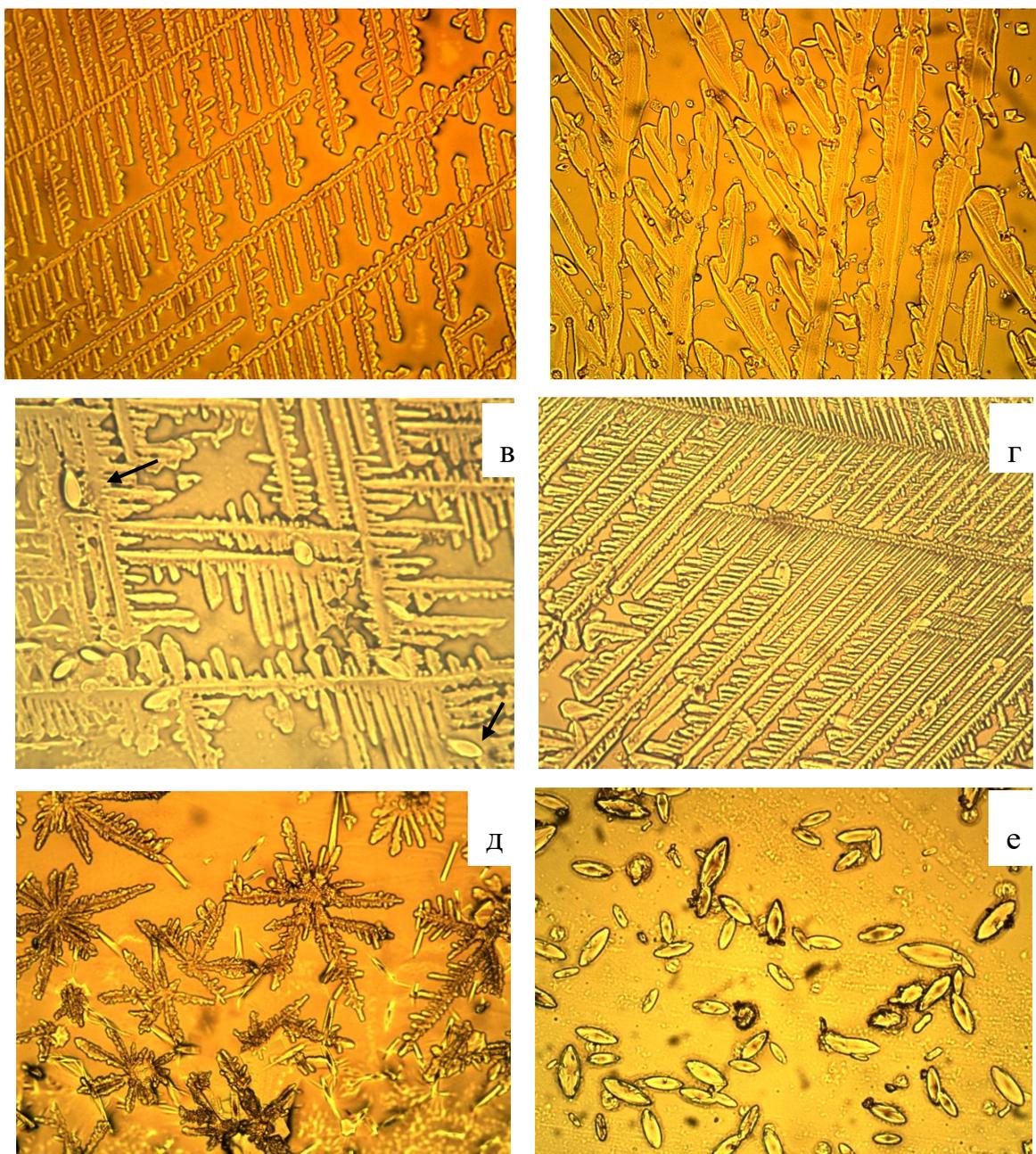


Рис. 20. Кристаллограммы, полученные при дегидратации различных образцов водных экстрактов шунгита. Съёмка при 200-кратном увеличении ответвления первого и второго порядков. На рис. 20б дендриты отличаются несколько меньшей упорядоченностью при угловом расположении ответвлений. На рис. 20в дендриты с боковыми ответвлениями перемыкаются между собой, на фоне которых отмечено присутствие отдельно лежащих овоидных образований (стрелка). Текстура кристаллизации на рис. 20г

представлена упорядоченными кристаллами удлиненной формы с короткими ответвлениями первого порядка. В структуре кристаллов в форме «звездочек» на рис. 20д из общего центра отходят отростки с микроответвлениями. Полной противоположностью сложной структуре «звездочек» на рис. 20е представлены кристаллы овоидной формы.

Полученная информация о структуризации водных экстрактов шунгита содержит сведения о концентрации элементов и отражает характер связей между ними, а также свидетельствует о высокой концентрации химических элементов. Следует отметить высокую вариабельность морфологии кристаллических образований, что может быть обусловлено как различным составом водных растворов шунгита, так и различиями молекулярной массы молекул. В свою очередь это феномен отражает гетерогенность по своему составу щебня шунгита, используемого для экстрагирования химических элементов [40].

6.3. Кристалоскопия экстрактов шунгита, полученных при использовании различных подкислителей

Из данных литературы известно, что РЗЭ хорошо растворяются в соляной, серной и азотной кислотах [85]. С целью определения оптимального режима экстракции химических элементов проводили подкисление экстрагента – водной среды до рН 2,0-2,5 добавлением одной из концентрированных кислот.

В опытах с соляной кислотой щебень шунгита заливали дистиллированной водой в соотношении 200 г на 1 л воды и изменяли рН экстрагента до значения 2,0 -2,5. Экстрагирование проводили в течение 72 часов при комнатной температуре. После этого раствор выпаривали кипячением до 1/10 от исходного объёма, изменяли водородный показатель экстракта до

pH 4,0-4,5 добавлением раствора щелочи. Методом центрифугирования удаляли образовавшуюся взвесь, образующуюся в процессе экстрагирования, получая тем самым конечный экстракт с pH 4,0-4,5. Для целей кристаллоскопии проводили нанесение экстрактов на предметные стекла и проводили дегидратацию водных экстрактов в термостате при температуре +37°C до полного испарения жидкой фазы с образованием твердой пленки-фации. В результате были получены кристаллы различной морфологии, часть из которых представлена на рис. 21.

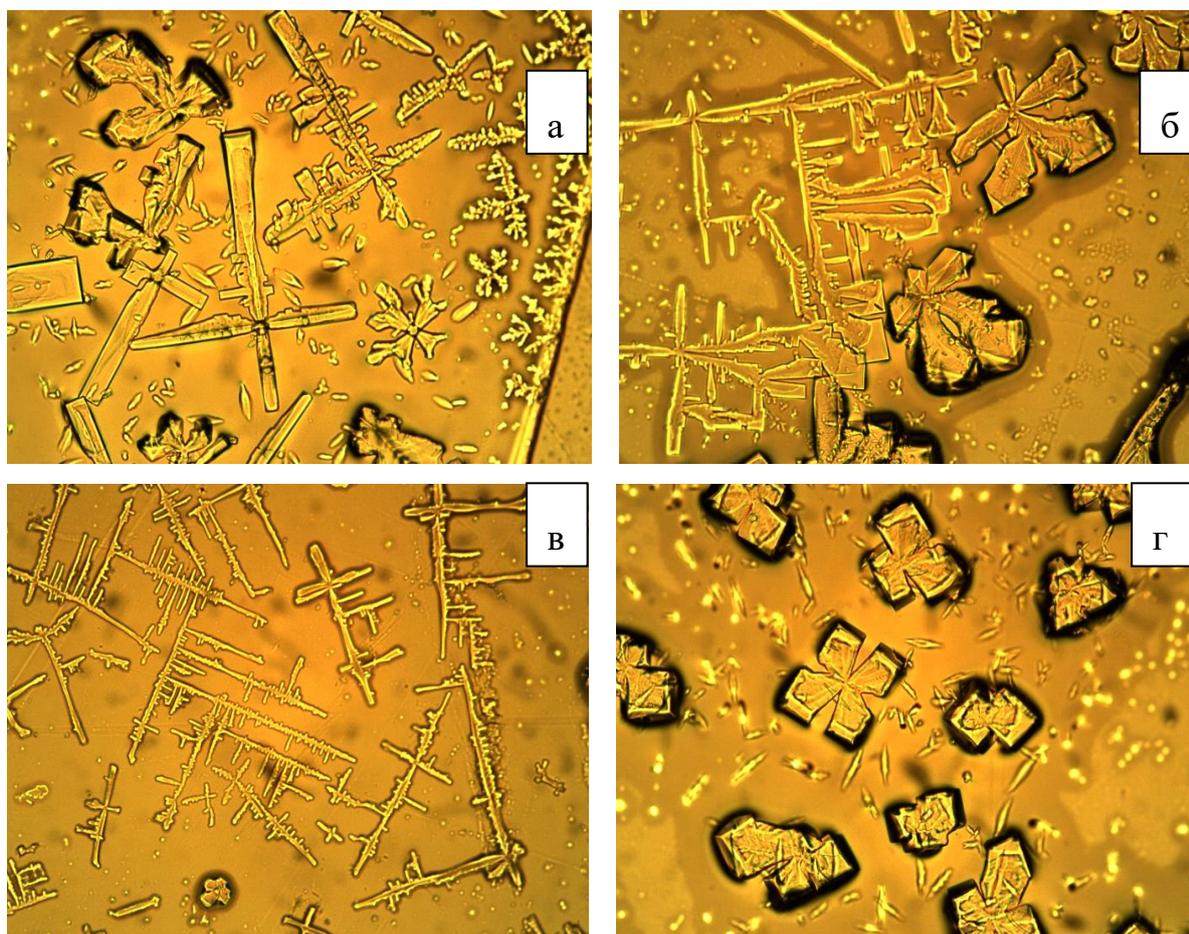


Рис. 21. Морфология кристаллических образований из экстрактов, полученных с использованием соляной кислоты в качестве подкислителя.

Съёмка при 200-кратном увеличении

Из данных снимков видно, что процесс дегидратации жидкости сопровождается образованием фаций с характерной структурой, специфика которой определяется качественным составом исследуемой жидкости. В

процессе дегидратации атомы и молекулы образуют упорядоченную структуру, например, при кристаллизации металлов и солей часто образуются древовидные кристаллы с ответвлениями — дендриты [33]. На снимках кристаллические образования представлены различной конформацией: это крупные структурно упорядоченные образования крестообразной формы различного размера и кристаллы с боковыми ответвлениями (а, б). Переменяющиеся между собой кристаллообразные формы, ответвления которых образуют прямой угол (в). Крестообразные фигуры разного размера с фрагментацией кристаллических образований до структур в виде ромбов, среди которых наблюдаются мелкие вытянутые кристаллики (г).

Для проверки воздействия некоторых физико-химических факторов на свойства экстракта с рН 4,0 часть раствора замораживали при температуре -20°C , а оставшийся разливали в стеклянные флаконы, закрывали резиновыми пробками, закатывали алюминиевыми колпачками и автоклавировали при температуре 121°C в течение 40 мин. Результаты кристаллоскопии дегидратированных образцов экстракта после заморозки-оттаивания и термообработки представлены на рис. 22, 23. Замораживание-оттаивание и термообработка водного экстракта шунгита экстракта не вызвало явного изменения структуры кристаллов относительно контроля. Фактически сохраняются морфологически идентичные кристаллические структуры.



Рис. 22. Морфология кристаллов из экстракта шунгита подвергнутого замораживанию-оттаиванию при температуре -20°C (pH4,0), x 400

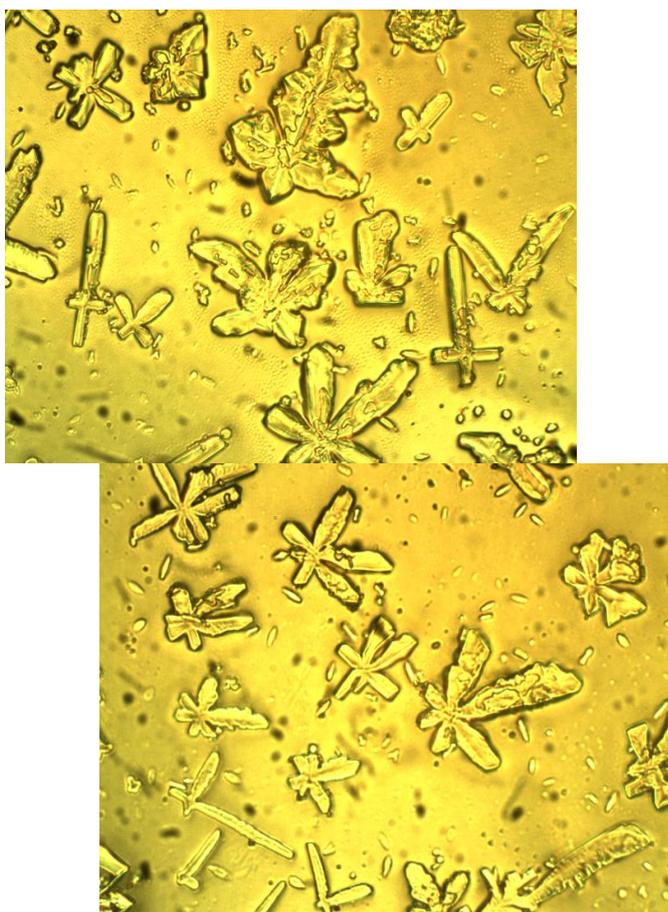
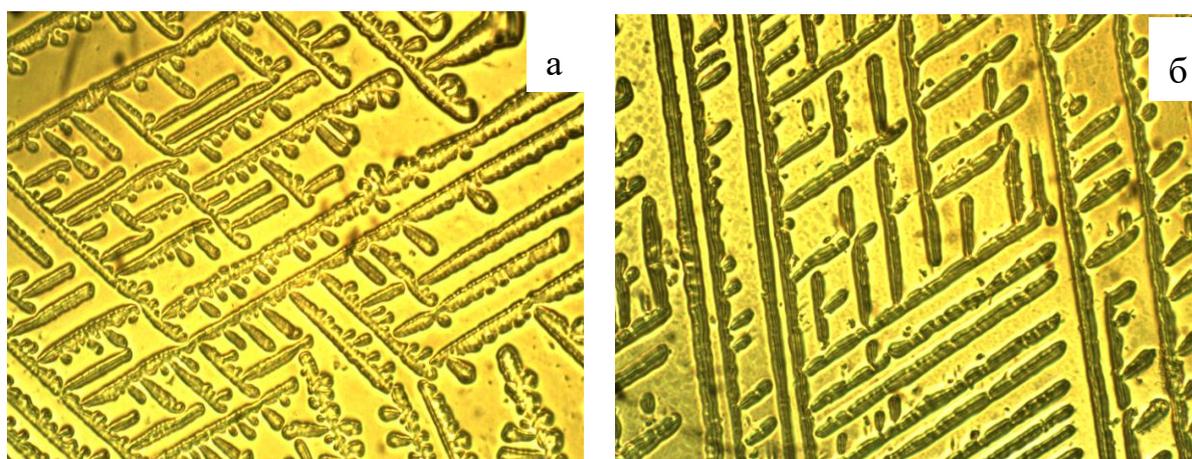


Рис. 23. Морфология кристаллических образований из экстракта шунгита с рН4,0 , подвергнутого термообработке 121°C 40 мин, x400

Для продолжения экспериментов по получению экстракта шунгита использовали щебень шунгита той же партии с повторением всех этапов предыдущего опыта. Отличие только в том, что только в качестве подкислителя экстрагента – водной среды использовали концентрированную азотную кислоту. Водный раствор после заливки щебня и контакта с водой в течение 30 мин имел довольно высокое значение рН 6,35. Концентрированной азотной кислотой изменяли до рН 2,3. Экстрагирование проводили при комнатной температуре в течение 72 часов при комнатной температуре. Этап концентрирования выпариванием завершали изменением водородного показателя добавлением щелочи до рН 4,0. Кристаллические образования представлены протяженными прямолинейными формами основного ствола с асимметричными боковыми ответвлениями различной длины (рис. 24 а, б). Идентичные формы повторяются при дегидратации образца экстракта после замораживания – оттаивания (в). Кристаллограммы из термообработанных экстрактов шунгита отличаются несколько меньшей длиной основного ствола с асимметрично расположенными боковыми ответвлениями (г).



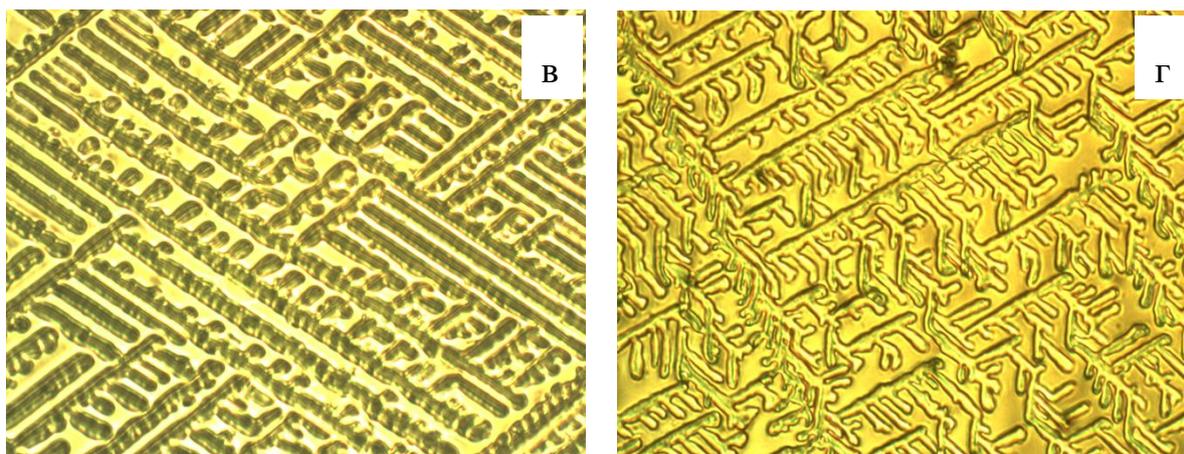
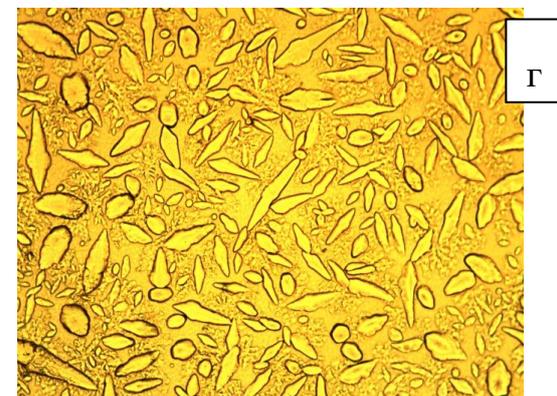
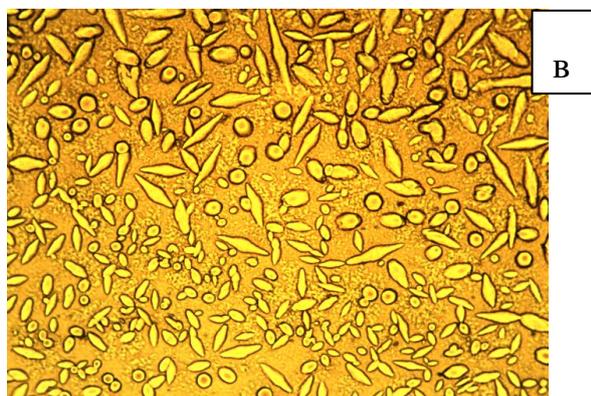
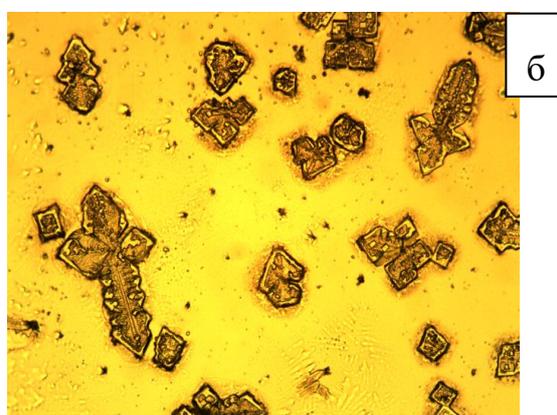


Рис. 24. Морфология кристаллических образований из экстракта, полученного с использованием азотной кислоты в качестве подкислителя, х 200

Результаты кристаллоскопических исследований данных водных экстрактов шунгита явным образом свидетельствуют об однородности их химического состава. С.П. Молчанов и соавт. [48] в своей работе отмечают, что процесс самоорганизации кристаллических структур обусловлен физико-химическими факторами внутри и на поверхности испаряемой капли, сопровождающимися переносом частиц. Скорость испарения, как основная движущая сила самосборки, зависит от внешних факторов – температуры окружающей среды, температуры подложки, давления паров растворителя в окружающей среде, а также конвективных потоков в атмосфере, структурированности подложки, внешних силовых полей, действующих как на поверхности, так и в объёме капли.

