

Биотестирование как способ интегральной оценки приёмов рекультивации загрязнённых нефтью экосистем

© 2021. Е. В. Морачевская¹, к. б. н., в. н. с.,

Л. П. Воронина^{1,2}, д. б. н., в. н. с.,

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
119991, Россия, г. Москва, Воробьёвы горы, д. 1, стр. 12,

²Центр стратегического планирования и управления
медико-биологическими рисками здоровью ФМБА,
119121, России, Москва, ул. Погодинская, д. 1, стр. 1.,

e-mail: Luydmila.voronina@gmail.com

Разработка новых и совершенствование существующих технологий по восстановлению нефтезагрязнённых земель, обезвреживание и утилизация нефтебуровых отходов – важные меры по решению экологических проблем. Биотестирование успешно применяется для определения опасности загрязнения объектов окружающей среды нефтью и отходами нефтяной промышленности. С помощью биотестов можно оценить состояние загрязнённых объектов, что не всегда возможно сделать химико-аналитическими методами, учитывая сложный химический состав нефтяных углеводородов. Аналитический обзор подтверждает необходимость разработки системы биотестирования для оценки состояния компонентов экосистемы в случае нефтезагрязнения и определения эффективности мер по их восстановлению. Принимая во внимание характер загрязнения, представленный в статье рядом положений по химической характеристике нефтяных углеводородов и длительность процессов восстановления, биотестирование следует проводить на каждом этапе процесса рекультивации, в динамике. Определение степени обезвреживания загрязнённых объектов заключается в поэтапном переводе уровня опасности из более высокого класса в более низкий. Биотестирование, в данном случае, остаётся обязательным методом определения суммарной токсичности. В ходе пробоподготовки образца для биотестирования целесообразно рассмотреть возможность увеличения биодоступности углеводородных компонентов. Обязательным условием применения биотестирования является использование

элюатного и контактного подходов. Основными методами, которые могут входить в сокращённую схему определения эффективности рекультивации нефтезагрязнённых объектов, можно считать метод биотестирования с использованием гидробионтов в элюате (водная вытяжка) и фитотестирование, выполненное с применением контактного и элюатного подходов. Батарея биологических тестов, входящих в расширенную схему, должна быть разработана с учётом конкретного случая, учитывая специфику компонентов экосистемы, почвенно-климатических условий, используемых способов рекультивации и др. Стратегия развития биотестирования теснейшим образом связана с решением вопросов по оценке реальной опасности нефтяных загрязнений и обезвреживанию нефтебуровых отходов, относящихся к числу приоритетных.

Ключевые слова: биотестирование, фитотестирование, отходы нефтедобывающей промышленности, рекультивация, класс опасности, экотоксикология.

Bioassay as a method of integral assessment for recultivation of oil-contaminated ecosystems

© 2021. E. V. Morachevskaya¹ ORCID: 0000-0002-7176-4767,

L. P. Voronina^{1, 2} ORCID: 0000-0003-1917-7490,

¹Lomonosov Moscow State University,

1–12, Leninskie Gory, Moscow, Russia, 119991,

²Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia,

10–1, Pogodinskaya St., Moscow, Russia, 119121,

e-mail: Luydmila.voronina@gmail.com

Keywords: bioassay, phytoassay, drilling slurries, reclamation, hazard class.

По официальной статистике Министерства энергетики России уровень добычи нефти за 2020 год составил 512,8 млн т. В 2019 г. на предприятиях топливно-энергетического комплекса произошло более 17 тыс. аварий с разливами нефти. Из них 10,5 тыс. случаев на нефтепроводах [1]. К основным

источникам загрязнения нефтью и нефтепродуктами относятся: утечки нефти при транспортировке, врезке; нефтебуровые шламы (НБШ), несвоевременная ликвидация шламовых амбаров и др. В представленном обзоре биотестирование рассматривается преимущественно в отношении наземных почвенных экосистем. Природные системы обладают способностью восстанавливаться даже при высоком уровне загрязнения. Процесс самоочищения природных объектов происходит довольно длительно, особенно в экстремальных климатических условиях [2, 3]. При этом особая защитная функция отводится почвам, в связи с чем применение методов биотестирования для оценки интегральной токсичности почвенных образцов является актуальным вопросом.

Мониторинг и контроль процесса рекультивации важен на всех этапах, а оценка состояния нефтезагрязнённых почв возможна при помощи биологических методов. При проведении биотестирования необходимо учитывать специфические методические нюансы, которые не всегда чётко прописаны в методических рекомендациях.

Например, гибель дафний в водной вытяжке из отхода, установленная за 48 ч, может не превышать 10%, но морфологическое состояние тест-объекта свидетельствует о значительном негативном воздействии: особи дафний имеют меньший размер, чем в контрольном тесте, их трофическая активность минимальна, и только при более длительной экспозиции (96 ч) приводит к гибели тест-организма, свидетельствуя о недостаточно объективной характеристике опасности отхода лишь по летальности [4].

В систему методов биотестирования для оценки эффективности приемов рекультивации почвы, загрязнённой нефтью и отходами нефтяной промышленности, прежде всего, входит набор биотестов, рекомендованных нормативным документом по определению класса опасности отходов (СанПиН 2.1.7.1386-03), но даже для них существуют нюансы, которые связаны со спецификой поллютанта, на которые следует обращать внимание.

Токсичность почв, определяемая методом фитотестирования, непосредственно в почве выше, чем токсичность водных вытяжек из этих же почв [5]. Разница результатов при загрязнении почв токсикантами малорастворимыми в воде (нефть и продукты ее трансформации) велика. При выборе оптимальных показателей для установления токсического эффекта существуют разногласия, вместе с тем накоплено достаточно экспериментального материала для их научного обоснования.

Целью обзора является обобщение имеющихся экспериментальных данных относительно эффективности использования методов биотестирования для установления токсичности в объектах окружающей среды при рекультивации загрязнённых нефтью компонентов экосистем.

Объекты и методы исследования

В данном обзоре использованы публикации, как отечественных, так и зарубежных авторов, а также информация, опубликованная на интернет-ресурсах (74 источник). Материалы охватывают временной период с 2000 по 2021 гг. Релевантность в информационном поиске получена при обращении к следующим научным поисковым системам: научная электронная библиотека eLIBRARY.RU, Академия Google (Google scholar), Scopus/ScienceDirect. Анализировали работы, отвечающие поисковым запросам: «биотестирование», «фитотестирование», «нефтебуровые отходы», «рекультивация нефтезагрязнённых земель», «класс опасности нефтяных отходов» (на русском языке). На зарубежных научных электронных ресурсах: Elsevier, Springer, ResearchGate, PubMed, Mendeley проводился поиск по ключевым словам и словосочетаниям: «bioassay», «drilling slurries», «reclamation», «pollution of oil products», «bioassay of oil-contaminated soils».

