

**КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ, БИОТЕХНОЛОГИИ И  
ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ**

*Кафедра биотехнологии*

**УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ К КУРСУ  
«БИОТЕХНОЛОГИИ ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ  
ТОКСИКАНТОВ И РЕКУЛЬТИВАЦИИ ПОЧВ»**

**Казань – 2025**

**УДК 502.55**

**ББК 20.1**

*Принято на заседании кафедры биотехнологии*

*Протокол №9 от 13 мая 2025 года*

**Рецензент:**

Кандидат биологических наук,  
заведующий кафедрой кафедра прикладной экологии Института  
экологии, биотехнологии и природопользования **Л.Г. Ахметзянова**

Кандидат биологических наук,  
руководитель НИЛ Биоконтроль Института экологии, биотехнологии и  
природопользования **Л.Р. Бикташева**

**Селивановская С.Ю., Курынцева П.А., Хлебова Д.Л.**

**Биотехнологии обезвреживания органических токсикантов и  
рекультивации почв / С.Ю. Селивановская, П.А. Курынцева, Д.Л.  
Хлебова. – Казань: Казан. ун-т, 2025. – 42 с.**

Учебное пособие предназначено для студентов обучающихся по направлениям 19.04.01 «Биотехнология» и 05.04.06 «Экология и природопользование» для изучения дисциплины «Биотехнологии обезвреживания органических токсикантов и рекультивации почв» и сопровождения практических занятий. В пособии представлен теоретический материал о видах токсикантов, способах снижения негативного воздействия токсикантов на окружающую среду, а также представлено описание практических работ по данной дисциплине.

© Селивановская С.Ю. с соавт., 2025

© Казанский университет, 2025

## СОДЕРЖАНИЕ

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	4
1. Виды органических токсикантов .....	4
2. Виды неорганических токсикантов.....	9
3. Методы обезвреживания органических токсикантов .....	12
3.1. Микробная биоремедиация .....	12
3.2. Фиторемедиация .....	13
4. Методы обезвреживания органических отходов.....	14
4.1. Анаэробное сбраживание.....	14
4.2. Компостирование .....	15
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ .....	17
1. Подготовка смесей органических отходов для анаэробного сбраживания и компостирования.....	17
2. Метод определения органического вещества .....	20
3. Приготовление водных вытяжек из отходов для дальнейшего проведения биотестирования.....	22
4. Определения pH водных вытяжек (ГОСТ 26423-85) .....	25
5. Определения токсичности отходов по смертности цериодафний (ФР.1.39.2007.03221).....	26
6. Определения токсичности отходов методом биотестирования с использованием равноресничных инфузорий <i>Paramecium caudatum</i> Ehrenberg ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.13-06 (ПНД Ф 16.1:2:3.10-06).....	29
7. Методика измерений оптической плотности культуры водоросли <i>Chlorella vulgaris</i> Beijer для определения токсичности отходов (ПНД Ф ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04).....	31
8. Биотестирование объектов с использованием семян редиса красного с белым кончиком <i>Raphanus sativus</i> (ISO 11269-2) .....	36
ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ ОТЧЁТА.....	38
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	39

# ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

## 1. Виды органических токсикантов

Токсиканты – это вещества, вызывающие интоксикацию и провоцирующие разные формы токсического процесса, не только организма, но биологических систем иных уровней организации: клеток (цитотоксикант), популяций (экотоксикант) [12]. Существует следующая классификация токсикантов:

### *1. По происхождению токсиканты подразделяются на:*

- Естественные токсиканты – вещества, вырабатываемые живыми организмами или образующиеся в результате их жизнедеятельности. К ним относятся: бактериальные токсины (ботулотоксин и тетанотоксин, вырабатываемые бактериями), микотоксины (афлатоксины и трихотеценовые токсины), фитотоксины (алкалоиды, такие как атропин и никотин), зоотоксины (яды животного происхождения - яд змей и пчел).
- Синтетические токсиканты – вещества, созданные человеком в процессе химического синтеза, которые используются в различных целях, включая промышленность, сельское хозяйство и медицину. К примерам синтетических токсикантов относятся: пестициды (ДДТ), органические соединения (ПАУ, растворители), неорганические соединения (соли мышьяка и ртути, тяжелые металлы).

### *2. По химической структуре:*

- Органические токсиканты включают: углеводороды, пестициды, растворители и многие другие химические соединения, содержащие углерод.
- Неорганические токсиканты включают: тяжелые металлы (например, свинец, ртуть, кадмий), кислоты и соли.

### *3. По условиям воздействия выделяют [12]:*

- Загрязнители окружающей среды (воздуха, воды, почвы, продовольствия).

- Производственные (профессиональные) токсиканты.
- Бытовые токсиканты.
- Вредные привычки и пристрастия (табак, алкоголь, наркотические средства, лекарства и т.д.).
- Поражающие факторы при специальных условиях воздействия.
- Аварийного и катастрофального происхождения.
- Боевые отравляющие вещества и диверсионные агенты.

*4. По характеру воздействия на организм согласно ГОСТ 12.0.003-74*

*[17] вещества подразделяются на [13]:*

- общетоксические - вызывающие отравление всего организма или поражающие отдельные системы (центральную нервную систему, систему кроветворения), а также вызывающие патологические изменения печени и почек (угарный газ, свинец, ртуть, бензол);
- раздражающие – вызывающие раздражение слизистых оболочек дыхательных путей, глаз, легких, кожных покровов (хлор, аммиак, оксиды серы и азота, озон);
- сенсibiliзирующие - действующие как аллергены (формальдегид, растворители, нитролаки);
- мутагенные – приводящие к нарушению генетического кода, изменению наследственной информации (свинец, марганец, радиоактивные изотопы);
- канцерогенные – вызывающие злокачественные новообразования (ароматические углеводороды, хром, никель, асбест);
- влияющие на репродуктивную функцию (ртуть, свинец, стирол).

Как в процессе жизнедеятельности человека, так и в природных процессах образуются органические соединения, которые могут оказывать негативное влияние на здоровье человека. Многие из них обладают высокой канцерогенной и мутагенной активностью, устойчивостью к химическому и биологическому разложению и способностью

аккумулироваться в живых организмах [1], все вышеперечисленное привело к одной из актуальных экологических проблем, которая обусловлена загрязнением компонентов биосферы органическими токсикантами различной природы [2].

Среди органических токсикантов выделяют углеводороды. Углеводороды, являющиеся основными компонентами нефти и природного газа, образуются в результате биологического и бактериального разложения органических веществ и керогена, отлагаются совместно с осадочными породами. Сырая нефть представляет собой сложную смесь органических соединений, включающую углеводороды (88%), метановые, нафтеновые и ароматические вещества, а также органические соединения серы, азота, и минеральные примеси [3]. Нефть, ее пары, сопутствующие газы и продукты переработки оказывают негативное воздействие на здоровье человека. К наиболее опасным примесям нефтепродуктов относятся бензол, тетраэтилсвинец и полициклические ароматические углеводороды (ПАУ).

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ, полиарены) – высокомолекулярные органические соединения, в структуре которых содержится два и более бензольных кольца (Рис.1). К природным факторам, способствующим образованию ПАУ, относят: эндогенные, космические, геологические и биологические. Антропогенные источники ПАУ включают производство алюминия, асфальта, цемента, нефтехимическую промышленность [4]. Кроме того, ПАУ продуцируются в процессах выработки энергии, неполного сжигания мусора и угля. Так, важным источником полиаренов являются выхлопные газы автотранспорта [5]. Один из путей поступления ПАУ в почву – орошение загрязненными водами [8].

