

Безопасность микроорганизма деструктора нефти, как компонента нового биологического препарата для основных звеньев морских модельных гидробиоценозов

DOI: 10.37663/0131-6184-2023-6-42-49 EDN dsxjzz

Научная статья
УДК 574.52

Никифоров-Никишин Дмитрий Львович – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник факультета биотехнологий и рыбного хозяйства, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского (ПКУ)», @ niknikdl@rambler.ru, Москва, Россия

Гавирова Лилия Андреевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник кафедры микробиологии биологического факультета МГУ, заместитель руководителя проекта Фонда «НИР», @ gavirovaliliya@gmail.com, Москва, Россия

Щербакова Полина Александровна – научный сотрудник кафедры микробиологии биологического факультета МГУ, главный микробиолог Фонда «НИР», @ shcherbakovara@gmail.com, Москва, Россия

Шестаков Андрей Иннокентиевич – научный сотрудник кафедры микробиологии биологического факультета МГУ, руководитель проекта Фонда «НИР», @ 6.ok.off@mail.ru, Москва, Россия

Давыдова Оксана Александровна – главный специалист отдела инновационных проектов на шельфе, ООО «Арктический Научный Центр», @ OA_Davydova@arc.rosneft.ru, Москва, Россия

Серезкин Илья Николаевич – главный специалист отдела инновационных проектов на шельфе, ООО «Арктический Научный Центр», @ IN_Serezhkin@arc.rosneft.ru, Москва, Россия

Адреса:

1. ФГБОУ ВО «Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского (ПКУ)» – 109004, Москва, ул. Земляной Вал, 73
2. ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» – 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1
3. Фонд поддержки научно-проектной деятельности студентов, аспирантов и молодых ученых «Национальное интеллектуальное развитие» – 119192, Москва, проспект Ломоносовский, д. 27, к. 1
4. Общество с ограниченной ответственностью «Арктический научно-проектный центр шельфовых разработок» (ООО «Арктический научный центр») – 119607, Москва, бульвар Раменский, д. 1

Аннотация.

В связи с активным развитием морской транспортной инфраструктуры и возможным появлением сопутствующих углеводородных загрязнений возникает необходимость в разработке новых безопасных способов как непосредственной ликвидации загрязнений, так и их последствий. Одним из перспективных и безопасных способов является применение микробиологических препаратов на основе микроорганизмов-деструкторов нефти. В данной работе рассмотрено влияние штамма *Arthrobacter psychrochitiphilus* ARC 42 на основные звенья морских экосистем. Было установлено, что исследуемый штамм не ингибировал развитие сапрофитной микробиоты, в высоких концентрациях влиял на развитие культуры фитопланктона, практически не оказывал воздействия на бентосные организмы, в рекомендуемых концентрациях безопасен для рыб и не оказывает влияния на их физиологические показатели. Проведение опытов с добавлением нефти позволило установить отсутствие токсичности продуктов ее разложения, что подтверждает безопасность применения препарата на основе данного штамма.

Ключевые слова:

микроорганизмы-деструкторы нефти, ПДК, *Phaeodactylum tricornutum*, *Oryzias latipes*

Для цитирования:

Никифоров-Никишин Д.Л., Гавирова Л.А., Щербакова П.А., Шестаков А.И., Давыдова О. А., Серезкин И. Н. Безопасность микроорганизма деструктора нефти, как компонента нового биологического препарата для основных звеньев морских модельных гидробиоценозов // Рыбное хозяйство. 2023. № 6. С. 42-49.
DOI: 10.37663/0131-6184-2023-6-42-49 EDN dsxjzz

SAFETY OF THE OIL DESTRUCTOR MICROORGANISM AS A COMPONENT OF A NEW BIOLOGICAL PREPARATION FOR THE MAIN LINKS OF MARINE MODEL HYDROBIOCENOSSES

Dmitry L. Nikiforov-Nikishin – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher at the Faculty of Biotechnology and Fisheries, *Moscow State University of Technology and Management named after K.G. Razumovsky (PKU)*, @ niknikdl@rambler.ru, Moscow, Russia

Lilia A. Gavirova – Candidate of Biological Sciences, Researcher at the Department of Microbiology of the Faculty of Biology of *Moscow State University*, Deputy Project Manager of the Foundation “National Intellectual Resource”, @ gavirovaliliya@gmail.com, Moscow, Russia

Polina A. Shcherbakova – Researcher at the Department of Microbiology of the Faculty of Biology of *Moscow State University*, Chief Microbiologist of the Foundation “National Intellectual Resource”, @ shcherbakovapa@gmail.com, Moscow, Russia

Andrey I. Shestakov – Researcher at the Department of Microbiology of the Faculty of Biology of *Moscow State University*, Project Manager of the Foundation “National Intellectual Resource”, @ 6.ok.off@mail.ru, Moscow, Russia

Oksana A. Davydova – Chief Specialist of the Department of Innovative projects on the shelf, LLC “Arctic Research Center”, @ OA_Davydova@arc.rosneft.ru, Moscow, Russia

Ilya N. Seryozhkin – Chief Specialist of the Department of innovative projects on the shelf, LLC “Arctic Research Center”, @ IN_Serezhkin@arc.rosneft.ru, Moscow, Russia

Addresses:

1. *Moscow State University of Technologies and Management named after K.G. Razumovsky (PKU)* – 109004, Moscow, Zemlyanoy Val str., 73
2. *Moscow State University named after M.V. Lomonosov* – 119991, Moscow, Leninskie Gory, 1
3. *Fund for Support of Scientific and Project Activities of Students, Postgraduates and Young Scientists “National Intellectual Development”* – 119192, Moscow, Lomonosovsky Prospect, 27, room 1
4. *Limited Liability Company responsibility “Arctic Research and Design Center for Offshore Developments” (LLC “Arctic Research Center”)* – 119607, Moscow, Ramenskiy Boulevard, 1

