***УДК 614.7***

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ШУНГИТА НА ЧИСЛЕННОСТЬ ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ В ВОДЕ ВО ВРЕМЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ *IN VITRO***

**©** 2017 Г.А. Даллакян, И.В. Мошарова, В.В. Ильинский

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва

*Исследовали влияние шунгита в количествах 1 г/л, 10 г/л и 100 г/л на численность гетеротрофных бактерий в воде. Полученные результаты не подтвердили эффективность применения шунгита в широком диапазоне вносимых количеств (от 1 до 100 г/л) для обеззараживания воды от бактерий. При внесении шунгита в экспериментальные емкости численность микроорганизмов не только не снижалась, а напротив - возрастала. В наибольшей степени численность бактериопланктона увеличивалась при внесении шунгита в количестве 10 г/л.*

***Ключевые слова:*** *Шунгит; фуллерены; гетеротрофный бактериопланктон; антибиотики; водные микроорганизмы*

**EFFECT OF SCHUNGITE ON BACTERIOPLANKTON ABUNDANCE DURING THE EXPERIMENTS *IN VITRO***

G.A. Dallakyan, I.V. Mosharova, V.V. Il’inskii

Lomonosov Moscow State University, Moscow

*We investigated the effect of shungite in amounts of 1 g/l, 10 g/l and 100 g/l on the total number of heterotrophic bacteria in the experimental flasks. The obtained results didn’t confirm the effectiveness of using shungite in a wide range of amounts (from 1 to 100 g/l) for disinfection of aquarium water from bacteria. When shungite was added to the experimental flasks, the number of microorganisms didn’t decrease, but on the contrary increased. The greatest number of bacterioplankton increased with the application of schungite in the amount of 10 g/l.*

***Key words:*** *Schungite, fullerenes, heterotrophic bacterioplankton, antibiotics, aquatic microorganisms*

К числу важнейших факторов сохранения здоровья населения относится его обеспечение качественной водой. В настоящее время постоянно ведутся работы по совершенствованию технологий очистки воды как из природных резервуаров, так и из водопроводной сети, в том числе, направленные на повышение ее бактериологической безопасности. Для обеспечения бактериологической безопасности воды, поступающей населению, контролируется уровень развития в ней микроорганизмов, в частности численность гетеротрофных бактерий, поскольку многие санитарно-показательные микроорганизмы являются представителями этой эколого-физиологической группы бактериопланктона. Обеззараживание воды проводится на станциях водоочистки с применением различных физических и химических методов (например, с использованием гипохлорита натрия, хлора, озона, ультразвука и пр.). Однако при прохождении воды через водопроводные коммуникации возможно вновь её микробиологическое загрязнение. Поэтому и в домашних условиях рекомендуют использование различных фильтровальных систем и установок для улучшения качества воды и обеззараживания ее от микроорганизмов. В качестве сорбционных агентов в таких фильтровальных установках применяют различные вещества, например, кокосовый активированный уголь, серебро, различные фильтрующие мембраны. В последнее время в качестве сорбционного агента для домашнего обеззараживания воды от бактерий и улучшения её качества часто предлагают использовать шунгит. Например, широко рекламируется применение воды, настоянной на шунгите, в оздоровительных целях населением [9]. Однако достоверной научной информации о влиянии шунгита на водные микроорганизмы, и в частности на численность гетеротрофных бактерий в воде недостаточно. Имеются лишь отдельные сообщения о применении шунгита для устранения жесткости воды [1], а также об использовании шунгита для обеззараживания воды от бактериальных клеток и фагов [4, 5].

**Цель исследования -** оценка влияния различных количеств шунгита на численность гетеротрофных бактерий в воде, а также на способность микроорганизмов к восстановлению численности после воздействия антибиотиков.

**Материалы и методы**

Для проведения экспериментов использовали шунгитовую крошку Зажогинского месторождения от компании «Арго», ее предварительно просеивали через фильтр с диаметром ячеи 0.5 мм для получения более однородной по размеру фракции. Затем шунгит обрабатывали согласно рекомендациям изготовителя: сначала его промывали холодной водопроводной водой, затем помещали в трехлитровую стеклянную банку с водой и выдерживали двое суток, после чего вновь промывали дистиллированной водой для удаления посторонних примесей [6]. После такой предварительной обработки шунгит стерилизовали в автоклаве при 1 атм. в течение 30 мин.