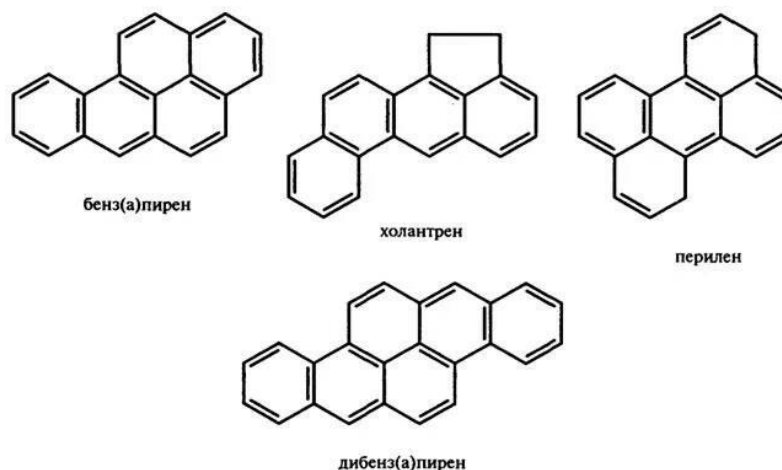


Рисунок 1. Структура отдельных представителей полициклических ароматических углеводородов

Еще одним распространённым видом органических токсикантов являются пестициды. Галогенсодержащие производные органических соединений применяются в виде гербицидов (хлорпроизводные), фунгицидов, инсектицидов. Хлорпроизводные органических соединений в природе образуются в значительном количестве при лесных пожарах, но основная масса (около 90%), имеет антропогенное происхождение. Галогенсодержащие соединения обладают большим периодом полураспада (от нескольких месяцев до нескольких десятков лет), вследствие чего происходит их накопление в различных компонентах окружающей среды [6]. В плодородных почвах их миграция и разложение идет медленнее из-за высокой адсорбционной способности таких соединений, при этом в песчаных почвах, наоборот, сорбция идет плохо, значительное количество пестицидов перемещается вниз по почвенным горизонтам и загрязняет грунтовые воды. Время полного разложения хлорорганических пестицидов в почве варьируется в широких пределах и зависит от свойств самих веществ, климатических условий, типов почв [3]. Ещё одним видом токсикантов являются органические растворители (этанол, толуол, ксилол), которые представляют собой серо- и азот-органические соединения. Органические растворители широко

применяются в различных промышленных отраслях, что приводит к массовому попаданию их в окружающую среду. Такие соединения плохо растворяются в воде и хорошо в органических растворителях, характеризуются липофильностью, обладают токсикологическими свойствами, вызывая угнетение функций ЦНС и оказывая наркотическое действие [7]. К органическим токсикантам также относятся диоксины и диоксиноподобные вещества. К этой группе ксенобиотиков относятся полихлорированные ибензодиоксины (ПХДД), полихлорированные дибензофураны (ПХДФ) и полихлорированные бифенилы (ПХБФ). Соединения данных представителей выглядят следующим образом (Рис. 2):

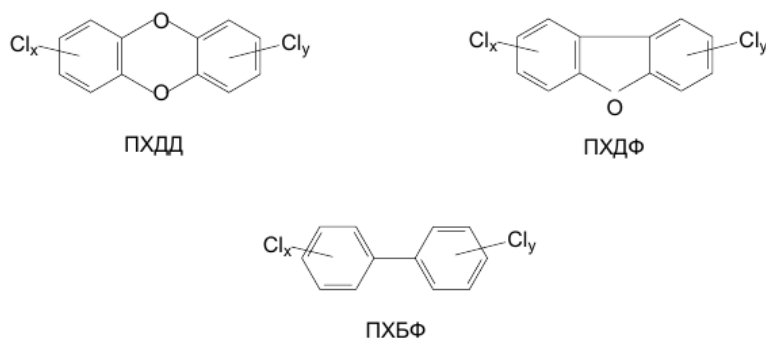


Рисунок 2. Представители диоксинов и диоксиноподобных веществ

Ксенобиотики попадают в биосферу в виде побочных продуктов – примеси, так как входят в состав препаратов гербицидов (дефолиантов) и хлорфенола. Соединения обладают широким спектром биологического действия. Они способны блокировать рецепторы клеток и накапливаться в живых организмах. Также вещества обладают высокой липофильностью – они способны растворяться и удерживаться в жироподобных матрицах. Из 100 исследованных штаммов микроорганизмов, способных метаболизировать полихлорированные соединения, лишь 5 обладают способностью разрушать диоксины и подобные вещества. Ввиду этого данные соединения характеризуются высокой стойкостью и сохраняются в биосфере более 10 лет [14]. К

токсикантам биологического происхождения относят бактериальные токсины. К бактериальным токсинам относятся высокомолекулярные соединения, преимущественно белковой, полипептидной или липополисахаридной структуры, которые обладают антигенной активностью. На сегодняшний день идентифицировано и исследовано более 150 токсинов. К наиболее опасным и известным веществам относятся: ботулотоксин, холерные токсины, тетанотоксин, стафилококковые токсины, дифтерийные токсины и т.д. Бактериальные токсины оказывают воздействие на разные органы и системы животных и человека, при этом наибольший вред наносят нервной и сердечно-сосудистой системе [12]. Также к токсикантам органического и биологического происхождения относят микотоксины, которые представляют собой грибные метаболиты, необходимые для их роста и размножения. Микотоксины поражают сельскохозяйственные культуры, корма и пищевые продукты, что представляет серьезную проблему для продовольственной безопасности и здравоохранения [9, 10]. Многообразие микотоксинов, их высокий уровень токсичности и способность проникать в ткани и органы приводит к разнообразным биохимическим, физиологическим и патологическим изменениям у людей и животных. Вредное воздействие микотоксинов может проявляться в виде иммунотоксичности, канцерогенности, нейротоксичности и др.

## **2. Виды неорганических токсикантов**

Среди неорганических соединений естественного происхождения наиболее опасными с точки зрения токсикологии являются металлы и их соединения, а также поллютанты – газообразные вещества атмосферного воздуха, кроме того, они могут встречаться и в воздухе производственных помещений. В природе металлы встречаются в виде руд и минералов, которые определяют в почве, воздухе и воде. Антропогенная деятельность, включающая добычу металлов из руд и их широкое применение во многих отраслях (автотранспорт, котельные,

мусоросжигающие установки, сельскохозяйственное производство и др.), привела к значительному увеличению концентрации этих элементов в окружающей среде [12]. Тяжелые металлы имеют способность к биоаккумуляции и даже в относительно низких концентрациях обладают высокой токсичностью для живых организмов [15]. Наиболее токсичными металлами являются: свинец, ртуть, цинк, кадмий, медь, хром, мышьяк, и др.

**Свинец (Pb)** – сильный токсикант. Он негативно действует на процессы растений: нарушает обмен веществ, фотосинтез, деление клеток, инактивирует дыхание. Также оказывает отрицательное влияние на биологическую деятельность в почве, снижает численность микроорганизмов, ингибирует активность различных почвенных ферментов и ферментов бактерий. В организме человека накопление свинца может вызывать различные заболевания, связанные с поражением нервной системы, цирроз печени, гипертонию [16].

**Кадмий (Cd)** является одним из опаснейших экотоксикантов. В природе источниками кадмия являются процессы выветривания и вулканизма, антропогенными источниками являются промышленные отрасли: производство красок, электротехническая промышленность и суперфосфатные удобрения. Токсическое действие данного металла связано с ингибированием белков, при этом поражаются нервная и сердечная система. Кадмий также способен проявлять канцерогенное и мутагенное действие [14].

Повышенное содержание **ртути (Hg)** также опасно для живых организмов. Металл попадает в окружающую среду в результате промышленного загрязнения и естественного испарения из земной коры. Токсическая опасность ртути основана на том, что она взаимодействует с –SH группами белков и блокирует их, при этом вызывая изменения свойств тканевых белков и инактивацию ряда гидролитических и

окислительных ферментов. Она способна приводить к нарушению обмена веществ, выделительной функции и накапливаться в печени и почках [12].

