

## ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА ПОЧВ

УДК 631.4:577.4:502.7

### БИОТЕСТИРОВАНИЕ ГУМИНОВЫХ ПРОДУКТОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ РЕМЕДИАНТОВ (ОБЗОР)

© 2022 г. В. А. Терехова<sup>a</sup>, \*, Е. В. Федосеева<sup>b</sup>, М. И. Панова<sup>c</sup>, С. Н. Чуков<sup>d</sup>

<sup>a</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

<sup>b</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Ленинский пр., 33, Москва, 119071 Россия

<sup>c</sup>Сколковский институт науки и технологий,  
Московская область, Одинцовский район, Сколково, ул. Большой бульвар, 30с1, 143025 Россия

<sup>d</sup>Санкт-Петербургский государственный университет,  
Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034 Россия

\*e-mail: vtterekhova@gmail.com

Поступила в редакцию 05.01.2022 г.

После доработки 18.01.2022 г.

Принята к публикации 26.01.2022 г.

Наличие экспериментально обоснованной оценки ремедиационных свойств гуминовых продуктов (ГП) – важное условие их безопасного и эффективного использования. Дан анализ существующих подходов к биотестированию ГП, которые позволяют сделать вывод об эффективности детоксикации почв и сопредельных сред и обеспечении жизнеспособности биоценозов при их применении. Обсуждаются преимущества и недостатки традиционных подходов к биотестированию ГП в почвенных средах на основе широко известных реакций высших растений и микроорганизмов, а также возможности альтернативного тестирования с применением флуоресцентных методов и микротестирования ГП в водных и искусственных питательных средах. Результаты экспериментальной проверки ремедирующей способности ГП при биотестировании в средах, богатых органическими веществами, указывают на необходимость стандартизации условий количественной оценки их качества. Универсальной почвенной матрицей для первичной оценки ГП может служить стандартная искусственная почва (по ISO 11268-2). Для обобщающей характеристики качества ГП как потенциальных почвоулучшителей предлагается индекс ремедиации, рассчитываемый по данным химических, биоиндикационных и экотоксикологических исследований почвы, обработанной ГП.

*Ключевые слова:* гуматы, экология, ремедиация, детоксикация, химическое загрязнение, экологическое качество, индекс ремедиации

DOI: 10.31857/S0032180X22070103

#### ВВЕДЕНИЕ

Для обеспечения устойчивого функционирования природных экосистем проводится поиск действенных способов восстановления нарушенных биотопов, комплексная диагностика эффективности и безопасности проводимых мероприятий. Среди множества углеродсодержащих веществ, рекомендуемых для улучшения здоровья почв, доминирующее положение занимают гуминовые продукты (ГП). Прогнозируется, что к 2024 г. объем рынка ГП превысит 1 млрд долларов США [92]. Объяснение этому видят в том, что ГП используются во всем мире в качестве кондиционеров и ремедиантов почвы и наиболее востребованы в сельском хозяйстве для обработки пахотных земель [81].

ГП рекомендуются к практическому применению для разных целей. Благодаря своему составу и свойствам они легко включаются в естествен-

ные круговороты веществ и не только активируют рост и развитие живых организмов (в первую очередь, растений и почвенных микроорганизмов), но и способны иммобилизовать и трансформировать загрязняющие вещества [46, 82]. ГП широко доступны благодаря развитой производственной базе, достаточной для удовлетворения спроса на эти почвенные ремедианты, *a priori* считающиеся эффективными и экологически безопасными. ГП производят из разных сырьевых источников натурального происхождения [29, 48]. Согласно Биллингхэму [53], ГП – это материалы, которые часто продаются в виде почвенных добавок с или без сопутствующих питательных веществ для растений.

Восстановление под влиянием ГП экологических функций почв, загрязненных химическими веществами, представляет собой сложный физико-химический и биологический процесс, вклю-

чающий иммобилизацию (уменьшение биодоступности) токсикантов, изменение показателей продуктивности фитомассы и активности почвенного микробиома. Аналогичное действие ГП фиксируется и при изучении их влияния на водные экосистемы.