При завершении опытов с кислотами в качестве подкислителя экстрагента – водной среды, использовали концентрированную серную кислоту. Все этапы повторяли в точности с предыдущими опытами. Через 30 мин после внесения щебня шунгита в емкость с водой рН водной среды имел значение 6,0 – 6,5. Подтитровкой с использованием серной кислоты снижали рН до значения 2,0-2,5. Экстракцию проводили в статическом режиме при комнатной температуре. Исследования по получению водных экстрактов минерала шунгита с серной кислотой проводились при участии студентов – биологов Института биологии и экологии Владимирского государственного университета имени. А.Г. и Н.Г. Столетовых. Специфика

методики заключалась в том, что все студенты группы использовали щебень шунгита из одной партии, дистиллированную воду из одной емкости и одинаковое время настаивания. Каждый студент в отдельности готовил свой экстракт от начальной стадии до получения концентрированного и нейтрализованного раствора. По завершению опыта проводились кристаллоскопические исследования с записью изображения морфологии кристаллов твердой фазы. На рис. 25 представлены кристаллограммы из экстракта шунгита, полученного при подкислении водной среды на этапе экстрагирования концентрированной серной кислотой до pH 2,0-2,3, концентрирования экстракта выпариванием и изменением кислотности до pH 4,0-4,5 добавлением раствора щелочи.



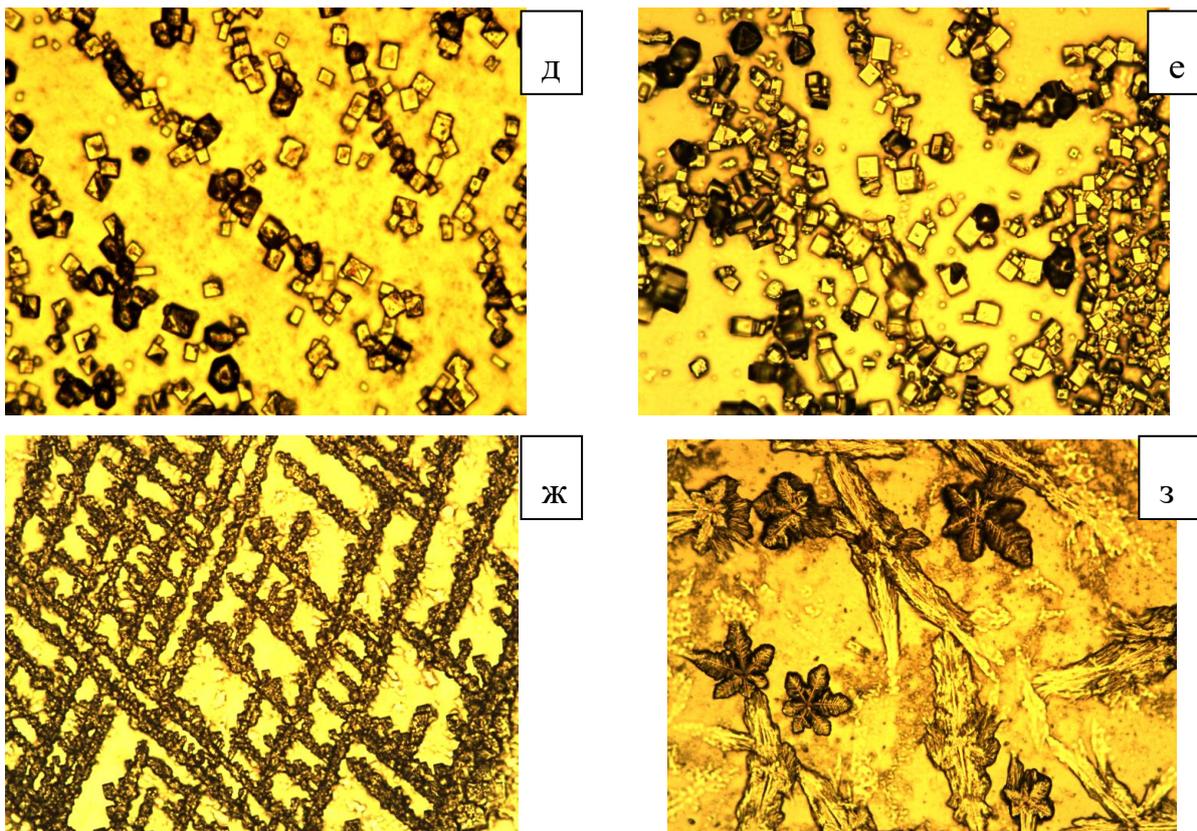


Рис. 25. Морфология кристаллических образований из экстрактов при использовании в качестве подкислителя серной кислоты, x200

После удаления образовавшейся взвеси центрифугированием проводили кристаллоскопические исследования. К особенностям данного коллективного опыта следует отнести то, что студентами были получены различные по морфологии кристаллические структуры.

На рис. 25 видно, что при явных отличиях в морфологии кристаллов необходимо отметить совпадающие картины, полученные попарно студентами. Снимки на рис. 25 «а» и «б» первая пара; «в» и «г» - вторая пара; «д» и «е» - третья пара. Совершенно различные между собой по морфологии кристаллы «ж» и «з» получены четвертой парой студентов. Удовлетворительного объяснения данному феномену мы не нашли за исключением явления полиморфизма, связанного с некоторыми отличиями во внутреннем строении, что обуславливает различия в кристаллических формах.

Как следует из опытов с кислотами, по морфологии кристаллические образования характеризуются выраженным полиморфизмом структур содержимого дегидратированных фаций. Метод кристаллоскопии, основанный на закономерностях самоорганизации при переходе из жидкокристаллического в фиксированное устойчивое состояние, несет информацию о самом процессе дегидратации и о характере взаимовлияния электролитов исследуемого материала, представляющего собой систему вода — минеральные вещества. По морфологии фации и этапам высыхания экстрактов можно судить об изменении электролитного состава взятого образца, каждая составляющая которого качественно и количественно отражается в структуре фации.

Экстрагирование редкоземельных ультрамикроэлементов из природного нанотехнологического минерала шунгита в водную среду — это сложный физико-химический процесс. Наиболее эффективно лантаноиды экстрагируются в сильноокислой среде pH 2,0-2,5. Нейтрализация кислотности водных экстрактов шунгита сопровождается эффектом очистки от макро- и микроэлементов при сохранении лантаноидов. При кристаллоскопических исследованиях экстрактов шунгита до нейтрализации кислотности отмечается образование кристаллических структур с высокой степенью упорядоченности.

Подводя итог исследованиям по получению очищенного и концентрированного водного экстракта минерала шунгита совершенно очевидно, что должны быть более убедительные доказательства присутствия в составе водных экстрактов редкоземельных ультрамикроэлементов — лантаноидов. Ранее это было показано в экспериментах с бактериями и нанобактериями, но в ранних опытах была использована шунгитовая вода содержащая макро-, микро- и ультрамикроэлементы — лантаноиды.

Одним из доказательств присутствия в водном экстракте лантаноидов может быть феномен комплексобразования с органическими веществами. Известно, что лантаноиды с рядом органических соединений, в частности с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА), образуют комплексные соединения.

6.4. Комплексобразование лантаноидов с ЭДТА

Этилендиаминтетрауксусная кислота ($C_{10}H_{16}O_8N_2$, ЭДТА, трилон Б, хелатон III) - четырехосновная аминокарбоксильная кислота. Молекулярный вес 292,35. Белый кристаллический порошок. Хорошо растворим в воде, образует стойкие растворы. Растворимость ЭДТА минимальна при рН 1,6-1,8. К особенностям препарата ЭДТА относится образование устойчивых комплексных соединений с большинством катионов, например: Са, Mg, Cu, Со, Ni и др. Схема действия трилона Б как ионкогулянта основана на извлечении ионов металла из нерастворимых солей металлов и замещения их на ионы натрия. Применение ЭДТА в медицине связано с удалением бляшек и улучшением состояния артерий, так как ЭДТА непосредственно связывает и выводит кальций из бляшек. Препарат образует стабильные комплексы (хелаты) с 2- и 3-х валентными металлами, включая кальций. В связи с этим его применяют при гиперкальциемии при заболеваниях сопровождающихся избыточным отложением солей кальция в организме. ЭДТА благодаря амфотерной природе, т.е. наличию в структуре как аминных, так и карбоксильных групп, обладает способностью взаимодействовать с редкоземельными элементами (РЗЭ) с образованием устойчивых внутрикомплексных соединений [17].

Для исследований готовили основной 5% раствор двуназатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты на дистиллированной воде с рН 4,5.

Первоначально были проведены кристаллоскопические исследования собственно 5% растворов ЭДТА с рН 4,4-4,6 от различных партий и сроков приготовления.

На рис. 26 приведены результаты кристаллоскопии 5% растворов ЭДТА. Кристаллоскопия растворов ЭДТА сопровождалась образованием кристаллов напоминающих срез дерева, в котором из центра кристаллизации расходятся радиальные лучи, пересекающие concentрические окружности. При этом каждый срез ограничен от других разделяющей полоской. В агрегатах видны concentрические наслоения вокруг центра с образованием многослойной структуры. В центре сферы видны радиальные лучи.

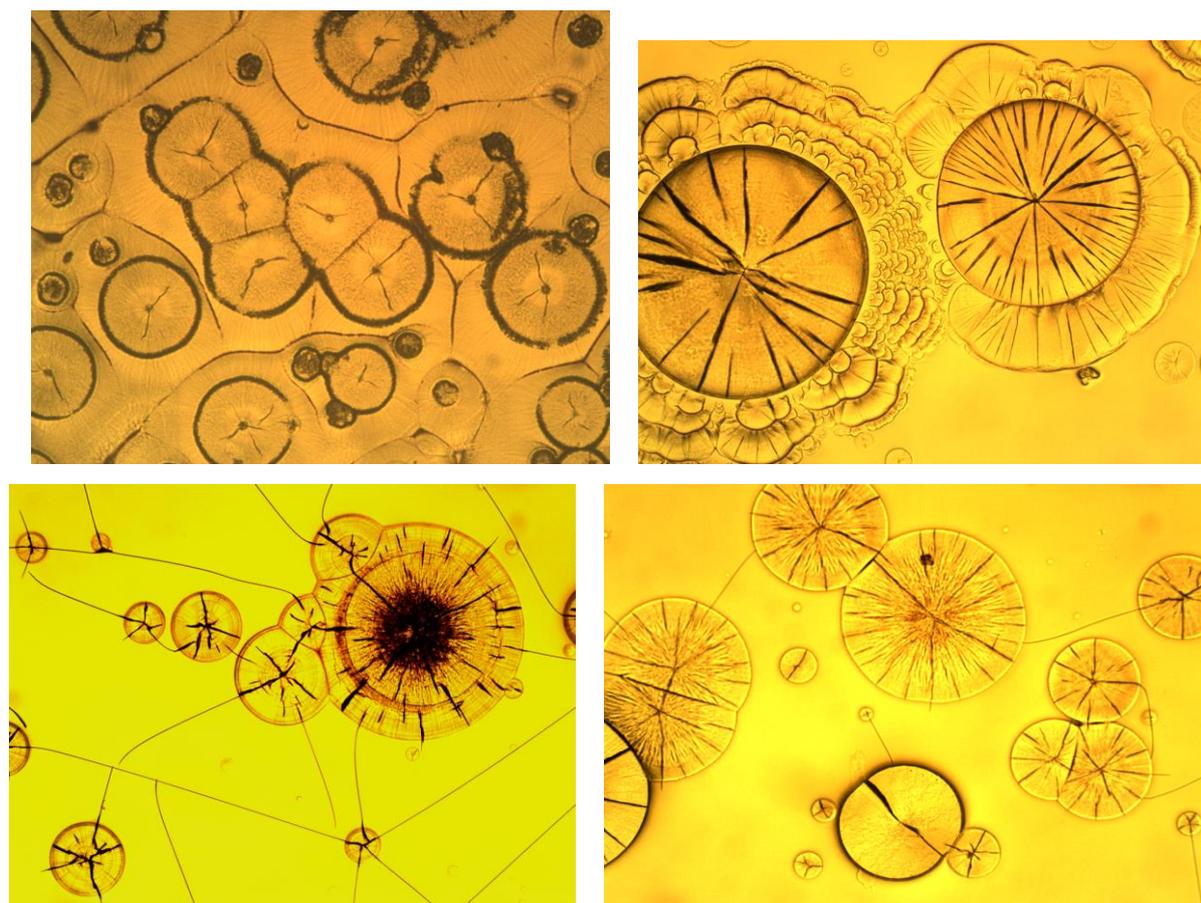




Рис.26. Морфологические особенности кристаллических структур 5% растворов ЭДТА из различных партий, x100 и 200

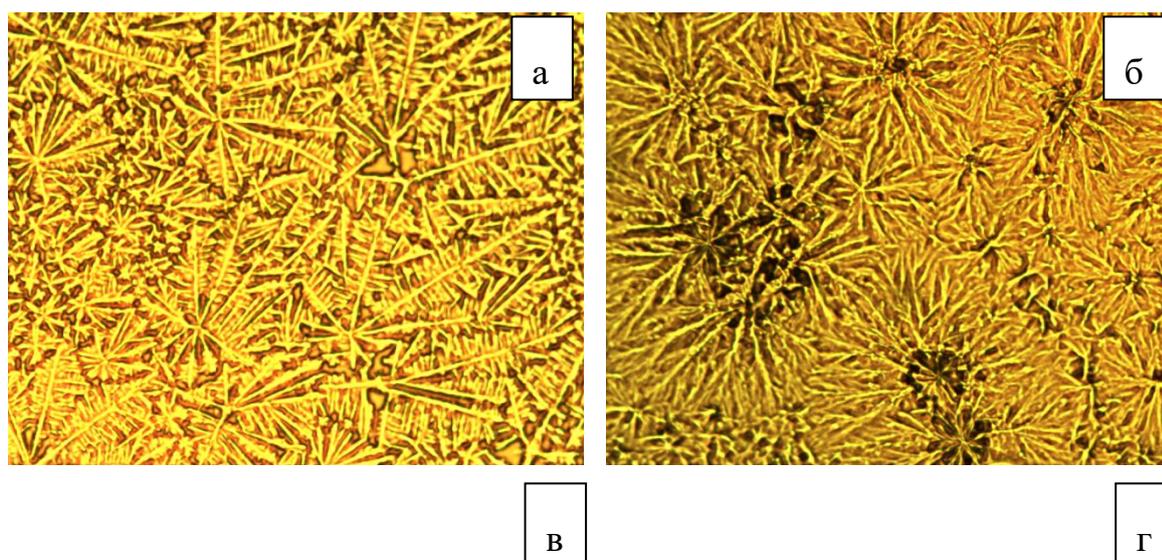
С целью определения присутствия лантаноидов в водном экстракте минерала шунгита были проведены опыты по их хелатированию комплексонатом – ЭДТА с визуализацией эффекта их взаимодействия методом классической кристаллоскопии. В опытах использовали водный экстракт шунгита приготовленный в отработанном режиме с конечным значением рН 4,0.

Термин «хелатирование» обозначает циклические структуры, которые образуются в результате присоединения катионов к двум или более донорным атомам, принадлежащим одной молекуле комплексообразующего агента. Название “хелат” происходит от греческого слова, которое означает “клешня”, отсюда и еще одно название этих соединений – “клешневидные”. Основным свойством комплексонов является способность образовывать с большинством ионов металлов в водных растворах комплексонаты. При введении комплексона в раствор, содержащий катион металла, создаются условия для конкуренции между молекулами гидратной оболочки катиона и молекулами внесенного в

раствор хелата, происходит это из-за высокой, по сравнению с водой, донорной способности лигандных групп, их стерической доступности, а также соответствующего значения рН раствора.

При проведении опытов по комплексобразованию к 1 мл экстракта шунгита в пробирках типа Эппендорф добавляли 5% раствор ЭДТА в нарастающей концентрации – 50, 100, 150 и 200 мкл. Смесь перемешивали и после непродолжительной экспозиции при комнатной температуре исследовали методом кристаллоскопии.

Готовили предметные стекла, на которые наносили по 50 мкл смеси каждого образца. Дегидратацию проводили при +37°C до образования пленки-фации. Визуально лучшие пленки были получены в образцах с добавлением 100 и 150 мкл ЭДТА, которые имели однородный матовый цвет. В образце с 50 мкл ЭДТА пленки-фации были неоднородными по окраске, а именно часть пленки имела матовый окраску, другая – прозрачную. На рис. 19 представлены кристаллограммы смесей с увеличивающейся концентрацией ЭДТА, из которых следует явно выраженное изменение морфологии кристаллических образований.



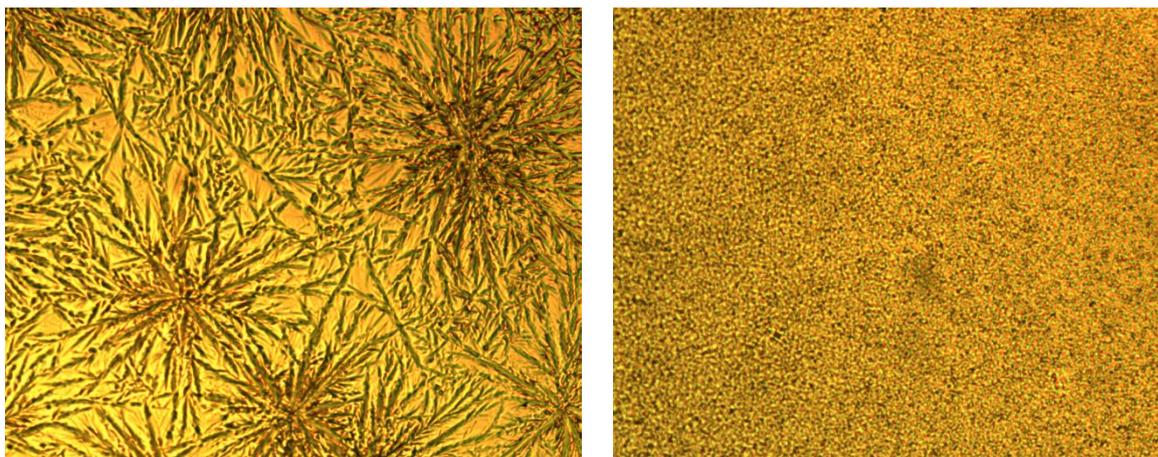
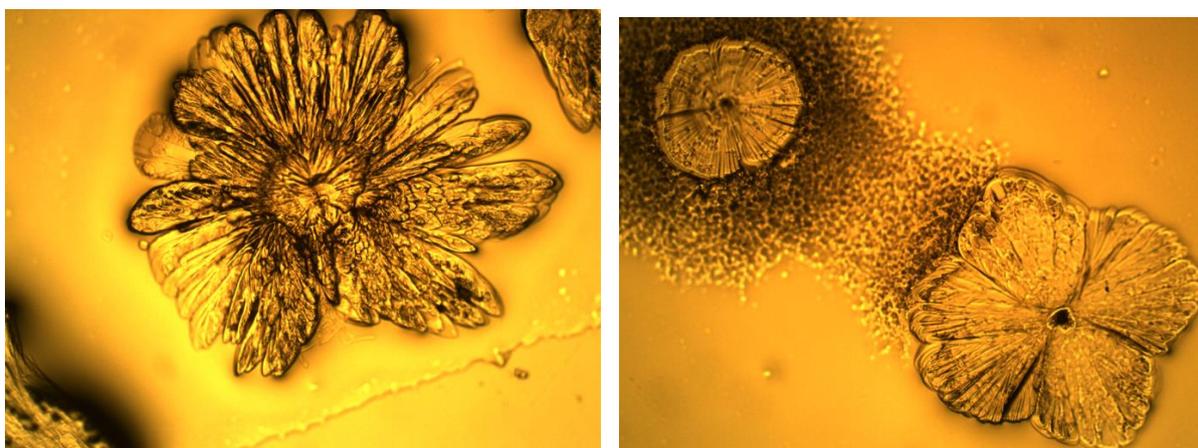


Рис. 27. Морфология кристаллических образований из смесей 1мл экстракта с вариантами добавок ЭДТА: (а) – 50мкл; (б) – 100 мкл; (в) – 150 мкл; (г) – 200мкл ЭДТА, х 200

Процесс хелатирования и последующая дегидратация водной фазы сопровождается образованием кристаллов в форме «звездочек» из стержнеобразных структур исходящих из подобия центра. При этом морфология образований наиболее выражена при добавлении 150 мкл ЭДТА, что можно считать за оптимальное соотношение концентраций. При добавке 200 мкл ЭДТА на 1 мл экстракта кристаллограммы были представлены однородным мелкозернистым фоном при отсутствии выраженных кристаллических образований.