Химические компоненты нефти, влияющие на токсичность нефтезагрязнённых образцов

Нефтяные углеводороды, представленные стойкими органическими загрязнителями (СОЗ) и полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ), оказывают серьёзное воздействие на окружающую среду, загрязняя почву и воду, и создают опасность как для человека, так и в целом для компонентов экосистемы [6–9]. Из всего перечня ПАУ, как правило, нормируется только бенз[а]пирен, который является канцерогеном и относится к 1-му классу опасности. Однако, данный ПАУ обладает слабой растворимостью, а химически более активные и легко растворимые ПАУ не учитываются в российских нормативных документах [10]. Таким образом, токсичность нефтепродуктов определяется углеводородным составом, а токсичность смеси углеводородов выше, чем её отдельных компонентов [11]. Эти положения с одной стороны, заставляют развивать методы биотестирования, позволяющие определять возможные токсические эффекты [12] и, с другой стороны, прибегать к использованию приёмов пробоподготовки образцов к биотестированию с возможным предварительным растворением присутствующих органических соединений, тем самым, увеличивая показатель токсичности образца [13]. Так, например, метанол позволяет десорбировать менее растворимые или связанные загрязнители и, таким образом, может помочь установить токсичность, обусловленную слабо растворимыми органическими загрязнителями. В ряде случаев прибегают к применению катализаторов, способных повысить деструкцию слабо растворимых загрязнителей в водной вытяжке и не оказывающих негативного действия на результаты биотестирования [14].

Алканы, нафтены и ароматические компоненты могут перерабатываться микроорганизмами, а более лёгкие фракции этих соединений могут полностью расщепляться. Циклические углеводороды представляют собой более тяжёлые

фракции, которые устойчивы к бактериальному воздействию [15]. В связи с данными положениями по характеристике углеводородного загрязнения расширяется батарея биотестов, широко используются бактериальные тест-системы [16.] Кроме углеводородного загрязнения, при аварийных разливах нефти в почву часто поступают и легкорастворимые минеральные соли, присутствующие в сырой нефти в составе пластовых вод и также способные оказывать негативное воздействие на биогеоценозы [17].

Исследование состава органических соединений, содержащихся в нефтешламах, необходимое для определения токсичности этих образцов [18, 19], может быть выполнено на завершающем этапе, по результатам биотестирования, которое существенно сократит временные и финансовые затраты на химический анализ углеводородов.

Биотестирование как этап контроля эффективности рекультивации нефтезагрязнённых территорий

При рекультивации почв применяют следующие методы: механические, физико-химические, агротехнические, микробиологические, фитомелиоративные [20]. Цель рекультивации заключается в снижении содержания нефти в почве и воде до безопасных концентраций. Рекультивация земель должна проводиться согласно ГОСТ Р 57447–2017 в два основных этапа: технический и биологический [21]. Решение о рекультивации принимается на основании региональных и муниципальных предельных нормативов допустимого остаточного содержания нефти и продуктов её трансформации в почвах (ДОСНП). Данный показатель выступает как главный и основополагающий критерий после проведения рекультивационных и иных восстановительных работ [22]. Определение массовой доли нефтепродуктов в почвах согласно ПНД Ф 16.1:2.2.22–98 актуально, но целесообразность обращения к этому показателю оправдана при условии отведения основных

объёмов жидкой фракции нефтепродуктов, в случаях контроля эффективности выполнения рекультивации, определения дальнейших этапов утилизации загрязнённых образцов или пути эксплуатации загрязнённого объекта. При количественной оценке уровня нефтяного загрязнения широко используется флуориметрический метод с использованием анализатора жидкости «Флюорат-02» (ПНД Ф 16.1:2.21-98), а также методы газовой и газожидкостной хроматографии [23].

Ещё одна распространённая и перспективная технология рекультивации – биоремедиация. Это процесс, в котором бактерии, грибы и растения разлагают, трансформируют и способствуют удалению загрязнителей, сохраняя целостность экосистемы. Увеличение микробной плотности с помощью внесения органических веществ (компост, ил сточных вод и т. д.), способствует ускорению разложения загрязняющих веществ. Биоремедиация может осуществляться с помощью биостимуляции аборигенной микрофлоры или путём внесения специализированных микробных препаратов, созданных для очистки загрязнённых экосистем [24, 25]. Препараты, мелиоранты и материалы, применяемые в данной технологии, предварительно оцениваются в лабораторных условиях с использованием биотест-культур [26].

Нормирование загрязняющих веществ и внедрение экосистемного подхода, подразумевающего использование системы биотестирования при рекультивации загрязнённых нефтью экосистем, позволяют реально оценить пагубные воздействия на компоненты экосистемы, обусловленные наличием комплекса загрязняющих химических веществ, которые не определяются посредством химических анализов. Не все химически опасные соединения могут быть известны, а во время биогеохимических процессов могут образовываться их метаболиты [27]. В настоящее время биотестирование широко применяется для контроля природных сред при обосновании допустимого воздействия загрязняющих веществ [28–30]. Определение степени обезвреживания загрязнённых объектов заключается в поэтапном переводе уровня опасности из более высокого класса в более низкий [31]. Очевидно, для

определения в динамике уровня опасности нефтяного загрязнения компонентов экосистемы можно использовать биологические тесты, включенные в схему экспериментального определения класса опасности отходов (Методы биотестирования на гидробионтах и в фитотесте) (СП 2.1.7.1386-03.). Важным условием в определении класса опасности является точное следование протоколу методики с целью безошибочного определения токсичности образца. Согласно Федеральному классификационному каталогу отходов [32], большинство наименований буровых шламов, образующихся при добыче нефти, относятся к четвертому классу опасности для окружающей среды, а отходы производства нефтепродуктов – к третьему классу. Эти парадоксальные сведения по отдельным компонентам никак не согласуются с серьёзными экологическими нарушениями, что лишний раз подчёркивает актуальность выбора дополнительных методов биотестирования и пересмотра критериев для адекватной оценки с их помощью состояния загрязнённой окружающей среды (вода, почва). Представляется возможным использование сокращённой и расширенной схемы биотестирования для интегральной оценки рекультивации компонентов экосистемы. Сокращённая схема имеет строго лимитированное небольшое количество тестов (2–3 биотеста). Учитывая специфику нефтяного загрязнения (комплексный углеводородный состав, возможное присутствие солевых растворов и других поллютантов), важно чтобы этот лимитированный набор тестов был выполнен с учетом необходимой пробоподготовки и/или методического подхода: в водной среде, используя водную вытяжку – элюатный подход; в твёрдом образце, например, нефтезагрязнённой почве – контактный подход.

Целесообразность сочетания элюатного и контактного биотестирования

Важно учитывать, что биотестирование в водной вытяжке может сопровождаться существенно заниженными результатами по определению

степени токсичности, в то время как субстратное биотестирование позволяет более полно оценить уровень загрязнения. Основное преимущество прямого контакта заключается в том, что происходит взаимодействие между почвой и подопытными тест-организмами, в процессе чего повышается биодоступность загрязняющего вещества. Именно с использованием контактного подхода в биотестировании увеличивается вероятность учёта присутствующих в нефтяных шламах тяжёлых металлов (ТМ), которые увеличивают их токсичность. В связи с чем сравнительный анализ фитотоксичности, установленный с использованием разных подходов (элюатного и аппликатного) существенно различается [33].