Annotation. Due to the active development of marine transportation infrastructure and possible occurrence of accompanying hydrocarbon pollution, there is a need to develop new safe methods of both direct elimination of pollution and its consequences. One of the promising and safe ways is the use of products based on oil-degrading microorganisms. In this work the influence of *Arthrobacter psychrochitiphilus* ARC 42 strain on the main links of marine ecosystems is considered. It was found that the studied strain did not inhibit the development of saprophytic microbiota, in high concentrations influenced the development of phytoplankton culture, practically had no effect on benthic organisms. Strain ARC 42 in the recommended concentrations is safe for fish and does not affect their physiological parameters. Experiments with the addition of oil revealed the absence of toxicity of its decomposition products, which confirms the safety of using the preparation based on this strain.

Keywords:

oil-degrading bacteria, threshold limit value (TLV), *Phaeodactylum tricornutum*, *Oryzias latipes*

For citation:

Nikiforov-Nikishin D.L., Gavirova L.A., Shcherbakova P.A., Shestakov A.I., Davydova O.A., Serezhkin I.N. (2023). Safety of the oil destructor microorganism as a component of a new biological preparation for the main links of marine model Hydrobiocenoses // Fisheries. No. 6. Pp. 42-49. DOI: 10.37663/0131-6184-2023-6-42-49 EDN dsxjzz

ВВЕДЕНИЕ

Арктический регион РФ является одной из наиболее интенсивно развивающихся экономических зон [1], в котором происходит как освоение новых месторождений полезных ископаемых, так и развитие прибрежной транспортной инфраструктуры, в том числе – для переработки и транспортировки нефти и газа [2]. В настоящее время ведутся работы по более интенсивному использованию Северного морского пути для транспортировки углеводородов и других полезных ископаемых, поэтому очевидно, что количество нефтепродуктов, непреднамеренно попадающих в морские акватории при эксплуатации морского транспорта, может расти [3]. Для ликвидации последствий потенциальных углеводородных загрязнений и минимизации ущерба окружающей среде необходимо использовать наиболее эффективные и экологически безопасные подходы [4; 5]. Одним из способов очистки прибрежных участков акваторий от углеводородов нефти может являться использование микробиологических препаратов [6]. Специально отобранные аборигенные штаммы микроорганиз-

мов способны проявлять высокую активность в разложении компонентов нефти даже при низких температурах северных широт. Это свойство делает их особенно ценными для потенциального использования в биоремедиации морских нефтяных загрязнений в холодных климатических условиях [7; 8]. Арелом их обитания и местом выделения могут быть акватории морей арктического региона, где они – естественные компоненты морских экосистем [9].

Микробные препараты можно использовать как отдельно, так и совместно с диспергентами и другими решениями для утилизации углеводородных загрязнений [10]. В качестве носителя для нефтеокисляющих микроорганизмов, как правило, используются относительно инертные компоненты, которые могут служить субстратом для развития и источником дополнительного углеродного питания, что увеличивает скорость роста микроорганизмов [11]. Для успешного использования данного подхода при очистке морских акваторий необходимо оценить потенциальные экологические риски его применения. В частности, требуется: (1) оценка взаимодействия препаратов с мо-

дельными морскими видами организмов; (2) изучение токсичности микроорганизмов и их метаболитов, в т.ч. продуктов разложения нефти; (3) разработка методов контроля микроорганизмов в водной среде для оценки их распространения после внесения. Подобные исследования могут быть проведены на модельных морских гидробиоценозах с использованием стандартизированных тест-организмов.

Многие штаммы микроорганизмов-деструкторов уже были протестированы на биобезопасность и показали низкую токсичность, а также – отсутствие негативного воздействия на все звенья морских биоценозов. Помимо этого, биологические препараты, в состав которых входят аборигенные штаммы микроорганизмов, являются более безопасными, ввиду того, что не будут оказывать негативного влияния на местное биоразнообразие [12]. Таким образом, для эффективного применения вновь разработанных биологических препаратов необходимо проведение комплексных исследований для подтверждения возможности их безопасного использования в морских экосистемах. Тестирование безопасности микробного штамма, описанного в работе, проходило на базе центра «Аквакультура» Факультета биологии и рыбного хозяйства МГУТУ им. К.Г. Разумовского (ПКУ).

Целью исследования являлась оценка влияния компонентов микробного препарата, а именно – штамма психрофильного микроорганизма-деструктора нефти, на сапрофитную

микрофлору, представителей фито- и зоопланктона, бентосных организмов и рыб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штамм микроорганизма в составе биопрепарата

Исследуемый биологический препарат предназначен для очистки воды и береговой линии арктических морей от загрязнений углеводородами в условиях морской воды и при низких, в том числе отрицательных температурах (до $-2,5^{\circ}\text{C}$). В состав препарата входит штамм *Arthrobacter psychrochitiphilus* ARC 42 (ВКПМ Ас-2076), депонированный в Национальном биоресурсном центре «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» (БРИЦ ВКПМ). Для указанного штамма область применения обозначена как биологическая очистка нефтяных загрязнений северных морей. Морфология колоний, при росте на плотной среде МРСА, позволяет проводить идентификацию его присутствия в водной среде.