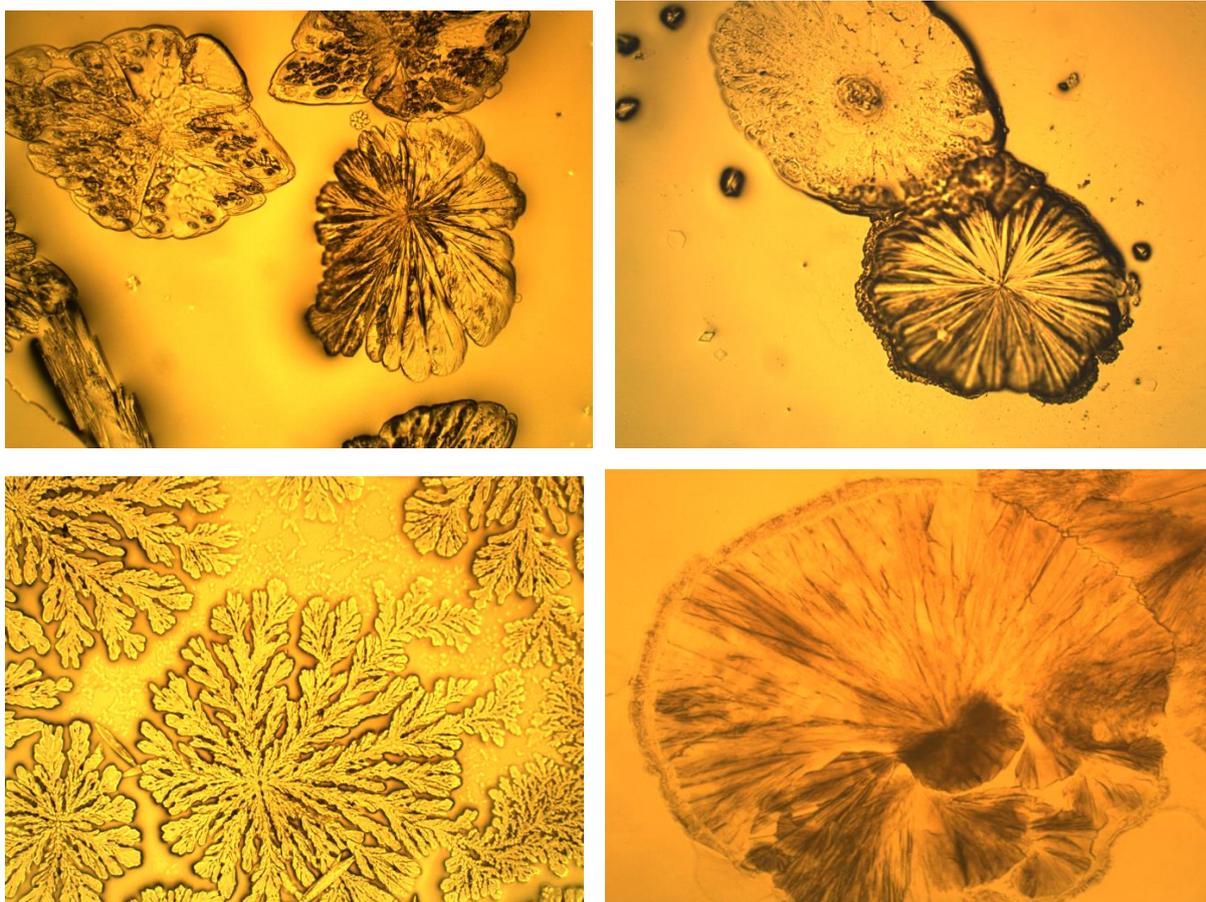


Рис. 28. Морфология хелатных комплексов ЭДТА с включением в их состав катионов лантаноидов, х 200

В последующих опытах при сохранении общей методики 1 мл экстракта смешивали со 150 мкл 5% раствора ЭДТА. Отличие состояло в том, что дегидратацию водной фазы после нанесения смеси на предметное стекло проводили в течение 24 часов и более при комнатной температуре. Результаты исследований твердых пленок-фаций в проходящем свете тринокулярного микроскопа показали наличие кристаллов в виде концентрированных образований отличающихся по размерам и форме (рис. 28). Отдельные кристаллы имели форму цветка, другие имели сходство с исходными кристаллами ЭДТА с выраженным стержневым строением. Из представленных кристаллограмм на рис 20 следует, что эффект хелатирования сопровождается включением катионов лантаноидов в состав комплексов,

подтверждением чему служит полное отсутствие свободных кристаллов соли. Данные исследования совершенно определенно подтверждают факт присутствия лантаноидов в водном экстракте шунгита. Возможным объяснением различий в морфологии комплексов является «старение» пленки-фазии с переходом от аморфной формы к кристаллической при более продолжительном хранении при комнатной температуре. Известно, что в процессе «старения» происходит рекристаллизация осадка с изменением размеров кристаллов за счет более мелких, то есть старение сопровождается их укрупнением благодаря комплексообразованию. При этом состав комплексонов зависит от многих факторов, которые делят на внутренние (рН среды, мольное соотношение реагентов, концентрация и пересыщение растворов, примеси) и внешние (температура, давление, время осаждения) [40, 84].

Глава 7. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОДНОГО ЭКСТРАКТА ШУНГИТА

7.1. Водный экстракт шунгита как питательная среда для репродукции плесневых грибов

В условиях наших опытов в процессе продолжительного времени экстрагирования (2 недели и более) в емкостях со щебнем шунгита в водном растворе с рН 2,0-2,5 отмечали рост и размножение мицелий грибов. Данный факт имел место по причине общей нестерильности процесса экстракции. Естественно дальнейшее использование в работе контаминиро-

ванных экстрактов исключалось. В связи с этим время экстрагирования минеральных элементов выдерживали более 72-96 часов. Затем водный экстракт подвергали концентрированию путем выпаривания воды. После нейтрализации кислотности экстракта добавлением раствора щелочи и его осветления путем центрифугирования, раствор расфасовывали по 400 мл в стеклянные флаконы, закрывали резиновыми пробками, закатывали алюминиевыми колпачками и проводили термообработку в автоклаве при температуре +121°C в течение часа. Полученные таким образом стерильные образцы хранили при температуре +4°C до использования.

При необходимости взятия раствора из герметически закрытого флакона резиновую пробку прокалывали иглой от шприца для доступа воздуха, а отбор экстракта проводили через шприц с иглой, введенной через пробку во флакон. При отсутствии фильтрующей насадки на воздушной игле при отборе раствора во флакон входил атмосферный воздух. По истечению 7-10 дней во флаконе с экстрактом вырастали мицелии плесневого гриба (рис. 21). Если на иглу для воздуха надевали насадку фильтра Minisart с размером пор 0,2 мкм, тем самым предотвращали попадание нестерильного воздуха и, как результат, исключали контаминацию водного экстракта минерала шунгита плесневыми грибами.



Рис. 29. Флакон с экстрактом шунгита после автоклавирования, в который через иглу от шприца проникает воздух, и, как следствие, вырастают мицелии плесневых грибов

Для определения вида выросших грибов проводили исследования по методике выявления плесневых грибов в соответствии с ГОСТ 10444.12-2013. С этой целью в чашки Петри с плотной средой Сабуро высевали по 0,1 мл нативного материала, взятого из флаконов с проросшим экстрактом шунгита. Засеянные чашки Петри инкубировали аэробно, крышками вверх, в горизонтальном положении в инкубаторе при температуре $(25\pm 1)^\circ\text{C}$ 5 сут.

В процессе инкубирования в чашках Петри вырастали плоские бархатистые колонии оливково-зеленого цвета, обратная сторона которых имела черный цвет. По морфологическим признакам было установлено, что в водном экстракте минерала шунгита с рН 2,0-4,0 и температуре $+4^\circ\text{C}$ вырастают мицелии плесневых грибов Кладоспориум (*Cladosporium*) и Пенициллиума (*Penicillium*). Известно, что Кладоспориум имеет многоклеточный, слабо ветвистый мицелий, на конидиеносцах которого



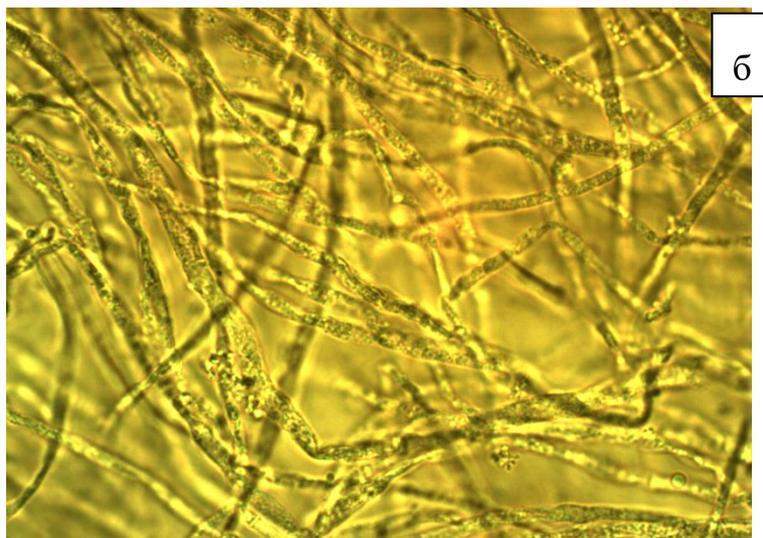


Рис. 30. Мицелии грибов извлеченных из флакона с проростом: а – 600-кратное увеличение; б - 1000 – кратное увеличение

образуются гроздевидные скопления оливково-зеленых овальных спор. Для идентификации плесневых грибов проводили микроскопирование мицелий и спор методом световой микроскопии на микроскопе «Olympus» при различном увеличении.

По истечению 3 суток инкубирования проводили предварительный учет количеств выросших колоний, а через 5 окончательный. Развитие плесневых грибов на питательных средах сопровождается появлением колоний различной окраски (рис. 31).

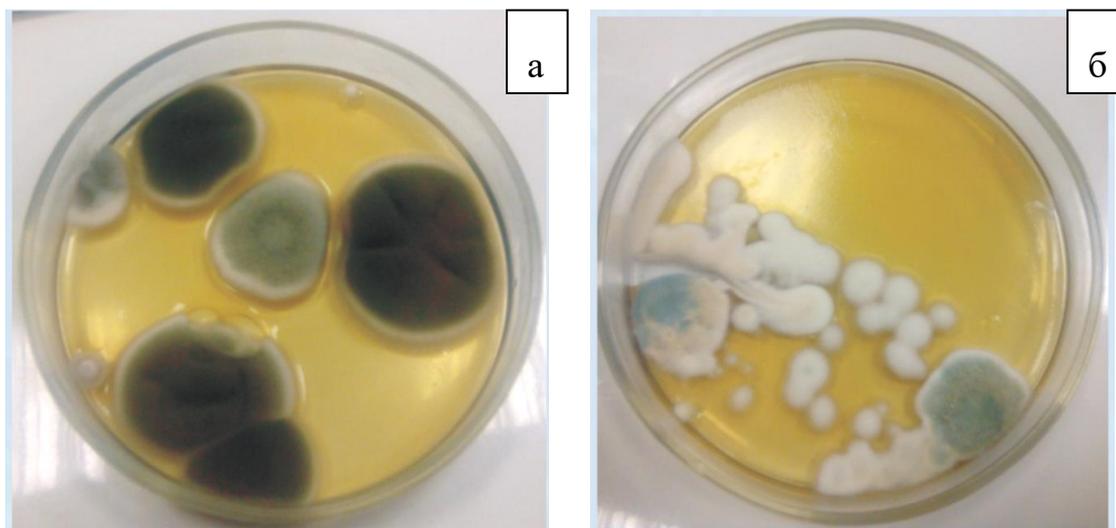


Рис. 31. Колонии грибов Кладоспориум (а) и Пенициллиума (б) на среде Сабуро

Данный факт роста грибов на растворе при сильно кислом значении рН, содержащем лантаноиды, не является исключением в мире микроорганизмов. Исследователи из Нидерландов получили первое свидетельство в пользу существования формы жизни, зависимой от редкоземельных металлов. Учёные из Неймегенского университета (Нидерланды) и Института медицинских исследований Общества Макса Планка (Германия) обнаружили бактерию *Methylophilum fumariolicum*, которой, как оказалось, жизненно необходимы целых четыре редкоземельных металла: лантан, церий, празеодим и неодим. Необычная бактерия живет в экстремальных условиях: в источнике кислотность среды составляет рН 2-5, а температура – 50-60°C. Бактерия добывает энергию из метана, а помогает ей это делать фермент метанолдегидрогеназа, который перерабатывает метанол, образовавшийся при разложении метана. Специалисты тщательно изучили структуру метанолдегидрогеназы бактерии и заметили, что она для расщепления метанола использует не кальций, а редкоземельные металлы, такие

как лантан, церий, празеодим и неодим. Все они поглощаются из окружающей среды [92].

Результаты исследований по росту и размножению плесневых грибов Кладоспориума и Пенициллиума позволяют заключить, что водный экстракт минерала шунгита обладает ростстимулирующей биологической активностью для микроорганизмов. В практическом аспекте следует исключать продолжительный контакт экстракта шунгита с атмосферным воздухом во избежание его контаминации плесневыми грибами. В следующем разделе монографии рассматривается возможность использования очищенного и концентрированного водного экстракта шунгита для удаления из питьевой воды бактериальной микрофлоры.

7.2. Удаление из воды бактериальной микрофлоры с помощью водного экстракта шунгита

Очевидно, следует принять без доказательств, что качественная и безопасная питьевая вода является важнейшим фактором, влияющим на здоровье людей, увеличения рождаемости, снижения смертности людей, увеличения продолжительности их жизни.

Вопросы физиологической полноценности питьевой воды требуют решения задач, связанных с установлением приемлемого диапазона её солевого состава, роли соотношений макро- и микроэлементов, а также роли воды в развитии неинфекционных и инфекционных заболеваний. По мнению профессора, доктора медицинских наук Яковлевой Т.В. качественная и безопасная питьевая вода является не только важнейшим фактором качества жизни населения, но и ведущим фактором, влияющим на здоровье людей [89]. Вопрос чистой воды напрямую связан и с демографической проблемой, которая заключается не только в увеличении рождаемости, но

и в снижении смертности, увеличении продолжительности жизни россиян. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), 80% всех болезней вызвано именно употреблением некачественной питьевой воды. Цена риска и потери здоровья населения от потребления некачественной питьевой воды в целом по России оценивается примерно в 33,7 млрд. рублей в год. По мнению специалистов только увеличение качества питьевой воды позволит увеличить среднюю продолжительность жизни на 5-7 лет [1, 16, 89].

Разработка критериев безопасности является важной составляющей обеспечения здоровья населения, так как питьевая вода является существенным фактором риска возникновения многих инфекционных заболеваний. К таким относятся вирусный гепатит А, рота- и норовирусная инфекция, дизентерия Флекснера, брюшной тиф и др. По медико-социальным и экономическим ущербам гепатиту А отведено одно из ведущих мест среди вирусных инфекций, он уступает лишь гриппу и острым респираторным инфекциям. Вследствие употребления некачественной питьевой воды возникают такие опасные инфекционные заболевания, как инфекционная желтуха, туляремия, водная лихорадка, бруцеллёз, полиомиелит, менингит [80].

Питьевая вода является одним из постоянных поставщиков макро- и микроэлементов в живой организм. Известно, что вода, как универсальный растворитель, может содержать в определяемых количествах до 70 химических элементов. Для того чтобы все биохимические процессы в организме протекали в оптимальном режиме, вода должна иметь определенные качества. Общеизвестно, что она не должна содержать хлора и его органических соединений, солей тяжелых металлов, нитратов, нитритов, пестицидов, ксенобиотиков, бактерий, вирусов, грибков, паразитов, нанобактерий, органических веществ и т. д. Сохранение

здоровья нации, снижение уровня смертности и увеличение продолжительности жизни являются важнейшими условиями решения проблемы обеспечения национальной безопасности. К числу определяющих факторов охраны здоровья населения относятся снабжение населения доброкачественной питьевой водой [51, 52].

Среди известных методов обеззараживания воды от бактериальной микрофлоры следует выделить следующие: введение в воду сильных окислителей, способных убивать бактериальные клетки; нагревание воды до температуры 80°C (пастеризация) – 100°C (стерилизация); облучение УФ-лучами, озонирование, ультразвук и др. К этому перечню следует добавить воздействие на воду биологически активных составляющих минерала шунгита. Из всего списка полезных свойств шунгита следует выделить сведения о бактерицидных свойствах шунгитовой воды, что может иметь практическое значение при эрадикации возбудителей бактериальной и вирусной этиологии [56].

В настоящем разделе монографии приведены экспериментальные данные по моделированию процесса очистки воды, искусственно зараженной бактериальной микрофлорой, с использованием водного экстракта минерала шунгита. Исследования были проведены на базе кафедры биологии и экологии ВлГУ и бактериологической лаборатории ГКУЗ ВО «Областной психиатрической больницы №1» г. Владимир при выполнении под руководством профессора Пономарева А.П. выпускной квалификационной работы студенткой Макиной О.А. [67].

Принципиальное отличие использования минерала шунгита для очистки воды заключалось в том, что щебень шунгита использовался для получения водного экстракта минералов, а не для загрузки в различные очистители воды. Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- получить очищенные и концентрированные экстракты минерала шунгита при использовании в качестве экстрагента подкисленную различными подкислителями до pH 2,0-2,2 дистиллированную воду;
- провести заражение образцов водопроводной воды тремя видами бактерий и их культивирование;
- образцы зараженной воды обработать водным экстрактом минерала шунгита и провести их осветление методом микрофильтрации;
- мембранные фильтры с осажденными бактериальными клетками инкубировать в присутствии питательной среды.

При проведении исследований были использованы музейные культуры микроорганизмов: *Escherichia coli* K₁₂, *Shigella sonnei* 2g и *Salmonella enteritidis* группы D. Для опытов были задействованы питательные среды и другие растворы: среда Эндо с фуксином; дезинфицирующий 0,1% раствор «Жавель-Абсолют» для обработки лабораторной посуды; 0,9% физиологический раствор; 5% раствор основного спиртового фуксина; спирт этиловый; дистиллированная вода; водопроводная вода.

Для тонкой фильтрации образцов контрольной и опытной воды использовали прибор вакуумного фильтрования ПВФ-35 (рис. 32). В состав прибора входят: ячейка для фильтрования, в которую помещали стерильный микрофильтр диаметром 35 мм с размером пор 220 нм, и вакуумная станция.

Термостат электрический суховоздушный ТС-1/20 СПУ для инкубирования микроорганизмов при температуре +37°C. Стерилизатор паровой ВК-30-01 использовали для стерилизации лабораторной посуды и мембранных фильтров при температуре 110°C (0,5 атм) в течение 20 минут.

Сущность моделирования опытов по очистке воды от контаминирующих микроорганизмов заключалась в том, что к образцам водопроводной воды добавляли указанные выше музейные микроорганизмы. Зараженные

водные растворы инкубировали при 37°C в течение 24 часов, а затем вносили водные экстракты минерала шунгита, отличающиеся минеральным подкислителем на этапе экстракции с обозначением: Э-1- HNO₃, Э-2 – H₂SO₄ и Э-3 - HCl. Контрольные и опытные образцы воды выдерживали в течение 20-24 часов при комнатной температуре и проводили отделение микроорганизмов микрофильтрацией через фильтр с диаметром пор 220 нм.

Перед началом собственно процесса фильтрации были подготовлены чашки Петри со средой Эндо с фуксином с нумерацией соответствующим образцам воды. В соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора ПВФ-35 фильтрование производится при соблюдении правил стерильности.



Рис. 32. Прибор для вакуумного фильтрования ПВФ-35

В воронку заливали 100 мл испытуемой воды, включали вакуумную станцию и проводили фильтрацию воды с определением времени прохождения образца воды через мембранный фильтр.

По окончании фильтрации выключали вакуумную станцию и в обратном порядке снимали воронку с основания, мембрану фильтра без при-

знаков влаги на поверхности извлекали стерильным пинцетом и помещали в чашку Петри со средой Эндо под соответствующим номером. Данную операцию повторяли с каждым контрольным и опытными образцами воды. Результаты визуальной оценки водных растворов до фильтрации и время фильтрации каждого образца представлены в табл. 23.

Таблица 23 – Визуальная оценка водных растворов перед пропуском через фильтр и время пропускания каждого образца

Вид культуры	Контроль	Э-1- HNO ₃ подкислитель	Э-2 H ₂ SO подкислитель	Э-3 HCl подкислитель	Смесь Э-1, Э-2, Э-3
<i>E. coli</i> K12	Прозрачная 44 сек.	Прозрачная 178 сек	Осадок ржавого цвета 85 сек	Прозрачная 185 сек	Прозрачная 127сек
<i>S. enteritidis</i> группы D	Прозрачная 51 сек.	Прозрачная 164 сек	Сильно ржавый осадок 88 сек	Слабый ржавый осадок 194 сек	Слабый ржавый осадок 147 сек
<i>S. sonnei</i> 2g	Прозрачная 42 сек	Слабый ржавый осадок 157 сек	Сильно ржавый осадок 94 сек	Слабый ржавый осадок 143 сек	Прозрачная 64сек

Эффект добавления водного экстракта с обозначением «Э-1» к бактериальным культурам и последующей инкубации в течение 24 часов выражается в сохранении прозрачности растворов с кишечной палочка K12 и *S. enteritidis* и образованием слабо выраженного ржавого осадка с *S. sonnei* 2g. При этом время прохождения растворов через мембранный фильтр соответственно равно – 157 и 178 сек. Несмотря на визуально отмечаемую прозрачность водных растворов, время их прохождения через фильтр по сравнению с контролем увеличивается в 4 раза.