**Медь (Cu)** при высоких концентрациях в почве вызывает токсические эффекты у растений, такие как хлороз (недостаток хлорофилла), пороки развития корневой системы, задержку роста и нарушение фотосинтеза [15]. У людей и животных потребление в пищу большого количества солей меди приводит к развитию хронических отравлений. Токсическое действие меди обусловлено на химическом сходстве с серой, что приводит к блокированию сульфидных групп ( $R-SH$ ) белков и ферментов [6].

**Мышьяк (As)** попадает в почву с продуктами сгорания угля, с отходами металлургической промышленности и предприятий по производству удобрений [16]. Металл высокотоксичен для большинства гидробионтов и растений. В организме человека токсическое действие металла обусловлено блокированием сульфгидридных групп ( $-SH$ ), ферментов, белков и биологически активных веществ. Чаще всего поражаются нервная система и стенки кровеносных сосудов, нарушается жировой и углеводный обмены, понижается скорость окислительных процессов в тканях. Мышьяк является антагонистом йода, селена и фосфора. Также соединения мышьяка обладают выраженным канцерогенным и тератогенным действием, то есть он способен вызывать нарушение эмбрионального развития [6].

В группу газообразных поллютантов, которые представляют наибольшую опасность, входят следующие вещества: сероводород ( $H_2S$ ), монооксид и диоксид углерода ( $CO$ ,  $CO_2$ ), оксиды азота ( $N_xO_y$ ), озон ( $O_3$ ), оксиды серы ( $S_xO_y$ ) и др. Загрязнение поллютантами происходит естественным путем, в результате вулканической деятельности (галогены, сероводород, оксиды серы) и в ходе лесных пожаров (сажа, оксиды азота,  $CO$ ). Источниками антропогенного происхождения газообразных загрязнителей являются: продукты сгорания топлива и отходы автотранспорта [3].

### 3. Методы обезвреживания органических токсикантов

Существуют различные методы обезвреживания органических токсикантов, включая термические, химические, биологические и физические методы.

#### 1. Термические методы:

- **Сжигание.** Уничтожение токсикантов при высоких температурах.
- **Пиролиз.** Разложение органических веществ в отсутствие кислорода.

#### 2. Химические методы:

- **Окисление.** Применение окислителей (озон, перманганат калия) для преобразования токсичных веществ в менее опасные соединения.
- **Реакция с реагентами.** Нейтрализация токсикантов с помощью химических реакций.

#### 3. Физические методы:

- **Фильтрация.** Удаление токсикантов из воды или воздуха с помощью механических фильтров.
- **Адсорбция.** Использование адсорбентов (например, активированного угля) для захвата токсичных веществ.

#### 4. Биологические методы:

- **Микробная биоремедиация.** Принцип основан на естественных способностях определённых микроорганизмов расщеплять и разлагать токсичные вещества на менее опасные компоненты.
- **Фиторемедиация.** Принцип основан на использовании растений для поглощения токсикантов из почвы или воды.

#### 3.1. Микробная биоремедиация

Микробная биоремедиация — это процесс, основанный на использовании микроорганизмов для деградации и трансформации различных загрязнителей окружающей среды, включая органические соединения, тяжелые металлы и нефтепродукты [28]. Основой микробной биоремедиации служит метаболическая активность бактерий, грибов и

микроводорослей, способных использовать загрязняющие вещества в качестве источника энергии и углерода, что приводит к их разложению или превращению в менее токсичные соединения [29]. В зависимости от условий проведения различают два основных типа биоремедиации:

- *In situ* – обработка загрязненной среды непосредственно на месте загрязнения без перемещения загрязненного материала. Этот подход включает методы биоаугментации (введение специально подобранных микроорганизмов), биостимуляции (добавление питательных веществ для активации аборигенной микрофлоры) и фиторемедиации (использование растений и связанных с ними микроорганизмов). К методам биоремедиации *In situ* относят: биовосстановление, биовентиляция, биобарботирование, проницаемый реактивный барьер (PRB).
- *Ex situ* – удаление загрязненного материала с последующей обработкой в биореакторах или на специальных полигонах, что позволяет создать оптимальные условия для микробной активности и ускорить процесс очистки. К методам биоремедиации *Ex situ* относят: биореактор, валки, ландфарминг, биопленки.

### 3.2. Фиторемедиация

Биоремедиация – биологический способ деконтаминации загрязненных почв и водных сред, основанный на использовании биологической продуктивности организмов [26]. Фиторемедиация – это приемы очистки, основанные на использовании зеленых растений. Основные направления фиторемедиации [27]:

- *Ризофильтрация*. Удаление поллютантов из окружающей среды с помощью корневой системы растений.
- *Фитоиспарение*. Использование растений для выноса контаминантов из почвы, с помощью преобразования их в летучую форму и транспирации в атмосферу.

- *Фитостабилизация.* Перевод химических соединений в менее подвижную и активную форму для снижения биодоступности контаминантов в почве.
- *Фитоэкстракция.* Поглощение из почвы или воды тяжёлых металлов и накопление их в надземной биомассе растения.
- *Фитодеградация.* Разложение растениями и симбиотическими микроорганизмами органической части загрязнений (высокомолекулярных веществ) до нетоксичных компонентов, которые не представляют опасности для окружающей среды.

#### **4. Методы обезвреживания органических отходов**

##### **4.1. Анаэробное сбраживание**

Анаэробное сбраживание — это процесс биологического разложения органических веществ с выделением свободного метана под воздействием микроорганизмов в условиях отсутствия кислорода. Данный метод помогает уменьшить массу и объем органических отходов, а также получить возобновляемую энергию и органические удобрения. В результате анаэробного сбраживания образуются два основных продукта: биогаз и шлам. Биогаз является альтернативным источником энергии – это газовая смесь, состоящая из 50–87 % метана, 13–50 % углекислого газа и незначительных примесей  $H_2$  и  $H_2S$ . Шлам, образующийся в процессе получения биогаза, представляет собой остаток, содержащий компоненты удобрений (азот, фосфат, калий, макро и микроэлементы) в растворенном виде необходимых для роста растений, а также активные биологические стимуляторы класса ауксинов, способствующих повышению урожайности [22]. Процесс разложения органического вещества в анаэробном сбраживании состоит из четырех основных этапов (Рис. 3): гидролиз, ацидогенез, ацетогенез и метаногенез. На стадии гидролиза сложные высокомолекулярные органические соединения (целлюлоза, белки, липиды, жиры) расщепляются внеклеточными ферментами

микроорганизмов до более простых низкомолекулярных соединений (аминокислоты, жирные кислоты, сахара). В процессе ацидогенеза происходит образование летучих органических кислот, спиртов и газов (углекислый газ, водород, аммиак). При ацетогенезе из органических кислот и спиртов образуется уксусная кислота и ацетаты, а также газы ( $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$ ). На этапе метаногенеза метаногенные бактерии превращают продукты ацетогенеза в метан и углекислый газ, которые составляют биогаз.



Рисунок 3. Этапы разложения органического вещества в процессе анаэробного сбраживания

## 4.2. Компостирование

Биологическая переработка отходов бывает двух видов: анаэробное (разложение/сбраживание органических отходов при полном отсутствии кислорода) и аэробное (разложение в присутствии достаточного количества кислорода). Компостирование – это аэробный биологический процесс, в котором сообщества микроорганизмов преобразуют

органические вещества в концентрированные почвенные продукты с ценными агрономическими (удобрительными) свойствами. Выделяют следующие этапы процесса компостирования: сбор отходов, сортировка, дробление, сепарирование, составление компостной смеси (рН, влажность, C/N), процесс ферментации, созревание, просеивание, готовый компост. В ходе компостирования осуществляются минерализация и гумификация органических компонентов. В минерализации происходит распад органических остатков до конечных продуктов: воды, диоксида углерода, простых солей. При гумификации происходит процесс образования гумусовых кислот, с помощью трансформации продуктов разложения органических остатков [23]. Благодаря компостированию достигается минимизация потерь питательных элементов из одних компонентов (навоза, жижи и птичьего помета), и одновременно ускоряется разложения других трудноразлагаемых отходов (торф, солома, опилки и бытовой мусор) [24]. Продукты жизнедеятельности микро- и макроорганизмов придают компосту как конечному продукту биоконверсии качественно новые свойства: экологическую безопасность, отсутствие токсинов и патогенных микроорганизмов, длительный срок хранения и высокое содержание питательных для растений веществ, что позволяет его широкое и рентабельное применение в сельском хозяйстве [25].