Вместе с тем воздействие ГП в большой степени зависит от природы исходного сырья, дозы и условий применения препарата, оцениваемого параметра. В ряде работ показано наличие ингибирующего эффекта ГП на активность почвенного микробиома [31]. При определенном уровне загрязнения токсикантами проявление положительного воздействия ГП в большой степени зависит от почвенных свойств. Так, при сильном загрязнении тяжелыми металлами (Cu 660, Zn 1100, Pb 650 мг/кг) агродерново-подзолистой почвы обработка равными дозами лигногумата (0.25%) образцов с разным содержанием органического углерода ( $C_{орг}$  3.86 и 1.30%) неодинаково сказалась на развитии тест-растений горчицы белой (*Sinapis alba*). Лигногумат в почве с низким содержанием органического углерода, загрязненной комплексом солей тяжелых металлов, не стимулировал рост растений [53].

Наличие экспериментально обоснованных универсальных схем оценки качества и ремедиационных характеристик – важное условие безопасного и эффективного использования ГП в природных средах. Неоднократно поднимался вопрос о необходимости сертификации ГП [48]. Известны разные способы и подходы к оценке качества ГП. Вещества, применяемые в природоохранных целях, подвергаются анализу в тест-системах, основанных на реакциях живых систем разного уровня организации. При анализе биологической активности ГП в почвенных, водных или искусственных средах отдается предпочтение тем или иным измеряемым показателям.

**Подходы к оценке эффективности и безопасности гуминовых продуктов в почвенных средах.** Как известно, гуминовые вещества (ГВ) способствуют формированию органо-минеральной матрицы, что обеспечивает структурную организацию почвы [7]. Положительное воздействие на агрофизические показатели происходит как напрямую, так и опосредованно через увеличение биологической активности почвенной биоты и растений [8, 14, 57], в связи с чем естественными и важными представляются исследования по оценке качества ГП, проводимые непосредственно в почвенной среде.

**Фитотестирование на высших растениях.** Наиболее доступной и распространенной оценкой ГП является проверка их детоксицирующей и фитостимулирующей способности по отношению к высшим растениям. В качестве доказательства поглощения ГП растениями приводятся

сведения о количественной оценке кинетики усвоения растениями препаратов, меченных тритием [13].

ГП обладают физиологической активностью по отношению к растениям. Эта активность ГП зачастую имеет гормоноподобный характер: стимулирование в низких концентрациях и ингибирование в высоких [3, 46, 48]. Многими отмечается наибольшее стимулирование роста и развития растений при внесении ГП в жестких по физическим или химическим параметрам неблагоприятных условиях окружающей среды (недостаточного или чрезмерного влагосодержания, низких температур, недостаточного освещения, а также загрязнения тяжелыми металлами или радионуклидами) [63, 83].

Определение действующих доз ремедиационных препаратов, а также оценку безопасности разрабатываемых новых ГП проводят при экспресс-фитотестировании (96 ч). Традиционно фитотоксический эффект загрязненных почв, как и эффективность ремедиации, определяют по развитию растений в водных экстрактах. Однако неизбежно встают вопросы об информативности результатов такой оценки, об особенностях химических свойств как ГП, так и непосредственно токсикантов (гидрофильность, гидрофобность) [2].

Немало работ посвящено сравнению двух распространенных подходов к фитотестированию – элюатного и аппликатного. При первом заключении делают по реакции семян растений на водную вытяжку из анализируемых образцов (элюат), а при втором – анализируют отклики растений на всю массу твердого образца. Применительно к анализу ГП аппликатный способ заключается в анализе действия внесенного в почву препарата, то есть непосредственно в массе почвенного образца. Тогда как элюатный способ фитотестирования ГП предусматривает анализ роста растений в серии концентраций растворов ГП, либо в водных экстрактах из почв, предварительно обработанных ГП [32, 35, 42].