Внесение водного экстракта шунгита «Э-2» во флаконы с бактериальными культурами сопровождалось образованием осадков с выраженной окраской напоминающей ржавчину. Время прохождения данных образцов через фильтр сохраняется на одном уровне – 85, 88 и 94 сек.

Эффект от внесения водного экстракта шунгита «Э-3» в суспензии бактериальных культур несколько различается: суспензия с кишечной палочкой сохраняет прозрачность и время пропуска через фильтр составляет 185 сек. В суспензиях с *Salmonella enteritidis* и *Shigella sonnei* образуются осадки со слабо выраженной окраской напоминающей ржавчину. Время пропуска несколько различается - 194 и 143 сек соответственно.

В качестве визуального подтверждения факта различий между контрольной и опытной бактериальными суспензиями, пропущенными через микрофильтры по характеру окраски осадка, на рис. 33 приведены фотографии фильтров сразу же после завершения процесса фильтрования. Отмечается незначительное изменение цвета поверхности фильтра контрольного образца и более интенсивного опытного. Подобная картина сохраняется и при пропуске водных растворов, зараженных *S. enteritidis* и *S. sonnei*.

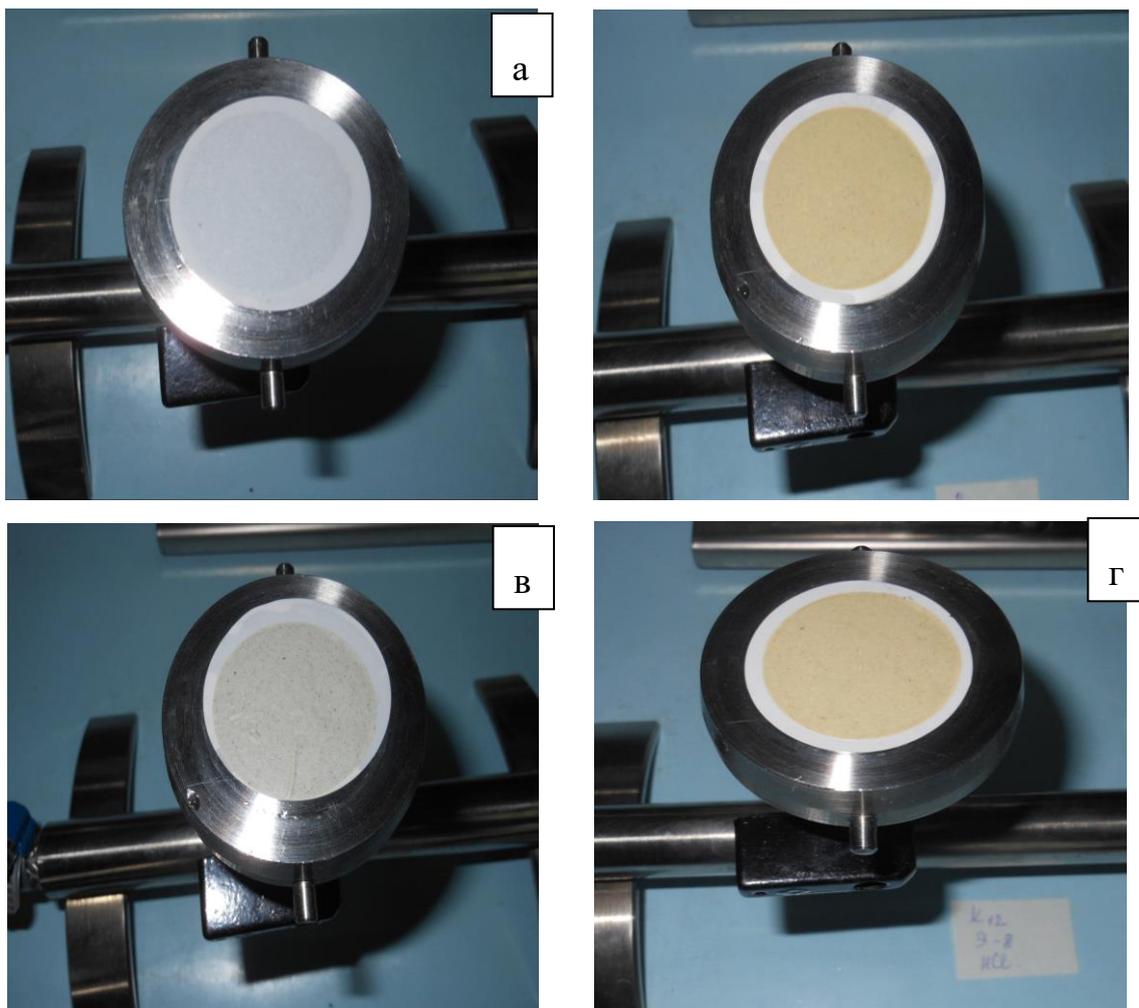


Рис. 33. Образование осадков на поверхности фильтров после пропускa контрольной воды зараженной кишечной палочкой (а) и обработанной экстрактами Э-1-(б), Э-2 (в) и Э-3 (г)

На рис. 34 представлены снимки фильтров после пропускa образца контрольной воды, зараженной культурой *S. enteritidis* (а) и опытных образцов с добавлением экстрактов шунгита Э-1 (б), Э-2 (в) и Э-3 (г).

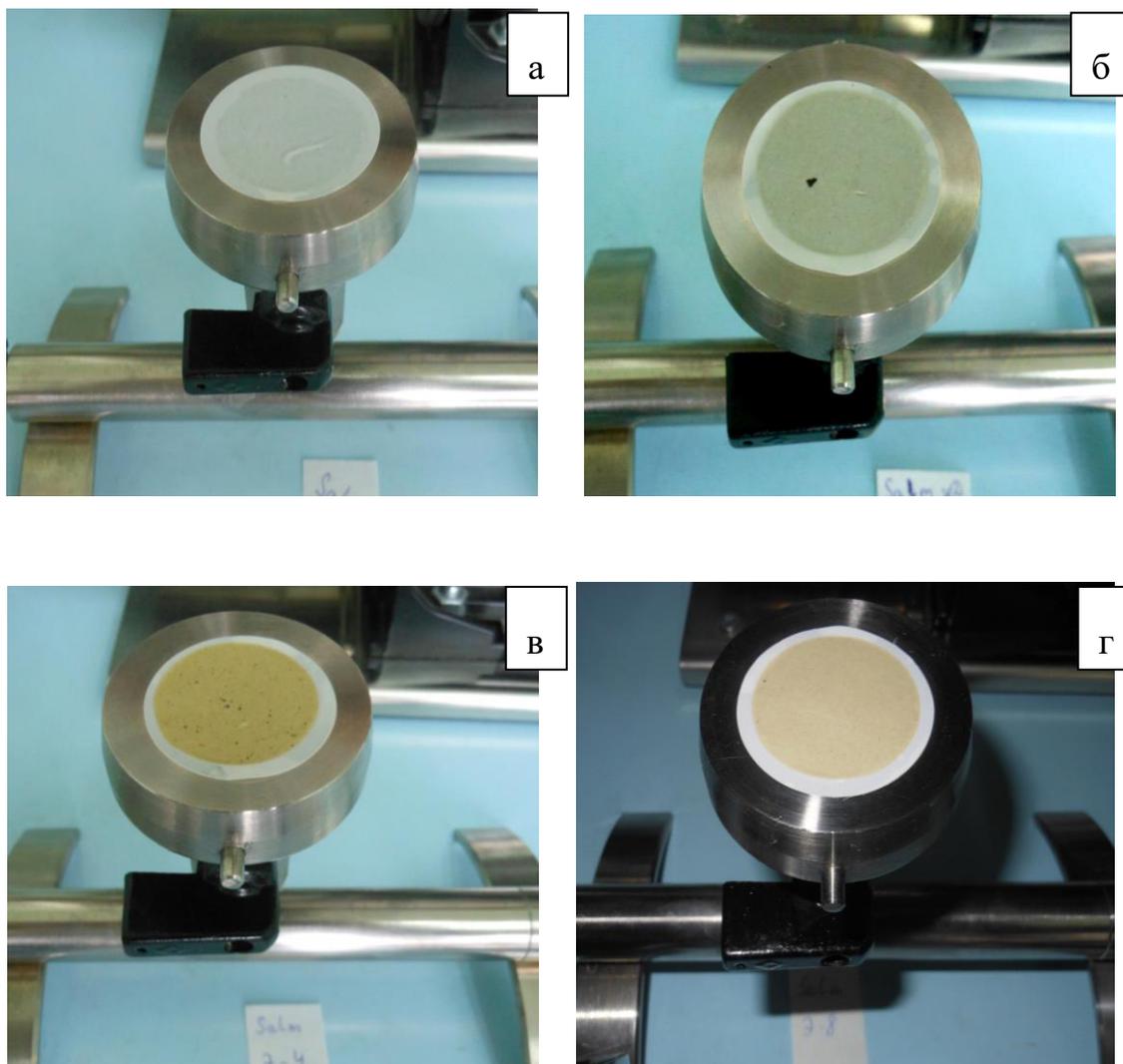


Рис. 34. Осадки на поверхности фильтров после пропускa контрольного и опытных образцов воды (Э-1, Э-2 и Э-3), зараженных *S. enteritidis*

Осадки на поверхности фильтров выделяются по окраске их кольцевой периферической части, закрытых уплотнительной прокладкой, и основной поверхностью фильтрования. Из снимков видно, что при наличии одного вида бактерий во всех образцах воды окраска зависит от вида использованного экстракта шунгита.

На рис. 35 мембранные фильтры после пропускa образцов контрольной воды и опытных, зараженных *S. sonnei* и обработанных экстрактами.

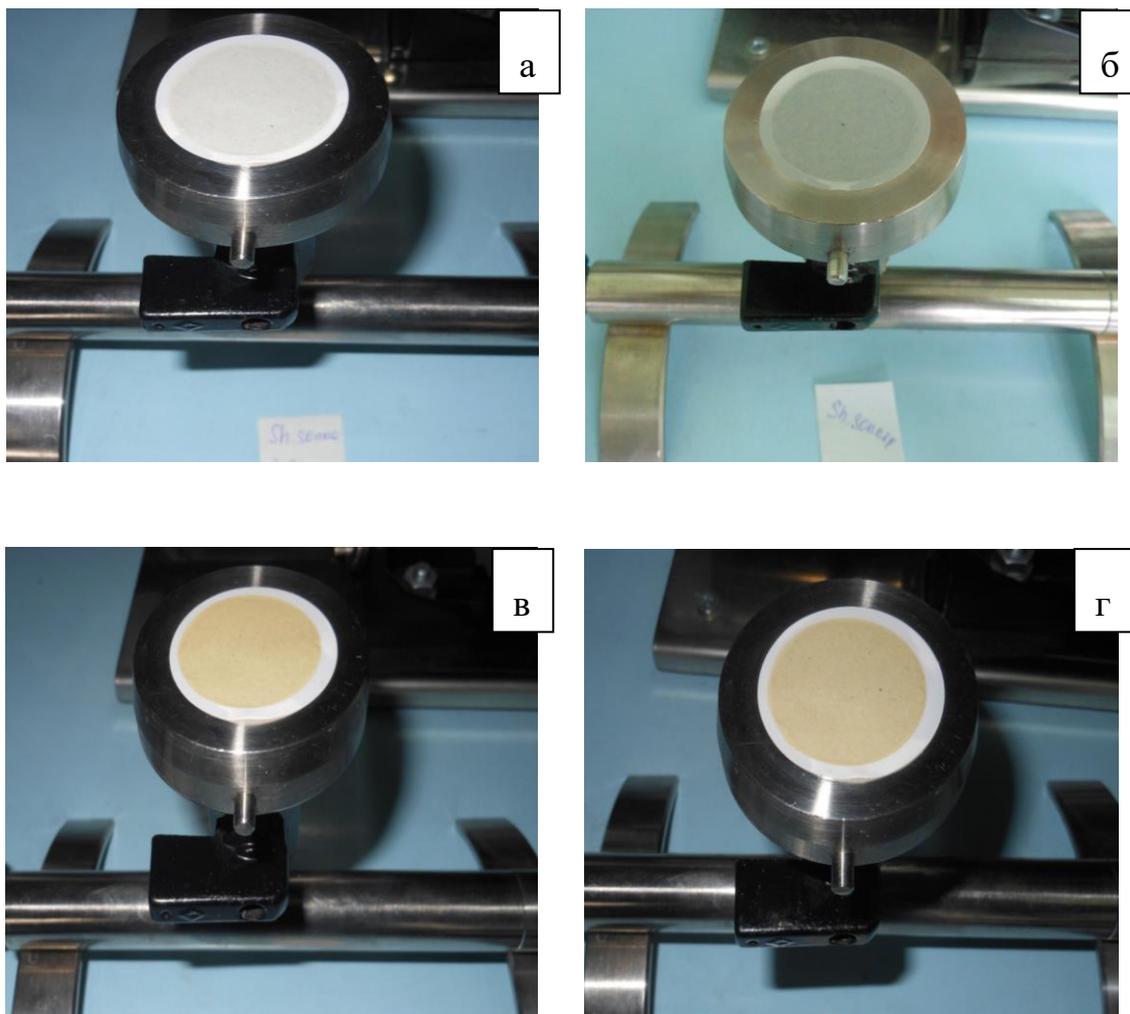


Рис. 35. Осадки на поверхности фильтров после пропуска контрольного (а) и опытных образцов воды зараженных *S. sonnei*: Э-1 – (б), Э-2 (в) и Э-3 (г)

Из приведенных снимков следует, что фильтры эффективно задерживают на своей поверхности образовавшиеся комплексы из бактериальных клеток, свидетельством чему является различие в окраске осадков. Идентичные результаты были получены также в опытах с экстрактами шунгита «Смесь – Э-1, Э-2 и Э-3.

Факт увеличения времени прохождения опытных образцов воды относительно контрольного через фильтрующий элемент и образование окрашенных осадков на поверхности фильтров свидетельствует о том, что обработка бактериальных суспензий экстрактами минерала шунгита сопровождается агрегированием бактериальных клеток. Последние, осаждаваясь на поверхности фильтра, образуют плотный монослой, снижающий проницаемость фильтрующего элемента.

В качестве подтверждения феномена агрегирования или комплексобразования бактерий в опытных образцах были проведены опыты по проверке роста и размножения бактерий, осажденных на поверхность фильтрующих мембран. С этой целью, как было указано выше, в стерильных условиях мембранные фильтры извлекали из фритты, помещали в чашки Петри со средой Эндо с фуксином и оставляли в термостате при +37°C на 24 часа. Затем проводили осмотр состояния фильтров.

На рис. 36 приведены фотографии фильтров в чашках Петри со средой Эндо, через которые был пропущен контрольный и опытные образцы воды, зараженные кишечной палочкой K12. Из снимков видно, что на мембране контрольного образца присутствуют колонии бактерий, а на мембранах с опытными образцами видны осадки без признаков бактериального пророста.

На рис. 37 и 38 представлены снимки мембранных фильтров после пропуска образцов воды зараженных бактериальными клетками *S. Enteritidis* и *S. Sonnei*. Представленные снимки демонстрируют существенные различия между контрольным и опытными образцами. Если на поверхности контрольных фильтров присутствуют колонии бактерии, то поверхности фильтров с опытными образцами свободны от них. Наблюдается только наличие осадков в виде сплошной пленки.

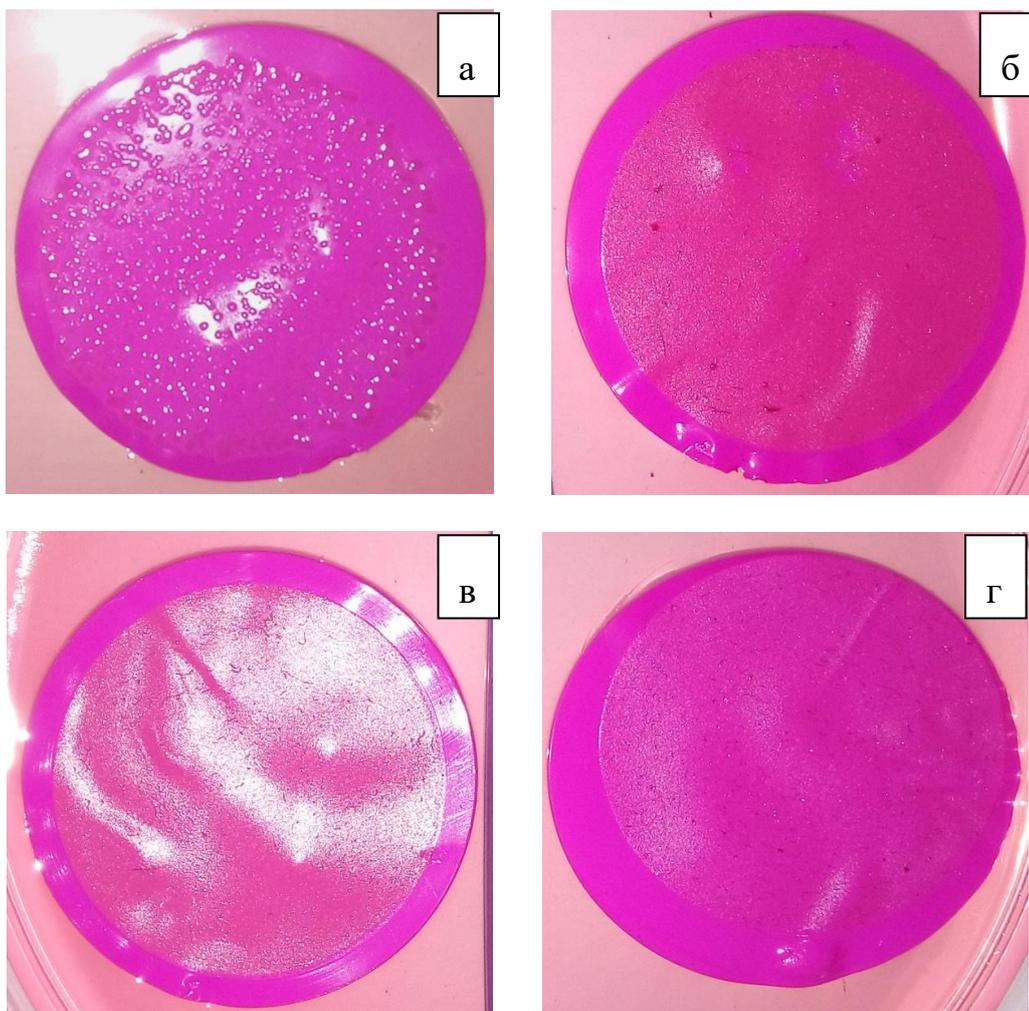


Рис. 36. Мембранные фильтры с осажденной кишечной палочкой после инкубации в питательной среде: (а) – контроль, (б) –Э-1, (в) -Э-2 и (г) - Э-3 - опытные после обработки экстрактами шунгита

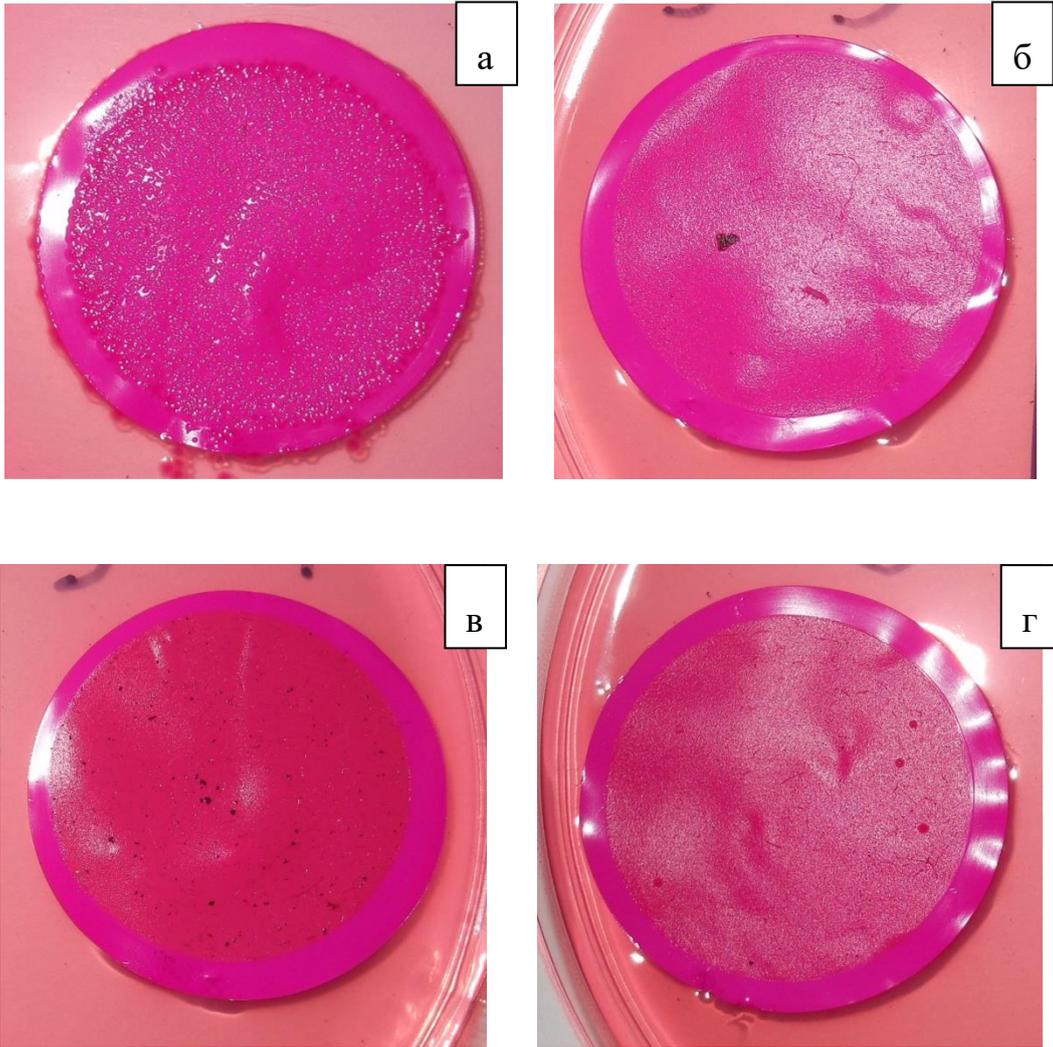


Рис. 37. Мембранные фильтры с осажденной *S. enteritidis* после инкубации в питательной среде: (а) – контроль и опытные (б) –Э-1, (в) -Э-2, (г) - Э-3 - после обработки экстрактами шунгита