Затем в 3 стерильные стеклянные колбы объемом 250 мл вносили по 100 мл воды из аквариума, после чего добавляли в них стерильную шунгитовую крошку в количествах 250 мг (или 1 г/л), 2,5 г (или 10 г/л) и 25 г (или 100 г/л). Далее в тексте статьи, использованные в экспериментах количества шунгита, будут указаны для наглядности в пересчете на 1 л.

Для определения численности гетеротрофных бактерий (ЧБ) использовали метод эпифлуоресцентной микроскопии с окраской клеток водным раствором флуорохрома акридинового оранжевого [6].

Для оценки влияния шунгита на ЧБ после воздействия антибиотиков, использовали смесь двух антибиотиков: ванкомицина (100 мг/л) и пенициллина (5 мг/л) [11].

**Результаты исследования**

***Эксперимент 1.***Целью этого эксперимента было изучение влияния различных количеств шунгита (1 г/л, 10 г/л, 100 г/л) на численность гетеротрофных бактерий в аквариумной воде**.**

Значение ЧБ в воде, взятой перед началом эксперимента из аквариума (11.01.2017 г.), составляло 0.53±0.01 млн. кл/мл. Через сутки после начала эксперимента (12.01.2017 г.) величина ЧБ в контрольной колбе (без добавления шунгита) увеличилась в 3 раза и достигла 1.54±0.02 млн. кл/мл. Наибольшее возрастание численности бактерий при сравнении трех вариантов опыта наблюдалось в колбе с содержанием шунгита 10 г/л, а наименьшее - в варианте с содержанием шунгита 100 г/л - 1.07±0.01 млн. кл/мл (рис. 1).

На второй день эксперимента численность бактерий в контрольном варианте хотя и увеличилась, но незначительно - до 1.73±0.02 млн. кл/мл. В то же время во всех трех вариантах опыта, в которых присутствовал шунгит, произошло резкое возрастание ЧБ, причем особенно заметно рост численности микроорганизмов (до 3.39±0.01 млн. кл/мл) был выражен в колбе с содержанием шунгита 10 г/л (рис. 1).



Рис. 1. Изменение численности бактериальных клеток в аквариумной воде в результате внесения различных количеств шунгита во время краткосрочного эксперимента *in vitro*

На пятый день эксперимента как в контроле, так и в трех опытных вариантах эксперимента с разным содержанием шунгита наблюдалось снижение ЧБ. В контрольном варианте без шунгита она снизилась до 0.81±0.01 млн. кл/мл и практически приблизилась к значению ЧБ в аквариумной воде, наблюдавшемуся до начала эксперимента. Во всех трех колбах с шунгитом численность бактерий также значительно снизилась по сравнению со значениями ЧБ, наблюдавшимися в них на третьи сутки, однако она все еще продолжала оставаться выше исходных значений ЧБ, наблюдавшихся в аквариумной воде до начала эксперимента (рис. 1). При этом наиболее высокие значения ЧБ (2.25±0.004 млн. кл/мл) были отмечены в варианте с содержанием шунгита 10 г/л.

Таким образом, в пятисуточном эксперименте все три исследованные нами концентрации шунгита (1 г/л, 10 г/л, 100 г/л) продемонстрировали выраженное стимулирующее воздействие на численность гетеротрофного бактериоценоза аквариумной воды. В максимальной степени оно проявлялось на вторые сутки эксперимента в опыте с содержанием шунгита 10 г/л.

***Эксперимент 2.***Его целью было повторное изучение влияния шунгита в количестве 10 г/л на численность гетеротрофного бактериоценоза аквариумной воды для подтверждения его стимулирующего действия на этот показатель**.**

Величина ЧБ в исходной аквариумной воде, которая была разлита в колбы перед началом эксперимента, была близка к таковой в первом эксперименте и составляла 0.51±0.01 млн. кл/мл. Через сутки после начала эксперимента численность бактерий в контрольной колбе (аквариумная вода без шунгита) увеличилась в 4.5 раза и составила 2.38±0.02 млн. кл/мл. В колбе с содержанием шунгита 10 г/л ЧБ через сутки возросла в 8 раз и составила 4.0±0.01 млн. кл/мл. Наибольшее возрастание численности бактерий в варианте с шунгитом наблюдалось, также как и в первом опыте, на вторые сутки эксперимента. Величина ЧБ при этом достигла 10.65±0.01 млн. кл/мл и более чем в 20 раз превысила значение ОЧБ, обнаруженное в контрольном варианте опыта (без шунгита). Кроме того, она почти в 3 раза превысила величину ЧБ, отмеченную в аналогичном варианте опыта в первом эксперименте - 3.39±0.01 млн. кл/мл. В то же время в контрольном варианте без шунгита численность микроорганизмов на вторые сутки составила всего 2.66±0.01 млн кл/мл (рис. 2).

