

Экологически безопасная биоремедиация почвы и очистка воды *in situ* от продуктов деструкции отравляющих веществ

© 2016. А. А. Янковская¹, офицер отдела, И. В. Филимонов², к. т. н., с. н. с.,
Н. В. Завьялова², д. б. н., профессор, г. н. с.,
А. Н. Голипад², к. т. н., начальник управления,
В. А. Ковтун², к. х. н., доцент, начальник,

¹ Федеральное управление по безопасному хранению
и уничтожению химического оружия,
115487, Россия, г. Москва, ул. Садовники, д. 4 а,

² Федеральное государственное бюджетное учреждение
27 Научный центр Министерства обороны Российской Федерации,
105005, Россия, г. Москва, Бригадирский переулок, д. 13
e-mail: fubhuho@yandex.ru

Для санации территорий бывшего производства химического оружия, а также при ликвидации последствий деятельности объектов по хранению и уничтожению химического оружия предлагается использование биотехнологических способов. Биотехнологические способы ремедиации почвы и очистки воды предусматривают применение бактерий и продуцируемых ими ферментов, фиторемедиацию, грибковые технологии, использование ила и др. Благодаря применению микроорганизмов-деструкторов или их консорциумов и продуцируемых ими ферментов, возможно проведение обеззараживания значительных объёмов и концентраций загрязнителей, без накопления токсичных вторичных продуктов за счёт полной их минерализации. В зависимости от масштаба и степени загрязнения возможны два основных направления санации загрязнённых территорий: 1) снятие верхнего слоя грунта для переработки на специальных установках – реакторах (*ex situ*); 2) разрушение вредных веществ непосредственно в окружающей среде (*in situ*). Проведённые комплексные химико-биологические исследования по изучению влияния на окружающую среду продуктов деструкции отравляющих веществ и изучению способов биодеструкции этих продуктов позволили разработать «дорожную карту» биотехнологической экологически безопасной санации *in situ*, представляющую собой пошаговый порядок действий, который может быть использован при крупномасштабной биоремедиации почвы и очистке воды. При формировании «дорожной карты» большое значение имели данные ранее проведенных исследований по разработке схем получения экобиопрепаратов на основе ферментов и штаммов микроорганизмов-деструкторов отравляющих веществ и продуктов их деструкции, принципиальных технологических схем и стадий биоремедиации почвы и очистки воды *in situ* в зависимости от степени загрязнения продуктами деструкции отравляющих веществ.

Ключевые слова: биоремедиация почвы и очистка воды, микроорганизмы-деструкторы, биокатализаторы, пошаговый порядок действий.

Ecologically safe bioremediation of soil and water purification *in situ* from chemical warfare agents destruction products

A. A. Yankovskaya¹, I. V. Filimonov², N. V. Zavyalova²,
A. N. Golipad², V. A. Kovtun²,

¹ Federal Directorate for Safe Storage and Destruction of Chemical Weapons,
4 a St. Sadovniki, Moscow, Russia, 115487,

² 27 Research center of the Russian Ministry of Defense,
13 Pereulok Brigadirskiy, Moscow, Russia, 105005,
e-mail: fubhuho@yandex.ru

It is suggested the use biotechnological methods for readjustment of the territories of the former production of chemical weapons, as well, as at eliminating the effects of chemical weapons storage and destruction facilities. Biotechnological methods for soil remediation and water treatment include the use of bacteria and enzymes produced by them, phytoremediation, fungal technologies, using sludge, and others. Due to the use of microorganisms-destructors or their consortia, and the enzymes produced by them, it is possible to decontaminate significant volumes and concentration