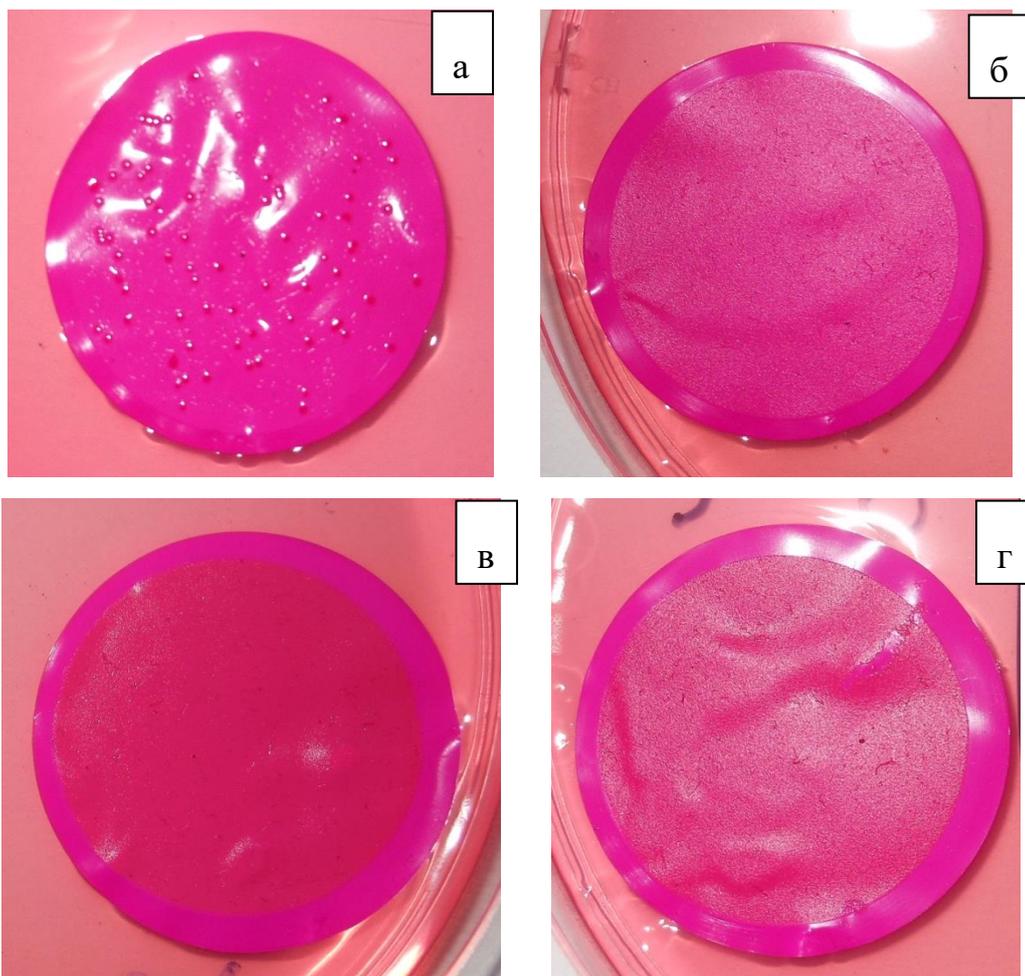


Рис. 38. Мембранные фильтры с осажденной *S. sonnei* после инкубации в питательной среде: (а) – контроль, и опытные (б) –Э-1, (в) -Э-2, (г) - Э-3 - после обработки экстрактами шунгита

Обобщенные результаты проведенных исследований по микробиологическому контролю роста и размножению бактериальных клеток, осажденных на поверхность мембранных фильтров и помещенных в чашки Петри с питательной средой с инкубацией при +37°C, приведены в табл. 24. Установлено, что клетки, осажденные из контрольных образцов воды, активно росли и размножались на поверхности фильтров с образованием колоний. Добавление к образцам воды, зараженных тремя видами культур клеток, водных экстрактов минерала шунгита в виде 10-кратного концен-

трата в объёме 2 мл на 100 мл зараженной воды сопровождается ингибированием роста и размножения данных бактериальных клеток.

Таблица 24 – Результаты микробиологического контроля роста и размножения бактериальных клеток из контрольных и опытных образцов зараженной воды

Вид культуры	Контроль	Э-1	Э-2	Э-3	Смесь Э-1, Э-2, Э-3
<i>E.coli</i> K12	множественный рост	нет роста	нет роста	нет роста	нет роста
<i>S. enteritidis</i> группы D	множественный рост	нет роста	нет роста	4 колонии	нет роста
<i>S. sonnei</i> 2g	множественный рост	нет роста	нет роста	нет роста	нет роста

Установлено, что процесс микрофльтрации бактериальных суспензий с использованием мембранного микрофилтра с диаметром пор 220 нм обеспечивает задержку бактериальных клеток, о чем свидетельствует их множественный рост в контроле. Отсутствие колоний на мембранах с опытными образцами совершенно очевидно является следствием комплексобразования бактерий при взаимодействии с лантаноидами.

В настоящих исследованиях интересным остаётся вопрос по содержанию в водных растворах минеральных элементов. Результаты контроля минерального состава воды, выполненных методом капиллярного электрофореза, одного из типовых опытов после пропуска через микрофилтры контрольных и опытных образцов представлены в табл. 25. из которой следует, что микрофилтр с диаметром пор 220 нм не является механической преградой для растворенных химических элементов, которые свободно проходят в контрольных и в опытных образцах.

Таблица 25 – Содержание катионов и анионов в образцах воды, пропущенных через микрофильтры

Образцы воды	Катионы (мг/л)				Анионы (мг/л)					
	Калий	Натрий	Магний	Кальций	Хлорид	Сульфат	Нитрат	Фторид	Фосфат	Карбонаты
Вода из контроля	2,3	9,5	17,7	64,9	13,0	29,0	0,56	0,26	0,09	246,6
Вода из опыта - Э-1, HNO ₃	2,5	16,2	17,5	63,2	16,4	26,5	51,2	0,31	0,08	218
Вода из опыта - Э-2, H ₂ SO ₄	3,0	15,2	17,3	63,5	17	88,6	0,7	0,28	0,12	197,3
Вода из опыта - Э-3, HCl	2,4	32,7	17,8	60,4	77,5	26,7	0,38	0,34	0,12	208

Прирост по содержанию некоторых элементов обусловлен их внесением с экстрактом шунгита. Более наглядно это видно на примере увеличения содержания в опытных образцах сульфатов, нитратов и хлоридов, что обусловлено видом подкислителя водной среды на этапе экстракции минералов из щебня шунгита.

Отсутствие различий по показателю общей жесткости воды: контроль – 4,7 мг-экв/л и опытные образцы – 4,5-4,6 мг-экв/л свидетельствует о том, что при добавлении к водной среде с бактериями экстракта шунгита концентрации катионов кальция и магния остается на исходном уровне. Это обусловлено тем, что при нейтрализации кислотности экстрактов шунгита раствором едкого натра происходит их удаление (до 95%) из состава водного экстракта. Содержание катионов натрия при этом увеличивается, и, как следствие, отмечается некоторое его увеличение в опытных образцах (табл. 25).

Главный вывод из результатов проведенных исследований заключается в том, что минеральная составляющая водных растворов не принимает участия в образовании осадка. Следствием обработки воды экстрактом шунгита и формирование осадка на поверхности мембраны в процессе микрофильтрации является извлечение из водных растворов органической составляющей.

В современном мире к наиболее актуальным проблемам качества воды относятся: присутствие в воде нерастворенных механических частиц; жесткость воды; растворенные в воде железо и марганец; плохие органолептические параметры воды; наличие в воде бактерий, вирусов, нанобактерий. Нерастворимые механические вещества удаляются с помощью различных фильтров в виде сеток, тканей и фильтрующих элементов. Для очистки воды с повышенной жесткостью используют ионообменные смолы. Наиболее проблематично проведение очистки от биологических агентов, которые могут иметь нанометровые размеры и свободно проходить через стерилизующие фильтры.

Установлено, что экстракт шунгита обладает бактерицидными свойствами в отношении различных микроорганизмов. Фактически в своей работе мы подтверждаем этот феномен с использованием очищенного и концентрированного водного экстракта шунгита. Это принципиальное отличие от известных способов очистки, при которых вода проходит через фильтры с наполнителем из щебня шунгита, позволяет более четко представлять механизм удаления из воды органической составляющей, включающей и биологические агенты: микробы, вирусы и нанобактерии. Процесс воздействия водного экстракта минерала шунгита сопровождается физико-химическим взаимодействием высокоактивных катионов лантаноидов с бактериальными клетками, что вызывает их комплексобразование и отделение в осадок при отстаивании, фильтровании или центрифугировании.

Подтверждением взаимодействия между компонентами экстракта и бактериями является образование окрашенных осадков на поверхности фильтров. Относительно механизма коагуляции микроорганизмов в зараженной бактериями воде следует привести известное правило Шульце – Гарди, согласно которому коагуляция определяется в основном валентностью противоионов. Высокая реакционная способность катионов лантаноидов обусловлена тем, что в нормальных условиях они трехвалентно положительные [39, 85]. Отношение порогов коагуляции одно-, двух-, и трехвалентных противоионов равно 1:60:700, то есть трехвалентных ионов для коагуляции нужно в 700 раз меньше, чем одновалентных [25]. Феномен избирательной коагуляции бактериальных клеток обусловлен реакцией комплексобразования катионов лантаноидов, которые обладают способностью взаимодействовать с отрицательно заряженными остатками фосфорной кислоты нуклеиновых компонентов микроорганизмов-контаминантов и вызывать их комплексобразование с последующим удалением микрофилтрацией [68].

Выполненные модельные опыты с тремя видами бактериальных клеток подтверждают факт комплексобразования, показанный ранее в опытах с другими микроорганизмами и позволяют заключить, что водный экстракт шунгита позволяет проводить эффективное обеззараживание питьевой воды. Кроме того, данный метод может быть использован на этапе предварительной оценки контаминации воды биологическими агентами из различных источников. Относительно использования очищенной с помощью водного экстракта шунгита воды в качестве питьевой следует исходить из предельно допустимой концентрации (ПДК), когда полезные элементы превращаются во вредные соли тяжелых металлов.

Глава 8. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВОДНОГО ЭКСТРАКТА ШУНГИТА ДЛЯ ЦЕЛЕЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

8.1. Сыворотка крови в биотехнологии и её варианты

В биологической промышленности широко используются первичные и перевиваемые культуры клеток человека и животных, на основе которых получают средства защиты и профилактики различных заболеваний. Но при этом сами препараты могут быть потенциальными источниками возбудителей различной этиологии для живых биосистем. Это обусловлено тем, что процесс культивирования клеток требует богатых по составу ростовых и поддерживающих питательных сред, обязательным компонентом которых является сыворотка крови животных. Одним из недостатков сыворотки, как главного компонента ростовых питательных сред, является их возможная контаминация в виде различных вирусов, дрожжей, грибов, L – форм бактерий, микоплазм, нанобактерий, ингибирующих белков не ясной этиологии. Это не только отрицательно сказывается на размножении клеток и репродукции вирусов, но и сопровождается загрязнением клеточных культур, а, следовательно, и конечного продукта, получаемого на их основе. К другим недостаткам сывороток относится непостоянство их состава, обусловленного возрастом животных, их кормлением, происхождением и временем года получения сыворотки [19, 24, 58].

В настоящее время принято считать, что для достижения высокого качества сывороток крови животных необходимо использовать современные фильтрационные установки для удаления контаминирующих агентов. Однако известно, что фильтры с диаметром пор 100-200 нм, используемые для очистки сывороток, не служат препятствием для L-форм бактерий, ви-

русов, микоплазм и нанобактерий, несущих угрозу здоровью человека и животных. Кроме того, животные сыворотки (препараты из крови животных) являются достаточно труднофильтруемым продуктом и требуют нескольких этапов предфильтрации и финишной стерилизующей фильтрации [73].

Другие известные способы повышения качества сыворотки взрослого крупного рогатого скота для культивирования клеток животных и человека, предполагают асептическое взятие крови только у бычков и только из сердца. Отделение сыворотки осуществляют через 72 часа при $+1-2^{\circ}\text{C}$ и её фильтрацию с последующим замораживанием в полиэтиленовых канистрах при минус $15-20^{\circ}\text{C}$ не менее 7 суток, затем размораживают и удаляют 5% нижних гемолизированных слоев, а светлую сыворотку подвергают 1-кратной стерилизующей фильтрации при $+2-6^{\circ}\text{C}$. Авторы утверждают, что удаление из нативной сыворотки крови бычков веществ, ингибирующих рост клеток, достигается методом замораживания – оттаивания [54а].

При изготовлении медицинских и ветеринарных препаратов для специфической профилактики альтернативным вариантом сыворотке КРС является сыворотка крови северных оленей, эмбриональная сыворотка и её искусственные заменители. Следует отметить, что сыворотка крови северных оленей малодоступна, а её производство возможно в сезон массового забоя животных в возрасте 1-5 лет [20, 21].

Для инициации и повышения скорости роста культур клеток наиболее распространенной добавкой к питательным средам является эмбриональная бычья сыворотка. Богатое разнообразие белков обеспечивает универсальность её применения при культивировании широкого спектра культур клеток. На первой стадии процесса получения данной сыворотки проводят заготовку крови от бычьего зародыша, как только последний будет изъят из забитой коровы. Обычный метод сбора крови – сердечный прокол, при

котором минимизируется контаминация крови от самого зародыша и окружающей среды. После центрифугирования крови отделяют сыворотку и замораживают для последующей обработки.

Вторая стадия включает каскадную фильтрацию сыворотки с заключительным фильтрованием через тройной мембранный фильтр с размером пор 100 нм [71a].

Производство эмбриональной сыворотки в РФ отсутствует, а её импортные варианты почти в 90% случаев контаминированы нецитопатогенным пестивирусом BVDV–вирусом диареи – болезни слизистых оболочек КРС, что создает условия для появления на рынке препаратов сомнительного качества. Исследователи указывают, что этот вирус является мощным иммуносупрессором, на фоне которого активируются другие инфекционные агенты. Кроме того, дефицитность и высокая стоимость также являются недостатками данных сывороток [15, 81].

В последние десятилетия проводятся интенсивные исследования по получению бессывороточных синтетических питательных сред (БС), которые снижают риск заражения культуры вирусами, грибами, микоплазмами и др. контаминантами. Прописи БС являются предметом собственности компаний Gibco, NuClone и др. и недоступны для широкого использования. Имеются сообщения о разработке российскими учеными БС Вектор-Вак-ПС1, пригодной для культивирования клеток и вирусов при получении вакцинных препаратов. Поскольку универсальной БС не существует, возникает необходимость разработки БС для каждого типа клеток, что относится к существенному недостатку данного препарата. Кроме того, отмечается пониженная жизнеспособность клеток в данной суспензии [6, 7].

Перспективным направлением, позволяющим устранить вышеуказанные недостатки сыворотки крови при масштабном выращивании переливаемых монослойных и суспензионных культур клеток, является ис-

пользование «искусственных» заменителей сыворотки. Фирмой NuClone разработаны заменители эмбриональных сывороток FetalClone I – III для культур клеток. Однако высокая стоимость данных препаратов и отсутствие производства их в РФ, ограничивает использование их при крупномасштабном производстве биопрепаратов [91].

В качестве альтернативы заменителям сыворотки и фетальным препаратам нами разработан метод очистки сыворотки крови КРС от контаминирующих микроорганизмов с использованием водного экстракта из горной породы – шунгита Зажогинского месторождения, содержащего лантаноиды.

Следующие разделы монографии включают вопросы подготовки экстракта шунгита, содержащего лантаноиды, очистку сыворотки с использованием лантаноидов, сравнительные исследования по культивированию культур клеток ВНК-21 с использованием заменителя сыворотки Fetal Clone II и сыворотки крови очищенной лантаноидами, сравнительные исследования культивирование клеточных линий человека и животных с использованием сыворотки крови, очищенной лантаноидами и сыворотки фирмы «БиолоТ».

8.2. Оптимизация режима получения водного экстракта шунгита

Обобщая результаты ранее проведенных исследований по получению водного экстракта шунгита и его практического применения на примере очистки воды от бактериальной микрофлоры следует выделить положительные и отрицательные стороны описанной технологии. Совершенно определенно предложенный подход получения биологически активного водного экстракта шунгита позволяет устранить основной недостаток щебня шунгита – гетерогенность его состава. Использование водного экс-

тракта шунгита, содержащего в среднем 60 химических элементов, позволяет стандартизировать условия работы и создает удобства в использовании. К несомненным положительным свойствам следует отнести избирательное удаление из воды контаминирующих микроорганизмов, обусловленных феноменом комплексобразования последних с лантаноидами. Метод получения водного экстракта шунгита, заключающийся в растворении щебня шунгита в водной среде с рН 2,0-2,5, при использовании дистиллированной воды в качестве экстрагента и настаивании в течение не менее 72 часов и последующем концентрировании экстракта путем простого выпаривания воды имеет следующие недостатки. Это длительность процесса настаивания, относительно низкий выход элементов, сложный и дорогостоящий процесс получения концентратов выпариванием свободной воды, что не позволяет использовать данный метод при получении больших объёмов экстракта. Известно, что в составе шунгита наряду с минеральной присутствует и органическая составляющая, присутствие которой в экстракте нежелательно как возможного источника структур органической природы. Ранее в работе были описаны опыты по удалению органической примеси путем замораживания-оттаивания, что затрудняет обработку больших объёмов экстракта и также следует отнести к недостаткам метода.

Для устранения указанных недостатков были проведены исследования по оптимизации процесса получения водного экстракта шунгита, включающие два новых подхода: прогрев щебня шунгита при температуре +200°C в течение 2,0 часов в сушильном шкафу ШСВЛ-80 и двух этапный экспресс-метод его растворения в сильно кислой зоне рН 1,3-1,5 с дополнительной ультразвуковой обработкой.

Включение этапа прогрева щебня шунгита при повышенной температуре имеет следующее значение. Первое, это высокотемпературное воздействие сопровождается стерилизацией щебня и испарением органиче-

ской компоненты из состава щебня шунгита. Второе, это происходит эффект термодиффузии химических элементов из внутренней области на поверхность щебня шунгита, что повышает выход элементов при растворении шунгита в кислой водной среде.

Сущность 2-х этапного растворения шунгита заключается в следующем: щебень шунгита после прогрева массой 1,5 кг помещали в пластиковую 10-и литровую емкость, заливали дистиллированной водой в объёме 7,5 л, вносили 10 мл концентрированной серной кислоты и проводили экстрагирование элементов в течение 20 мин. За данный период времени с поверхности щебня шунгита происходит активный переход макро-, микро – и ультрамикроэлементов в водный раствор. Для контроля отбирали пробу водного раствора и определяли рН, электропроводность (мкСм/см) и содержание (ppm). Последние параметры определяли с использованием кондуктометра TDS/EC Meter, показания которого основаны на прямой зависимости от количества растворенных в воде соединений.

На втором цикле растворения щебень шунгита в водном растворе переносили в ультразвуковую камеру «Сапфир», добавляли 5 мл серной кислоты и проводили ультразвуковую обработку в течение 20 мин. Отбирали пробу для контроля параметров экстракта. В данном случае объём водного экстракта в 7,5 л ограничен емкостью ультразвуковой камеры «Сапфир».

Водный экстракт сливали в приемную емкость, проводили нейтрализацию кислотности добавлением 10% раствора едкого натра до достижения рН 11,5 и оставляли минимум на 24 часа для осаждения образовавшейся взвеси из макро- и микроэлементов. После отстоя с помощью сифона откачивали надосадочный раствор, снижали добавлением серной кислотой водородный показатель до рН 3,5,-4,0. Затем раствор пропускали через микрофильтр, разливали по 400 мл в стеклянные флаконы, закрывали резиновыми пробками и закатывали алюминиевыми колпачками. Подготов-

ленный таким образом водный экстракт шунгита автоклавировали при температуре +120°C в течение 45 мин и хранили до момента использования.