Штамм на исследование был предоставлен в виде суспензии чистой культуры с концентрацией микроорганизмов не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

Определение токсических свойств

Работа по определению безопасных концентраций биопрепарата выполнена в соответствии с методическими указаниями (согласно «Методическим указаниям», приказ Росрыболовства № 695 от 04.08.09 г., с учетом пункта 5 Требо-

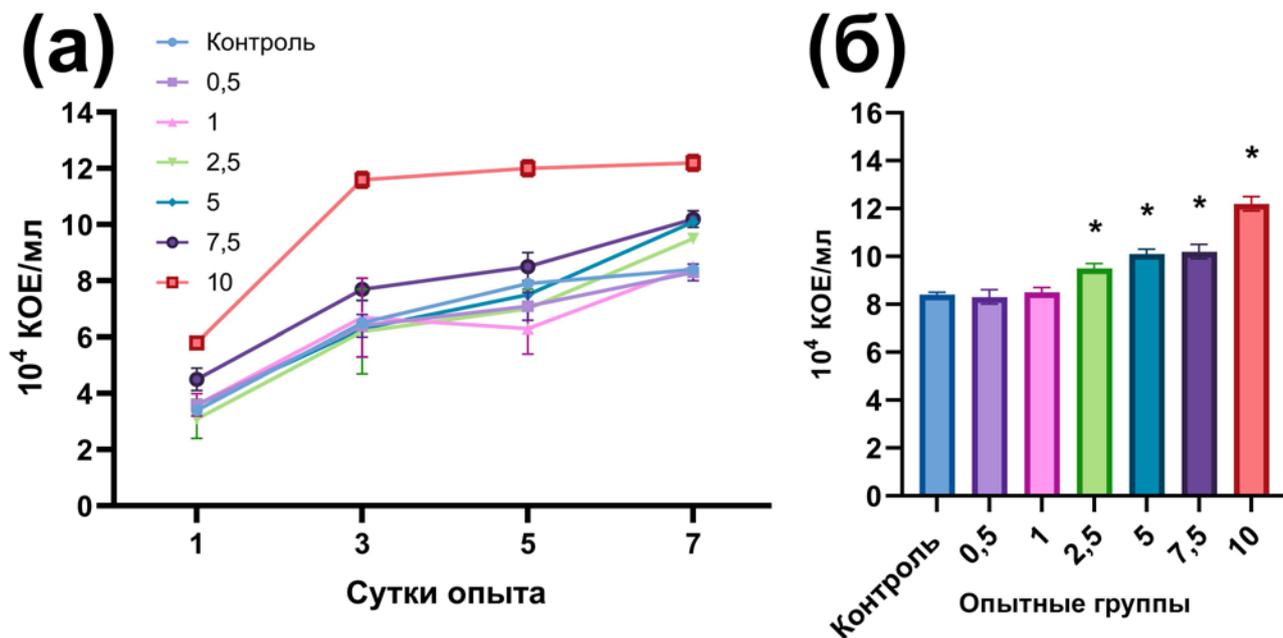


Рисунок 1. Влияние культуры *Arthrobacter psychrochitiphilus* ARC 42 на численность сапрофитной микрофлоры (10^4 КОЕ/мл) с добавлением нефти. (а) – динамика численности сапрофитных микроорганизмов на 1-7 сутки; (б) – численность микроорганизмов на 7 сутки опыта. **Примечание:*** – значения, статистически достоверно отличающиеся от контроля при $t_d = 2,77$, $p \leq 0,05$

Figure 1. *Arthrobacter psychrochitiphilus* ARC 42 on the number of saprophytic microflora (10^4 CFU/ml) with the addition of oil. (a) – dynamics of the number of saprophytic microorganisms on 1-7 days; (b) – the number of microorganisms on the 7th day of the experiment. **Note:*** – values statistically significantly different from the control at $t_d = 2,77$, $p \leq 0,05$

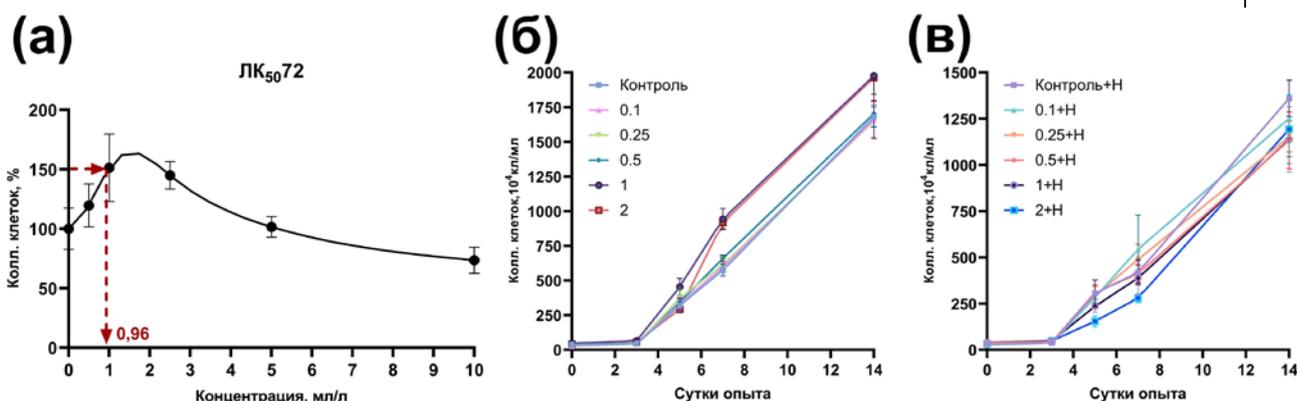


Рисунок 2. Влияние культуры *Arthrobacter psychrochitiphilus* ARC 42 на рост культуры *Phaeodactylum tricornerum* в остром и хроническом опыте с добавлением и без добавления нефти

Figure 2. Influence of the culture of *Arthrobacter psychrochitiphilus* ARC 42 on the growth of *Phaeodactylum tricornerum* culture in acute and chronic experience with and without the addition of oil