of pollutants, without accumulation of toxic by-products due to their full mineralization. Depending on the scale and extent of pollution, there are two main ways of remediation of contaminated areas: 1) removing the top layer of soil to be processed at specialized facilities – reactors (*ex situ*); 2) direct destruction of harmful substances in the environment (*in situ*). Comprehensive chemical and biological studies on the environmental impact of the degradation products of chemical agents and studying the ways of biodegradation of these products allowed us to develop a «road map» for biotechnological environmental readjustment *in situ*. It is a step-by-step procedure that can be used in large-scale bioremediation of soil and in water treatment. Figures of the previous studies on development of schemes for ecobiological products based on enzymes and strains of microorganisms-destroyers of toxic substances and their degradation products, of technological schemes and stages of bioremediation of soil and water treatment *in situ*, depending on the degree of contamination by products of toxic substances degradation were very important during the formation are of great importance in forming the «road map».

Keywords: bioremediation of soil and water purification, microorganisms-destruction, biocatalysts, set out procedures.

Федеральной целевой программой «Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации» [1] и Санитарными правилами СП 2.2.1.2513-09 [2] предусмотрено проведение работ по санации загрязнённых территорий, на которых были расположены объекты по бывшему производству, хранению и уничтожению химического оружия после завершения всех работ и выведения их из эксплуатации. Однако указаний об использовании определённых, конкретных технологий по очистке территорий данные документы не содержат. Поэтому разработка конкретных технологий и выбор наиболее перспективных из них является важной задачей на этапе завершения процесса уничтожения химического оружия.

Необходимость разработки технологий по санации загрязнённых территорий связана с тем, что загрязнения могут быть причиной таких последствий как торможение хода почвообразовательных процессов и самоочищения почвы; снижение урожайности; накопление вредных веществ в окружающей среде, в водных бассейнах, в растениях, которые прямо или опосредованно могут оказывать влияние на здоровье человека.

Следовательно, при проведении мероприятий по санации загрязнённых территорий необходимо обязательно учитывать результаты наблюдений, оценки и прогноза, оформленные в виде карт рассеивания и распространения контролируемых соединений в компонентах природной среды (почве, воде, воздухе), с указанием уровней загрязнения, характера и степени фонового и специфического загрязнения.

Для обеззараживания загрязнённых территорий могут быть использованы физические, химические, физико-химические и биотехнологические способы или их комбинации. Биотехнологические способы, методы и технологии очистки и восстановления почвы и

воды предусматривают применение бактерий или продуцируемых ими ферментов, фиторемедиацию, грибковые технологии, использование ила и др.

В зависимости от масштаба и степени загрязнения возможны два основных направления санации загрязнённых территорий: 1) снятие верхнего слоя грунта для переработки на специальных установках – реакторах (*ex situ*); 2) разложение вредных веществ непосредственно в окружающей среде (*in situ*).

Согласно оценкам экспертов биотехнологии ремедиации почв и очистки воды значительно экономичнее традиционных физико-химических способов. Применение биокатализаторов на основе клеточных деструкторов примерно в 50 раз дешевле принятых химических или физических методов. Биотехнологии позволяют решить проблему вторичных загрязнений, так как разрушение токсичных ксенобиотиков проводится без накопления вредных вторичных продуктов. Кроме этого, благодаря использованию ферментов, специальных анаэробных или аэробных штаммов микроорганизмов-деструкторов или их консорциумов, возможно, осуществить обеззараживание значительных объёмов и концентраций загрязнителей, а также больших территорий. Бионейтрализация продуктов химического разрушения отравляющих веществ (ОВ) делает процесс их уничтожения необратимым за счёт минерализации загрязнителей.

Проведённые нами комплексные химико-биологические теоретические исследования по изучению влияния продуктов химического разрушения ОВ на окружающую среду позволило разработать «дорожную карту» биотехнологической экологически безопасной санации почвы и очистки воды *in situ*.

Создание «дорожной карты» базировалось на анализе данных научной литературы за последние 30 лет в области получения био-

препаратов (биокатализаторов) и разработке биотехнологий очистки и восстановления почвы и воды, загрязнённых токсичными химикатами, в том числе ОВ и продуктами их химического разрушения; выборе ферментов и штаммов микроорганизмов, обладающих высокой деструктирующей способностью и достаточной толерантностью к фосфорорганическим отравляющим веществам (ФОВ), люизиту, иприту и продуктам их разрушения; анализе и выборе методов аналитического контроля процессов биодеградации загрязнителей в почве и воде [3].