Уменьшение времени экстрагирования по сравнению с простым настаиванием при 10-кратном повышении выхода элементов обусловлено использованием прогретого щебня, с поверхности которого химические элементы активно переходят в раствор при пониженном значении рН водной среды. Дополнительный эффект экстрагирования связан с воздействием ультразвука. Динамика изменения выхода элементов при последовательном прогревании щебня шунгита показывает постепенное их снижение (табл. 26). Данные получены после нейтрализации кислотности водного экстракта шунгита.

Таблица 26. Выход химических элементов в процессе экспресс-экстрагирования из прогретого щебня шунгита

№№ опытов	Солесодержание (ррм)	Электропроводность (мкСм/см)	рН	Кратность прогрева щебня
1	7 300	14 680	1,5	1-кратный
2	5 385	12 460	1,4	2-кратный
3	5 110	11 750	1,3	3-кратный
4	4 700	10 770	1,4	4-кратный
5	4 850	9 430	1,3	5-кратный
6	4 610	9 100	1,35	6-кратный
7	4 600	9 370	1,4	7-кратный
8	3 990	8 080	1,4	8-кратный

Для сравнения следует привести данные по экстракту, полученного при настое в течение 72 часов и концентрированного методом выпаривания свободной воды:

№1 - исходный экстракт рН 2,0 – 7750 мкСм/см;

№2 – после нейтрализация кислотности до рН 4,5 – 3100 мкСм/см;

№3 – после нейтрализация кислотности до рН 7,2 – 3050 мкСм/см;

№4 – после нейтрализация кислотности до рН 8,0 – 3150 мкСм/см;

№5 – после нейтрализация кислотности до рН 11,7 – 3400 мкСм/см.

Среднее значение выхода элементов при простом настаивании, последующем концентрировании выпариванием и нейтрализации кислотности равно 3150 мкСм/см. По сравнению с данными таблицы 26 экспресс-метод позволяет увеличить выход элементов от 4,6 (1-й прогрев) до 2,6 раза (8-й прогрев) в зависимости от кратности прогрева щебня шунгита. При этом затраты времени на получение 20 литров экстракта составляют: 2 часа собственно процесс экстрагирования, 24 часа отстой экстракта после нейтрализации кислотности, фильтрация и фасовка около 2 часов..

Обобщая результаты экспресс-метода экстрагирования элементов из щебня следует отметить выявленные особенности уникальной горной породы шунгита:

– высокотемпературный прогрев щебня шунгита сопровождается термодиффузией химических элементов к поверхности, что позволяет проводить многократное их экстрагирование из одной партии щебня;

– выход элементов существенно возрастает в сильнокислой зоне рН в режиме двухэтапного подкисления водного раствора, при этом совершенно определенным является факт экстрагирования элементов с поверхности щебня;

– повторное экстрагирование из прогретого щебня шунгита уменьшает содержание в экстракте примесей органической природы по причине их испарения при воздействии высокой температуры.

8.3. Очистка сыворотки крови крупного рогатого скота от контаминирующих микроорганизмов

В данном разделе монографии приведены результаты исследований по очистке сыворотки крови крупного рогатого скота от контаминирующих агентов. Задачей настоящей работы являлось улучшение качества сыворотки крови крупного рогатого скота за счет освобождения её от возможных контаминирующих агентов вирусной и бактериальной этиологии с целью предотвращения их попадания в состав питательной среды, используемой в биотехнологии для культивирования клеточных культур. Для решения поставленной задачи использовали биоматериал в форме сыворотки крови крупного рогатого скота, которую доставляли с боенских предприятий в замороженном виде для обработки на научно-производственное предприятие НПП «БИОХИМСЕРВИС» г. Владимир.

Сущность метода очистки сыворотки крови крупного рогатого скота с помощью водного экстракта шунгита заключается в том, что замороженный исходный материал после оттаивания осветляли микрофльтрацией через микрофильтр с диаметром пор 450 нм. К осветленной сыворотке в полипропиленовых емкостях, заполненных по 15 л, добавляли 1% экстракта шунгита, с показателем солесодержания от 4000 до 5000 ppm. Сыворотку оставляли при комнатной температуре на 48 часов с периодическим перемешиванием.

В результате экспозиции в сыворотке образуется взвесь, размеры и концентрация которых могут различаться в отдельных партиях. Данный

критерий свидетельствует об эффективности действия катионов лантаноидов в плане комплексобразования.

Отделение коагулированных частиц проводили с использованием центробежного проточного сепаратора «Сокол» при скорости вращения барабана сепаратора 11000 об/мин и производительностью 100 л/час. В процессе сепарирования через верхний лоток сепаратора происходит отделения по каплям жировой эмульсии, а осветленная сыворотка выходит через нижний лоток в приемную емкость. В процессе сепарирования 100 л сыворотки в шламовом пространстве барабана сепаратора формируется гелеобразный осадок из коагулированных частиц, образуемых вследствие добавления экстракта шунгита. Из шламового пространства барабана шпателем извлекали биосубстрат, который помещали в стерильный бюкс для проведения дальнейших исследований.

По завершению процесса сепарирования всего объема (200-220 л) сыворотку фильтровали через стерилизующий микрофильтр с диаметром пор 220 нм. Отфильтрованную сыворотку расфасовывали в стерильные бутылки 600 мл с градуировкой до 500 мл, для культур клеток с винтовой крышкой и диаметром горла 22 мм. Данные бутылки изготовлены из полиэтилентерефталата, стерильны и предназначены для работы со стерильными растворами, питательными средами.

На каждом этапе очистки проводили отбор проб сыворотки для контроля. В таблице 27 представлены данные биохимического контроля одного из типовых опытов следующих образцов сыворотки: нативная; прошедшая этап микрофльтрации через фильтр 450 нм; после внесения лантаноидов и экспозиции; сыворотка после стерилизующей микрофльтрации.

Сыворотка крови, осветленная сепарированием с отделением биосубстрата, в процессе стерилизующей микрофльтрации не вызывает

интенсивной закупорки пор фильтра, что значительно упрощает технологию микрофльтрации.

Из результатов биохимического контроля следует, что содержание компонентов белкового обмена: общий белок, альбумин, мочеви́на, мочеви́ная кислота, креатинин, билирубин в образцах сохраняются на уровне исходной сыворотки.

По содержанию кальция, магния, фосфора, калия, натрия, меди, алюминия, никеля и стронция различия отсутствуют на всех этапах очистки сыворотки. Отмечается колебания показателей по содержанию железа и марганца.

Главными липидными компонентами сыворотки крови являются холестерин и триглицериды, которые, как и ферменты сыворотки, аланинаминотрансфераза, альфа-амилаза, креатинкиназа, щелочная фосфатаза и другие в исходном образце и в образцах после сепаратора и микрофльтрации остаются на одном уровне.

Таблица 27. Результаты биохимического контроля сыворотки КРС

Тесты	Размерность	Сыворотка после фильтра 450 нм	Сыворотка после экспозиции с лантаноидами	Сыворотка после сепаратора и фильтра 220 нм
Общий билирубин	Мкмоль/л	4,5	4,2	4,0
Общий белок	Г/л	80	80	75
Хлориды	Ммоль/л	126	119	119
Фосфор	Ммоль/л	2,37	2,3	2,24
Железо	МкМоль/л	24,7	28,9	23,6
Триглицериды	Ммоль/л	0,25	0,21	0,22
Холестерин	Ммоль/л	2,61	2,43	2,29
Глюкоза	Ммоль/л	1,8	2,8	5,4

Мочевая кислота	МкМоль/л	142	138	111
Кальций общий	Ммоль/л	2,57	2,32	1,89
Альбумин	Г/л	32,6	30,3	28,9
Фосфатаза щелочная	Е/л	81	80	77
АЛТ	Е/л	21	19	22
АСТ	Е/л	58	57	55
Амилаза	U/л	44	40	37
Креатинкиназа	U/л	1299	1327	1423
Лактатдегидрогеназа	U/л	1198	1173	1197
Азот мочевины	Ммоль/л	6,5	6,5	5,8
Креатинин	МкМоль/л	130	130	126

Оценку содержания катионов лантаноидов в водном экстракте шунгита, 1% которого добавляли к нативной сыворотке, и в образцах сыворотки проводили методом масс-спектрометрии с ионизацией в индуктивно связанной плазме (ELAN DRC II, «PerkinElmer», США). Результаты контроля представлены в таблице 28.

Таблица 28. Содержание лантаноидов в экстракте и после добавления к сыворотке в процессе очистки

Хим. элементы	Водный экстракт шунгита (мкг/л)	Сыворотка + лантаноиды (мкг/л)	Сыворотка после сепаратора (мкг/л)	Сыворотка после фильтра (мкг/л)	Биосубстрат (мкг/л)
Церий	211,23	1,92	1,85	1,81	65,3
Неодим	162,54	1,41	1,4	1,35	29,4
Лантан	82,08	1,1	0,8	0,75	43,0

Гадолиний	46,34	0,38	0,41	0,41	7,7
Празеодим	38,24	0,3	0,32	0,32	8,5
Самарий	38,37	0,3	0,33	0,33	6,0
Диспрозий	26,9	0,23	0,2	0,24	4,2
Эрбий	11,6	-	-	-	2,0
Европий	9,24	0,16	0,17	0,21	5,1
Иттербий	6,65	-	-	-	1,2
Гольмий	4,81	-	-	-	0,8
Тулий	1,33	-	-	-	0,2
Лютеций	0,8	0,13	0,15	0,17	0,1

Из данных таблицы 28 следует, что при фактическом 100-кратном разведении экстракта содержание лантаноидов в сыворотке меньше расчетного. Из всей группы лантаноидов в образцах сыворотки не было выявлено четыре элемента: эрбий, иттербий, гольмий и тулий, но они присутствовали в биосубстрате. Это можно оценить, как результат полного связывания данных элементов в процессе коагулирования с последующим отделением взвеси в процессе сепарирования и микрофльтрации. Это обусловлено тем, что при переходе от La к Lu ионные радиусы плавно уменьшаются (La – 1,061 Å и Lu – 0,848 Å), а ионные потенциалы и потенциалы ионизации увеличиваются, что усиливает склонность РЗЭ к комплексобразованию. При этом устойчивость комплексов увеличивается с уменьшением радиуса от лантана к лютецию [53, 84].

По другим элементам на примере церия, неодима и лантана установлено, что их остаточные количества в сыворотке на конечном этапе меньше расчетных значений на 14,4, 17,0 и 9,1%. Данные масс-спектрометрического анализа свидетельствует о том, что большая часть лантаноидов переходит в биосубстрат в составе коагулированной взвеси.

Повышенные концентрации лантаноидов в составе концентрируемого в шламовом пространстве сепаратора биосубстрата свидетельствует о том, что лантаноиды вступают во взаимодействие с биоструктурами, которые отделяются в процессе сепарирования.

Для контроля эффективности очистки из гелеобразного биосубстрата, отобранного из шламового пространства сепаратора, на дистиллированной воде готовили 10% суспензию, осветляли центрифугированием при 1 500 об/мин в течение 10 мин и надсадочную осветленную фазу использовали для микробиологического и масс-спектрометрического анализа.

Для визуальной оценки содержимого отделяемого биосубстрата готовили препараты для световой микроскопии. Каплю 10% суспензии наносили на чистое предметное стекло, смешивали с каплей акридинового оранжевого, препарат заключали под покровное стекло, наносили каплю иммерсионного масла и проводили исследования под люминесцентным микроскопом «Микромед 3 ЛЮМ» при 1000-кратном увеличении. Результаты контроля фиксировали с помощью «электронного окуляра» DCM300, подключенного к персональному компьютеру с программным обеспечением для обработки изображений «ScopePhoto» (рис. 39).

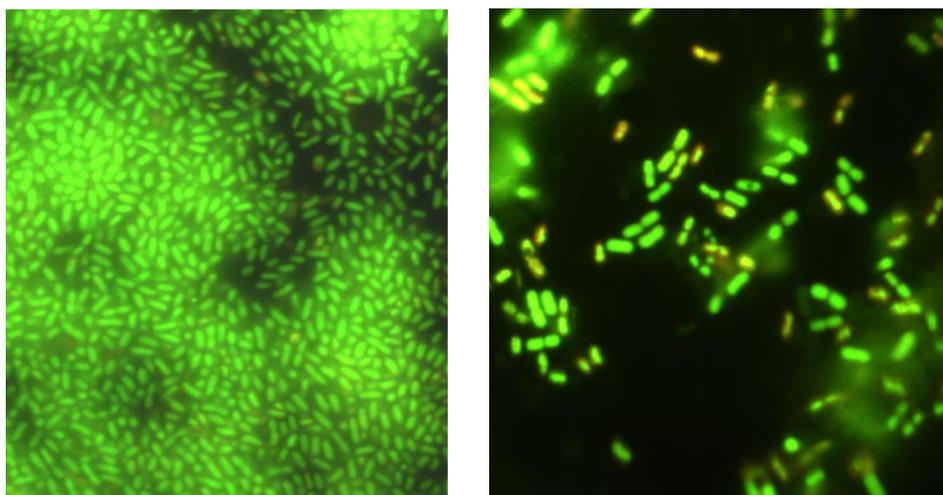


Рис. 39. Бактериальные клетки из содержимого 10% суспензии биосубстрата, отделяемого в процессе сепарирования сыворотки обработанной лантаноидами

При люминесцентной микроскопии в поле зрения наблюдали высокие концентрации микроорганизмов зеленого цвета в форме палочек с признаками бинарного деления. Зеленая окраска бактерий характерна для микроорганизмов содержащих двуспиральную ДНК. Посев данной культуры на твердую питательную среду в чашках Петри в разведении до 10^{-7} сопровождался образованием на поверхности агара блестящих колоний. В конечном разведении образовалось 32 крупные колонии (рис. 40). Результаты микроскопии показали, что в биосубстрате присутствуют бактериальные клетки в высокой концентрации.



Рис. 40. Посев 10% суспензии биосубстрата на чашки Петри с агаром

Исследование микрофлоры сыворотки выполнялись биологом Иваненко Е.А. на базе микробиологической лаборатории Владимирского филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии по железнодорожному транспорту». При исследовании биосубстрата с целью определения содержащихся в нем микроорганизмов готовили десятикратные разведения исходного материала и проводили посев на питательные среды трех видов:

– 5% кровяной агар (специальная среда для выделения стрептококков, пневмококков);

- среда «Эндо» (среда для выделения и первичной идентификации энтеробактерий);
- среда «Чистовича» (среда для выделения и первичной идентификации стафилококков).

На 2-е сутки исследования на 5% кровяном агаре был обнаружен массивный рост серых слизистых колоний. На среде «Эндо» – лактозонегативные, возвышенные, слизистые колонии, склонные к слиянию. На среде «Чистовича» множественный рост пигментированных лецитиназоположительных колоний.

Далее методом микроскопии было выявлено, что на среде «Эндо» и 5% кровяного агара находятся грамтрицательные толстые короткие палочки, с закругленными концами, расположенные попарно или одиночно, окруженные капсулой. А на среде «Чистовича» – Грамположительные кокки, расположенные одиночно или гроздьями.

Из результатов выполненных микробиологических исследований следует, что 10% суспензия из гелеобразного биосубстрата содержит 1×10^{11} КОЕ/мл *Klebsiella pneumoniae* и 1×10^4 КОЕ/мл *Staphylococcus aureus*. Фактически эти данные подтверждают высокую концентрацию бактериальных клеток, выявляемых при люминесцентной микроскопии.

По результатам исследований собственно сыворотки отмечено отсутствие роста микроорганизмов во всех питательных средах на протяжении всего срока инкубации (7 дней). Установлено, что образцы сыворотки крови КРС нативные неспецифические без консерванта первой категории очищенные лантаноидами, произведённые ООО НПП «БИОХИМСЕРВИС» (г. Владимир) стерильны.

Относительно присутствия микоплазм и вирусов следует привести сведения входного контроля трех серий сывороток объёмом 97, 105 и 110 л, изготовленных НПП «БИОХИМСЕРВИС» и поставленных ФГБНУ

«ФНЦИ-РИП» им. М.П. Чумакова РАН. Из аналитических листов входного контроля сырья № 009, 010 и 176 следует, что сыворотка крови микоплазм и вирусов не содержит, то есть стерильна и по данным микроорганизмам.

Проверку ростовых свойств питательной среды с очищенной сывороткой крови крупного рогатого скота проводили в специализированной лаборатории ФГБУ «ВНИИЗЖ» по культивированию клеток эукариот для целей биотехнологии. Результаты проверки сыворотки крови, очищенные с помощью лантаноидов, позволили успешно вести культивирование различных видов клеток в ФГБУ «ВНИИЗЖ» г. Владимир на протяжении последних 5-х лет. Положительное заключение на качество очищенной сыворотки получено из НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, г. Санкт-Петербург. Кроме того, данный способ очистки сыворотки крови крупного рогатого скота защищён патентом на изобретение [55].

Результаты проведенных исследований по очистке сыворотки крови показали, что в процессе микрофильтрации с использованием фильтра с диаметром пор 450 нм контаминанты сыворотки в виде бактериальных клеток полностью не задерживаются. При добавлении к осветленной сыворотке крови экстракта шунгита происходит коагуляция, по-видимому, тяжелых белков, в состав которых включаются и клетки микроорганизмов с образованием видимых невооруженным глазом хлопьев. Отделение коагулированных частиц в осадок в процессе сепарирования позволяет увеличить прозрачность сыворотки и провести её предварительную деконтаминацию. Окончательный процесс достижения стерильности сыворотки достигается микрофильтрацией через стерилизующий фильтр с диаметром пор 220 нм.

Как уже отмечалось ранее, сущность механизма коагуляции микроорганизмов обусловлена феноменом их комплексобразования с катионами

лантаноидов. При этом компоненты сыворотки, в составе которых отсутствуют ДНК или РНК, не принимают участия в реакции комплексобразования, так как их содержание в исходной нативной сыворотке не изменяется по сравнению с конечным продуктом (табл. 27). Комплексы, образуемые бактериальными клетками, вирусами и микоплазмами, эффективно удаляются последовательным сепарированием и микрофильтрацией через фильтры с порами 220 нм.

8.4. Сравнительные исследования культивирования клеток ВНК-21 с использованием заменителя сыворотки Fetal Clone II и сыворотки крови, очищенной лантаноидами

В данном разделе монографии изложены результаты, полученные при выполнении в 2017 году под руководством профессора Пономарева А.П. выпускной квалификационной работы студентом кафедры биологии и экологии ВлГУ Негодуйко П.В. Работа была выполнена на базе предприятия АО «Генериум» (пос. Вольгинский, Владимирская обл.), уверенно занимающего лидирующие позиции в области биотехнологических разработок и производстве препаратов для лечения гемофилии, туберкулеза, рассеянного склероза, онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний. В работе принимали непосредственное участие сотрудники АО «Генериум»: начальник ЦБСПБМ к.б.н. А.А. Орлов, начальники ЛВК к.б.н. В.В. Бодягин, начальник ЦБХПБМ к.б.н. В.В. Мягченков и технологи ЦБСПБМ – А.С. Трунов, А.А. Деев, Д.С. Прошин, что позволило провести исследования на высоком научно-методическом уровне.

Основная цель работы заключалась в исследовании вопроса замещения импортного дорогостоящего заменителя эмбриональной сыворотки на сыворотку крови КРС отечественного производителя. Для производства

качественных лекарственных средств, соответствующих фармацевтическим стандартам GMP, российские производители вынуждены закупать импортное сырье и материалы. В процессе работы проводился анализ и сравнение количества и качества целевого белка получаемого в процессах культивирования клеток-продуцентов с применением сыворотки крови КРС и заменителя эмбриональной сыворотки FetalCloneIII .

Цех биосинтетического производства биологических материалов (ЦБСПБМ) занимается приготовлением питательных сред, культивированием клеточной культуры в роллерных бутылках для получения культуральной жидкости с целевым белком с последующей передачей наработанного материала (КЖ) в цех биохимического производства биологического материала для хроматографической очистки, получения лиофилизата и приготовления раствора для внутривенного введения.

Для получения сравнительных данных в ходе выполнения практической части работы были использованы сыворотка крови КРС и заменитель эмбриональной сыворотки FetalCloneIII. Сыворотка КРС, очищенная водным экстрактом шунгита (ООО НПП «БИОХИМСЕРВИС» г. Владимир) с рыночной стоимостью 1100 рублей за 0,5 л. и заменитель эмбриональной сыворотки FetalCloneIII, произведенный компанией GE Healthcare (Австралия) с рыночная стоимостью 324 \$ (19500 – 20100 рублей) за 0,5 л.

Для проведения исследований была использована культура клеток ВНК-21с13 – клеточная линия, полученная из ткани почки новорожденного сирийского хомячка. На основе данных клеток разработана технология получения рекомбинантного фактора свертываемости крови VIIa и последующего производства лекарственного средства «Коагил-VII». Культивирование клеток проводили на питательной среде ДМЕМ (ростовая и поддерживающая) - ростовая питательная среда с 10% сыворотки используется для накопления клеточной биомассы, а поддерживающая с 4% сыворот-

ки используется для получения культуральной жидкости с целевым белком.