На третьи сутки эксперимента в обоих вариантах наблюдалось незначительное снижение численности микроорганизмов.

На пятые сутки эксперимента численность бактерий в варианте с шунгитом (10 г/л) еще несколько снизилась - до 8.07 млн. кл/мл, однако она все еще превышала стартовое значение этого параметра (0.51±0.01 млн. кл/мл) почти в 16 раз. В контрольном варианте опыта численность бактерий в конце эксперимента составила 5.23±0.02 млн. кл/мл, т.е. она увеличилась в 10 раз по сравнению со значением ЧБ, определенным до начала эксперимента, чего не наблюдалось на пятые сутки в контрольном варианте первого эксперимента. Некоторое расхождение результатов первого и второго экспериментов по значениям ЧБ можно объяснить более высокой температурой аквариумной воды во второй половине марта (около 23о С), по сравнению с температурой воды во время первого эксперимента – в январе (около 10о С). Кроме того, известно, что интенсивность размножения гетеротрофных микроорганизмов в значительной мере зависит от доступности легкоокисляемого органического вещества, его источником являются экссудаты фитопланктона, численность которого в аквариумной воде увеличивается с наступлением весны. Несмотря на то, что эксперименты проводились при комнатных условиях, биологические и сезонные факторы очень существенно влияли на возрастание численности бактериопланктона в марте по сравнению с январским экспериментом. Во втором эксперименте стимулирующий эффект от внесения шунгита в количестве 10 г/л на численность гетеротрофного бактериоценоза аквариумной воды полностью подтвердился и оказался даже более выраженным, чем в первом эксперименте. Эффект стимулирования особенно ярко был выражен на вторые сутки эксперимента. Таким образом, при благоприятных условиях среды шунгит может более интенсивно стимулировать рост численности бактерий.



Рис. 2. Изменение численности бактериальных клеток в аквариумной воде под влиянием шунгита в количестве 10 г/л во время краткосрочного эксперимента *in vitro*

***Эксперимент 3.***Его целью было оценить влияние шунгита, внесенного в количестве 10 г/л, на способность бактерий восстанавливать свою численность после действия антибиотиков.

Для проведения этого эксперимента нами были предварительно подобраны такие действующие концентрации двух антибиотиков - ванкомицина и пенициллина, которые оказывали выраженное бактериостатическое действие на гетеротрофный бактериоценоз аквариумной воды. Они составили 100 мг/л и 5 мг/л соответственно. Через сутки после внесения смеси этих антибиотиков, величина ЧБ в аквариумной воде с антибиотиками снизилась до 0.04±0.001 млн. кл/мл, т.е. более чем в 10 раз по сравнению со стартовыми значениями этого параметра (0.51±0.01 млн. кл/мл). В варианте «Шунгит 10 г/л+антибиотики» численность бактериальных клеток через сутки после внесения антибиотиков тоже снизилась и составила 0.3±0.01 млн. кл/мл, т.е. оказалась почти в 8 раз выше, чем в варианте «Антибиотики» с внесением только антибиотиков без шунгита (рис. 3).

В дальнейшем величина ЧБ в варианте «Шунгит 10 г/л+антибиотики» последовательно, хотя и медленно, возрастала и в конце эксперимента, на шестые сутки, составила 0.81 млн. кл/мл, что в 1,6 раза превысило исходное значение ЧБ, наблюдавшееся в самом начале эксперимента (0.51±0.01 млн. кл/мл). В тоже время в варианте «Антибиотики» величина ЧБ оставалась низкой и лишь к концу эксперимента несколько повысилась - до 0.26 млн. кл/ мл, что, однако, было практически в два раза ниже стартовой величины ОЧБ (0.51±0.01 млн. кл/мл).