Важное значение при формировании «дорожной карты» имели данные, полученные при ранее проведённых исследованиях по обоснованию направлений технологических способов и разработке схем получения экобиопрепаратов на основе ферментов и штаммов микроорганизмов-деструкторов ФОВ иприта, люизита и продуктов их деструкции, разработке технологий и принципиальных технологических схем биоремедиации (очистки и восстановления) почвы и воды с помощью этих биопрепаратов, разработке стадий технологий биоремедиации почвы и очистки воды в биореакторах и *in situ* [4, 5].

Разработанная «дорожная карта», приведённая на рисунке, представляет собой пошаговый порядок действий при использовании биотехнологий для экологически безопасного обеззараживания почвы и очистки воды *in situ*.

По нашему мнению, прежде чем приступить к обеззараживанию почвы и очистке воды *in situ* при помощи биотехнологий, следует провести тщательный анализ территории, мест бывшего производства, хранения, уничтожения и исследования ОВ; установить тип токсичного соединения, обнаруженного на загрязнённой территории, его концентрацию, глубину проникновения токсиканта в почву; тип почвы, влажность, рН и процентное содержание гумуса; предполагаемое количество осадков, выпадаемых на данной территории; наличие и глубину залегания грунтовых вод; определить загрязнённость вод. То есть провести комплексное обследование и составить характеристику загрязнённой территории. Далее необходимо отобрать пробы с загрязнённой территории и установить жизнеспособность природных микроорганизмов.

Такое обследование является **первым шагом** в порядке действий при проведении биоремедиации почвы и очистки воды. По его результатам должны быть составлены карты-схемы с отображением информации (выяв-

ленных границ распределения специфических загрязняющих веществ на исследуемых территориях и их концентрации); разработаны исходные данные для выполнения комплекса мероприятий по приведению в безопасное состояние загрязнённых территорий; принято решение о проведении биологической очистки – биоремедиации; разработан алгоритм проведения биологической очистки; осуществлён выбор технологической операции (в зависимости от установленного количественного показателя загрязнения территории), которая будет использована для биоремедиации почвы и очистки воды.

Одновременно проводится подготовка к проведению биоремедиации почвы и очистки воды, которая заключается в бурении скважин для введения питательной среды (веществ) и отборе проб на загрязнённой территории.

Биоремедиация загрязнённых территорий может осуществляться в процессе следующих основных технологических операций:

- при слабом загрязнении – обработка почвы и воды *in situ*, путём стимулирования роста природных микроорганизмов-деструкторов, аэрации и введения питательных веществ;
- при среднем загрязнении – внесение в почву и воду *in situ* биокатализаторов на основе ферментов, суспензий или лиофилизированных бактерий-деструкторов, иммобилизованных ферментов и бактерий-деструкторов или консорциумов микроорганизмов;
- при сильном загрязнении – обработка почвы и воды *in situ* иммобилизованными ферментными препаратами с последующим внесением иммобилизованных бактерий-деструкторов, устойчивых к большим концентрациям экотоксикантов.

Необходимо отметить, что микроорганизмы-деструкторы достаточно широко распространены в почве и донных отложениях водоёмов, ранее загрязнённых экотоксикантами. В этих экологических нишах создаются все необходимые условия для их роста, а именно, наличие кислорода, углерода, азота, фосфора. Кислород играет роль акцептора электронов и источника энергии в процессах клеточного метаболизма.

Если загрязняющие соединения, попавшие в почву или воду, не являются сильно токсичными, применение обычных агротехнических приёмов с внесением необходимых минеральных удобрений будет способствовать быстрому самоочищению.