вания к разработке ПДК биологических препаратов [13]). В качестве основных тест-объектов в исследовании были использованы водоросли *Phaeodactylum tricornerum*, макрофиты – хетоморфа (*Chaetomorpha linum*), ракообразные *Artemia salina*, представители бентоса – амфиподы (*Gammarus duebeni*), представители ихтиофауны – рыбы медака (*Oryzias latipes*) и гуппи (*Poecilia reticulata*). Работы проводились на базе центра «Аквакультура» Факультета биологии и рыбного хозяйства МГУТУ им. К.Г. Разумовского (ПКУ). Для содержания тест-объектов и проведения исследования использовалась искусственная морская вода на основе соли «Red Sea Salt» (Red Sea International) соленостью 20‰. Для исследования влияния на сапрофитную микрофлору использовалась вода из действующей морской аквариальной системы.

Исследования проводились в двух вариантах: с добавлением (0,05 мл/л) и без добавления нефти. Установление чувствительности применяемых тест-организмов проводилось с помощью бихромата калия.

Для сапрофитной микрофлоры, фитопланктона и простейших оценивалось влияние на динамику роста культуры. Для зоопланктона и бентосных организмов основным критерием оценки токсичности выступала выживаемость тест-объектов. Спектр исследований на рыбах включал как краткосрочные, так и долгосрочные эксперименты. Помимо выживаемости оценивалось воздействие на эмбриональные стадии развития, гематологические и гистологические показатели. Оценка возможной генотоксичности проводилась с использованием микроядерного теста на эритроцитах рыб [14].

Статистическая обработка

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 9.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA), среды R (v3.5.2; R Core Team [15]) и программы RStudio [16]. Данные анализируемых показателей представлены как среднее \pm стандартное отклонение ($M \pm m$). Для оценки статистических

различий между тест-показателями биологических объектов в разных концентрациях использовали тест Стьюдента в модификации Уэлча (в случае неравных дисперсий) с использованием поправки Бонферрони-Холма (для учета множественных сравнений). Статистически значимым считалось значение $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние исследуемого штамма на сапрофитную микрофлору

Концентрация биопрепарата для исследования была определена при оценке органолептических показателей, а также в острых опытах на тест-объектах. При исследовании воздействия культуры *Arthrobacter psychrochitiphilus* ARC 42 удалось выявить закономерности взаимодействия исследуемого микроорганизма и естественной сапрофитной микрофлоры.

Штамм ARC 42 приводит к достоверной стимуляции численности сапрофитной микрофлоры на 3 и 5 сутки в концентрациях 7,5 и 10 мл/л с добавлением нефти (рис. 1, а). Внесение нефти в опытные растворы приводило к достоверной стимуляции роста сапрофитных микроорганизмов также в концентрации 5 мл/л. На 7 сутки численность микроорганизмов в концентрациях более 2,5 мл/л достоверно превышала контрольные значения, как с добавлением, так и без добавления нефти (рис. 1, б).

Исходя из полученных результатов можно видеть, что добавление культуры в концентрациях более 0,5 мл/л приводит к существенному ускорению роста бактериальных сообществ. Эффект стимуляции может быть вызван внесением более высокого титра микроорганизмов, по сравнению с присутствующей в водной среде сапрофитной микрофлорой. Также ускорение роста может быть вызвано метаболитами исследуемого штамма и присутствием культуральной среды. При добавлении нефти, за счет метаболизма нефтеокисляющих штаммов микроорганизмов, могут появляться дополнительные источники питания для естественной микрофлоры.