Опуская детали технологии культивирования клеток остановимся на основных этапах, которые включают следующее:

- на начальном этапе проводят расконсервацию клеточной культуры, которая хранится при температуре минус 196°C в сосудах Дьюара;

- на следующем этапе суспензию клеток вносят в пластиковый матрас с поверхностью 75 см² и помещают в СО₂-инкубатор для дальнейшего культивирования. Температура (37,0±0,5)°С, СО₂ (10-14) % ;

- отдельно в бутылки с ростовой средой асептически добавляют сыворотку крови КРС и заменитель сыворотки FetalCloneIII;

- по достижению в матрасе 100% монослоя культуру пересевают в 8 культуральных флаконов, содержащих питательную среду с 10% сыворотки крови КРС и 8 флаконов, содержащих питательную среду с 10% заменителя сыворотки FetalCloneIII;

- сравнение культур осуществляют на протяжении 4 суток (время образование монослоя в культуральном флаконе). На 4 сутки монослой достигает 100%. Количество клеток на 1 мл суспензии сравнительно одинаковое;

- на 5 сутки культуры пересевают в роллерные бутылки. Было использовано 8 роллерных бутылей с питательной средой, содержащей 10% сыворотки КРС и 8 роллерных бутылей с питательной средой, содержащей 10% заменителя сыворотки FetalCloneIII. Роллерные бутылки оставляют в инкубаторе при температуре + 37°C и СО₂ - 14%. В таблице 29 указаны результаты восьмого дня (четвертого дня наблюдения за роллерными бутылками) сравнительного анализа клеток на сыворотках КРС и FetalCloneIII (FCL).

Таблица 29. Сравнительные данные культивирования клеток ВНК-21 с различными сыворотками

Суспензия клеток	Вид сыворотки	
	КРС	FetalCloneIII
Концентрация клеток в 1 мл	1700000 кл	1750000 кл
Доля жизнеспособных клеток	87%	85%
Посевная концентрация клеток	900000 кл/см ²	926470 кл/см ²

– на следующем этапе проводят замену ростовой среды на поддерживающую с 4% сыворотки КРС и FetalCloneIII. Для этого ростовую среду стерильно удаляют, вносят поддерживающую в том же количестве и бутылки помещают в инкубатор;

– клетки, прикрепленные к стенкам роллерных бутылей, продуцируют целевой белок, который вместе с поддерживающей средой через сутки стерильно отбирают, а роллерные бутылки заполняют свежей средой;

– для получения конечного продукта с сывороткой КРС и с заменителем сыворотки FetalCloneIII было осуществлено по 4 смены питательной поддерживающей среды, образцы которых были переданы во внутрицеховую лабораторию для последующих анализов.

***Лабораторный анализ полученных проб культуральных жидкостей,
содержащий целевой белок***

Определение количества эндотоксинов. Тест на определение количества эндотоксинов (ЛАЛ-тест) выявил следующие показатели:

– в пробе культуральной жидкости полученной с применением сыворотки крови КРС количество эндотоксинов меньше 3 ЭЕ/мл;

– в пробе культуральной жидкости полученной с применением заменителя эмбриональной сыворотки FetalCloneIII количество эндотоксинов от 3 до 5 ЭЕ/мл.

Определение коагуляционной активности полученного белка в культуральной жидкости. Результаты показали незначительное расхождение в пробах с сывороткой КРС и FCL. Пробы культуральной жидкости полученной с применением сыворотки крови КРС показали среднюю активность 4,1 МЕ/мл, а пробы с применением эмбрионального заменителя сыворотки FetalCloneIII показали среднюю активность 5,9 МЕ/мл. Среднее время свертываемости: пробы FCL – 32,1сек, пробы сыворотки КРС – 34,6 сек.

Количественное определение содержания рекомбинантного фактора свертываемости крови VIIa в культуральной жидкости методом иммуноферментного анализа. Результаты иммуноферментного анализа показали, что в культуральной жидкости полученной с использованием сыворотки крови КРС целевого белка незначительно меньше, чем в пробах культуральной жидкости с применением заменителя эмбриональной сыворотки FetalCloneIII. Среднее количество белка в 1 мл по четырем пробам:

КРС – 1064,75 Ng/ml и FCL – 1256,75 Ng/ml.

Таким образом, иммуноферментный анализ выявил незначительное преимущество культуральной жидкости полученной с применением заменителя эмбриональной сыворотки FetalCloneIII.

В ходе проведенных исследований было установлено следующее: рост и размножение клеток как с применением сыворотки крови КРС, так и заменителем эмбриональной сыворотки FetalCloneIII не имеет существенных различий. Клетки растут практически одинаково. Прослеживается незначительная разница в доле жизнеспособных клеток, что в свою очередь не влияет на производство биологического материала. Концентрация клеток в суспензии, доля жизнеспособных клеток и посевная концентрация не имеют существенных различий. ЛАЛ-тест, тест на определения коагулометрической активности, и определение количества белка методом иммуноферментного анализа показали возможность замещения аналогового заменителя эмбриональной сыворотки FetalCloneIII на сыворотку отечественного производства, а именно сыворотку крови КРС очищенную водным экстрактом шунгита, произведенную на ООО НПП «БИОХИМСЕРВИС» г.Владимир

8.5. Культивирование клеточных линий человека и животных с использованием сыворотки крови, очищенной лантаноидами

В настоящем разделе работы представлены результаты по испытанию сыворотки крови крупного рогатого скота очищенной лантаноидами в составе питательных сред при выращивании постоянных клеточных культур.

В основные задачи данного раздела работы входило проверка роста культур клеток на средах с сывороткой очищенной лантаноидами в сравнении с сывороткой фирмы «БиолоТ».

Культивирование клеточных линий. Клинические испытания двух серий сыворотки №12 и №13 очищенной лантаноидами были выполнены на базе ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, г Санкт-Петербург в соответствие с приказом Росздравнадзора №7279 от 13.10.2015 года. В процессе клинических испытаний были использованы клеточные линии McCoу, Vero и HEp-2.

На основании клинических испытаний исполнителями был составлен акт оценки результатов №6/2-4-2017 от 22 сентября 2017 года, данные из которого приведены в настоящем сообщении (исполнители к.м.н. А.М. Миличкина, к.б.н. Н.Г.Рощина, к.м.н. А.В. Закревская).

Тест-культуру в виде клеточной линии McCoу культивировали в 5 пассажах на среде RPMI-1640 с L-глутамином и гентамицином и с добавлением 10% испытуемой сыворотки КРС. Посевная доза $(100-120) \times 10^3$ клеток в 1 см^3 . Клеточные культуры инкубировали в пластиковых культуральных флаконах площадью 25 см^2 при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Состояние клеточного слоя оценивали микроскопированием на 3-и сутки культивирования.

Для пересева клетки снимали с пластика подогретой до $35 \pm 2^\circ\text{C}$ смесью раствора версена и трипсина в соотношении 1:1. Рассев проводили с кратностью 1:4. В течение пяти пассажей определяли кратность прироста, как отношение исходной концентрации жизнеспособных клеток к конечной концентрации жизнеспособных клеток. Подсчет жизнеспособных (неокрашенных) клеток проводили в счетной камере Горяева.

Аналогично проводили культивирование клеток на ростовой среде с добавлением сыворотки сравнения производства фирмы БиолоТ в 2-х параллельных пробах и определяли кратность прироста клеток для данной ростовой среды. Результаты определения кратности прироста испытуемой и сыворотки сравнения представлены в таблице 30.

Таблица 30 – Определение кратности прироста для клеточной линии

McCoу

№№ п/п	Сыворотки в составе ростовой среды	Индекс пролиферации (ИП)		
		Параллельные пассажи		Среднее значение (ИП)
		1 культурал. флакон	2 культурал. флакон	
1	Испытуемая КРС сер. 12	3,8	3,4	3,60±0,20
2	Испытуемая КРС сер. 13	4,0	3,5	3,75 ±0,25
3	Испытуемая КРС сер. 13	3,7	3,9	3,80±0,10
4	Сыворотка сравнения	4,2	3,7	3,95±0,25

При оценке состояния клеточного монослоя, после пятого пассажа путем микроскопирования, было отмечено, что клетки на испытуемых питательных средах образовывали плотный клеточный монослой хорошего качества. Клетки отличались чёткими границами, отсутствием вакуолизации и зернистости в цитоплазме. Визуальной разницы между клетками, выращенными на среде с испытуемой сывороткой, и клетками, выращенными на среде с сывороткой сравнения, обнаружено не было. Результаты сравнительного исследования двух серий сыворотки при культивировании клеток линии McCoу в двух параллельных пассажах показали идентичные результаты по кратности прироста. Внутри серийная воспроизводимость подтверждается идентичностью результатов кратности прироста для параллельных пассажей клеток, выращенных на ростовой среде, приготовленной на сыворотке одной серии, но из разных флаконов (3,75±0,25 и

3,80±0,10). При сравнении испытуемой сыворотки и сыворотки сравнения не выявлено существенных различий.

Результаты сравнительного исследования кратности прироста при культивировании клеток линии Vero и HEp-2 испытуемой сыворотки и сыворотки сравнения приведены в таблицах 31 и 32.

Таблица 31 – Определение кратности прироста для клеточной линии Vero

№ п/п	Сыворотки в составе ростовой среды	Индекс пролиферации (ИП)		
		Параллельные пассажи		Среднее значение (КП)
		1 культурал. флакон	2 культурал. флакон	
1	Испытуемая КРС сер. 12	4,8	4,5	4,65±0,15
2	Испытуемая КРС сер. 13	5,0	4,4	4,7±0,30
3	Испытуемая КРС сер. 13	4,7	5,1	4,9±0,20
4	Сыворотка сравнения	4,9	4,5	4,7±0,20

Таблица 32 – Определение кратности прироста для клеточной линии HEp-2

№№ п/п	Сыворотки в составе ростовой среды	Индекс пролиферации (ИП)		
		Параллельные пассажи		Среднее значение (ИП)
		1 культурал. флакон	2 культурал. флакон	
1	Испытуемая КРС сер. 12	3,6	3,4	3,50±0,10
2	Испытуемая КРС сер. 13	3,2	3,5	3,35±0,15
3	Испытуемая КРС сер. 13	3,7	3,2	3,45±0,25
4	Сыворотка сравнения	3,3	3,7	3,50±0,20

Сравнительные исследования двух серий сыворотки КРС при культивировании клеток линии Vero и HEp-2 были получены идентичные результаты по значению кратности прироста. Подтверждена внутри серийная воспроизводимость результатов определения кратности прироста для параллельных пассажей клеток, выращенных на ростовой среде, приготовленной на сыворотке одной серии, но из разных флаконов. При сравнении испытуемой сыворотки с сывороткой сравнения существенных различий выявлено не было, что дает основание для заключения о возможности использования сыворотки очищенной с лантаноидами для выращивания культур клеток. Кроме того, полученные данные позволяют заключить об отсутствии токсичности сыворотки очищенной с лантаноидами.

В 2017 году подобные испытания были проведены в ФГБУ «ВНИИЗЖ» г. Владимир с использованием клеточных линий: Vero-V (почка зеленой мартышки), ЯДК-04 (гонады козы), СПЭВ, ППК (почка порося), ПСГК-30 и первично – трипсинизированные клетки почки порося (СП), ВНК-21 – Шведская из музея лаборатории культивирования клеток.

Опыты по изучению ростовых свойств клеток на питательной среде с сывороткой крови КРС, проведенные на базе ФГБУ «ВНИИЗЖ», показали положительные свойства ростовой среды с испытуемой сывороткой при работе с клеточной культурой ЯДК-04, которая очень чувствительна к изменению условий культивирования, в том числе и к качеству сыворотки. Следует отметить, что клеточная линия ЯДК-04 при культивировании на комбинированной питательной среде ПСП + 1/3 среды 199 с эмбриональной сывороткой элиминируется (деградирует) через 2-3 пассажа при расसेве 1:2 или 1:3. В тоже время в опытах с испытуемой сывороткой в трехкратной повторности при расसेве 1:6 через 3-4 суток получали плотный конфлюэнтный монослой (рис.41.) При данной кратности рассева количе-

ство митозов в логарифмической фазе роста возрастает в 2 раза, популяция клеток омолаживается, уменьшается число некротических клеток и в стадии апоптоза. Кариологическое обследование показало, что видовая принадлежность культуры сохранилась. При этом увеличилась частота появления в метафазных клетках метацентрических хромосом до 10% (рис. 41).

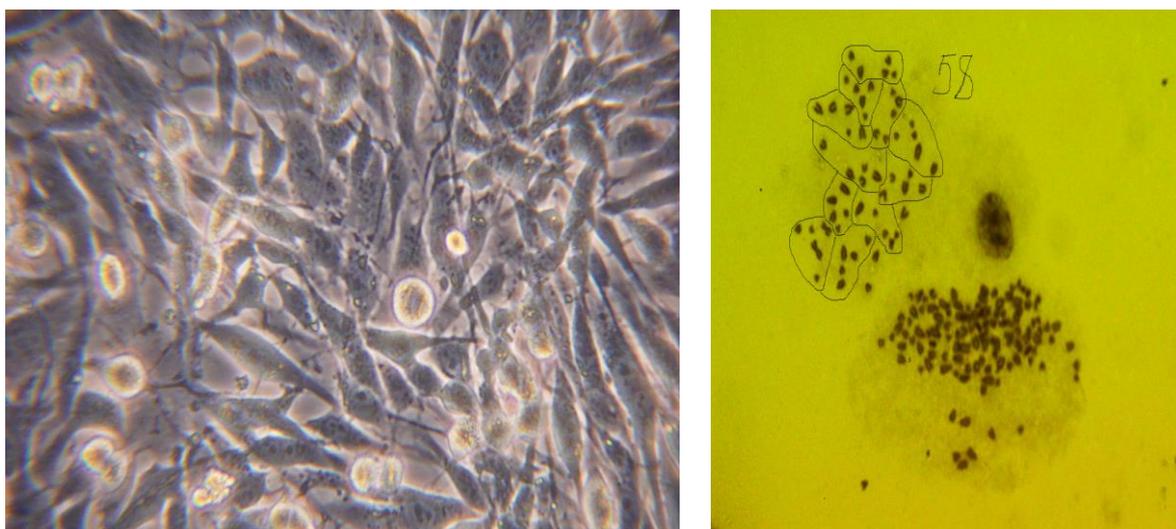


Рис 41. Морфология и метафазная пластинка клеточной линии ЯДК-04, выращенной с применением сыворотки обработанной лантаноидами

В опытах с клеточной линией ППК использовали питательную среду с 5% сыворотки, обработанной лантаноидами. В 7 последовательных пассажах снижения интенсивности роста клеток не установлено. В морфологии отмечалась однородность клеток, минимум зернистости, присутствие митозов в логарифмической фазе роста. Длительность непрерывного выращивания увеличивалась до 15 -20 пассажей. При контроле методом ПЦР в составе сыворотки геном вируса ВД КРС не обнаружен.

Первичную клеточную культуру СП выращивали с соблюдением стандартных условий трипсинизации и культивирования. При посевной концентрации клеток 100-150 тыс/мл на 4-5 сутки формировался конфлюэнт-

ный монослой с полиморфными клетками при минимальной вакуолизации и гранулярности. В предварительных опытах с вирусом ящура отмечено увеличение на 10% чувствительной данной клеточной культуры.

В результате выполненных исследований установлены важные для теории и практики сведения по работе с сывороткой крови животных – одного из главных компонентов питательных сред для клеточных культур. Сравнительные испытания сыворотки очищенной лантаноидами и сыворотки фирмы БиолоТ показали, что практически все постоянные клеточные культуры положительно реагируют на применение испытуемой сыворотки. Установлено увеличение количества проводимых пассажей без дегенерации клеток и уменьшения их гранулярности в монослое. На примере культуры клеток ЯДК-04 установлено, что испытуемая сыворотка оказалась предпочтительней дорогостоящей импортной эмбриональной. Отмечен также факт омоложения клеток и формирование их однородной популяции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многолетними исследованиями установлено, что в составе шунгита присутствуют не только химические элементы, но и остатки древней органики и фуллерены. Из различных источников литературы следует, что настой на шунгите или шунгитовая вода представляет собой водно-минеральный раствор, обладающий уникальными свойствами. К перечню универсальных свойств шунгита относят очистку воды, её обеззараживание, при котором отмечается уменьшение количества бактерий не менее чем в 100 раз, одновременно повышается биологическая активность воды за счет обогащения макро- и микроэлементами, выделяемыми шунгитом. При этом шунгитовая вода показана для профилактики и лечения более 20 различных заболеваний человека.

К многоплановым свойствам шунгита относят не только очистку воды, но и повышение иммунных характеристик человека и животных, а также и многое другое, что иногда следует отнести к уровню фантастики, так как отсутствуют действительно научно обоснованные материалы, подтверждающие необыкновенные свойства шунгита.

Практически все многочисленные сведения о положительных свойствах шунгита указывают на присутствие в составе шунгита фуллеренов. В наших исследованиях подтверждается присутствие фуллеренов в составе щебня шунгита, но при этом отмечено существенное различие в их выходе при использовании в качестве экстрагента воды и бромбензола. Литературные данные свидетельствуют, что фуллерены практически нерастворимы в воде, а использование в качестве экстрагентов органических растворителей делает процесс неприемлемым в физиологическом плане. Это первое, а второе – затруднительно обосновать универсальность механизма действия молекулы из 60 атомов углерода при очистке воды от бактерий,

нефтепродуктов, пестицидов, избытка марганца, меди, железа. Несмотря на трудности извлечения фуллеренов, имеются сведения о том, что вода, настоянная на шунгите, является молекулярно-коллоидным раствором гидратированных фуллеренов, относящимся к новому поколению средств для профилактики и лечения заболеваний человека. Основное препятствие широкого использования фуллеренов для научных исследований и практики связано с нерастворимостью их молекул в воде.

При исследовании минерального состава шунгита было выявлено присутствие не только макро- и микроэлементов, но редкоземельных элементов лантаноидов, которые отличаются высокой подвижностью в кислой среде и малой в нейтральной. В наших опытах показано, что в отдельных партиях шунгита образцы щебня при взаимодействии с водой образуют сильнокислые растворы с рН 2,5-3,0, что обусловлено образованием серной кислоты за счет присутствия в шунгите сульфидов. Щебень другой представительной партии порядка 500 кг при взаимодействии с водой снижает водородный показатель до рН 4,5 -5,5 и как следствие растворения химических элементов не происходит. Для восстановления растворяющей способности в водном растворе изменяли рН до 2,0-3,0 с добавлением одной из минеральных кислот. Опытным путем было установлено, что при последовательном экстрагировании в кислом водном растворе из одной партии щебня снижается выход химических элементов по причине их истощения в поверхностном слое. Экспериментальным путем было показано, что экстракция химических элементов восстанавливается до прежнего уровня после прокаливании щебня при температуре 200 °С в течение 2 часов. Феномен термодиффузии сопровождается активацией внутренних компонентов шунгита с их перемещением на поверхность. Эти два свойства: растворимость в сильной кислой зоне рН химических элементов с их переходом в водную среду и явление их термодиффузии при прокаливании

щебня для его повторного использования являются основными физико-химическими свойствами шунгита.

При использовании шунгитовой породы для решения проблем биотехнологии мы столкнулись с проблемой сильного варьирования минерального и химического состава щебня шунгита, что затрудняло или делало невозможным его использование. Принципиальным отличием нашего подхода от общеизвестных методов было то, что в опытах использовали не сам щебень шунгита, а полученный на его основе водный экстракт, содержащий макро-, микро- и ультрамикроэлементы – лантаноиды. Но высокая кислотность шунгитовой воды не позволяет её использовать для биотехнологических целей. В процессе нейтрализации кислотности оксиды макро- и микроэлементов образуют соль и воду с образованием взвеси, которая легко осаждается при простом отстаивании.