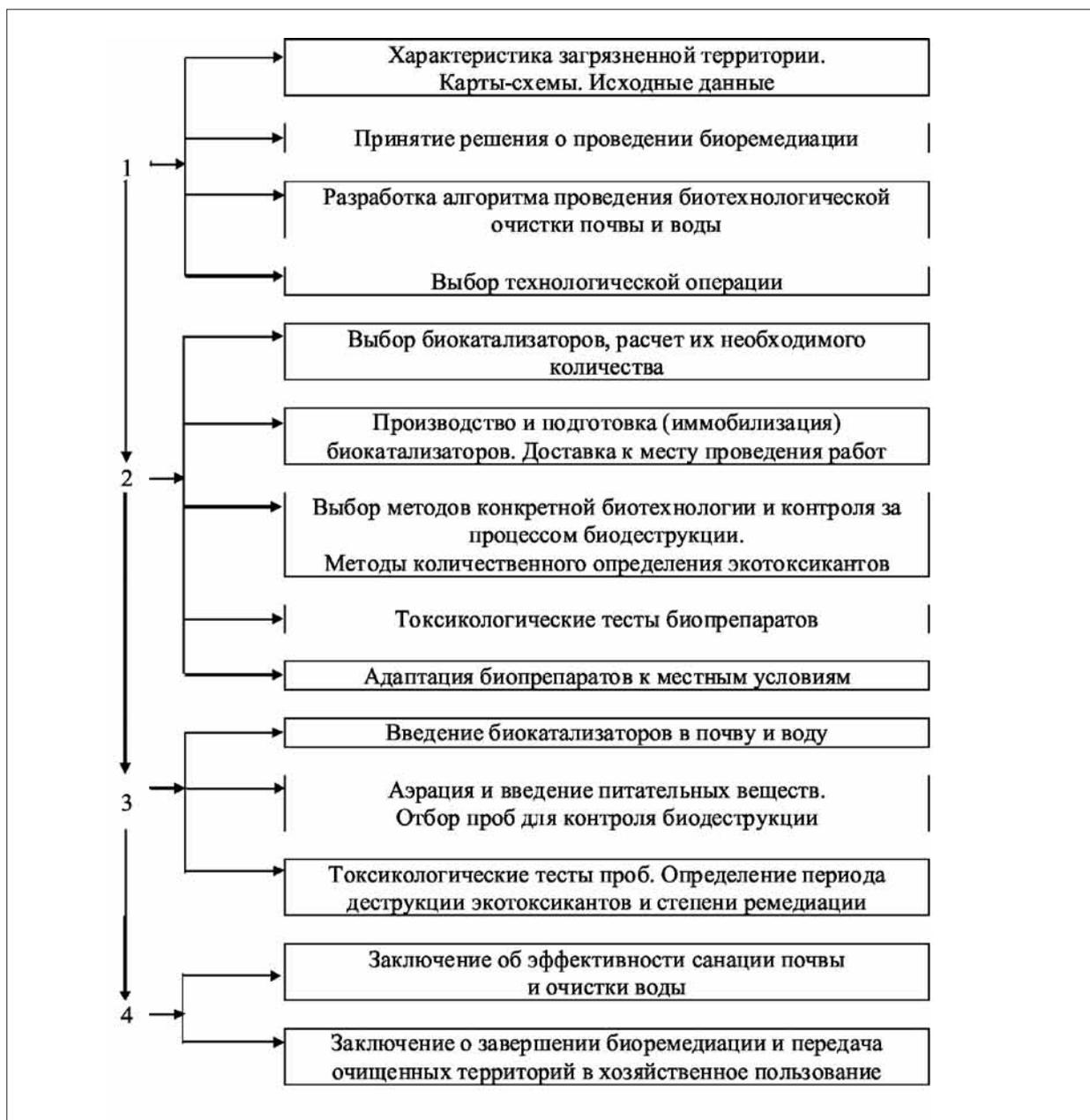


Рис. «Дорожная карта» – порядок действий при санации почвы и очистке воды *in situ*

Когда же загрязнения высокотоксичные (при среднем и сильном загрязнении) и глубина проникновения ксенобиотиков значительна, процессы самоочищения не работают, необходимо использование специально разработанных технологий биоремедиации и биопрепаратов как на основе ферментов, так и иммобилизованных клеток бактерий-деструкторов или их консорциумов.