Закономерно отмечают различия в результатах анализа водных экстрактов и твердой массы почвы [87]. Так, в экспериментах при элюатном способе фитотестирования редко обнаруживаются эффекты от ГП. Как правило, значения в опытных образцах статистически неотличимы от значений в контрольных, в то время как при проведении фитотестирования ГП аппликатным способом обнаруживаются достоверные различия [1, 28, 74, 87]. Важно отметить, что проведение фитотестирования элюатным способом не только не дает четко представления о качестве ГП при небольших дозах воздействия, но потенциально может приводить к недооценке экологических рисков химического загрязнения почв и эффективности ремедиационных мероприятий с применением ГП.

С помощью аппликационного фитотестирования показан детоксицирующий эффект ряда ГП в аллювиальной луговой почве, подверженной многолетнему техногенному загрязнению ТМ [89], дерново-подзолистой почве, черноземе в условиях моделирования полиметаллического загрязнения ТМ [10, 46, 90]. В ряде случаев для сравнительных оценок качества ГП целесообразно использовать стандартные образцы почвы, которые широко применяются в экотоксикологических исследованиях препаратов за рубежом [84, 99].

В целом фитотестирование аппликационным способом способствует быстрому и надежному определению ремедиационных свойств и безопасности гуминовых продуктов. Немаловажным фактором является экономическая доступность и простота выполнения такого исследования. К недостаткам фитотестирования на высших растениях следует отнести отсутствие комплексности, ограниченность подхода к оценке токсичности лишь для растений. Предпринимаются попытки введения расширенных схем для комплексной оценки воздействия ГП.

*Биотестирование по реакции микроорганизмов.* Почвенные организмы играют ключевую роль в функционировании почвы, поэтому для современных подходов к оценке потенциала ГП к восстановлению нарушенных территорий характерно включение биологических и биохимических показателей микробиома [9, 51]. В некоторых европейских странах в качестве показателя “здоровья” почв используется микробная биомасса и ее функциональная активность [67].

*Почвенное дыхание.* Одним из наиболее общих показателей активности почвенных микроорганизмов является так называемое дыхание почв – выделение углекислого газа и поглощение кислорода образцами почв [30, 50, 60]. Выделение углекислого газа из почвы отражает интенсивность жизнедеятельности почвенной биоты, скорость минерализации опада и подстилки. Известно, что на присутствие токсикантов в почве микроорганизмы откликаются изменением основных функциональных характеристик – сокращением биомассы и интенсивности дыхания [2, 36, 93]. Внесение же ГП может оказывать положительный эффект на эти показатели [6, 9, 15].

В ряде исследований показано, что добавление ГП в загрязненную ТМ дерново-подзолистую почву стимулирует развитие микробного сообщества, увеличивая показатель  $S_{\text{мик}}$  (углерод микробной биомассы), рассчитываемый по скорости эмиссии  $\text{CO}_2$  [36]. Обнаруженная положительная корреляция между дыханием почв и развитием растений повышает биодиагностическую ценность микробного показателя.

*Ферментативная активность почвенных образцов.* Применение ГП существенно влияет на био-

химические процессы в почвах и активность почвенных ферментов. Внесение ГП может оказывать действие на поступление углерода и азота в растения, и, как следствие, процессы разложения органического вещества в почве. Кроме того, ГП могут воздействовать на споры грибов, цисты простейших и бактерий, которые образуют фермент-субстратные и сополимеризованные комплексы с органическим веществом почв [100]. Энзиматическую активность почв многие авторы рассматривают в качестве экспрессного и чувствительного способа биотестирования ГП, в том числе при оценке ремедиации нарушенных почв.

При проведении исследований ферментативной активности почвенных образцов обнаруживаются разнонаправленные эффекты, зависящие как от свойств самих ГП, так и от вида определяемого фермента. Для таких ферментов, как фосфатазы, инвертаза, пероксидаза имеются данные, как о стимулировании, так и ингибировании активности при добавлении в почву ГП [1, 20]. Показано положительное влияние гуминовых добавок на активность фосфатазы, уреазы и дегидрогеназы в условиях засухи [88], каталазы, фосфатазы, пероксидазы и гидролаз при химическом загрязнении [20, 25].