В работе [34] представлен сравнительный анализ чувствительности двух подходов (контактного и элюатного) при определении токсичности избыточного активного ила биологической очистки нефтесодержащих сточных вод. Биотестирование с использованием семян редиса (*Raphanes sativus* L.) и кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) показало, что водные экстракты ила в концентрациях 100, 50 и 25% оказались нетоксичными. В ходе тестирования контактным методом, непосредственно на иле, наблюдали подавление всхожести семян (100% фитотоксичность).

Контактные тесты в отличие от элюатных позволяют повысить биодоступность поллютантов и, таким образом, увеличить показатель токсичности. Использование биотестирования субстрата, которое обеспечивает прямой контакт тестируемого организма с исследуемым образцом, позволяет установить уровень кумулятивного воздействия от присутствующих в твёрдых субстратах загрязнителей [35, 36].

Таким образом, система биотестов для определения почвенной токсичности должна включать как элюатный, так и контактный методы. Их совокупность позволит дать объективную оценку загрязнения почвы прочно закреплёнными или малорастворимыми токсикантами, создающими хроническую токсичность.

Использование гидробионтов для оценки токсичности загрязнённых нефтью объектов

Суть метода биотестирования заключается в определении действия токсикантов на специально выбранные тест-организмы с установленной в стандартных условиях чувствительностью с регистрацией различных поведенческих, физиологических или биохимических показателей (тест-реакции) [37]. Хотя биотестами не удаётся идентифицировать специфические токсичные соединения, комбинация различных используемых тест-систем является показательной (но не всегда достаточной) для определения экотоксичности почвы, как загрязнённой нефтяными углеводородами, так и подвергшейся рекультивации [13].

Имеются данные, что метод биотестирования позволяет зафиксировать токсический эффект водных фильтратов нефтезагрязнённого торфа даже в тех случаях, когда инструментальными методами (ИК-спектрофотометрия) содержание нефти не обнаруживается [38].

В тех случаях, когда существует опасность попадания нефтесодержащих продуктов в водоёмы, оправдано использование в биотестировании гидробионтов. Причем необходимо учитывать, что наряду с риском миграции поллютантов в грунтовые воды, может происходить и латеральный смыв в водные объекты.

Одной из самых распространённых тест-культур, которая используется в экотоксикологических исследованиях, является *Daphnia magna* Straus. Она является чувствительным тест-организмом, чутко реагирует на наличие в воде нефтепродуктов различных фракций и массовых концентраций [39–41]. В опытах [42] тест-отклик наблюдался в диапазоне концентраций нефтепродуктов от 0,012 до 200 мг/дм³. Максимальное воздействие на *D. magna* оказали наиболее тяжёлые масляные фракции нефтепродуктов. 100% реакция на воздействие токсиканта (всплытие на поверхность, вращение на поверхности на боку, судороги, нарушение дыхательных функций) в течение первого часа с

момента постановки опыта наблюдалась при концентрации керосина – 20 мг/дм³, нефтесодержащего отхода – 0,45 мг/дм³. Биотестирование бурового шлама и бурового раствора с использованием дафний показало, что оба токсиканта в диапазоне концентраций 1,0–2,0 г/л токсичны, и лишь содержание 0,5 г/л в воде не оказывало негативного действия на жизнедеятельность рачков – они оставались активными, положительно реагировали на свет и совершали вертикальные миграции. Увеличение экспозиции до 25 сут (хронический эксперимент) усилило негативное действие бурового шлама на дафний, а при максимальной концентрации на 10 сут погибли все особи. К концу эксперимента гибель дафний при концентрации 1,0 и 0,5 г/л составила 50 и 10% соответственно [43].

Гибель 50% дафний наблюдалась при концентрации 0,25 мл/л топочного мазута, 1,3 мл/л дизельного топлива и 5,5 мл/л авиабензина. Нефть характеризовалась достаточно высокой токсичностью для ветвистоусых рачков, гибель 50% тест-объектов фиксировалась при концентрации 0,86 мл/л. Минимальными недействующими являлись $6,1 \cdot 10^{-3}$ мл/л мазута, $3,7 \cdot 10^{-2}$ мл/л дизельного топлива, 0,53 мл/л авиабензина и $1,8 \cdot 10^{-3}$ мл/л нефти [44].

В эксперименте с изъятием нефтезагрязнённого грунта из озёр наблюдалось улучшение экологического состояния водоёмов, что отразилось на жизнедеятельности *D. magna*. После очистки озера не наблюдалось ни острого, ни хронического летального действия на *D. magna*, выживаемость рачков в остром опыте (4 сут) была 100%, в хроническом (30 сут) – незначительно (на 10%) ниже контроля или на уровне контроля [45].

По результатам биотестирования на тест-культуре *D. magna* установлено, что фактический уровень безвредных концентраций (БК10) растворённых и диспергированных в природной воде нефтепродуктов в точках отбора в пределах пятна нефтяного загрязнения на протоке Серебряная Воложка (Астрахань, Россия), в 1,4–1,5 раза ниже, чем ПДК по нефтепродуктам для водоёмов рыбохозяйственного значения [46].

Во всех материалах исследований с данной тест-культурой большое значение отводится длительности эксперимента, т. е. в остром или хроническом эксперименте установлены достоверные отклонения от контроля по выживаемости культуры.

Помимо летальности водных организмов, можно оценивать такие показатели, как плодовитость, темп роста, изменение линейных размеров и др.

Другой культурой, используемой в экспериментальном определении класса опасности отходов и для биотестирования образцов, загрязнённых нефтью и нефтепродуктами, является *Paramecium caudatum* Ehrenberg.

В серии опытов по воздействию сырой нефти Лугинецкого месторождения, численность пресноводных инфузорий вида *P. caudatum* определяли в лабораторных условиях в течение 18 дней до установления 50% гибели особей [47]. Данные изменения численности инфузорий показывают, что все использованные в эксперименте концентрации сырой нефти (50, 100 и 200 мг/л) вызывают рост численности парамеций в определённые сутки наблюдения и сокращают их количество. Для инфузорий при концентрации 50 мг/л смертность 50% особей установлена на 18 сут наблюдений, при концентрации 75 мг/л – на 12 сут, при внесении 100 мг/л и 200 мг/л нефти – на 6 и 5 сут соответственно. Благодаря высокой чувствительности, данной тест-культуры и возможности автоматической фиксации гибели *P. caudatum* [48], существенно повышается воспроизводимость результатов, что делает данный метод весьма перспективным.

Другим показателем токсичности при использовании метода биотестирования с культурой парамеций может выступать реакция хемотаксиса, основанная на способности инфузорий перемещаться в направлении или от источника химического воздействия. Интактных парамеций помещали в чистую каплю воды, соединённую со второй каплей суспензии нефтезагрязнённых почв. На 1 сут контрольные особи практически равномерно распределились в обеих каплях воды, в дальнейшем они концентрировались в одной из капель чистой воды [49].