Широкому использованию препаратов на основе иммобилизованных ферментов для санации почвы и очистки воды способствуют следующие их качества: гидролитический ферментативный процесс может быть осуществлён в нейтральных, слабнокислых и слабощелоч-

ных средах; скорости реакций минерализации весьма широки, в силу чего могут быть достигнуты высокие степени конверсии в ограниченные промежутки времени; ферментативная нейтрализация может быть важным звеном любой экологически безопасной технологии детоксикации нервнопаралитических ядов и продуктов их разложения; ферменты совместимы с любыми биологическими системами, что обуславливает экологическую безопасность самого процесса ферментативного разрушения продуктов деструкции ОБ, которыми могут быть загрязнены почва и вода.

Использование микроорганизмов, полностью утилизирующих токсичные вещества

и способных расти при высоких концентрациях ксенобиотиков, является весьма важным в биотехнологии санации почвы и очистки воды *in situ*. Скорость и эффективность такого биоразрушения в значительной степени определяется свойствами выбранных микроорганизмов-деструкторов. Среди известных путей получения препаратов клеток-деструкторов используют способ накопительной культуры и генно-инженерные методы. Большинство известных в настоящее время бактерий-деструкторов продуктов разрушения отравляющих веществ выделены методом накопительных культур из окультуренных почв, сточных вод и активного ила.

Вторым шагом в порядке действий при проведении биоремедиации почвы и очистки воды *in situ* служит обоснование и выбор биотехнологий и подбор биокатализаторов на основе штаммов-деструкторов и ферментов для конкретных загрязнителей. При этом определяется, будут ли использованы природные микроорганизмы или биокатализаторы; устанавливается жизнеспособность естественной биоты; проводится подбор микроорганизмов и растений для восстановления окружающей среды; создаются производственные мощности для наработки необходимого количества биокатализаторов; производится расчёт и наработка биокатализаторов и их иммобилизация; разрабатываются рекомендации по технологическим параметрам производства биокатализаторов; определяется степень биodeградации загрязнителей; определяется количество необходимых питательных веществ для природных микроорганизмов и штаммов-деструкторов. Биокатализаторы на основе иммобилизованных клеток-деструкторов подбираются из музея культур микроорганизмов с более высокими показателями продуктивности, метаболической стабильности и жизнеспособности, что позволит более эффективно использовать их в процессе биотехнологической санации почвы и очистки воды. Ферменты могут быть использованы как в иммобилизованном, так и в нативном виде.

После проведения биоремедиации почвы и очистки воды при помощи биокатализаторов на основе ферментов и непатогенных микроорганизмов-деструкторов, трансформирующих ксенобиотики в менее токсичные, более гидрофильные соединения, в дальнейшем возможно использование растений, имеющих высокий фиторемедиационный потенциал. Такие растения могут осуществлять фитоэкстракцию и фитотрансформацию, т.е.

удалять продукты биodeградации из загрязнённой среды. Растения, накопившие в себе продукты фитобиоремедиации, уничтожают на специальной установке с последующим захоронением золы.

В качестве фиторемедиаторов хорошо зарекомендовали себя подсолнечник, сорго, суданская трава и водный гиацинт. Полученные к настоящему времени результаты демонстрируют широкие возможности метода биоремедиации почвы и очистки воды с помощью растений и ассоциированных с ними микроорганизмов [6].