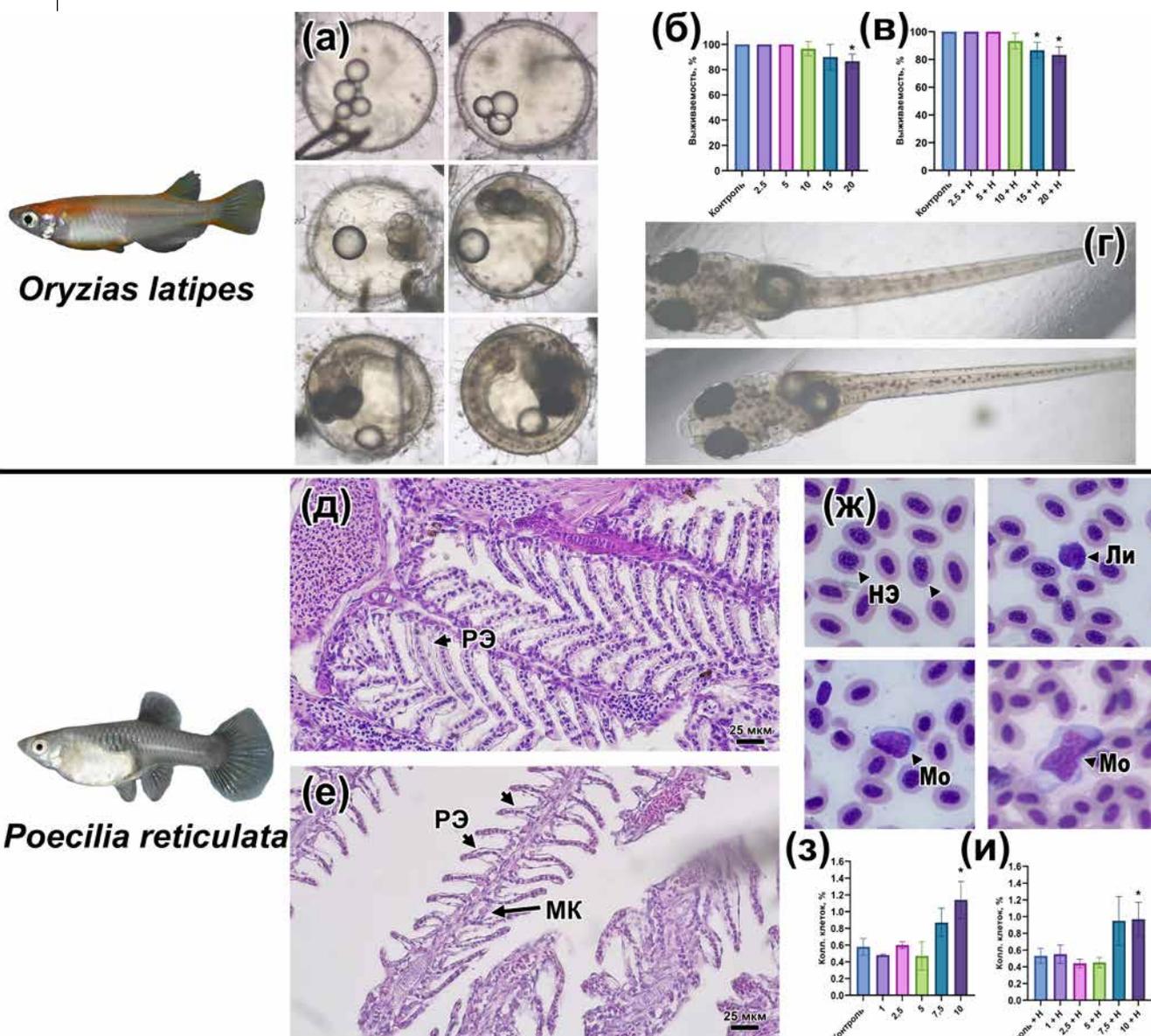


Рисунок 3. Результаты исследования по влиянию бактериальных культур на рыб (*Poecilia reticulata*, *Oryzias latipes*): (а) – эмбриональное развитие медаки в контроле (слева) и в концентрации штамма ARC 42 10 мл/л (справа); (б) – выживаемость икры медаки без добавления нефти (в) и с добавлением нефти; (г) предчичинка медаки в контроле (сверху) и в концентрации штамма ARC 42 20 мл/л (снизу); (д) гистологические срезы жабер гуппи в концентрации штамма ARC 42 7,5 мл/л и (е) 10 мл/л; (ж) форменные элементы крови из опытных групп; (з) относительная встречаемость незрелых эритроцитов в периферической крови гуппи при действии штамма ARC 42 без добавления нефти и/ или с добавлением нефти. **Сокращения:** РЭ – респираторный эпителий; МК – мукоидные клетки; НЭ – незрелый эритроцит; Ли- лимфоцит; Мо – моноцит. **Примечание:*** – значения, статистически достоверно отличающиеся от контроля при $td = 2,77, p \leq 0,05$

Figure 3. Results of a study on the effect of bacterial cultures on fish (*Poecilia reticulata*, *Oryzias latipes*): (а) – embryonic development of honeydew in the control (left) and in the concentration of strain ARC 42 10 ml/l (right); (б) – the survival rate of honey caviar without the addition of oil (c) and with the addition of oil; (д) the predchichinka of honey in the control (top) and in the concentration of shmma ARC 42 20 ml/l (bottom); (е) histological sections of guppy gills in the concentration of the ARC 42 strain 7.5 ml/l and (e) 10 ml/l; (г) shaped blood elements from the experimental groups; (h) the relative occurrence of immature erythrocytes in the peripheral blood of guppies under the action of the ARC 42 strain without the addition of oil and/or with the addition of oil. **Abbreviations:** RE – respiratory epithelium; MK – mucoid cells; NE – immature erythrocyte; Li- lymphocyte; Mo – monocyte. **Note:*** – values statistically significantly different from the control at $td = 2.77, p \leq 0.05$

Таким образом, безопасной, не оказывающей влияния на рост сапрофитных микроорганизмов концентрацией бактериальной культуры может быть признана 0,5 мл/л (500 мг/л; $0,5 \cdot 10^5$ КОЕ/л). Внесение штамма в данной концентрации в морскую среду не окажет негативного воздействия на существующий микробиоценоз, но

может существенно снизить остаточное нефтяное загрязнение.

Влияние исследуемого штамма на фитопланктон (*Phaeodactylum tricornutum*)

С целью оценки влияния исследуемого штамма на организмы фитопланктона исполь-

зовалась диатомовая водоросль *Phaeodactylum tricorutum*, которая является чувствительным тест-объектом к загрязнениям водной среды. Исследования проводились в остром (72 часа) и хроническом опытах (14 суток). В условиях краткосрочного эксперимента был установлен токсикометрический параметр ЭК₅₀ 72, который составил для штамма ARC42 0,96 мл/л (рис. 2, а). В концентрациях 1 и 2,5 мл/л происходило значительное ускорение роста культуры водоросли, при этом в максимальных концентрациях наблюдалось незначительное падение численности клеток. Таким образом, можно утверждать, что исследуемый микроорганизм оказывает схожий стимулирующий эффект на рост культуры водорослей в низких концентрациях.

В хроническом опыте без добавления нефти достоверная стимуляция роста культуры феодактилума наблюдалась в концентрациях 1 и 2 мл/л начиная с 5 суток опыта (рис. 2, б). Большая, в сравнении с контролем, численность клеток в данных концентрациях сохранялась на 7 и 14 сутки. При внесении нефти в исследуемый раствор была установлена разнонаправленная динамика роста культуры *P. tricorutum*. Так, на 3 сутки эксперимента, при внесении нефти концентрации культур 1 и 2 мл/л привели к менее выраженной стимуляции роста водоросли, чем без ее внесения (рис. 2, в). Однако, начиная с 5 суток, в данных концентрациях было установлено существенное снижение численности клеток в культуре

по сравнению с контролем. По завершении опыта (14 сутки) достоверные различия по количеству клеток феодактилума и исследуемой культуры не установлены.