Важно отметить способность почвенных ферментов окислять гуминовые добавки за счет разрыва С–С связей, способствовать окислению феноксильных радикалов и ароматических соединений [55, 59, 101], и тем самым увеличивать активность ферментов не благодаря улучшению условий функционирования микробного комплекса, а за счет разложения самих ГП, что существенно снижает достоверность получаемых результатов для целей биодиагностики ремедиационной способности ГП.

*Бактериальные люминесцентные методы.* В современной практике бактериального тестирования известно несколько перспективных для мониторинга люминесцентных тест-систем: прямые люминесцентные бактериальные тесты (ЛБТ) и ферментативные люминесцентные бактериальные тесты (ФЛТ) [54, 72]. Люминесцентные бактериальные тесты успешно используются для оценки токсичности растворов ГВ, а также их антиоксидантной и прооксидантной активности [8, 54, 64, 69, 71]. Однако их применение для изучения детоксицирующей способности ГВ имеет свои особенности и потенциальные аналитические сложности [5, 71, 73].

Прямые ЛБТ основаны на использовании светящихся бактерий, содержащих фермент люциферазу (*Vibrio harveyi*, *V. fisheri*, *Photobacterium phosphoreum*, *P. leiognathi*) [49, 54]. За рубежом зарегистрированы такие тест-системы, как “Микротокс” и “Люмитокс”. В России производится тест-система на основе генноинженерных светя-

щихся бактерий *Escherichia coli*, получившая фирменный знак “Эколюм” [26, 27]. Измеряемым параметром является биолюминесценция в видимой области спектра, регистрируемая с помощью фотоэлектронного умножителя прибором “Биотокс-10М”. Уменьшение интенсивности биолюминесценции пропорционально токсическому эффекту [26, 27]. При анализе токсичности водных вытяжек из загрязненных почв и смесей загрязняющих веществ с ГП необходимо проводить параллельное измерение водных вытяжек из контрольных (незагрязненных) образцов почвы и растворов ГП для предотвращения ложного вывода о токсичности пробы, вызванного не наличием загрязняющих веществ, а воздействием ГВ на бактериальную культуру. Ранее в обзоре [48] отмечалось, что ГП с повышенным содержанием кислоторастворимой фракции (например, ГП из сапропеля и лигносульфоната) стимулировали свечение бактериального препарата относительно контроля. Подобное стимулирование возможно даже на фоне присутствия в пробе загрязняющих веществ.

В ФЛТ функция биосенсоров представлена ферментативными реакциями [11, 12]. Три ферментативные системы обладают максимальной чувствительностью к разным классам токсикантов: бутирилхолинэстераза, НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза и лактатдегидрогеназа + НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза [11]. Комбинированная ферментная система люминесцентных бактерий: НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (Red + Luc) использовалась для прогнозирования потенциальной токсичности промышленных урбостратоземов [69]. По данным [69], эффект на ферментную систему Red + Luc может быть вызван не только загрязняющими веществами в образцах почвы, но и природными почвенными свойствами, влияющими на активность ферментной системы. Например, установлено, что содержащиеся в почве ГВ ускоряют скорость потребления никотинамидадениндинуклеотида, приводя к уменьшению интенсивности свечения светящихся бактерий [96]. Поэтому возможна формулировка ложного вывода о загрязнении почвы. Авторы [69] отмечают, что существует потребность в поправочных коэффициентах для точного биолюминесцентного анализа загрязнения образцов почвы, богатых гумусом.

**Подходы к оценке эффективности и безопасности гуминовых продуктов в водных и искусственных средах.** Оценить биологические эффекты ГП можно не только с помощью биотестирования в почвенных средах, но и в искусственных питательных средах и водной среде. Применение этих подходов позволяет получить дополнительную информацию об эффективности применения ГП в качестве ремедиантов.