Проведённые предварительные расчёты показали, что для обезвреживания и очистки загрязнённых территорий *in situ* потребуется небольшое количество фермента (4,0 мг с активностью 200 Ед/мл на 1 кв.м загрязнённой площади) [7]. Так, для очистки 1 га площади почвы, загрязнённой продуктами деструкции фосфорорганических отравляющих веществ необходимо всего 40,0 г иммобилизованного (на пшеничной соломе) фермента органофосфатгидролазы (His₆-ОФГ). При этом себестоимость производства фермента для очистки 1 га составит около 80 тыс. рублей. Стоимость такой очистки с учётом затрат на оплату труда и затрат по эксплуатации техники составит не более 200 тыс. рублей (в ценах 2014 г.). Стоимость биологической очистки с использованием катализаторов на основе микроорганизмов-деструкторов будет приблизительно в 5–7 раз выше, так как количество клеток бактерий для получения препаратов необходимо больше по сравнению с ферментом.

За рубежом опыт успешного применения биопрепаратов *in situ* для очистки загрязнённых площадей на полигонах и опасных объектах показал, что, например, препарат DBS Plus (лиофилизированные культуры бактерий – нативный фермент), производимый Flow Laboratories (Inglewood, CA) должен вноситься в количестве 28 кг на 1 га, а препарат Detoxsol (мутантные бактерии в смеси с питательными веществами и стимуляторами роста), производимый Sybron Biochemical (Birmingham, NJ, Salem, VA), – в количестве 400 кг на 1 га.

Третьим шагом в порядке действий при проведении биоремедиации почв и очистки вод *in situ* является введение (внесение в почву распылением и закачка в воду через скважины) биокатализаторов; периодическое введение питательных веществ орошением на почву и закачка через скважины; периодическая аэрация взрыхлением; отбор проб

с различной глубины; проведение контроля процесса биоремедиации почвы и очистки воды; проведение токсикологических тестов проб; определение периода разрушения загрязнителей почвы и воды и степени биоремедиации почвы и очистки воды аналитическими методами. Питательные вещества и кислород закачивают через специальные скважины на глубину до 40 см (глубину обитания почвенных микроорганизмов). При сильном и среднем загрязнении, кроме питательных веществ и кислорода, добавок для ускорения разложения токсичных химикатов, активирующих метаболические процессы растений и поддержания необходимого рН среды, вносят биокатализаторы – иммобилизованные ферменты, бактерии-деструкторы или консорциумы микроорганизмов.

Закачку питательных веществ, кислорода и биокатализаторов можно проводить многократно в течение нескольких дней или недель (при сильном загрязнении, если за одну обработку не достигнуто желаемого эффекта).

Внесение биопрепаратов в почву проводят с аэрированными на специальной установке грунтовыми водами по методу Biox-S.

В случаях наличия загрязнений люизитом или продуктами его деструкции необходимо проведение обработки почвы и воды биоокисляющими бактериями, которые переведут загрязнение, содержащие мышьяк, в растворимую форму (в раствор) и сконцентрируют его в своих клетках.

Для определения полноты биодegradации, времени протекания процесса биоремедиации, жизнеспособности микроорганизмов-деструкторов и естественной биоты производится отбор проб через специальные скважины. Пробы анализируются, результаты заносятся в специальные протоколы. По результатам аналитического контроля процесса биоремедиации почвы и очистки воды токсикологическим тестом принимается решение о продолжении или завершении процесса ремедиации при помощи биопрепаратов. Период очистки может варьировать от нескольких часов и дней до нескольких недель, и будет зависеть от разрушающей способности использованных культур микроорганизмов, их консорциумов или иммобилизованных биокатализаторов, а также от степени загрязнённости территории.

Завершающим моментом во всех случаях биоремедиации почвы и очистки воды является токсикологическая оценка качества обезвреживания, которая проводится методами

биотестирования с использованием живых организмов [8–11].

После завершения процесса деструкции экотоксикантов, когда степень загрязнённости достигает норм ПДК или почва и вода полностью освобождаются от загрязнителей, содержание внесённых в почву бактерий резко снижается.