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### 1. Подготовка смесей органических отходов для анаэробного сбраживания и компостирования

Для проведения данной работы необходимо подготовить два вида компостных смесей (Рис. 4):

1. Смесь, содержащая только пищевые отходы (овощи, фрукты, шелуха, яичная скорлупа и т.д.). При приготовлении данного компоста не используются продукты, которые заражены плесневыми грибами.
2. Смесь, состоящая из пищевых отходов (овощи, фрукты, шелуха, яичная скорлупа и т.д.) и куриного помета (или пометов/фекалий животных). Куриный помет добавляется для ускорения процесса разложения органики и насыщения субстрата дополнительными полезными элементами. Помет является источником азота, фосфора, калия, кальция и т.д.



Рисунок 4. Два вида компостных смесей

Пищевые отходы измельчаются, размер частиц находится в диапазоне 0,3-2 см. В вариант с куриным пометом к 2 частям пищевых отходов добавляется 1 часть куриного помета по массе. Из полученной смеси отбирают пробу массой не менее 200г для анализа исходных

характеристик (1КС). Полученные смеси делят для проведения компостирования и анаэробного сбраживания.

Для компостирования используются контейнеры объемом не менее 10 л. Готовую смесь для компостирования в случае необходимости доводят до влажности 55%. В динамике процесса компостирования отбирается 3 пробы массой не менее 200 г (Таблица 2). В процессе компостирования раз в 3 суток определяется влажность и температура компостной смеси цифровым высокоточным многофункциональным прибором для исследования почвы КС-300 (Рис. 5). Данные вносятся в таблицу 1.

Таблица 1. Влажность и температура компостной смеси.

№	Дата	Т, °С	Влажность, %	Дата	Т, °С	Влажность, %
1						
2						



Рисунок 5. Цифровой высокоточный многофункциональный прибор для исследования почвы КС-300

**ВАЖНО!** В процессе созревания необходимо поддерживать влажность и аэрацию компостной смеси, для этого раз в 3 дня производится перемешивание и увлажнение в случае необходимости.

Для проведения анаэробного сбраживания подготавливают тару объемом не менее 1л, которая закрывается герметично и имеет в крышке выходной шланг, соединенный с мерным цилиндром, полностью заполненным водой (Рис. 6).

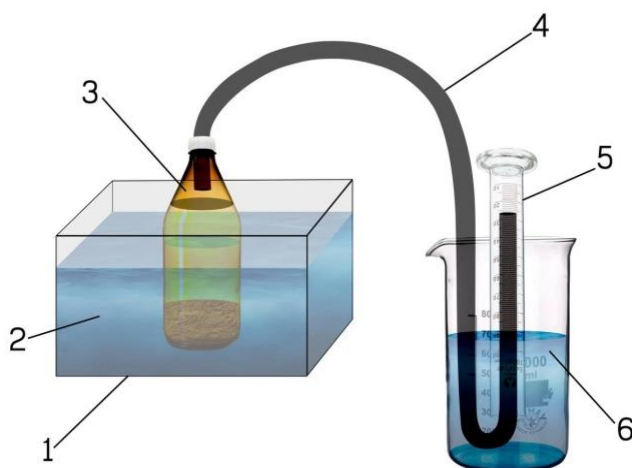


Рисунок 6. Схема анаэробного сбраживания, где 1 – водяная баня, 2 – водопроводная вода, 3 – герметичная тара с пробой, 4 – выходной шланг, 5 – мерный цилиндр, 6 – стакан с водопроводной водой.

В такую ёмкость помещается смесь для анаэробного сбраживания, влажность смеси для анаэробного сбраживания доводится до 80-90% водопроводной водой. Ёмкость помещается в водяную баню, таким образом, чтобы температура смеси составляла  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Ёмкость герметично закрывается, необходимо оставить от края горлышка бутылки порядка 1 см. Свободный конец трубки опускается в мерный цилиндр. Цилиндр помещается в стакан с водопроводной водой. В течение 1 недели необходимо отслеживать объем вытесненной воды, который говорит о выделении биогаза в процессе анаэробного сбраживания органических

отходов. Через 7 суток емкость открывают и полученную смесь используют для дальнейших проведенных опытов.

Таблица 2. Перечень отобранных проб для оценки эффективности анаэробного сбраживания и компостирования органических отходов

№	Шифр пробы	Тип биологической обработки	Состав смеси	Время, сут.
1	АС	Аэробное сбраживание	Пищевые отходы	7
2	1КС	Исходная компостная смесь	Пищевые отходы + Куриный помет	0
3	2КС	Смесь через 2 недели компостирования		14
4	3КС	Смесь через 6 недель компостирования		42

## 2. Метод определения органического вещества

Принцип метода определения органического вещества при сжигании отходов в муфельной печи заключается в сухом сжигании образца при температуре 550 °С и определении в нём количества золы и органической части. При сжигании отходов, почвы и растительного материала органические соединения окисляются и улетучиваются в виде углекислого газа, воды и оксидов азота. Оставшийся нелетучий остаток (зола) содержит элементы, называемые зольными. Разница между весом сухого образца и зольным остатком составляет органическое вещество.

Для определения органического вещества необходимо:

1. Муфельная печь МИМП-17П;
2. Тигли керамические;
3. Весы II класса точности;
4. Шпатель для отбора проб.

Перед началом опыта следует определить изначальные массы керамических тиглей и записать их в таблицу с результатами (Таблица 3). В

каждый тигель навешивается максимальный объем исследуемой пробы. Далее проводится взвешивание исходной смеси с тиглем до прокаливания, определяют массу пробы, вносят ее в таблицу 3. Далее готовые тигли помещаются в муфельную печь (Рис. 7) при температуре 550°C на 3 часа.



Рисунок 7. Муфельная печь МИМП-17П

После охлаждения проводится взвешивание тиглей с остатками золы, результаты вносятся в таблицу 3. Из веса исходной смеси с тиглем до прокаливания вычитается вес тигля с остатком золы после прокаливания. Полученный остаток (потеря от прокаливания) показывает содержание органического вещества, которое выражается в процентах. Содержание органического вещества вычисляется по следующей формуле:

$$\text{ОВ (\%)} = 100 - \frac{(m_z - m_T) \cdot 100}{(m_{\text{исх}} - m_T)}$$

где  $m_{\text{исх}}$  – масса исходной компостной смеси с тиглем;  $m_T$  – изначальная масса тигля;  $m_z$  – масса золы; ОВ (%) – содержание органического вещества, выраженное в %.

Результаты следует записать в виде таблицы и представить данные в виде столбчатой диаграммы (Рис. 8).