Рис. 3. Изменение численности бактериальных клеток в аквариумной воде под влиянием шунгита в количестве 10 г/л и антибиотиков во время краткосрочного эксперимента *in vitro*

Таким образом, внесение шунгита в количестве 10 г/л совместно с антибиотиками, по-видимому, оказывает защитное действие на гетеротрофных бактерий, и это позволяет микроорганизмам сохранить более высокую численность по сравнению с тем вариантом опыта, в котором присутствовали только антибиотики и отсутствовал шунгит.

Шунгит - это минерал, основой которого является углерод, причем часто этот элемент присутствует в шунгитах в особом агрегатном состоянии, в виде глобул – фуллеренов [7, 10]. Впервые фуллерены были обнаружены в составе шунгитов в 1992 г. [10]. Известно, что фуллерены могут встраиваться в биологические мембраны, влиять на их структуру, изменять каталитическую активность мембранных ферментов [8, 9]. Помимо углерода в состав шунгитов входят кремний, алюминий, железо, магний, калий, сера, кальций, фосфор и др. [7].

О благоприятном воздействии на многие организмы воды, пропущенной через шунгит, известно уже давно [7]. Тем не менее, влияние шунгита на такую важную группу гидробионтов, как микроорганизмы, среди которых могут встречаться и потенциально патогенные бактерии, исследовано недостаточно. Недавно было показано, что с помощью шунгита можно инактивировать повреждающее действие на рост микроводорослей синглетного кислорода, образующегося в присутствии фотосенсибилизаторов, которые увеличивают чувствительность водорослей к повреждающему действию света [3]. Также было показано влияние шунгита на защиту ракообразных и микроводорослей от токсического действия бихромата калия [1, 2]. Имеются отдельные сведения о применении шунгита для «улучшения качества» воды, в частности для её обеззараживания от патогенных микроорганизмов [4, 5]. Однако, наши исследования не подтвердили эффективности применения шунгита в широком диапазоне вносимых количеств (от 1 до 100 г/л) для обеззараживания аквариумной воды от гетеротрофных бактерий. Данный бактериоценоз для проведения экспериментов с шунгитом был выбран совсем не случайно. В его состав входят представители самых разнообразных физиологических групп бактерий, поскольку известно, что аквариум является близким аналогом природного водоема. Предполагаемое ингибирование численности бактерий в присутствии шунгита и, таким образом, обеззараживание воды, не было обнаружено. Напротив в экспериментах наблюдалось стимулирующее действие шунгита на численность микроорганизмов в воде, причем при внесении его в количествах, различающихся на два порядка от 1 г/л до 100 г/л. Возможно, способность шунгита к обеззараживанию воды, доложенная в работе [5], была связана с большой толщиной шунгитового слоя в использованном ими фильтре, тогда как в наших экспериментах поверхность шунгита, контактирующая с водой, условиями проведения эксперимента была ограничена. Обнаруженное нами стимулирующее влияние шунгита, внесенного в экспериментальные емкости в количествах от 1 до 100 г/л, на развитие водного гетеротрофного бактериоценоза, можно объяснить положительным воздействием на бактерий фуллеренов, которые входят в состав шунгита. Известно, что фуллерены могут встраиваться в биологические мембраны, влиять на их структуру и изменять каталитическую активность мембранных ферментов. При этом механизмы биологического действия фуллеренов зависят от их агрегатного состояния [9, 10]. Проведенные к настоящему времени научные исследования показывают, что характер воздействия фуллеренов на биологические объекты зависит от способов получения и чистоты этих молекулярных соединений. Разнонаправленное действие фуллеренов на биологические объекты объясняется, как полагают, особыми свойствами водных сферических оболочек этих соединений [8, 10].

Мы отдаем себе отчет в том, что результаты наших исследований во многом носят лишь предварительный характер, а проведенные эксперименты требуют дальнейшего развития. Однако, по нашему мнению, полученных данных уже достаточно для того, чтобы с большой осторожностью относиться к широко рекламируемым, но не прошедшим необходимых испытаний препаратам, особенно к тем, которые предлагаются в оздоровительных целях населения и для «улучшения» качества такого жизненно необходимого для человека продукта, как питьевая вода.

**Выводы:**

Результаты проведенных экспериментов *in vitro* позволяют сделать вывод о наличии стимулирующего влияния шунгита в количествах 1 г/л, 10 г/л и 100 г/л на численность гетеротрофных бактерий в аквариумной воде*.*

В наибольшей степени численность бактериопланктона увеличивалась при внесении шунгита в количестве 10 г/л.