Проблема вторичного загрязнения часто возникает после рекультивации земель нефтеразливов. Полученные результаты вторичного загрязнения показали, что адсорбционное консервирование нефти в грунте увеличивает её токсичность, а это губительно сказывается на живых организмах и на состоянии почвы в целом. Изменение выживаемости инфузорий *P. caudatum* изучалось при разных сроках хранения проб вытяжек из почв разного срока нефтезагрязнения. Установлено, что при длительной консервации нефтезагрязнённых грунтов (до 6 мес.) выживаемость инфузорий снижалась, а токсичность водных вытяжек возрастала [50].

Водные экстракты нефтезагрязнённых почв, содержащие 300–10000 мг/л нефтепродуктов, замедляли процессы размножения и вызывали гибель части наименее устойчивых особей популяции простейших, однако на 16 сут скорость деления клеток культуры увеличилась, что сопровождалось интенсивным приростом численности простейших (на 58–128% по сравнению с разведённой питательной средой). Таким образом, можно говорить о проявлении адаптаций резистентных особей [49].

Известно, что одной из закономерностей токсического действия нефтяного загрязнения на простейших является чередование угнетения и стимуляции их биологических функций (численность, хемотаксис, фагоцитоз). Стимулирующее влияние потенциально токсического вещества обеспечивается за счёт мобилизации резервных ресурсов организма, и если негативное влияние не превышает этого адаптивного ресурса, то стимуляция может сохраняться на протяжении длительного времени [51].

Тест с использованием представителя простейших – ресничных инфузорий тетрахимен (*Tetrahymena pyriformis* Ehrenberg) является в настоящее время распространённым и общепринятым, удобным в культивировании и процессе тестирования. Благодаря тому, что инфузория является одновременно и клеткой, и организмом, можно оценивать воздействие токсикантов как на клеточном, так и на наиболее высоком уровне организации [53, 53].

Таким образом, среди рассмотренных тестов с использованием водных организмов, особенно в случаях, связанных с нефтяным загрязнением и потенциально-возможным миграционным загрязнением вод, культуры *D. magna*, *P. caudatum*, *T. pyriformis* могут быть рекомендованы для оценки токсичности на всех этапах работ по рекультивации нефтезагрязнённых территорий.

Использование высших растений для оценки токсичности загрязнённых нефтью объектов

Одним из доступных методов биотестирования, загрязнённых поллютантами почв, является фитотестирование – диагностика с помощью растительных организмов, которая проводится в контролируемых условиях на тест-растениях по известным и поддающимся учёту характеристикам [54].

Научный интерес представляют исследования фитотоксичности нефтезагрязнённых почв с использованием разных видов растений на разных почвах [55]. Фитотестирование позволяет оценить суммарное загрязнение, т. е. не только нефтяное, но и от других побочных веществ, загрязняющими почву в ходе добычи нефти [56].

В работе [57] предложен экспресс-фитотест по измерению всхожести семян клевера белого (*Trifolium repens* L.). Фитотест разработан на примере серой лесной почвы, загрязнённой дизельным топливом или медью (II), и апробирован в ходе многолетних экспериментов по адсорбционной биоремедиации нефтезагрязнённых почв. Чувствительность предложенного метода достаточно высока, так как он может зафиксировать 10% увеличение фитотоксичности нефтезагрязнённой почвы при концентрации общего количества нефтяных углеводородов 1–5 г/кг, что близко к их ПДК (1 г/кг) для рекультивированных техногенных почв.

Учитывая, что всхожесть семян растений в нефтезагрязнённой почве определяется, в основном, доступностью для них воды и кислорода, а не

токсичностью нефти [58], в качестве тест-культуры используются растения, которые обладают чувствительностью к данному загрязнению. Для нефтепродуктов и ПАУ это могут быть семена салата (*Lactuca sativa* L.), сорго (*Sorghum saccharatum* L.) и горчицы (*Sinapis alba* L.) [37]. Было обнаружено, что скорость снижения содержания нефтяных углеводородов на последующих этапах процесса восстановления коррелирует с уровнем фитотоксичности, в связи с чем, данные культуры можно использовать для оценки токсичности на всех этапах биоремедиации почвы, загрязнённой дизельным топливом [59]. Имеются сведения о хорошем отклике семян яровой пшеницы на токсическое действие нефтезагрязнителей в почве [29, 60].

Влияние на растения нефти при загрязнении почвы можно разделить на прямое – непосредственное токсическое (стимулирующее) действие углеводов и других веществ, содержащихся в нефти, и опосредованное, при котором возможны изменения свойств почвы и трансформация почвенного микробного сообщества [61]. Поэтому для оценки токсичности образцов с нефтяным загрязнением целесообразно в схему фитотестирования включать, помимо лабораторных экспрессных методов, и длительные хронические (вегетационные) опыты.

В длительных экспериментах при определении степени воздействия загрязнения на растения отражается совокупность факторов, влияющих на биодоступность поллютантов. Например, с ростом концентрации нефти также, как и в почве без растений, в ризосфере и на поверхности корней растений (ризоплане) происходит увеличение численности сапротрофных микромицетов, однако в зоне ризосферы и ризопланы это повышение более значительно [62, 63].

Расхождения в результатах по оценке токсичности нефти методом фитотестирования могут быть продиктованы отсутствием единого контроля, т. е. изменения связаны с активностью субстрата, в который попадает данный загрязнитель. Контролем могут выступать как стандартные почвы, предусмотренные в ряде нормативных документов по биотестированию,

состоящие из коалинита, песка и верхового торфа, так и субстрат с референтными добавками питательных элементов. Доказано, что более приемлемо использовать почву с бедными удобрительными питательными характеристиками (ГОСТ Р ИСО 22030-2009).

Критериями оценки должны выступать как минимум два показателя: всхожесть семян и рост растений на ювенильной стадии. Прорастание зависит от внутренней энергии семени растения. Методы фитотестирования, основанные на реакции растений на негативное воздействие загрязняющих веществ, способны давать достоверную информацию о качестве почв, обладают высокой чувствительностью, универсальностью, интегральностью и простотой [54, 64].