Таблица 3. Определение органического вещества в пробах

№	Шифр пробы	Масса тигля, г	Масса тигля с пробой до прокаливания, г	Содержание органического вещества	
				г	%
1	АС				
2	1КС				
3	2КС				
4	3КС				

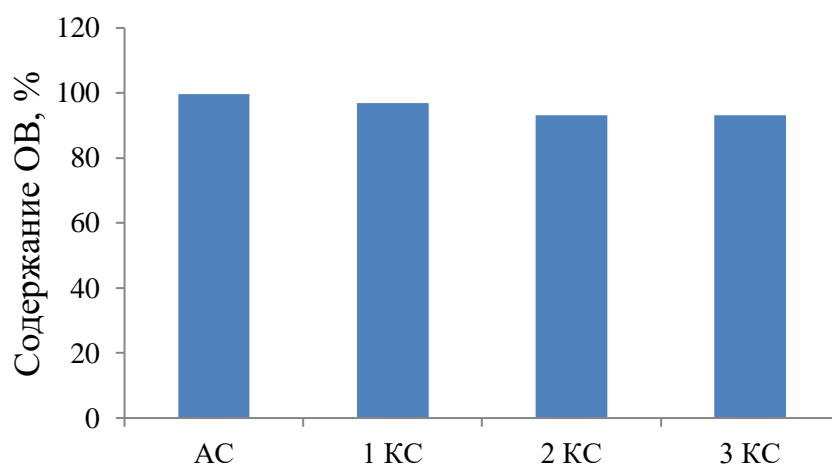


Рисунок 8. Содержанию органического вещества

### 3. Приготовление водных вытяжек из отходов для дальнейшего проведения биотестирования

Определение уровня токсичности с помощью методов биотестирования – это сложный процесс, включающий несколько ключевых этапов. Одним из главных ключевых этапов является подготовка водных вытяжек из исследуемых проб. Подготовка вытяжек необходима для преобразования водорастворимых токсикантов в формы, доступные для тестируемых организмов. В водную вытяжку могут переходить соединения тяжелых металлов, растворимые соли, органические вещества и многое другое. Существует множество стандартизированных методик получения водных вытяжек, выбор которых зависит от типа исследуемой среды и предполагаемых токсикантов.

Для подготовки водной вытяжки (Рис. 9) необходимо:

1. Дистиллированная вода;
2. Культивационная вода;
3. Коническая колба объемом 500 мл;
4. Шпатель для отбора проб;
5. Шейкер LOIP LS-110;
6. Фильтр обеззоленный «Белая лента»;
7. Воронка;
8. Коническая колба объемом 250 мл.



Рисунок 9. Приготовление водных вытяжек.

Водную вытяжку из отходов готовят из соотношения твердой фазы к жидкости равного 1:10. В качестве жидкости используется дистиллированная вода (pH 7,0 - 7,5). В колбу на 500 мл добавляется 20 г тестируемой пробы и 200 мл дистиллированной воды ( $\text{dH}_2\text{O}$ ). Приготовленная колба с суспензией устанавливается на шейкер (Рис. 10) и перемешивается в течение 30 минут, далее 10 минут отстаивается.



Рисунок 10. Шейкер LOIP LS-110

После перемешивания суспензия профильтровывается через складчатый фильтр, изготовленный из Фильтра обеззоленного «Белая лента». Полученный фильтрат разбавляют в 10 раз: 20 мл фильтрата + 180 мл культивационная воды (аквариумная вода). Разбавленную вытяжку используют для проведения последующих анализов:

1. Определение pH водных вытяжек (ГОСТ 26423-85);
2. Определения токсичности отходов по смертности цериодафний (ФР.1.39.2007.03221);
3. Определения токсичности отходов методом биотестирования с использованием равноресничных инфузорий *Paramecium caudatum Ehrenberg* (ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.13-06 (ПНД Ф 16.1:2:3.10-06));
4. Методика измерений оптической плотности культуры водоросли *Chlorella vulgaris Beijer* для определения токсичности отходов (ПНД Ф ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04);
5. Биотестирование объектов с использованием семян редиса красного с белым кончиком *Raphanus sativus* (ISO 11269-2).

#### 4. Определения pH водных вытяжек (ГОСТ 26423-85)

Для определения pH водных вытяжек [20] необходимо:

1. Дистиллированная вода;
2. Водная вытяжка;
3. pH-метр АНИОН 4100;
4. Буферные растворы (pH 4,01; 6,86 и 9,18);
5. Химический стакан на 50 мл;
6. Фильтровальная бумага.

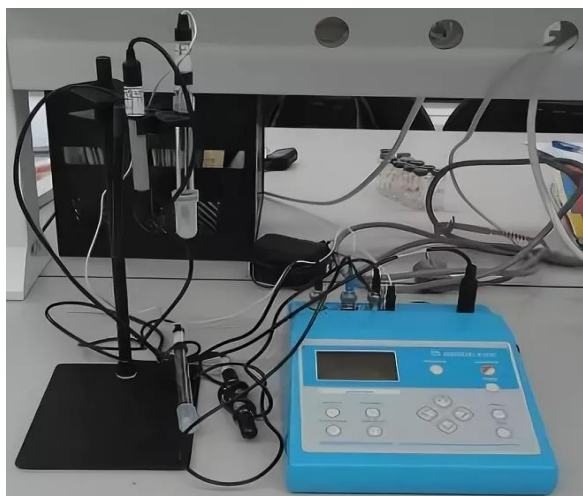


Рисунок 11. pH-метр АНИОН 4100

Перед работой следует прогреть pH-метр (Рис.11) достаточно 15 – 20 минут. Измеряется значение pH разбавленной вытяжки. Для этого разбавленную вытяжку объемом 15—20 см<sup>3</sup> сливают в химический стакан вместимостью 50 см<sup>3</sup> и используют для измерения pH. Далее в стакан помещаются электрод/электроды, термокомпенсатор (ВНИМАНИЕ! Не забудьте открыть отверстие на электроде перед использованием прибора, и закрыть его после использования!). Показания прибора считывают не ранее чем через 1,5 мин после погружения электродов в измеряемую среду, после превращения дрейфа измерительного прибора и записывают в таблицу 3. Во время работы настройку прибора периодически проверяют по буферному раствору с pH 6,86. Далее необходимо промыть электрод/электроды, термокомпенсатор водой и аккуратно просушить фильтровальной бумагой.

Результаты следует записать в виде таблицы 4 и представить данные в виде столбчатой диаграммы (аналогичной Рис. 8), где на оси X – цифровые значения pH, на оси Y – полученные значения pH разбавленных водных вытяжек.

Таблица 4. Значения pH разбавленных водных вытяжек

№	Шифр пробы	Значения pH водных вытяжек
1	АС	
2	1КС	
3	2КС	
4	3КС	

#### 5. Определения токсичности отходов по смертности цериодафний (ФР.1.39.2007.03221)

Принцип методики [11] основан на определении смертности цериодафний (*Ceriodaphnia affinis*, *Cladocera*, *Crustacea*) при воздействии токсических веществ, присутствующих в исследуемой среде, по сравнению с контрольной культурой в пробах, не содержащих токсических веществ (контроль). Критерием острой токсичности служит гибель 50% и более цериодафний за 48 часов в исследуемой среде при условии, что в контроле гибель не превышает 10%. В ходе экспериментальных исследований может быть установлена:

- *Острая токсичность или средняя летальная концентрация отдельных веществ* (кратность разбавления вод, водной вытяжки из почв, осадков сточных вод и отходов, содержащих смеси веществ), вызывающую гибель 50 % и более тест-организмов;
- *безвредная концентрация отдельных веществ*, которая не вызывает острого токсического эффекта (кратность разбавления вод или водной вытяжки из почв, осадков сточных вод и отходов, содержащих смеси веществ) и приводит к гибели не более 10 % тест-организмов.

Для проведения биотестирования на цериодафниях необходимо:

1. Культивационная вода;
2. Пробирки объемом на 50 мл;
3. Химический стакан на 30 мл;
4. Пипетка;
5. Штатив для пробирок;
6. Культура цериодафний – не более 24-часового возраста (Рис. 12).

Пробы разбавленной в 10 раз вытяжки (подготовленные в п. 3) в объеме 30 мл разливаются в пробирки в трехкратной повторности и сопровождаются одной серией контроля. В качестве контроля используется культивационная вода. В каждую пробирку помещаются по пять цериодафний (не более 24-часового возраста). Цериодафнии отлавливаются из химического стакана пипеткой. Посадку рачков следует начинать с контрольной серии. Учет смертности цериодафний в опыте и контроле проводится через 48 часов. Неподвижных особей следует считать погибшими, если они не начинают двигаться в течение 15 секунд после легкого покачивания пробирки.