Четвёртый шаг в порядке действий при проведении биоремедиации *in situ* – составление заключения об эффективности проведённой санации; выдача заключения о завершении процесса биоремедиации; передача очищенных территорий в хозяйственное пользование.

В связи с тем, что информация о конкретных разработках или технологиях *in situ*, а также предложения по порядку выполнения действий по биоремедиации почвы и очистки воды в научной литературе отсутствует (в опубликованных статьях указываются только стратегия и возможные направления работ в полевых условиях), необходимо предусмотреть обязательное проведение анализа ситуации и согласование с властями различного уровня; оценку факторов внешней среды, влияющих на процессы биодegradации; анализ лабораторных и полевых работ; мониторинг состояния; заключение об эффективности работ в соответствии с существующими нормативами.

Заключение

Проведённые исследования и разработанная «дорожная карта» позволяют рекомендовать комплексную экологически безопасную биологическую очистку для санации загрязнённых территорий, мест бывшего производства, хранения и уничтожения отравляющих веществ.

С экономической точки зрения предлагаемые биологические способы разрушения продуктов деструкции ОВ выгоднее имеющихся физико-химических технологий, не предполагают крупных единовременных капиталовложений, а связанные с ним издержки могут быть распределены на несколько лет. Возможна биотехнологическая санация обширных территорий, что способствует сохранению и оздоровлению окружающей среды. Это наиболее эстетичная и перспективная технология очистки природных сред.

Результаты проведённого исследования могут быть реализованы в технологиях промышленного получения биопрепаратов (биокатализаторов), на основе ферментов и

микроорганизмов-деструкторов продуктов химического разрушения фосфорорганических отравляющих веществ, иприта, люизита, которые возможно использовать в технологиях обеззараживания, восстановления почвы и очистки воды *in situ* на загрязнённых территориях. «Дорожная карта» может быть использована для крупномасштабного обеззараживания почвы и очищения воды в местах бывшего производства, хранения и уничтожения отравляющих веществ.

Литература

1. Федеральная целевая программа «Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации», утверждённая Постановлением Правительства Российской Федерации от 21.03.1996 г. № 305 (в ред. Постановлений Правительства РФ от 24.10.2005 № 639, от 21.06.2007 № 392, от 29.12.2007 № 969, от 12.09.2008 № 679, от 09.12.2010 № 1005, от 29.11.2011 № 988, от 27.12.2012 № 1420).

2. Санитарные правила СП 2.2.1.2513-09 «Гигиенические требования к размещению, проектированию, строительству, эксплуатации и перепрофилированию объектов по уничтожению химического оружия, реконструкции зданий и сооружений и выводу из эксплуатации объектов по хранению химического оружия». 2009.

3. Завьялова Н.В., Филимонов И.В., Ефременко Е.Н., Холстов В.И., Янковская А.А. Биотехнологические методы и нейтрализующие средства для обеззараживания почв и очистки вод, загрязнённых экотоксикантами // Теоретическая и прикладная экология. 2014. № 4. С. 26–33.

4. Завьялова Н.В., Филимонов И.В., Ковтун В.А., Голипад А.Н., Петров С.В., Стяжкин К.К., Ковтун В.А., Ефременко Е.Н., Холстов В.И., Янковская А.А. Основные технологические операции и стадии биоремедиации почв и очистки вод *in situ* // Теоретическая и прикладная экология. 2014. № 4. С. 33–41.

5. Завьялова Н.В., Филимонов И.В., Ефременко Е.Н., Холстов В.И., Янковская А.А. Биокатализаторы на основе штаммов микроорганизмов и ферментов, обладающих повышенной способностью к разложению отравляющих веществ и продуктов их деструкции, в процессе очистки почв и вод // Теоретическая и прикладная экология. 2014. № 4. С. 42–50.