В работе [65] представлены данные по фитотестированию нефтезагрязнённого почвогрунта методом «водной вытяжки» и «почвенных пластин». Фитотестирование, проведённое с использованием тест культуры кресс-салата (*Lepidium sativum* L.), позволило установить закономерности в изменении уровня загрязнения и состояния нефтезагрязнённого субстрата в ходе рекультивационных работ с применением сорбентов. В почвогрунт вносили нефть в концентрациях 1, 5 и 10% от его массы. В течение всего периода исследования в вариантах с применением сорбентов наблюдалась тенденция увеличения биометрических параметров проростков кресс-салата. Наглядным примером эффективного использования фитотестирования в ходе восстановления сильно загрязнённых нефтью почв являются результаты исследований образцов, отобранных из лагун-отстойников при использовании шести видов высших растений: ржи (*Secale cereale* L.), салата (*Lactuca sativa* L.), кукурузы (*Zea mays* L.), кресс-салата (*Lepidium sativum* L.), пшеницы (*Triticum vulgare* L.) и капусты (*Brassica oleracea* L.) [13]. В экотоксикологическом анализе исследовались два тест-параметра: прорастание семян и длина корней. Результаты по фитотестированию сравнивались с результатами на острую токсичность по другим биотестам: с люминесцентными бактериями *Vibrio fischeri*, ресничными простейшими

Spirostomum ambiguum Ehrenberg, с новорождёнными пресноводными ракообразными остракодами *Heterocypris incongruens* Ramdohr. Авторы наряду с сопоставимостью результатов подчеркивают, что во время биогеохимических процессов в почве могут образовываться более токсичные метаболиты или соединения.

Анализ литературных данных подтверждает, что фитотестирование может успешно применяться для обнаружения нефтяного загрязнения, а также при оценке и контроле процессов обезвреживания токсикантов и ремедиации нефтезагрязнённых почв. При этом важно использовать тест-культуры, которые наиболее чувствительны для данного типа загрязнения.

Использование дополнительных анализов для оценки токсичности загрязнённых нефтью объектов

Растёт интерес к включению в ходе ремедиации нескольких тестов на токсичность одновременно (батареей разных анализов), для более полной экотоксикологической оценки загрязнённых почв.

Такой поиск выполнен в экспериментальной работе по скринингу токсической опасности нефтезагрязнённых донных отложений, в которой авторы использовали элюатный тест на *P. caudatum* совместно с контактным тестом на ракообразных *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg и *Hyalella azteca* Saussure [66]. Группой авторов разработана тест-система, состоящая из микробного штамма *Pseudomonas putida* [67]. В другой работе [68] предлагается использовать в качестве тест-культуры грамположительную бактерию *Bacillus pumilus* KM-21 для определения токсичности ТМ и возможности этого метода для оценки токсичности нефтяных отходов. Авторы работы [69] предлагают использовать для экотоксикологической оценки три тест-объекта: гидробионты (*D. magna*), почвенные микроорганизмы (почвенное дыхание) и высшие растения (*Avena sativa*). В мировой практике широко используется интегральная оценка, рассчитанная с учётом результатов комплекса

используемых методов – триадный подход (TRIAD approach) [70]. Данный подход наряду с биотестированием, которое отражает экотоксикологическую характеристику, включает методы химического анализа и биоиндикационные параметры с учетом биологической активности и реакции сообществ микроорганизмов.

Ряд исследователей прибегает к характеристике дополнительных тест-систем, включающих комплекс почвенных ферментов [8]. Присутствие этих методов вполне оправдано, так как биологическая активность почвы как «приёмник» токсиканта отражает способность почвы к трансформации поллютанта.

Исследования ряда авторов [71, 72] свидетельствуют о перспективности применения биотестирования загрязнённых нефтью и нефтепродуктами почвы и водных объектах не только с помощью высших растений, но и с помощью биоллюминесцентного теста на фотобактериях. Использование данных методов, определяющих редуцирующую активность микроорганизмов в совокупности с ростовыми тестами на бактериях и микроводорослях, отражает загрязнение воды и почвы нефтепродуктами. Также сообщается о чувствительности контактных и элюатных тестов с использованием микробных тест-организмов *V. fischeri* (тест ингибирования биоллюминесценции) и *Azomonas agilis* Beijerinck (тест активности дегридрогеназы) [73].

Среди всех потенциальных индикаторов, которые можно было бы использовать для оценки эффективности методов биоремедиации, можно отметить активность ферментов почвы, содержание малонового альдегида, активность супероксиддисмутазы и люминесценцию *Photobacterium phosphoreum* [27].

Токсичность, установленная в тестах, базирующихся на использовании прямого контакта с образцом (аппликатные способы тестирования), более тесно коррелирует с результатами физико-химических анализов. В настоящее время именно «тесты прямого контакта» с почвой, например, с дождевыми червями *Eisenia foetida* Michaelsen, стандартный тест ГОСТ 33036–2014, в которых

биоиндикаторы находятся в тесном контакте с токсичными веществами, адсорбированными на частицах почвы, являются достаточно перспективными. Загрязнение почвы нефтью оказывает длительное отрицательное действие на почвенных животных, вызывая почти полную их элиминацию в облигатной зоне загрязнения и резкое снижение численности даже при слабом загрязнении. Токсическое действие нефти на дождевых червей определяется не только интенсивностью загрязнения, но и морфо-экологическими особенностями отдельных видов и их принадлежностью к разным природно-климатическим зонам [74].

Биотестирование водных организмов и высших растений для оценки нефтяного загрязнения – хорошо изученные, но не единственные методы. Использование в качестве тест-организмов бактерий и ферментов активно изучается в настоящее время благодаря тому, что эти тест-организмы обладают высокой чувствительностью к исследуемым загрязнителям и хорошо растут в лабораторных условиях. Эти данные могут быть использованы для создания обязательных методик для биотестирования нефтезагрязнённых объектов и включены в систему биотестов, в составе которой важно присутствие представителей всех основных царств живого: бактерий, грибов, растений и животных.

Заключение

Несмотря на то, что не существует универсальной тест-системы для определения всех существующих токсикантов, биотестирование как способ интегральной оценки успешно применяется в качестве инструмента мониторинга окружающей среды. Биотестирование имеет хороший потенциал для оценки эффективности технологий по очистке и восстановлению нефтезагрязнённых компонентов экосистемы, которое целесообразно выполнять в динамике.

Принимая во внимание слабую биодоступность загрязнителей (гидрофобные органические токсиканты), целесообразно использовать элюатный и контактный подходы биотестирования как дополняющие друг друга. Для повышения точности результатов биотестирования в ходе определения токсичности гетерогенных нефтесодержащих компонентов в комплексе с другими токсикантами следует рассмотреть возможность использования пробоподготовки реагентов для растворения/выщелачивания слаборастворимых органических соединений.

Система биотестирования может быть представлена сокращённой (базовый вариант) и расширенной схемами. Для выбора батареи биотестов, используемых в сокращённой схеме, можно предложить методы с использованием гидробионтов и растений, которые рекомендуются в природоохранном и гигиеническом законодательстве. Гидробионты *Daphnia magna* Straus или *Paramecium caudatum* Ehrenberg (*Tetrahymena pyriformis* – рассматривается как альтернативная тест-культура) являются чувствительными тест-организмами и способны диагностировать как острую, так и хроническую токсичность водных вытяжек нефтезагрязнённых объектов. Высшие растения *Lactuca sativa* L., *Sorghum saccharatum* L., *Avena sativa* L. и *Sinapis alba* L. широко апробированы, используются в качестве тест-культуры для фитотестирования нефтезагрязнённых почв. Данные методы биотестирования соответствуют ГОСТ и методическим рекомендациям (МР), имеют чёткий протокол исполнения и применяются для оценки эффективности приёмов рекультивации.