Как правило, бактериальные культуры, при совместном культивировании с фитопланктоном, влияют на процессы роста, так как микробные клетки, прикрепляясь к поверхности клеток водорослей, снижают интенсивность фотосинтеза и газообмена. Стимуляция роста водоросли, скорее всего, обусловлена обогащением водной среды метаболитами бактериальных клеток, которые могут стимулировать рост водорослей за счет присутствия азотистых соединений, выделения CO₂ и биологически активных веществ [17]. Выявленная разнонаправленная динамика роста культуры при добавлении нефти может быть связана с негативным воздействием нефти непосредственно на организмы фитопланктона, численность которых снижалась по мере разложения нефти микроорганизмами.

Таким образом, безопасной концентрацией для исследуемого штамма, не оказывающей влияния на рост водорослевой культуры *Phaeodactylum tricorutum*, следует признать 0,5 мл/л (500 мг/л; 0,5*10⁵ КОЕ/л).

Сводные данные о влиянии исследуемого штамма на представительных гидробионтов

Данные по влиянию исследуемой бактериальной культуры на представительных гидробионтов, а также гидрохимический режим приведены в таблице 1.

Таблица 1. Сводная таблица по влиянию бактериальной культуры на солоноватоводную и морскую водную среду и представительных гидробионтов / **Table 1.** Summary table on the effect of bacterial culture on the brackish and marine aquatic environment and representative hydrobionts

Тест-организм	Определяемый показатель	МДК, мл/л (КОЕ/л)
		ARC 42
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	Численность сапрофитов	1 (1*10 ⁶)
	ЭК ₅₀ 72	0.96
	Динамика численности клеток	0.5 (0.5*10 ⁵)
<i>Zostera marina</i>	Прирост листьев	5 (5*10 ⁶)
	Прирост таллома	10(1*10 ⁷)
<i>Chaetomorpha linum</i>	Прирост таллома	1 (1*10 ⁶)
<i>Stylonichia mytilus</i>	Изменение численности	1 (1*10 ⁶)
<i>Artemia salina</i>	ЛК ₅₀ 96	11.57
	Выживаемость	1 (1*10 ⁶)
<i>Gammarus duebeni</i>	Выживаемость	2.5 (2.5*10 ⁶)
	ЛК ₅₀ 96	14.02
<i>Poecilia reticulata</i>	Выживаемость мальков	5 (5*10 ⁶)
	Выживаемость молоди	10 (1*10 ⁷)
<i>Oryzias latipes</i>	Воздействия на эмбриональное развитие	10 (1*10 ⁷)
	Выклев предличинок	10 (1*10 ⁷)
<i>Poecilia reticulata</i>	Гистологическое исследование	5 (5*10 ⁶)
	Гематологическое исследование	5 (5*10 ⁶)
	Генотоксичность (МЯТ)	10 (1*10 ⁷)

Было установлено, что бактериальная культура, в исследуемых концентрациях, оказалась малотоксичной для большинства экспериментальных тест-организмов. Эффекта при воздействии на организмы зоопланктона (*Stylonichia mytilus*, *Artemia salina*) не наблюдалось, как в остром, так и в хроническом опыте, даже при внесении 1 мл/л биопрепарата. Показатель – полулетальная концентрация за 96 часов для *Artemia salina* для штамма ARC 42 составил 11,57 мл/л.

Исследуемый штамм не оказывал негативного воздействия на организмы фитобентоса до концентрации 1 мл/л (на примере *Zostera marina*, *Chaetomorpha linum*). При этом, хетоморфа оказалась более чувствительной к воздействию штамма. Так, для ARC 42 в концентрации 2,5 мл/л наблюдалась стимуляция роста таллома, а при концентрациях 7,5 и 10 мл/л было выявлено ингибирование роста. Организмы зообентоса (*Gammarus duebeni*) не реагировали на присутствие в водной среде исследуемого штамма в концентрации менее 2,5 мл/л как при добавлении, так и без добавления нефти.

Исследуемые виды рыб (*Poecilia reticulata*, *Oryzias latipes*) продемонстрировали низкую чувствительность к воздействию данного препарата (рис. 3). Показатель ЛК50 за 96 часов для мальков гуппи составил: для штамма ARC 42 – 14,02 мл/л. Безопасная концентрация, не оказывающая воздействия на мальков гуппи в хронической опыте, составила 5 мл/л. Влияние на эмбриональное развитие *Oryzias latipes* было установлено только при концентрации более 15 мл/л для штамма ARC42 с добавлением нефти (рис. 3, б, в). Высокие концентрации исследуемого штамма также влияли на физиологические функции рыб. Так, концентрации выше 7,5 мл/л приводили к нарушениям жаберного аппарата, выражающегося в отслоении респираторного эпителия и гипертрофии мукоидных клеток (рис. 3, д, е). Изменения также наблюдались в лейкоцитарной формуле гуппи. Штамм ARC 42 приводил к достоверному уменьшению числа лимфоцитов в периферической крови рыб в концентрациях 7,5 и 10 мл/л.

Исследование возможной генотоксичности изучаемого штамма и метаболитов в присутствии углеводородов нефти, с помощью микроядерного теста на эритроцитах *Poecilia reticulata*, показало отсутствие увеличения встречаемости цитогенетических нарушений во всех исследуемых концентрациях.

Все вышеперечисленные звенья модельного гидробиоценоза не лимитировали по токсическому воздействию на изучаемый штамм микроорганизма. При этом, проведение экспериментов показало безопасность исследуемого штамма до концентрации $0,5 \cdot 10^5$ КОЕ/л (0,5 мл/л).