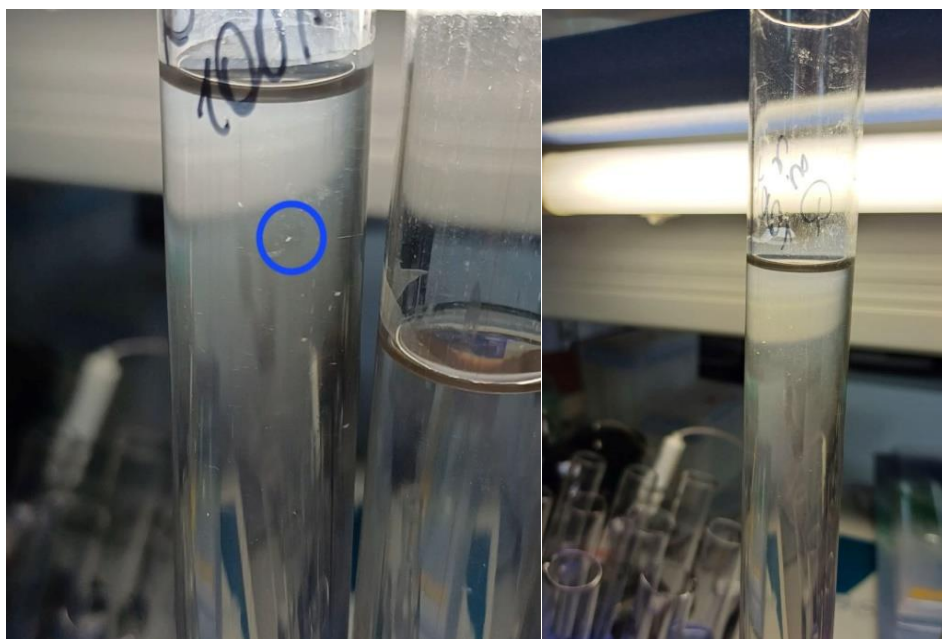


Рисунок 12. Культура цериодафний

Для определения острой токсичности исследуемого вещества, рассчитывается процент выживших цериодафний в тестируемой воде ( $A$ , %) по сравнению с контролем по формулам:

$$X_{\text{контр}} = \frac{(x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n)}{n},$$

$$X_{\text{оп}} = \frac{(x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n)}{n},$$

$$A (\%) = \frac{100 * X_{\text{оп}}}{X_{\text{контр}}}$$

где  $X_{\text{контр}}$  – среднее значение контроля;  $x_n$  – количество выживших цериодафний в  $n$ -ой повторности;  $n$  – количество параллельных определений;  $X_{\text{оп}}$  – среднее опытное значение;  $A$  (%) – процент выживших особей от контроля.

По полученным результатам заполняется таблица 5 и строится столбчатая диаграмма (аналогично Рис. 8). По оси  $Y$  откладывается процент выживших особей от контроля, по оси  $X$  откладывается наименование образца.

Таблица 5. Определение токсичности по смертности цериодафний

№	Шифр пробы	Повторности	Поместили	Выжило	Ср. значение помещенных	Ср. значение выживших	A, %
1	АС	1.1.					
		1.2.					
		1.3.					
2	1КС	2.1.					
		2.2.					
		2.3.					
3	2КС	3.1.					
		3.2.					
		3.3.					
4	3КС	4.1.					
		4.2.					
		4.3.					
5	Контроль	5.1.					
		5.2.					
		5.3.					

**6. Определения токсичности отходов методом биотестирования с использованием равноресничных инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.13-06 (ПНД Ф 16.1:2:3.10-06)**

Методика [19] основана на определении смертности парameций при воздействии токсических веществ, присутствующих в исследуемых растворах по сравнению с контролем. Острое токсическое действие исследуемой пробы на парameций определяют по их смертности (летальности) за определенный период экспозиции. Критерием острой токсичности служит гибель 50% и более парameций за 24 часа (в нашем случае 30 минут) в исследуемой пробе, при условии, что в контроле гибель не превышает 10% тест-организмов.

Для проведения биотестирования на инфузориях необходимо:

1. Культивационная вода;
2. Планшета с лунками;
3. Бинокляр (Микромед МС-2 Zoom);
4. Химический стакан на 30 мл;
5. Капиллярная пипетка;
6. Штатив для пробирок;
7. Культура инфузорий (Рис. 13)



Рисунок 13. Культура инфузорий (вид под бинокляром)

Для проведения биотестирования в данном опыте используется планшета с лунками (Рис. 14а). Культуру инфузорий следует переносить в лунки с помощью бинокуляра. Перенос производится с помощью капиллярной пипетки. В каждую лунку помещаются по 10-12 особей. **ВАЖНО!** При помещении тест-организмов количество культуральной жидкости в лунке не должно превышать  $0,02 \text{ см}^3$ . После помещения инфузорий в лунки - в контроль приливается по  $0,6 \text{ см}^3$  культивационной воды, в опытные - по  $0,6 \text{ см}^3$  тестируемой пробы. Микроаквариум оставляют на 30 минут. По истечении этого времени производится подсчет выживших и погибших особей под бинокуляром (Рис. 14б).

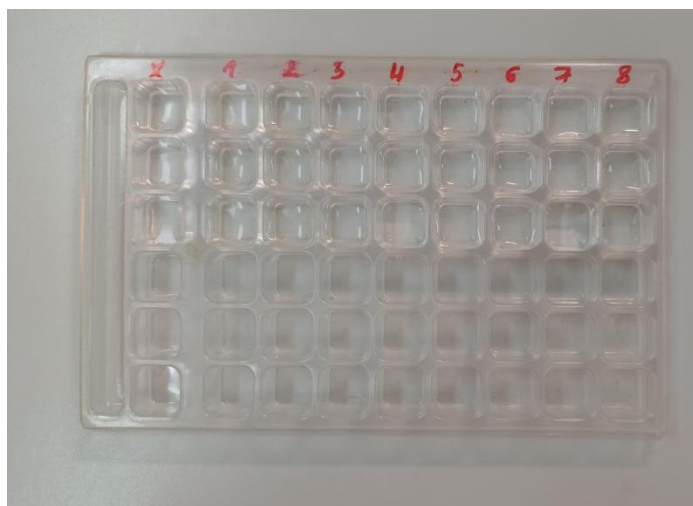


Рисунок 14. Оборудование и расходные материалы, необходимые для проведения биотестирования с инфузориями (а - планшета с лунками, б – бинокуляр)

Для определения острой токсичности исследуемого вещества, рассчитывается процент выживших инфузорий в тестируемой пробе ( $A, \%$ ) по сравнению с контролем по формулам:

$$X_{\text{контр}} = \frac{(x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n)}{n},$$

$$X_{\text{оп}} = \frac{(x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n)}{n},$$

$$A (\%) = \frac{100 * X_{оп}}{X_{контр}}$$

где  $X_{контр}$  – среднее значение контроля;  $x_n$  – количество выживших переодафний в n-ой повторности; n – количество параллельных определений;  $X_{оп}$  – среднее опытное значение; A (%) – процент выживших особей от контроля.

По полученным результатам заполняется таблица 6 и строится столбчатая диаграмма (аналогично Рис. 8). По оси Y откладывается процент выживших особей от контроля, по оси X откладывается наименование образца.

Таблица 6. Определение токсичности по смертности инфузорий

№	Шифр пробы	Повторности	Поместили	Выжило	Ср. значение помещенных	Ср. значение выживших	A, %
1	АС	1.1.					
		1.2.					
		1.3.					
2	1КС	2.1.					
		2.2.					
		2.3.					
3	2КС	3.1.					
		3.2.					
		3.3.					
4	3КС	4.1.					
		4.2.					
		4.3.					
5	Контроль	5.1.					
		5.2.					
		5.3.					