Расширенная схема исследования проводится с учётом специфики загрязнённых объектов, рекультивационных мероприятий и по результатам, полученным в сокращённой схеме. Расширенная схема охватывает широкий спектр тестируемых организмов и уровней их реакции: высшие растения, почвенная биота, простейшие организмы, гидробионты, микроорганизмы, люминесцентные бактериальные тесты, биохимические ферментативные методы и др. Выбор комплекса чувствительных и разных по физиологическим

характеристикам тест-культур, определение информативных тест-показателей, выбор обладающих высокой воспроизводимостью методов, суммарный подход к результативной оценке, обработка результатов, автоматизация методов – необходимые условия работы системы биотестирования для оценки эффективности рекультивационных мер.

Химическую количественную оценку присутствующих опасных загрязнителей целесообразно выполнять по предварительно полученным результатам, установленным системой биотестирования, однако, это требует разработки индивидуального подхода.

Для разработки единой стратегии по классификации нефтяных загрязнителей и определения их реальной опасности научным учреждениям необходимо установить связь с регулирующими органами, которые занимаются предупреждением экологических опасностей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-14-50312.

Acknowledgments: The reported study was funded by RFBR, project number 20-14-50312.

References

1. Ministry of Energy of the Russian Federation [Internet resource] <https://minenergo.gov.ru/node/910> (Accessed: 16.07.2021) (in Russian).
2. Pushkareva M.V., Mai I.V., Seredin V.V., Leybovich L.O., Chirkova A.A., Vekovshinina S.A. Environmental assessment of the surrounding area and population health state in the oil production areas in Perm region // Environmental protection in oil and gas complex. 2013. No. 2. P. 40–45 (in Russian).
3. Gamm T.A., Shabanova S.V., Gamm A.A., Sagitov R.F., Azhikenov N.S., Arstanaliev E.U., Tulegenova O.Sh. Stages of drilling waste disposal technology // Young Scientist. 2016. No. 9.1 (113.1). P. 25–27 [Internet resource] URL: <https://moluch.ru/archive/113/29047/> (Accessed: 16.07.2021) (in Russian).

4. Olkova A.S. Properties and problems of biotesting of aqueous media using certified methods // *Voda: khimiya i ekologiya*. 2014. No. 10. P. 87–94 (in Russian).
5. Bakina L.G., Bardina T.V., Mayachkina N.V. Methodic approaches of phytoassay of technogenically polluted soils // *Environmental problems of the northern regions and ways to solve them: Materialy Mezhdunarodnoy konferentsii*. 2004. Part. 1. P. 167–169 (in Russian).
6. Sammarco P.W., Kolian S.R., Warby R.A.F., Bouldin J.L., Subra W.A., Porter S.A. Concentrations in human blood of petroleum hydrocarbons associated with the BP/Deepwater Horizon oil spill, Gulf of Mexico // *Arch. Toxicol.* 2016. V. 90. P. 829–837. doi: 10.1007/s00204-015-1526-5
7. Hentati O., Lachhab R., Ayadi M., Ksibi M. Toxicity assessment for petroleum-contaminated soil using terrestrial invertebrates and plant bioassays // *Environ. Monit. Assess.* 2013. V. 185. P. 2989–2998. doi: 10.1007/s10661-012-2766-y
8. Macci C., Doni S., Peruzzi E., Bardela S., Filippis G., Ceccanti B., Masciandaro G. A real-scale soil phytoremediation // *Biodegradation*. 2013. V. 24. P. 521–538. doi: 10.1007/s10532-012-9608-z
9. Gennadiev A.N., Pikovskii Yu.I. The map of soil tolerance toward pollution with oil products and polycyclicaromatic hydrocarbons: methodological aspects // *Eurasian Soil Science*. 2007. V. 40. No. 1. P. 70–81 (in Russian).
10. Khaustov A.P., Redina M.M. Geochemical markers based on concentration ratios of PAH in oils and oil-polluted areas // *Geochemistry International*. 2017. No. 1. P. 57–67 (in Russian).
11. Smolnikova V.V., Yemelyanov S.A., Dementyev M.S. Influence of oil hydrocarbons on the environment and ways of sanitation the petropolluted substrata // *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii*. 2009. V. 11. No. 1 (6). P. 1378–1380 (in Russian).
12. Daniela Morais Leme, Maria Aparecida Marin-Morales. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application // *Mutation Research*. 2009. V. 682. No. 1. P. 71–81. doi: 10.1016/j.mrrev.2009.06.002
13. Płaza G., Nalecz-Jawecki G., Ulfig K., Brigmon R.L. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation // *Chemosphere*. 2005. V. 59. No. 2. P. 289–296. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.11.049
14. Cheremnykh E. G., Tikhomirova N.A., Ignateva O.N. Biotesting of food supplements and milk products // *Molochnaya promyshlennost*. 2009. No. 10. P. 36–38 (in Russian).
15. Nazarko M.D., Shcherbakov V.G., Aleksandrova A.V. Prospects for the use of microorganisms for biodegradation of oil-contaminated soils // *Izvestiya VUZov. Pishchevaya tekhnologiya*. 2004. No. 4. P. 89–91 (in Russian).

16. Juvonen R., Martikainen E., Schultz E., Joutti A., Ahtiainen J., Lehtokari M. A battery of toxicity tests as indicators of decontamination in composting oily waste // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2000. V. 47. No. 2. P. 156–166. doi: 10.1006/eesa.2000.1943
17. Avetov N.A., Arzamazova A.V., Kinzhaev R.R., Trofimov S.Ya., Shishkonakova E.A. Methodic approaches to assessment of oil-polluted lands in middle Priobye region, West Siberia // *Problemy agrohimii i ekologii*. 2012. No. 3. P. 56–61 (In Russian).
18. Voronina L.P., Ponogaybo K.E. An approach to the choice of bioassay methods for soil research // *Agrochemistry*. 2021. No. 9. P. 77–81 (in Russian).
19. Zavgorodnyaya Yu.A., Bocharova E.A., Kol'tsov G.I. Determining the level of soils contamination by the method of automated rapid extraction in subcritical conditions // *Ecology and Industry of Russia*. 2012. No. 2. P. 30–33 (in Russian). doi: 10.18412/1816-0395-2012-2-30-33
20. Bobrenko E., Yugov Ya. Specific Aspects of Oil-Contaminated Land Reclamation at the Oil and Gas Field // *Elektronnyy nauchno-metodicheskiy zhurnal Omskogo GAU*. 2018. No. 3 (14). P. 1–13. [Internet resource] <http://e-journal.omgau.ru/images/issues/2018/3/00601.pdf> (Accessed: 16.07.2021) (in Russian).
21. Rogova N.S. Causes of the inefficient reclamation of oil-contaminated lands in Western Siberia // *Geoecology*. 2020. No. 1. P. 82–85 (in Russian).
22. Chuksin I.V. Problems of recultivation of oil-polluted lands // *Nauchno-prakticheskiy elektronnyy zhurnal Alley of science*. 2020. No. 6 (45). P. 176–181 (in Russian).
23. Kuznetsova T.O. Methods of assessment and control of oil pollution of soils education // *Science-production: Materialy Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii*. 2018. V. 2. P. 122–127 (in Russian).
24. Masciandaro G., Macci C., Peruzzi E., Ceccanti B., Doni S. Organic matter–microorganism–plant in soil bioremediation: a synergic approach // *Rev Environ Sci Biotechnol*. 2013. V. 12. P. 399–419. doi: 10.1007/s11157-013-9313-3
25. Leshchenko A.A., Pogorelsky I.P., Ashikhmina T.Ya., Lundovskikh I.A., Darmov I.V., Yanov S.N., Lazykin A.G., Shabalina M.R., Ustyuzhanin I.A., Sharov S.A., Rychkov G.M. Microbial biotechnology of soil remediation for sanitation and sustainable functioning of the technogenic ecosystem // *Theoretical and Applied Ecology*. 2017. No. 4. P. 54–65 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2017-4-054-065
26. Timanov A.S., Ashikhmina T.Ya., Leshchenko A.A., Pogorelskiy I.P., Sharov S.A., Teterin B.B., Lazykin A.G., Filimonova G.V., Ezhov A.V., Permyakov R.G. A biological product with an extended spectrum of biodegradative activity for soil reclamation of the chemical weapons destruction facility “Maradykovsky” // *Theoretical and Applied Ecology*. 2015. No. 3. P. 61–69 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2015-3-042-061-069