Таким образом, из шунгитовой воды получается водный экстракт содержащий лантаноиды, так как оксиды лантаноидов не вступают во взаимодействие со щелочью. Водный экстракт имеет преимущества в плане контроля, изменения концентрации элементов, очистки и удобства использования. Свойства лантаноидов достаточно хорошо изучены и широко используются в различных областях науки и техники. Высокая реакционная способность лантаноидов обусловлена их физико-химическими свойствами, так как в нормальных условиях они трехвалентно положительные. На примере очистки воды и сыворотки крови крупного рогатого скота установлен факт избирательной коагуляции бактериальных клеток, обусловленной реакцией комплексобразования катионов лантаноидов с отрицательно заряженными остатками фосфорной кислоты в составе клеточных оболочек и составе нуклеиновых кислот микроорганизмов. Свидетельством избирательного процесса удаления микрофлоры является сохранение на уровне интактной сыворотки компонентов белкового обмена, липи-

дов, ферментов сыворотки, элементов электролитного состава, то есть тех компонентов, у которых отсутствует отрицательно заряженные фосфатные группы. Это дает основание для заключения, что широкий спектр биологической активности шунгита определяется не только фуллеренами, но и присутствием в его составе редкоземельных элементов – лантаноидов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Аксенов С.И. Вода и её роль в регуляции биологических процессов. – М.: – Наука, 1990. –120 с.
2. Амелин В.Г., Ефремова А.А., Третьяков А.В. Определение фуллеренов в воде, соках и шунгите методом обращено-фазовой ВЭЖХ. [Электронный ресурс] // Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология .— 2012 .— №8 .— С. 17-21 .— Режим доступа: <https://rucont.ru/efd/421560>.
3. Барановская Н.В. Закономерности накопления и распределения химических элементов в организмах природных и природно-антропогенных экосистем: Автореф. дисс. док. биол. наук. – Томск: ТПУ, 2011. – 46 с.
4. Бгатов А.В. Биогенная классификация химических элементов // Философия науки. – 1999. -- №2(6). – С. 12-24.
5. Безмельницын В. Н., Елецкий А. В., Окунь М. В. Фуллерены в растворах // Успехи физических наук. – 1998. – 168. – 1195-1120.
6. Бессывороточная питательная среда для культивирования клеток и вирусов / Е.А. Нечаева, И.Ф. Радаева, Н.Б. Думченко, Т.П. Сумкина и др. // Вестник ПНИПУ. Химическая технология и биотехнология. 2018. (4). 85-96. Doi: 10.15593/2224-9400/2018.4.07
7. Бессывороточная питательная среда для культивирования клеток Vero / Г.П. Трошкина, Л.Д. Мартынец, Е.В. Кирова, Т.П. Сумкина и др. // Фундаментальные исследования. 2005. (5). <http://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=6105> (дата обращения: 06.04.2019).
8. Борисов П. А. Карельские шунгиты. — Петрозаводск. 1956 г. 92 с

9. Булаев А.Г., Пименов Н.В. Биотехнологические методы очистки сточных вод цветной металлургии // Биотехнология. – 2015. – №3. – С. 8 – 29

10. Волков В.Т., Рихванов Л.П., Волкова Н.Н. Нанобактерия в питьевой воде - новейший фактор современной экологии // Вестник Сибирского отделения РАН ВШ. – 2005. – № 1(9). – С. 20-25.

11. Волкова Н.Н. Исследование биоминерализационного геоэкологического фактора в подземных водах Томского района : Автореф... дис. канд. геолого.-минералог. наук. – Томск, 2006. – 25 с.

12. Влияние нанобактерий на качество и безопасность питьевой воды / Е.В. Гарасько, Р. Р. Шиляев, А.П. Пономарев, А.П. Горшенин // Вестн. Иванов. мед. акад. – 2011. – Т. 16. – № 2. – С. 14–19.

13. Гибридные наноструктуры на основе фуллеренов для применения в медицине и биологии // А.И. Котельников, Р.А. Котельникова, Г.Н. Богданов и др. // Технология живых систем. – 2006. – №3. – С. 42-46.

14. Гидратированный фуллерен как инструмент для понимания роли особых структурных свойств водной среды живого организма для его нормального функционирования / С.В. Ширинкин, А.А. Шапошников, Т.О. Волкова [и др.] // Научные ведомости. Естественные науки. – 2012. – №9(128). – Вып.19. – С. 122-129.

15. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Котенева С.В. О контаминации импортируемой фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота пестивирусами как факторе распространения вирусной диареи в условиях глобализации: мини – обзор // Сельскохозяйственная биология.– 2018. – Т. 53, №2. – С.248-257.

16. Горшенин А.П., Гарасько Е.В., Пономарев А.П. Кальцинирующие наночастицы в питьевой воде // Водоснабжение и санитарная техника. – 2010. – № 12. – С. 20–24.

17. Грошева В.И. Особенности комплексообразования тетрациклина с ионами редкоземельных металлов: дис. ... канд. физ.- мат. наук: 03.00.02. – Москва, 2006. – 127 с.

18. Гуляев С.М. Церебропротекторное действие лантана ацетат при экспериментальной ишемии головного мозга: Автореф... дис. канд. мед. наук. Улан-Удэ, 2004. – 21с.

19. Гурьянов, Н.И. Преимущество использования сыворотки крови из сердца бычков для культивирования клеток // Ветеринария. – 2008. – Том 7. – С. 58 – 61.

20. Гуненков В.В., Сухарев О.И., Сирота В.Ф. Свойства сыворотки крови северных оленей и результаты применения её в вирусологии и биотехнологии // Вопросы вирусологии. – 2003. – №6. – С. 37-41.

21. Гуславский А.И. Перспективы применения сыворотки крови северных оленей в клеточной биотехнологии / А.И. Гуславский, А.В. Канарский, З.А.Канарская // Вестник Казанского технологического университета. 2013. (4). 192-194.

22. Девярых Г.Г. , Еллиев Ю.В. Введение в теорию глубокой очистки веществ.– М.: Наука, 1981. – 317 с.

23. Доржиев Ж.П. Влияние лантана ацетата на систему гемостаза и его фармакотерапевтическую эффективность при ДВС-синдроме: Автореф... дис. канд. мед наук. Улан-Удэ. 2008. – 18 с.

24. Животная клетка в культуре / Под ред. Л.П. Дьяконова. «Спутник»+». — 2009. — 656 с.

25. Зонтаг Г., Штрэнге К. Коагуляция и устойчивость дисперсных систем. – Л.: Химия, 1973. – 152 с.

26. Игнатов И., Мосин О.В. Математическая модель взаимодействия природного фуллеренсодержащего минерала шунгита с водой // Нанотехнология. – 2015. – №6(48). – С 24-32.

27. Иванов В.К., Щербаков А.Б., Усатенко А.В. Структурно-чувствительные свойства и биомедицинские применения нанодисперсного диоксида церия // Успехи химии. – 2009. – 78 (9). – С. 924–941.

28. Изучение влияния свойств шунгита на микроорганизмы / М.Д. Дриаева, А.Я. Сыпченко, И.Ш. Туктамышев [и др.] // ВНМТ. –2003. –№4. – С. 60-61. Режим доступа: <http://shungitrussia.ru/izuchenie-vliyaniya-svoystv-shungita-na-mikroorganizmy>.

29. Искандаров М.И. Биологические свойства препаратов на основе редкоземельных элементов // Ветеринария и кормление. – 2016. – № 3. – С. 13-15.

30. Калинин Ю.К., Горлов В.И. Вещественный состав шунгитового вещества // Науч. труды Института геологии Кар. Фил. АН СССР «Шунгиты Карелии и пути их комплексного использования»: Сб. науч. тр. – Карелия, Петрозаводск, 1975. – С. 44-56.

31. Калинин Ю.К. Экологический потенциал шунгита / Шунгиты и безопасность жизнедеятельности человека: Мат. 1-ой Всерос. науч.-практ. конф. (3 - 5 октября 2006 г.) / под ред. Ю. К. Калинина - Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. – С. 5-9.

32. Калинин Ю.К., Ковалевский В.В. Шунгитовые породы: горизонты научного поиска // Наука в Росси. –2013. – 6.– С. 66-72.

33. Камакин Н.Ф., Мартусевич А.К., Кошкин А.Н. Перспективы развития кристаллографических методов исследования // Вятский медицинский вестник. – 2003. – №3. – С. 6 – 11.

34. Колокольцова Т.Д., Сабурин И.Н. Патологические аспекты микоплазменной контаминации клеточных культур / Патогенез – Изд.: ИП Иришкин Д.А., 2013. – Т. 11, – № 3. – С. 29 – 31.

35. Концентрирование органических примесей из водных растворов методом направленной кристаллизации / В.Ф. Бондаренко, Н.А. Собина,

Л.Я. Хейфец, Г.В. Слепцова // Проблемы охраны вод. – Харьков, 1977. – Вып. 7. – С. 25-29.

36. Коньков О.И., Теруков Е.И. Пфаундер Н. Фуллерены в шунгите // Физика твердого тела. – 1995. – Т. 36, №10. – С. 3169-3171.

37. Кротоус В.А. Лечебные свойства шунгита. - Карелия-шунгит. – Изд. 6-е, испр. и доп. – Петрозаводск:[б. и.] – 2016. – 39 с.

38. Косынкин В.Д., Глебов В.А. Возрождение российского производства редкоземельных металлов – важнейшая задача отечественной экономики. г. Суздаль, Россия, 4-8 октября 2010 г. esa-conference.ru>wp...pdf/Kosynkin...Dmitrievich.pdf (Дата обращения 29.02.20)

39. Крисс Е.Е., Яцемирский К.Б. Взаимодействие нуклеиновых кислот с металлами // Успехи химии. – 1996. –Т. 35, №2. – С. 349-365.

40. Кристаллизация из растворов. Режим доступа: studfile net >pre-view>page2.

41. Кривонос О.И., Плаксин Г.В. Использование до- и сверхкритического диоксида углерода для извлечения отдельных групп биологически активных веществ из сапропелей // Сверхкритические флюиды. Теория и практика. – 2010. – Т.5, №3. – С. 4-14.

42. Кузнецова С.А., Орецкая Т.С. Нанотранспортные системы адресной доставки нуклеиновых кислот в клетки // Российские нанотехнологии. – 2010. – Т.5, №9-10. – С. 40-52.

43. Лебедев А.Т., Заикин В.Г. Задачи и достижения современной масс-спектрометрии / Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2007. – Т.73, №2. – С. 21-30.

44. Ловиц Т.Е. Избранные труды по химии и химической технологии. Редакция, статьи и примечания Н.А. Фигуровского. «Классики науки». М.: Изд. АН СССР, 1955.– 618 с.

45. Мастеров В.Ф. Физические свойства фуллеренов // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – №1. – С. 92-99.

46. Мартусевич А.К., Камакин Н.Ф. Кристаллография биологической жидкости как метод оценки её физико-химических свойств // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – 143, №3. – С. 358-360.

47. Мекалова Н.В. Фуллерены в растворах. – М.: Экзамен. – 2001. – 352 с.

48. Молчанов С.П., Лебедев-Степанов П.В., Алфимов М.В. Влияние температуры на самосборку частиц в испаряющейся капле коллоидного раствора // Российские нанотехнологии. – 2010. –Т.5, №9-10. – С. 61-66.

49. Мосин О.В., Игнатов И. Состав и структурные свойства фуллеренсодержащего минерала шунгита // Нано- и микросистемная техника. – 2013. – Т. 1. – С. 32-40.

50. Мосин О.В. Новый природный минеральный сорбент – шунгит // Сантехника. – 2011. – №3. – С.34-36.

51. Нанотехнологии в очистке питьевой воды: за и против. Расчеты, испытания, отчеты, экспертизы. – http://vik-nik-2009.narod.ru/VODA_june.pdf; .

52. Нанобиотехнологические проблемы питьевой воды // А.П.Пономарев, Е.В. Белик, А.В. Третьяков, В.Г. Амелин // 23-я Российская конф. по электронной микроскопии: Тез. докл. – Черногловка, 2010. – С. 413.

53. Очерки геохимии человека: монография / Н.В.Барановская, Л.П. Рихванов, Т.Н. Игнатова [и др.]. – Томский политехнический университет. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета. – 2015. – 378 с.

54. Особенности химического состава экстрактов органической массы шунгитовой породы Зажогинского месторождения Карельского Заоне-

жья / В.В. Платонов, Д.В. Прокопченков, В.А. Проскуряков [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2006. – Т. 13I, № 4 . – С. 132–133.

54а. Пат. 2 460 786. Российская Федерация, С1МПК С12N 5/07. Способ получения сыворотки крови взрослого крупного рогатого скота для культивирования клеток животных и человека / Иванов А.В., Плотникова Э.М., Гурьянов Н.И. и [др.]; заявитель и патентообладатель ФГУ "Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных" (ФГУ "ФЦТРБ-ВНИВИ").– № 2011115490/10, заяв.19.04. 11; опубл.09.10.12/.

55. Пат. 2 664 729 Российская Федерация, МПК G01N 33/49. Способ очистки сыворотки крови крупного рогатого скота от контаминирующих агентов / Пономарев А.П., Белик Е.В., Манин Б.Л., Коган М.М.; заявитель и патентообладатель ООО НПП «БИОХИМСЕРВИС». – № 2017117994; заяв. 23.05.17; опубл. 22.08.18, Бюл. №24.

56. Перспективы использования шунгитовых пород при водоочистке и водоподготовке / Е.Ф. Дюккиев, Ю.К. Калинин, Л.М. Загуральская, А.З.Зайденберг // Геология и охрана недр Карелии, Петрозаводск, 1992.– с.

57. Пономарев А.П., Узюмов В.Л., Груздев К.Н. Вирус ящура: структура, биологические и физико-химические свойства. Владимир: Фолиант, 2006. – 250 с.

58. Пономарев А.П., Манин Б.Л., Герасимов В.Н. Исследование контаминации постоянных клеточных структур методом электронной микроскопии // Цитология. – 2006. – №9. – С. 792-793.

59. Пономарев А.П., Гарасько Е.В. Морфологические изменения в структуре нанобактерий под воздействием некоторых физико-химических факторов // Нанотехнологии: наука и производство. – 2011. – № 1 (10). С. 27–34.

60. Пономарев А.П. Электронная микроскопия нанобактерий и других представителей микро- и наномира.(монография) - ИП Журавлева. – Владимир, 2011. – 180 с.

61. Пономарев А.П., Подколзин И.В., Третьяков А.В. Феномен воздействия. Минеральный состав шунгитовой воды и её воздействие *in vitro* на клетки нанобактерий // Вода Magazine. – 2012. – №1(53). – С. 34-37.

62. Пономарев А.П., Подколзин И.В., Амелин В.Г. Макро-, микро- и ультрамикрорэлементы в экстрактах из природного нанотехнологического минерала – шунгита // Нанотехнологии и охрана здоровья. – 2012. –Т.4, №2. – С. 48-55.

63. Пономарев А.П., Амелин В.Г., Подколзин И.В. Органоминеральный состав нанобактерий, выделяемых из питьевой воды, крови животных и человека // Нанотехнологии и охрана здоровья. – 2012.– Т. IV, №3(12). – С. 52-59.

64. Пономарев А.П., Фролова Л.В. Феномен воздействия водных экстрактов шунгита на микроорганизмы // Прикладная аналитическая химия — 2013. – Том IV, №1(9). – С. 10-18.

65. Пономарев А.П., Фролова Л.В. Хелатирующее воздействие водных экстрактов шунгита на микроорганизмы // Дезинфекция. Антисептика. –2013. – Том IV, №1(13). – С. 50-58.

66. Пономарев А.П., Большаков Д.Б., Дынчик С.Д. Извлечение редкоземельных ультрамикрорэлементов–лантаноидов из природного нанотехнологического минерала шунгита // Научный журнал «Ruxis». – Санкт-Петербург. – 2016. – №1(1). – С. 10 – 19

67. Пономарев А.П., Подолец А.А., Макина О.А. Использование водного экстракта минерала шунгита для удаления из воды бактериальной микрофлоры // Водоснабжение и санитарная техника. – 2017. – №9. – С. 17-24.

68. Пономарев А.П. Водный экстракт минерала шунгита – комплексообразователь для микроорганизмов при очистке водных растворов // Водоснабжение и санитарная техника. – 2018. – №7. – С. 11-17.

69. Пономарев А.П. Шунгитовые породы как источник редкоземельных ультрамикроэлементов – лантаноидов // Микроэлементы в медицине. – 2019. – 20(2).– С. 3-9. DOI.10.19112/2413-617-2019-20-2-3-9

70. Применение препарата изготовленного на основе редкоземельных элементов для профилактики и лечения маститов у коров / В.З. Бондаренко, О.Д Скляров, С.В Игнатова [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2018. – №4. –С. 8-11.

71. Производные фуллеренов как нанодобавки для полимерных композитов // А.В. Пенькова, S.F.A.Асqah, Л.Б. Пиотровский и [др.] – Успехи химии. – 2017. – Т.86, №6. – С. 530-566.

71а. Фетальная бычья сыворотка:
https://ru.qwe.wiki/Fetal_bovine_serum (Дата обращения 27.05.2020)

72. Прокопченков Д.В. Системный анализ биологической активности шунгитовой породы на основе её вещественного состава: дис. ...канд. биол. наук. – Тула, 2008. – 182 с.

73. Разработка и оптимизация технологий производства ветеринарных препаратов и ферментов / В.М. Попова, И.И. Кочиш, И.Л. Боро, А.Я. Самуйленко и др. // Сельскохозяйственная биология. 2010 (4), 45-50.

74. Разработка лекарственной формы препарата на основе редкоземельных металлов для защиты кожных покровов от воздействия патогенной микрофлоры и неблагоприятных факторов внешней среды. – Методическое пособие / С.С. Искандарова, М.И. Гулюкин, А.М. Гулюкин [и др.] – Новосибирск: Изд.АНС «СибАК», 2019. – 68 с.

75. Родионов И.В. Имплантационные материалы с антисептическими и антитромбогенными свойствами. Режим доступа: http://www.rusnauka.com/2KAND_2009/Medecine/39495.doc.htm.

76. Рожкова В.С., Кочнева И.В., Ковалевский В.В. Минералогические исследования процессов взаимодействия шунгитовых пород с водой // Геология и полезные ископаемые Карелии. - Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2008. Вып. 11. – С. 242-247. <https://docplayer.ru/26443792-V-s-rozhkova-i-v-kochneva-v-v-kovallevskiy-mineralo>.

77. Рукк Н.С., Апрышко Г.Н., Скрыбина А.Ю. Перспективность создания противоопухолевых лекарств на основе координационных соединений элементов ШВ-группы. Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – №2. – С.47 – 50.

78. Рябчиков Д.И., Рябухин В.А. Аналитическая химия редкоземельных элементов и иттрия. М.: Наука. – 1966. – 378 с.

79. Сравнительный анализ микроэлементных профилей 10 отделов головного мозга при ишемическом инсульте и без ишемических повреждений / З.К. Зангиева, Е.И. Гусев, О.А. Громова [и др.] // Земский Врач. – 2013. – 4(21). – С. 21 – 30.

79. Трemasова А.М., Ахметов Ф.Г., Коростылева В.П. Влияние шунгитов на иммунный статус телят // Проблемы ветеринарии санитарии, гигиены и экологии. – 2011. – № 3. – С. 72–74.

80. Требования к качеству питьевой воды в Украине и инфекционная заболеваемость с водным путем передачи возбудителей / Е.В. Сурмашева, Г.И. Корчак, А.И. Михиенкова [и др.] // Гигиена и санитария. – 2013. – №6. – С. 33-37.

81. Урываев Л.В. Анализ контаминации клеточных культур пестивирусом BVDV и микоплазмами / Л.В. Урываев, К.С. Ионова, А.В. Дедова, Л.В. Дедова и др. // Вопросы вирусологии. 2012. (5). 15-21.

82. Фуллерены в природе. Режим доступа: <http://ipacom.com/index.php/ru/fullerenes-and-water>.

83. Шунгиты как природная нанотехнология (обзор литературы) / В.А. Хромушкин, Т.В. Честнова, В.В. Платонов [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. Электронный журнал. – 2014. – № 1. – С. 1–8
URL:<http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/5039.pdf> (дата обращения: 22.12.2018).

84. Шунгит – природный нанотехнологический материал. Режим доступа: <http://www.nanonewsnet.ru/articles/>

85. Химия лантаноидов. Режим доступа: ref.by/refs/93/34834/1.html.

86. Химический состав минерального вещества шунгитовой породы Зажогинского месторождения Карельского Заонежья / В.В. Платонов, Д.В. Прокопченков, В.А. Проскуряков [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. -2006. –Т.13, №4. –С. 132.

87. Цыдыпов В.И. Лантана ацетат при экспериментальных повреждениях почек: Автореф. дис... канд. мед. наук. - Улан-Удэ, 2004. – 21 с

88. Эльпинер Л.И. Влияние водного фактора на формирование здоровья человека // Вода. Химия и экология. – 2009. – №3. – С. 6-10.

89. Яковлева Т.В. Проблема чистой воды // Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. – 2009. – №4. – С. 10-15.

90. Buseck P.R., Tsipursky S. J., Hettich R. Fullerenes from the Geological Environment // Science. – 1992. – Vol. 257. – № 5067. – P. 215 – 217.

91. HyClon. FetalClone. Engineered serum products [Elektronnyi resurs]. General Electric Company. Elektron. dan. Sweden. 2015. Rezhim dostupa: https://betastatic.fishersci.com/content/dam/fishersci/en_EU/promotions/GEHealthcareLifeSciences/FetalClone_flyer.pdf (дата обращения 16.03.2019 г.)

92. Rare earth metals are essential for methanotrophic life in volcanic mudpots // Arjan Pol, Thomas R.M.Barends, Andreas Dietl and [et. al]. – Environmental microbiology. – 2014. – 16(1). P – 255-264.

93. www.eko-prod.com/images/ Шунгит В Агрономии.doc (Дата обращения 25.03.2018 года).

Учебное электронное издание

ПОНОМАРЕВ Алексей Петрович

ГОРНАЯ ПОРОДА ШУНГИТ – ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ
И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Монография

Издается в авторской редакции

Системные требования: Intel от 1,3 ГГц ; Windows XP/7/8/10; Adobe Reader;
дисковод CD-ROM.

Тираж 25 экз.

Владимирский государственный университет
имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых
Изд-во ВлГУ
rio.vlgu@yandex.ru

Институт биологии и экологии
aleksei_pp-44@mail.ru