## 7. Методика измерений оптической плотности культуры водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer для определения токсичности отходов (ПНД Ф ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04)

Методика [18] основана на регистрации различий в величине оптической плотности тест-культуры водорослей хлореллы *Chlorella vulgaris* Beijer, выращенной на среде, не содержащей токсических веществ (контроль) и тестируемых проб, где эти вещества могут присутствовать (опыт):

поверхностные пресные, грунтовые, питьевые, сточные воды, водные вытяжки из почвы, осадки сточных вод и отходы производства и потребления. В нашем случае тестируются исходная смесь органических отходов, компостная смесь в динамике процесса компостирования и дигестат после анаэробного сбраживания. Измерение оптической плотности суспензии водорослей позволяет оперативно контролировать изменение численности клеток в контрольном и опытном вариантах острого токсикологического эксперимента, проводимого в специализированном многокюветном культиваторе. Критерием токсичности является 20% и более подавление роста или 30% и более стимуляция роста культуры водорослей, выращиваемой в течение 22 часов.

Для проведения биотестирования на тест-культуре водорослей необходимо:

1. Дистиллированная вода;
2. Культивационная вода;
3. Тест-культура водорослей хлореллы *Chlorella vulgaris* Beijer;
4. Спектрофотометр ПЭ-5300ВИ (Санкт-Петербург, Россия);
5. Кюветы толщиной 10 мм;
6. Культиватор КВ-05;
7. Культиватор КВМ-05;
8. Марля;
9. Среда Тамия 50%;
10. Химический стакан на 100 мл;
11. Флаконы пенициллиновые;
12. Полиэтиленовые крышки;

### *Приготовление среды Тамия (50%)*

В 1 л воды растворяется 2,5 г нитрата калия ( $\text{KNO}_3$ ), 1,25 г сульфата магния семиводного ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 0,625 г фосфата калия двухзамещенного трехводного ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), 0,0015 г железа лимоннокислого (растворять при кипячении), 0,5 мл раствора микроэлементов А и 0,5 мл раствора микроэлементов Б.

### *Приготовление раствора микроэлементов А*

В 1 л воды растворяется 2,86 г борной кислоты ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), 1,81 г хлорида марганца четырехводного ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), 0,222 г сульфата цинка пятиводного ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).

### *Приготовление раствора микроэлементов Б*

В 1 л воды растворяется – 17,64 г оксида молибдена ( $\text{MoO}_3$ ), 22,96 г ванадата аммония ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ) (растворять при нагревании)

Каждый раствор отдельно стерилизуется кипячением в течение 30 минут, плотно закрывается и хранится в холодильнике не более 3 месяцев при температуре от 2 до 4 °С.

### *Проведение биотестирования*

Для биотестирования используется чистая культура водоросли *Chlorella vulgaris*, находящаяся в экспоненциальной стадии роста (через одни сутки после посева в культиватор КВ-05). Перед биотестированием культура водоросли *Chlorella vulgaris*, выращенная на 50%-ной среде Тамия в культиваторе КВ-05 (Рисунок 10), профильтровывается через 4 слоя марли и разбавляется средой Тамия 50% до оптической плотности  $D=0,125 \pm 0,005$ . Регистрация оптической плотности культуры тест-объекта проводится с помощью спектрофотометра ПЭ-5300ВИ (Рисунок 15) в кювете толщиной 10 мм при длине волны 670 нм.



Рисунок 15. Спектрофотометр ПЭ-5300ВИ

Культура водорослей в объеме 2 мл смешивается с 48 мл тестируемой вытяжки в химическом стакане на 100 мл. Далее содержимое стакана разливается по 6 см<sup>3</sup> в пенициллиновые флаконы в трех кратной повторности, включая контрольную пробу с культивационной водой. Все флаконы закрываются чистыми полиэтиленовыми крышками и делаются отверстия диаметром около 6 мм, для обеспечения оптимального газообмена со средой и предотвращения излишнего испарения культуральной жидкости. После этого пенициллиновые флаконы устанавливаются в культиватор КВМ-05 (Рис. 16) при температуре  $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$  и средней интенсивности света – 60 Вт/м<sup>2</sup>. Флаконы загружаются в приостановленную кассету по ходу ее вращения, т.е. против часовой стрелки.



Рисунок 16. Культиваторы КВМ-05 и КВ-05

Измерение оптической плотности суспензии водорослей проводится через 22 часа после культивирования на спектрофотометре в кювете толщиной 10 мм, при длине волны 670 нм. О степени острого токсического воздействия тестируемой воды на водоросли судят по разнице величины оптической плотности тест-культуры в контрольных и опытных вариантах после 22 часов выращивания в культиваторе KBM-05. С этой целью для каждого опытного образца по результатам трех параллельных определений вычисляют среднее значение оптической плотности для каждого варианта.

$$X_i = \frac{(x_1+x_2+x_3+...x_n)}{n},$$

где  $X_i$  - среднее значение оптической плотности в n-ом параллельном эксперименте, n – количество параллельных определений.

По полученным результатам заполняется таблица 7 и строится столбчатая диаграмма (аналогично Рис. 8), где по оси Y откладываются цифровые значения, по оси X откладываются наименования образца.

Таблица 7. Данные оптической плотности тест-культуры водорослей

№	Шифр пробы	Повторности	Оптическая плотность тест-культуры	Ср. значение оптической плотности тест-культуры
1	АС	1.1.		
		1.2.		
		1.3.		
2	1КС	2.1.		
		2.2.		
		2.3.		
3	2КС	3.1.		
		3.2.		
		3.3.		
4	3КС	4.1.		
		4.2.		
		4.3.		
5	Контроль	5.1.		
		5.2.		
		5.3.		

## 8. Биотестирование объектов с использованием семян редиса красного с белым кончиком *Raphanus sativus* (ISO 11269-2)

Принцип методики [21] основан на оценке влияния водного экстракта или водных растворов на интенсивность прорастания семян редиса *Raphanus sativus* (Сорт «Красный с белым кончиком»).

Для проведения биотестирования на редисе необходимо:

1. Дистиллированная вода;
2. Культивационная вода;
3. Чашки Петри;
4. Диски фильтровальной бумаги;
5. Семена редиса;
6. Водная вытяжка;
7. Линейка.

Опыт проводится в трехкратной повторности. В чашки Петри раскладываются диски фильтровальной бумаги диаметром 9 см. В каждую чашку равномерно вносятся по 10 семян, затем заливаются по 5 мл исследуемых вытяжек или исследуемых растворов (Рис. 17). В качестве контроля используют дистиллированную воду или культивационную воду, в зависимости от того на какой воде были приготовлены растворы или водные вытяжки. Уровень жидкости в чашках должен быть ниже поверхности семян. Чашки закрываются и оставляются при температуре 20 °С. Через 3 суток измеряется длина корней проростков. У не проросших семян длину корня принимают равной нулю.

Уровень фитотоксичности (Т,%) рассчитывается по следующей формуле:

$$T = \frac{X_{\text{контр}} - X_{\text{оп}}}{X_{\text{контр}}} * 100$$

где  $X_{\text{контр}}$  – среднее значение контроля;  $X_{\text{оп}}$  – среднее опытное значение;  
Т (%) – уровень фитотоксичности.