Внесение шунгита в количестве 10 г/л совместно с антибиотиками, по-видимому, защищает гетеротрофный бактериопланктон от воздействия антибиотиков.

Необходимо с большой осторожностью относиться к не прошедшим научных испытаний, но широко рекламируемым препаратам для оздоровительных целей населения, а также для улучшения качества воды.

**Литература:**

1. *Даллакян Г.А., Погосян С.И., Ипатова В.И. и др.* Инактивация токсического действия бихромата калия шунгитом в присутствии микроводорослей // Токсикологический вестник. 2014. № 5. С. 39-44.
2. *Даллакян Г.А., Исакова Е.Ф., Гершкович Д.М.* Действие шунгита на ракообразных и его влияние на токсичность бихромата калия // Токсикологический вестник. 2016. Т. 140. № 5. С. 53–58.
3. *Даллакян Г.А.* Рост популяции микроводорослей в условиях питательных сред, обогащенных синглетным кислородом // Известия РАН. Серия биол. 1998. № 6. С. 751-753.
4. *Дриаева М.Д., Сыпченко А.Я., Туктамышев И.Ш. и др.* Изучение влияния свойств шунгита на микроорганизмы // [Вестник новых медицинских технологий](http://elibrary.ru/contents.asp?issueid=1245397). 2003. Т. 10, №4, стр. 60-61
5. *Дюккиев Е.Ф., Калинин Ю.К. и др*. Перспективы использования шунгитовых пород при водоочистке и водоподготовке // В кн.: Геология и охрана недр Карелии. Петрозаводск. 1992. С. 20-42.
6. *Ильинский В.В.* Гетеротрофный бактериопланктон // В кн. Практическая гидробиология: Учеб. для студ. биол. спец. университетов / Под ред. Федорова В.Д. и Капкова В.И. М.: ПИМ. 2006. С.331-365.
7. *Каленин Ю.К.* Экологический потенциал шунгита // Наука в России. 2008. № 6. С. 39-44.
8. *Пиотровский Л.Б., Еропкин М.Ю., Еропкина Е.М. и др.* Механизмы биологического действия фуллеренов - зависимость от агрегатного состояния // Психофармакол. биол. наркол. 2007. Т. 7. №. 2. С. 1548-1554.
9. *Ширинкин С.В., Шапошников А.А., Волкова Т.О. и др.* [Гидратированный фуллерен, как инструмент для понимания роли особых структурных свойств водной среды живого организма для его нормального функционирования](http://elibrary.ru/item.asp?id=24910330) // [Научные ведомости белгородского государственного университета. Серия: медицина-фармация](http://elibrary.ru/title_about.asp?id=26710). 2015. Т. 31, № 16 (213). С. 20-30.
10. *Buseck P.R., Tsipursky S.J., Hettich R.* Fullerenes from the geological environment // [Science. 1992. V. 257 (5067). P. 215-217](http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/257/5067/215).
11. *Sherr, B., Sherr, E., Andrew T. et al.* Trophic interactions between heterotrophic Protozoa and bacterioplankton in estuarine water analyzed with selective metabolic inhibitors // Marine Ecology – Progress Series. 1986. V. 32. P. 169-179.

***Контактная информация:***

Мошарова Ирина Викторовна, +7(910)474-9717 – мобильный. E-mail: ivmpost@mail.ru, Mosharova Irina Viktorovna, +7(910)474-9717 – mobile phone, E-mail: ivmpost@mail.ru.

***Сведения об авторах:***

**Даллакян Генарис Арминакович**, старший научный сотрудник кафедры гидробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова, кандидат биологических наук, 8(495)939-2573 – рабочий, +7(916)676-1899 – мобильный. Почтовый адрес: E-mail: honaris@bk.ru.

**Мошарова Ирина Викторовна**, старший научный сотрудник кафедры гидробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова, кандидат биологических наук, 8(495)939-2573 – рабочий, +7(910)474-9717 – мобильный. Почтовый адрес: 127253, Москва, ул. Псковская, дом 12, корпус 1, кв. 117, E-mail: ivmpost@mail.ru.,

**Ильинский Владимир Викторович**, профессор кафедры гидробиологии, доктор биологических наук, 8(495)939-2573 – рабочий, +7(906)032-0173 – мобильный. Почтовый адрес: 105043, Москва, Измайловский бульвар, дом 34, кв. 25, Е-mail: vladilinskiy@gmail.com.