6. Анищенко Л.Н., Белясников И.А., Рудакова Т.А. Экологические аспекты фиторемедиации и рекультивации и использованием сосудистых растений и мохообразных // Теоретическая и прикладная экология. 2014. № 4. С. 122–127.

7. Сироткина М.С. Имобилизованные биокатализаторы для деструкции фосфорорганических соединений и продуктов их разложения: Автореф. ... дис. канд. хим. наук. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова. 2013. 26 с.

8. Авторское свидетельство 228210 /СССР/ Способ определения токсичности сточных вод, содержащих компоненты РТ // Г.П. Усов, Г.Н. Светлакова, Т.И. Тряхова, Л.И. Розанова, 1984.

9. Авторское свидетельство № 258499 /СССР/ Определение токсичности веществ по интенсивности потре-

бления растворенного кислорода микроорганизмами // Г.П. Усов, Г.Н. Светлакова, Т.И. Тряхова, 1985.

10. ОСТ В-84-2398-88. Биотестирование отраслевых сточных вод. Основные положения. 1988.

11. ОСТ В-84-2399-88. Биотестирование отраслевых сточных вод. Методы анализа. 1988.

References

1. The federal target program «Chemical weapons destruction in the Russian Federation», approved by RF Government Decree of 21.03.1996, № 305 (as amended. RF Government Decree of 24.10.2005 № 639 from 21.06.2007 № 392, from 29.12.2007 № 969, № 679 from 12.09.2008 from 09.12.2010 № 1005 from 29.11.2011 № 988 from 27.12.2012 № 1420) (in Russian).

2. Sanitary rules SP 2.2.1.2513-09 «Hygienic requirements for placement, design, construction, operation and conversion facilities for destruction of chemical weapons, reconstruction of buildings and facilities and destruction of chemical weapons storage facilities». 2009 (in Russian).

3. Zavyalova N.V., Filimonov I.V., Yefremenko Ye.N., Kholstov V.I., Yankovskaya A.A. Biotechnological methods and neutralizing agents for decontamination of soil and water treatment, polluted with ecotoxicants // Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya. 2014. № 4. P. 26–33 (in Russian).

4. Zavyalova N.V., Filimonov I.V., Kovtun V.A., Golipad A.N., Petrov S.V., Styazhkin K.K., Kovtun V.A., Yefremenko Ye.N., Kholstov V.I., Yankovskaya A.A. The main process steps and stages of bioremediation of soils and water purification *in situ* // Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya. 2014. № 4. P. 33–41 (in Russian).

5. Zavyalova N.V., Filimonov I.V., Yefremenko Ye.N., Kholstov V.I., Yankovskaya A.A. Biocatalysts based on strains of microorganisms and enzymes having an increased ability to degrade toxic substances and their degradation products during cleaning of soils and waters // Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya. 2014. № 4. P. 42–50 (in Russian).

6. Anishchenko L.N., Belyasnikov I.A., Rudakova T.A. Environmental aspects of phytoremediation and rehabilitation with the use of vascular facilities and bryophytes // Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya. 2014. № 4. P. 122–127 (in Russian).

7. Sirotkina M.S. Immobilized biocatalysts for destruction of organophosphorus compounds and their decomposition products: Avtoref. dis. kand. khim. nauk. M.: MGU im. M.V. Lomonosova. 2013. 26 p. (in Russian).

8. Author's Certificate 228210 / USSR / method for determining toxicity of waste water containing mercury components // G.P. Usov, G.N. Svetlakova, T.I. Tryakhova, L.I. Rozanova, 1984 (in Russian).

9. Copyright certificate № 258499 / USSR / toxicity of certain substances on the intensity of consumption of oxygen dissolved by microorganisms // G.P. Usov, G.N. Svetlakova, T.I. Tryakhova, 1985 (in Russian).

10. The OST-84-2398-88. Biotesting industrial wastewater. The main provisions. 1988 (in Russian).

11. The OST-84-2399-88. Biotesting industrial wastewater. Methods of analysis. 1988 (in Russian).