ВЫВОДЫ

1. Штамм-деструктор нефти *Arthrobacter psychrochitiphilus* ARC 42, взаимодействуя с естественной микрофлорой воды, может вызвать

стимуляцию ее развития при внесении в концентрации более 0,5 мл/л (500 мг/л ; $0,5 \cdot 10^5 \text{ КОЕ/л}$). Во всех исследуемых концентрациях с добавлением и без добавления нефти угнетения развития сапрофитов установлено не было.

2. Диатомовая водоросль *Phaeodactylum tricornutum* являлась лимитирующим звеном, так как уже при воздействии исследуемого штамма в концентрации 1 мл/л (1000 мг/л ; $1 \cdot 10^5 \text{ КОЕ/л}$) без добавления нефти отмечалась стимуляция роста культуры. При добавлении нефти на 3 и 5 сутки хронического опыта отмечалось ингибирование ее роста.

3. Зоопланктон, фитобентос и зообентос оказались не чувствительными к воздействию исследуемого штамма микроорганизма и токсический эффект проявлялся только в самых больших концентрациях – более $0,5 \cdot 10^5 \text{ КОЕ/л}$.

4. Исследуемый штамм не оказывал влияния на выживаемость рыб на всех стадиях развития. Эффект был выявлен по ряду гистологических и гематологических показателей в концентрациях более $0,5 \cdot 10^5 \text{ КОЕ/л}$.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов в работу: **Никифоров-Никишин Д.Л.** – экспериментальная часть, анализ данных, подготовка основного текста. **Гавирова Л.А.** – анализ данных, корректировка текста; **Щербакова П.А.** – подготовка культуры на исследования; **Шестаков А.И.** – идея статьи, проверка текста статьи; **Давыдова О.А.** – подготовка к печати, окончательная проверка текста; **Серезжкин И.Н.** – идея статьи, корректировка текста

The authors advertise the rejection of the conflict of intersections.

The authors' contribution to the work: **Nikiforov-Nikishin D.L.** – experimental work, data analysis, preparation of the main text. **Gavirova L.A.** – data analysis, correction of the text; **Shcherbakova P.A.** – preparation of cultures for research; **Shestakov A.I.** – of the article, verification of the text of the article; **Davydova O.A.** – preparation for printing, final check of the text; **Serezshkin I.N.** – idea of the article, correction of the text

ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ

1. Иванова А.В. Развитие арктического региона: проблемы и приоритеты // Сборник материалов IV Всероссийской научно-практической конференции. Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова». 2023. С. 787-790.
2. Маслобоев В.А. Природоподобные технологии в горнопромышленном комплексе Арктики. Сборник научных материалов Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения акад. Николая Павловича Лавёрова. / отв. ред. А.О. Глико, А.А. Барях, К.В. Лобанов, И.Н. Болотов. Архангельск: Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаверова Российской академии наук. 2020. С. 43-48.
3. Патин С. А. Нефть и экология континентального шельфа: в 2-х т. 2-е изд. переработанное и дополненное // М.: ВНИРО. 2017. С. 326.
4. Погребов В.Б. Интегральная оценка экологической чувствительности биоресурсов береговой зоны к антропогенным воз-

действиям // Основные концепции современного берегопользования. Т. 2. СПб: Изд-во РГГМУ. 2010. С. 43–85.

5. Шайхиев И.Г., Ярочкина А.Н., Гафаров Р.Р., Мирошниченко Н.А., Сеитова С.А. Химические, физико-химические и биологические методы обезвреживания нефтесодержащих отходов // Сборник докладов Всероссийской научной конференции Безопасность, защита и охрана окружающей природной среды: фундаментальные и прикладные исследования. Белгород: Белгородский государственный технологический университет им. В.Г. Шухова. 2021. С. 187-196.

6. Rosenberg E. Hydrocarbon-oxidizing bacteria //The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry. 2013. С. 201-214.

7. Semenova E.M., Babich, T.L., Sokolova D.S., Ershov A.P., Raievska Y.I., Bidzhieva S.K., Stepanov A.L., Korneykova M.V., Myazin V.A., Nazina T.N. Microbial communities of seawater and coastal soil of Russian Arctic Region and their potential for bioremediation from Hydrocarbon Pollutants //Microorganisms. 2022. Т. 10. №. 8. С. 1490.

8. Гоголева О.А., Немцева Н.В. Угледородоокисляющие микроорганизмы природных экосистем //Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2012. №. 2.

9. Федоренко В. Н., Серезжкин И.Н., Ламова Я.А., Князюк М.К., Нетрусов А.И., Шестаков А.И. Свойства естественных угледородоокисляющих микробных сообществ для утилизации нефтяных загрязнений в Северных регионах // Биотехнология. 2015. №6. С. 72-78.

10. Malavenda R., Rizzo C., Michaud L., Gerçe B., Bruni V., Sylдатк С., Hausmann R., Giudice L. Biosurfactant production by Arctic and Antarctic bacteria growing on hydrocarbons //Polar Biology. 2015. Т. 38. №. 10. С. 1565-1574.

11. Шестаков А.И., Федоренко В.Н., Виноградова Е.Н., Садраддинова Э.Р., Абрамов С.М., Шестакова О.О., Нетрусов А.И. Микробный препарат для утилизации угледородных загрязнений береговой зоны арктических морей // Нефть. Газ. Новации. 2013. Т. 177. №. 10. С. 47-50

12. Сидоренко М.Л., Русакова Д.А. Разнообразие психрофильных бактерий и их биотехнологический потенциал (обзор) // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2022. №. 58. С. 28-54.