27. Shen W., Zhu N., Cui J., Wang H., Dang Z., Wu P., Luo Y., Shi C. Ecotoxicity monitoring and bioindicator screening of oil-contaminated soil during bioremediation // *Ecotoxicol Environ Saf.* 2016. V. 124. P. 120–128. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.10.005
28. Saterbak A., Toy R.J., Wong, D.C.L., McMain B.J., Williams M.P., Dorn P.B., Brzuzy L.P., Chai E.Y., Salanitro J.P. Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon-contaminated soils and application to ecological risk assessment // *Environ. Toxicol. Chem.* 1999. V. 18. P. 1591–1607.
29. Arzamazova A.V., Kinzhaev R.R., Trofimov S.Ya. Application of spring wheat in phytotesting of oil-polluted soils // *Problemy agrohimii i ekologii.* 2016. No. 2. P. 47–51 (in Russian).
30. Lisovitskaya O.V., Terekhova V.A. Phytoassay: basic approaches. Problems of the laboratory method and modern solutions // *Interactive journal of ecological soil science.* 2010. No. 1. Issue. 13. P. 1–8 (in Russian).
31. Pozdniakov S.A., Kesler K.E., Voronina L.P. The approach to studying and neutralization petroleum sludge as a part of utilization of sludge pits // *Wastes, the reasons for their formation and prospects for use: Sbornik nauchnykh trudov po materialam Mezhdunarodnoy nauchnoy ekologicheskoy konferentsii.* Krasnodar: Kubanskiy gosudarstvennyy agrarnyy universitet imeni I.T. Trubilina, 2019. P. 337–339 (in Russian).
32. Federal Classification Catalog of Waste. [Internet resource] <https://docs.cntd.ru/document/542600531> (Accessed: 03.05.2021) (in Russian).
33. Pukalchik M.A., Terekhova V.A., Karpukhin M.M., Vavilova V.M. Comparison of eluate and direct soil bioassay methods of soil assessment in the case of contamination with heavy metals // *Eurasian Soil Science.* 2019. No. 4. P. 507–514 (in Russian).
34. Nafikova L.F., Trubnikova L.I., Erokhina N.I., Bogdanova A.R. Phytotoxicity of the sludge of biological treatment of oily wastewater // *Aspirant.* 2017. No. 5. P. 88–92 (in Russian).
35. Boży M. Assessment of phytotoxicity of leachates from landfilled waste and dust from foundry // *Ecotoxicology.* 2020. V. 29. P. 429–443. doi: 10.1007/s10646-020-02197-1
36. Kapelkina L.P., Chugunova M.V., Bardina T.V., Malyshkina L.A. Bioassay of drilling slurries of oil fields // *Ekologicheskiiy vestnik Rossii.* 2013. No. 8. P. 25–29 (in Russian).
37. Terekhova V.A., Voronina L.P., Kiryushina A.P., Morachevskaya E.V., Kydralieva K.A. Standard algorithm for measuring phytoeffects. Moskva: Scientific Library of the Lomonosov Moscow State University, 2021. 58 p. (In Russian).
38. Kudryavtsev A.A., Mikhailova L.V., Rybina G.E., Gordeeva F.V., Tsulaiya A.M., Znamenzhikov A.N. Study of migration and degradation of oil in peat soil of upland bogs in

KHMAO under control of biotesting // *Sibirskiy Ekologicheskiy Zhurnal* (Siberian Journal of Ecology). 2012. No. 6. P. 761–768 (in Russian).

39. Borodulina T.S., Polonsky V.I., Vlasova E.S., Shashkova T.L., Grigoriev Yu.S. Effect of water pollution with oil on delayed fluorescence of *Chlorella vulgaris* Beiger Algae and survival probability for *Daphnia magna* Str. // *Sibirskiy Ekologicheskiy Zhurnal* (Siberian Journal of Ecology). 2011. No. 1. P. 107–111 (in Russian).

40. Sipulinov R.B., Karagaycheva Yu.V., Shilova N.A., Rogacheva S.M. Estimation the toxicity of oil production waste by biotesting methods // *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*. 2015. V. 17. No. 5 (2). P. 695–699 (in Russian).

41. Zakk E.E. Chemical and toxicological assessment of drilling waste // *Sbornik statey XII Mezhdunarodnogo nauchno-issledovatel'skogo konkursa*. 2021. P. 255–258 (in Russian).

42. Fomicheva G.P., Kamakin A.M., Fyodorova I.V. Determining the degree of toxicity of natural surface water polluted with oil products by methods numerical chemical analysis and biotesting // *Vestnik AGTU. Ser.: Rybnoe khozyaystvo*. 2016. No. 4. P. 42–49 (in Russian).

43. Kryuchkov V.N., Kurapov A.A. Assessment of the impact of drilling waste on hydrobionts // *Vestnik AGTU. Ser.: Rybnoe khozyaystvo*. 2012. No. 1. P. 60–65 (in Russian).

44. Lozovoy D.V., Dagurov A.V., Potapov D.S., Stom D.I. Estimation of toxicity of mixtures of non-ionogenic surface-active substances and oil products for *Daphnia* // *Byulleten VSNTs SO RAMN*. 2005. No. 6 (44). P. 146–149 (in Russian).

45. Belskaya M.A., Rybina G.E. Assessment of the toxicity of bottom soils of some lakes of the Nizhneartovskiy district using *Daphnia magna* Straus // *Sbornik materialov XLIX Mezhdunarodnoy studencheskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii*. 2015. Part I. P. 155–158 (in Russian).