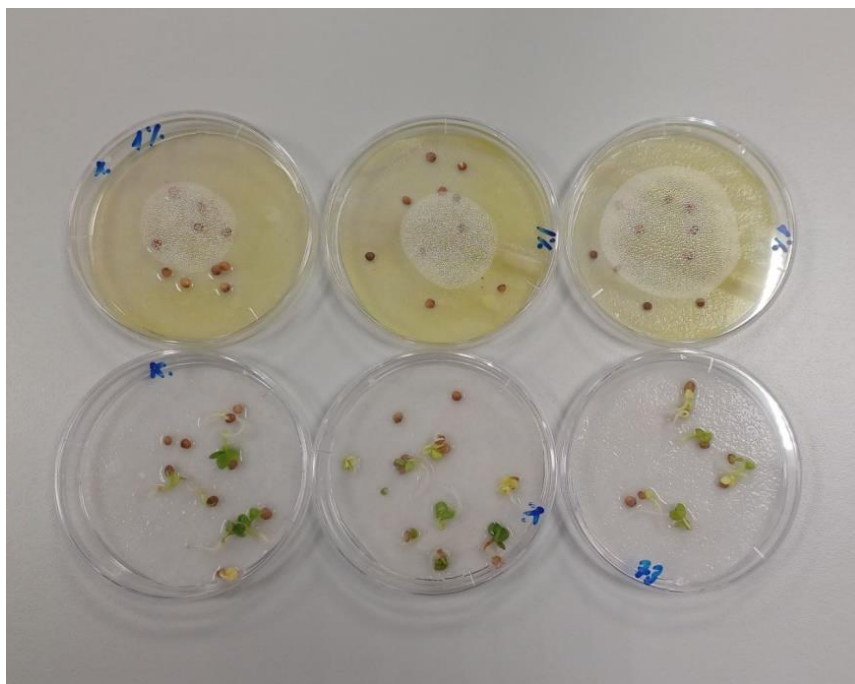


Рисунок 17. Чашки Петри с редисом

По полученным результатам заполняется таблица 8 и строится столбчатая диаграмма (аналогично Рис. 8), где по оси Y откладываются полученные уровни фитотоксичности, по оси X откладываются наименования образца.

Таблица 8. Данные по биотестированию водных вытяжек с использованием семян редиса

№	Шифр пробы	Среднее опытное значение	Т, %
1	АС		
2	1КС		
3	2КС		
4	3КС		
5	Контроль		

## **ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ ОТЧЁТА**

В конце проделанной работы необходимо подготовить отчёт, который должен состоять из следующих пунктов:

1. Титульный лист
2. Содержание
3. Объекты и методы исследования
4. Результаты и обсуждения.
5. Выводы

Примечание: В пункт 4 необходимо включить все таблицы и диаграммы, полученные в процессе выполнения экспериментов. В выводах необходимо отразить ваши предположения, объясняющие полученные результаты.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чернова Р.К., Козлова Л.М., Шестопалова Н.Б., Рьянова Ю.О. Тест-методы определения некоторых органических токсикантов в водных средах (обзор) // Изв. Саратов. ун-та Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2008. №2.
2. Курочкина Г.Н. Физико-химическое исследование раннего загрязнения системы почва-растение органическими токсикантами // МНИЖ. 2014. №10-1 (29).
3. Гладких В.Д. Фосфорорганические соединения. Клиника, диагностика и лечение / под ред. проф. В.Д. Гладких — М.: Комментарий, 2019. 192 с.
4. Цибарт, А.С. Полициклические ароматические углеводороды в почвах: источники, поведение, индикационное значение (обзор) / А.С. Цибарт, Геннадиев А.Н. // Почвоведение. 2013. № 7. 788 с.
5. Никифорова Е.М., Алексеева Т.А. Полициклические ароматические углеводороды в почвах придорожных экосистем Москвы // Почвоведение. 2002. № 1. 47–58 с.
6. Янин В.С. Основы экологической токсикологии: учеб. пособие – 4-е Изд., испр. и доп. – Пенза: ПГУАС, 2014. 196 с.
7. Заболотских В.В. Основы токсикологии: учебно-методическое пособие / В.В. Заболотских – Тольятти: ТГУ, 2009. 643 с.
8. Шурубор Е.И. Полициклические ароматические углеводороды в системе «почва–растение» района нефтепереработки (Пермское Прикамье) // Почвоведение. 2000. № 12. 1509-1514 с.
9. Папуниди К.Х. Микотоксины (в пищевой цепи): монография / К.Х. Папуниди, М.Я. Трemasов, В.И. Фисинин, А.И. Никитин, Э.И. Семёнов. – 2-е изд., перераб. и доп. – Казань: ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 2017. 188 с.
10. Pleadin J., Frece J., Markov K. Mycotoxins in food and feed //Advances in food and nutrition research. 2019. Т. 89. 297-345 с.

11. ФР.1.39.2007.03221 Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний.
12. Смирнова В.М. и др. Токсикология: промышленные и экологические аспекты: учеб. пособие / Нижегород. гос. техн. ун-т им. Р.Е. Алексеева. – Нижний Новгород, 2019. 240 с.
13. Звягинцева А.В., Павленко А.А. Основы токсикологии: учеб. Пособие /А.В. Звягинцева, А.А. Павленко. Воронеж: ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный технический университет», 2012. 251 с.
14. Улахович Н.А. и др. Экоотоксиканты: Учебно-методическое пособие для лекционного курса «Химия в экологии» / Н.А. Улахович, М.П. Кутырева, Э.П. Медянцева, С.С. Бабкина. – Казань: Издательство Казанского государственного университета, 2010. 56 с.
15. Теплая Г.А. Тяжелые металлы как фактор загрязнения окружающей среды (обзор литературы) // Астраханский вестник экологического образования, №1(23), 2013.
16. Медведев И.Ф., Деревягин С.С. Тяжелые металлы в экосистемах / Саратов: «Ракурс», 2017. 178 с.
17. ГОСТ 12.0.003-74. Система стандартов безопасности труда. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация. М: Изд-во стандартов, 1974.
18. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04 (ПНД Ф 16.1:2:3.7-04) Методика измерений оптической плотности культуры водоросли Хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления.
19. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.13-06 (ПНД Ф 16.1:2:3.10-06) Методика определения токсичности отходов, почв, осадков сточных вод, сточных, поверхностных и грунтовых вод методом биотестирования с

- использованием равноресничных инфузорий *Paramecium Caudatum Ehrenberg*.
20. ГОСТ 26423-85. Почвы. Методы определения удельной электрической проводимости, рН и плотного остатка водной вытяжки. – М., 1985. 7 с.
  21. ISO 11269-2 Determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants. [Incorporating corrigendum, June 2009].
  22. Автоматизация процесса анаэробного сбраживания органических отходов / И.Х. Гайфуллин, Б.Г. Зиганшин, А.И. Рудаков, Ю.Х. Шогенов // Агроинженерная наука XXI века: Научные труды региональной научно-практической конференции, Казань, 18 января 2018 года. – Казань: Казанский государственный аграрный университет, 2018. 339-343 с.
  23. Ульянова, О.А. Гумификация коры разных видов деревьев и удобрительных композиций на ее основе / О.А. Ульянова, В.В. Чупрова // Агрохимия. – 2016. № 5. 11-20 с.
  24. Гузенко К.В. Компостирование органических отходов // Инновационный вектор развития науки: сборник. 2014. 15 с.
  25. Промышленное компостирование органических отходов как фактор развития зеленой экономики / Т.Н. Ашурбекова, К.Ю. Козенко, Д.С. Аваданов, М.Р. Магомедов // Известия Дагестанского ГАУ. 2019. № 3(3). 13-18 с.
  26. Андреева И.В., Байбеков Р.Ф., Злобина М.В. Фиторемедиация почв, загрязненных тяжелыми металлами // Природообустройство. 2009. №5.
  27. Гончарова, Н.В. Фиторемедиация: новая стратегия использования растений для очистки почвенного покрова / Н. В. Гончарова // Экологический вестник. 2010. № 4. 5-13 с.
  28. Сизенцов А.Н., Сальникова Е.В. Бактериальная ремедиация и перспективы ее использования (обзор) // Экосистемы. 2024. №38. 150-165 с.

29. Бабаев Э.Р., Муштагова Ф.Г. Применение микроорганизмов в процессах биоремедиации // НефтеГазоХимия. 2024. №3-4. 49-55 с.