13. Методические указания по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения (с изменениями на 22 декабря 2016 года), приказ Росрыболовства № 695 от 04.08.09 г.

14. Kochetkov N.I., Smorodinskaya S.V., Nikiforov-Nikishin D.L., Klimov V.A., Golovacheva N.A., Nikiforov-Nikishin A.L., Grozescu Y.N. Evaluating possible genotoxicity of three feed additives recommended for aquaculture by using micronucleus test on Danio rerio erythrocytes // Vestnik of Astrakhan State Technical University. Series: Fishing Industry. 2022. No. 3. P. 48-59.

15. R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org>. (Дата обращения 03.08.2023)

16. RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com>. (Дата обращения 07.08.2023)

17. Клишевич Н.Г., Ананьева И.Н., Аleshenkova З.М. Фитостимулирующая активность микроорганизмов-деструкторов нефти //Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. 2020. С. 440-446.

REFERENCES AND SOURCES

1. Ivanova A.V. (2023). Development of the Arctic region: problems and priorities // Collection of materials of the IV All-Russian Scientific and practical Conference. Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Federal State Educational Institution of Higher Education "Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov". Pp. 787-790. (In Russ.).

2. Masloboev V.A. (2020). Nature-like technologies in the mining complex of the Arctic. Collection of scientific materials of the All-Russian conference with international participation dedicated to the 90th anniversary of the birth of akad. Nikolai Pavlovich Laverov. / ed.

by A.O. Gliko, A.A. Baryakh, K.V. Lobanov, I.N. Bolotov. Arkhangelsk: Federal Research Center for the Integrated Study of the Arctic named after Academician N.P. Laverov of the Russian Academy of Sciences. Pp. 43-48. (In Russ.).

3. Patin S.A. (2017). Oil and ecology of the continental shelf: in 2 vols. 2nd ed. revised and supplemented //Moscow: VNIRO. P. 326. (In Russ.).

4. Pogrebov V.B. (2010). Integral assessment of the ecological sensitivity of bioresources of the coastal zone to anthropogenic impacts // Basic concepts of modern coastal management. Vol. 2. St. Petersburg: Publishing House of RGGMU. Pp. 43-85. (In Russ.).

5. Shaikhiev I.G., Yarochkina A.N., Gafarov R.R., Miroshnichenko N.A., Seitova S.A. (2021). Chemical, physico-chemical and biological methods of neutralization of oily waste // Collection of reports of the All-Russian scientific conference Safety, protection and protection of the environment: fundamental and applied research. Belgorod: Belgorod State Technological University named after V.G. Shukhov. Pp. 187-196. (In Russ.).

6. Rosenberg E. (2013). Hydrocarbon-oxidizing bacteria //The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry. Pp. 201-214.

7. Semenova E.M., Babich, T.L., Sokolova D.S., Ershov A.P., Raievska Y.I., Bidzhieva S.K., Stepanov A.L., Korneykova M.V., Myazin V.A., Nazina T.N. (2022). Microbial communities of seawater and coastal soil of Russian Arctic Region and their potential for bioremediation from Hydrocarbon Pollutants // Microorganisms. Vol. 10. No. 8. p. 1490.

8. Gogoleva O.A., Nemtseva N.V. (2012). Hydrocarbon-oxidizing microorganisms of natural ecosystems //Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. No. 2. (In Russ.).

9. Fedorenko V.N., Serezjkin I.N., Lamova Ya.A., Knyazyuk M.K., Netrusov A.I., Shestakov A.I. (2015). Properties of natural hydrocarbon-oxidizing microbial communities for utilization of oil pollution in the Northern regions // Biotechnology. No.6. Pp. 72-78. (In Russ.).

10. Malavenda R., Rizzo C., Michaud L., Gerçe B., Bruni V., Sylдатк С., Hausmann R., Giudice L. (2015). Biosurfactant production by Arctic and Antarctic bacteria growing on hydrocarbons //Polar Biology. Vol. 38. no. 10. Pp. 1565-1574.

11. Shestakov A.I., Fedorenko V.N., Vinogradova E.N., Sadraddinova E.R., Abramov S.M., Shestakova O.O., Netrusov A.I. (2013). Microbial preparation for utilization of hydrocarbon pollution of the coastal zone of the Arctic seas // Oil. Gas. Innovations. vol. 177. no. 10. Pp. 47-50. (In Russ.).

12. Sidorenko M.L., Rusakova D.A. (2022). Diversity of psychrophilic bacteria and their biotechnological potential (review) // Bulletin of Tomsk State University. Biology. No. 58. Pp. 28-54. (In Russ.).

13. Methodological guidelines for the development of water quality standards for water bodies of fishery significance, including standards for maximum permissible concentrations of harmful substances in the waters of water bodies of fishery significance (as amended on December 22, 2016), Order of Rosrybolovstvo No. 695 of 04.08.09. (In Russ.).

14. Kochetkov N.I., Smorodinskaya S.V., Nikiforov-Nikishin D.L., Klimov V.A., Golovacheva N.A., Nikiforov-Nikishin A.L., Grozescu Y.N. (2022). Evaluating possible genotoxicity of three feed additives recommended for aquaculture by using micronucleus test on Danio rerio erythrocytes // Vestnik of Astrakhan State Technical University. Series: Fishing Industry. No. 3. Pp. 48-59.

15. R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org>. (Date of request)

16. RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com> . (Date of request)

17. Klishevich N.G., Ananyeva I.N., Aleshenkova Z.M. (2020). Phytostimulating activity of microorganisms-oil destructors // Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects. Pp. 440-446. (In Russ.).

Материал поступил в редакцию / Received 16.10.2023
Принят к публикации / Accepted for publication 18.10.2023