46. Fomicheva G.P., Nasibulina B.M., Biryukova M.G. Crustaceans of the Volga delta in emergency conditions of oil spills // *Vestnik AGTU. Ser.: Rybnoe khozyaystvo*. 2020. No. 1. P. 27–34 (in Russian).

47. Izeneva S.V. Investigation of oil pollution impacts for freshwater infusions *Paramecium caudatum* // *Sovremennye issledovaniya*. 2018. No. 5 (9). P. 251–253 (in Russian).

48. Mai T.L., Voronina L.P., Cheremnikh E.G. Bioassay of soils on rice fields in Vietnam // *Moscow University Bulletin. Series 17. Soil science*. 2014. No. 3. P. 28–35 (in Russian).

49. Gordeeva F.V., Mikhaylova L.V., Petukhova G.A. Vital parameters *Paramecium Caudatum* in water extracts of oil polluted soil // *Tyumen State University Herald*. 2009. No. 3. P. 232–237 (in Russian).

50. Artemenko S., Vanyuhova A. Biotesting secondary petropollutid adsorbed by soil // *Tyumen State University Herald*. 2017. V. 3. No. 4. P. 66–73 (in Russian).

51. Gordeeva F.V. Results of biotesting of bottom deposits of some lakes in Khanty-Mansi autonomous okrug – Yugra // *Vestnik rybokhozyaystvennoy nauki*. 2017. V. 4. No. 4 (16). P. 87–93 (in Russian).
52. Donerian L.G., Vodyanova M.A. Substantiation of the place of alternative biological methods in hygienic research // *Hygiene and Sanitation*. 2018. V. 97. No. 11. P. 1093–1097 (in Russian).
53. Valiullina A.M. Biotesting as a method of environmental monitoring // *Nauchno-prakticheskie issledovaniya*. 2020. No. 8–3 (31). P. 32–34 (in Russian).
54. Voronina L.P. Plant bioassay for environmental assessment of agrocenosis // *Problemy agrokhimii i ekologii*. 2013. No. 3. P. 16–21 (in Russian).
55. Klimova A.A, Azarova S.V, Yazikov E.G, Matveenko A. Scanning electron microscopy study of drilling cuttings in Tomsk oblast sites // *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 2019. P. 1–7. doi: 10.1088/1755-1315/272/2/022004
56. Ovsyannikova I.V., Pryanichnikova V.V., Pashkina K.V., Lebed I.V., Surina A.G., Gizetdinov A.N. The assessment of phytotoxicity of reservoir water // *Petroleum engineering*. 2018. V. 16. No. 4. P. 141–145 (in Russian).
57. Vasilyeva G.K., Kondrashina V.S., Strijakova E.R., Pinsky D.L. Express-phytotest for choosing conditions and following process of soil remediation // *Environ Geochem Health*. 2020. Sep 26. doi: 10.1007/s10653-020-00727-8
58. Nazarov A.V. Microbial-plant interaction in oil pollution of soddy-podzolic soils of Permskoe Preduralie // *Avtoreferat dissertatsii*. Perm, 2000. 24 p. (in Russian).
59. Wieczorek D., Kwapisz E., Marchut-Mikołajczyk O., Bielecki S. Phytotests as tools for monitoring the bioremediation process of soil contaminated with diesel oil // *BioTechnologia*. 2012. V. 93. No. 4. P. 431–439. doi: 10.5114/bta.2012.46597
60. Ovsyannikova I.V., Shulaev N.S., Pryanichnikova V.V., Kadyrov R.R. Determination of toxicity of soil contaminated with by of petrochemical hydrocarbons // *Journal of Physics Conference Series*. 2021. V. 1889. No. 3. Article No. 032011. doi: 10.1088/1742-6596/1889/3/032011
61. Nazarov A.V. The effect of oil pollution of the soil on plants // *Bulletin of Perm University. Biology*. 2007. V. 5. No. 10. P. 134–141 (in Russian).
62. Ilarionov S.A., Nazarov A.V., Kalachnikova I.G. The role of micromycetes in the phytotoxicity of crude oil-polluted soils // *Russian Journal of Ecology*. 2003. V. 34. No. 5. P. 303–308 (in Russian).

63. Sakaeva E.Kh., Rudakova L.V. Assessment of the biological activity of industrial soils based on drill slurries for reclamation of disturbed lands // *Theoretical and Applied Ecology*. 2020. No. 4. P.192–197 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2020-4-192-197
64. Voronina L.P., Terekhova V.A., Morachevskaya E.V. Phytoassay in environmental control. Moskva: Scientific Library of the Lomonosov Moscow State University, 2021. 34 p. (in Russian).
65. Fomina N.V. Phytotesting of oil polluted soil-grants after use of sorbents // *Epokha nauki*. 2017. No. 11. P. 154–161 (in Russian). doi: 10.1555/2409-3203-2017-0-11-154-161
66. Stepanova N.Yu., Akhmetshina A.D., Latypova V.Z. Test-organism sensitivity comparison in toxicological evaluation of bottom sediments polluted with oil of various origin // *Povolzhskiy Journal of Ecology*. 2012. No. 3. P. 319–325 (In Russian).
67. Selivanovskaya S. Yu., Latypova V.Z. Development of a test system for assessing the toxicity of multicomponent wastes stored in the natural environment // *Russian Journal of Ecology*. 2004. No. 1. P. 21–25 (in Russian).
68. Selivanovskaya S.Yu., Galitskaya P.Yu., Latypova V.Z., Semanov D.A. Evaluation of efficiency of contact and eluate methods of biotesting of soils // *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*. 2007. V. 149. No. 1. P. 113–122 (in Russian).
69. Mayachkina N.V., Chugunova M.V. Peculiarities of soil biotests to evaluate soil ecotoxicity // *Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod*. 2009. No. 1. P. 84–93 (in Russian).
70. ISO 19204:2017. Soil quality – Procedure for site-specific ecological risk assessment of soil contamination (soil quality TRIAD approach) [Internet resource] <https://www.iso.org/standard/63989.html> (Accessed: 02.06.2021).
71. Palamae S., Sompongchaiyakul P., Suttinun O. Effects of crude oil and aromatic compounds on growth and bioluminescence of *Vibrio campbellii* FS5 // *Environ Monit Assess*. 2021. V. 193. Article No. 291. doi: 10.1007/s10661-021-09081-3
72. Esimbekova E.N., Kondik A.M., Kratasyuk V.A. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity // *Environ Monit Assess*. 2013. V. 185. No. 7. P. 5909–5916. doi:10.1007/s10661-012-2994-1
73. Leitgib L., Kálmán J., Gruiz K. Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites // *Chemosphere*. 2007. V. 66. No. 3. P. 428–34. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.06.024
74. Kibardim V.M., Artiemiya T.I., Zherebtzov A.K. Effects of oil pollution on earthworms in different natural and climatic zones // *Uchenye zapiski kazanskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2008. V. 150. No. 1. P. 97–105 (in Russian).