**Микотестирование.** Группой организмов, которую потенциально можно использовать для тестирования биологических и ремедиационных свойств ГП, являются почвенные микроскопические грибы (микромикеты) – активный компонент почвенных микробных сообществ [33, 58, 66].

Обоснованием применения микроскопических грибов в качестве тест-организмов служит то, что микромикеты чувствительны к загрязнению почв и природных вод. Причем эта чувствительность фиксируется на разных уровнях биологической организации: клеточном, организменном, биоценоотическом. Под влиянием антропогенных факторов происходят изменения в прорастании спор, росте мицелия, морфологии колоний многих чувствительных видов, в частности *Fusarium oxysporum* [16, 33]. Введение тяжелых металлов в среду роста вызывает физиологические и морфологические адаптационные стратегии в микробном сообществе [7]. Устойчивость к тяжелым металлам, например, может определяться секвестрацией и комплексообразованием с катионами, продукцией внутриклеточных и внеклеточных ферментов [8, 65, 66]. В загрязненных средах увеличивает обилие и разнообразие группа условно-патогенных грибов (оппортунистов), которые характеризуются специфическими свойствами, такими как мицелиально-дрожжевой диморфизм, клеточный меланизм, способность к адгезии и внеклеточной секреции протеаз и фосфолипаз [70]. Помимо этого, грибные сообщества отражают и реагируют на изменение физико-химических свойств почв. Содержание и состав органического вещества почв имеет значительное влияние на формирование грибного сообщества [37, 79]. Грибы, способные к отклику на изменения гумусного статуса почв, реагируют и на внесение углеродсодержащих добавок, к которым относятся ГВ и биоуголь. Показано, что ГВ оказывают как благоприятное (стимулирующее), так и негативное (ингибирующее) воздействие на отдельные виды микромикетов [38, 40, 64, 75–77]. В целом замечено, что ГВ проявляют большее стимулирующее действие на виды-антагонисты, чем на фитопатогенные виды [75, 76]. Внесение ремедиантов вызывало заметные изменения в структуре грибного сообщества: положительный эффект проявился в возрастании показателей обилия целлюлозолитических видов (*Isaria*, *Trichoderma*), в уменьшении обилия фитопатогенных и темнопигментированных видов [37]. Широкий диапазон наблюдаемых эффектов объяснить можно полифункциональностью ГВ, а также пластичностью почвенного микробиома. При этом, однако, высокая резистентность к токсикантам и адаптационная способность снижает перспективность применения широкого набора видов в качестве тест-культур. Необходимы дополнительные исследования по поиску оптимального тест-вида, с определенным уровнем чувствитель-

ности, не отличающегося от широко используемых стандартизованных видов [32, 33, 37].

Почвенная система *in situ* включает сложные микробные сообщества, поэтому различить биологические воздействия на отдельные виды микроорганизмов в этих условиях затруднительно [52]. По этой причине использование искусственных питательных сред и выращивание отдельных чистых культур может пролить свет на биологическое воздействие загрязняющих веществ и ГВ на метаболизм грибов [61]. При культивировании на искусственных питательных средах тест-реакциями микроскопических грибов, применимыми для целей биотестирования, могут быть скорость прорастания спор, скорость роста колоний, прирост биомассы, изменения в морфогенезе и репродукции [16, 33, 64]. Медленнорастущие виды (*k*-стратеги), более устойчивые (часто меланин-содержащие) в неблагоприятных условиях окружающей среды предпочитают образовывать компактные колонии [16, 64]. Были случаи, когда экологические условия для активного спорообразования отличались от благоприятных для роста колонии [78]. Сочетание двух грибных тест-реакций, таких как снижение скорости роста мицелия и активация спороношения, может рассматриваться как отклик на стресс. Однако, разумеется, искусственные питательные среды имитируют лишь определенные природные абиотические и биотические условия, необходимые для роста микробиоты. Для всестороннего рассмотрения химических, физических и биологических процессов в средах, где живут микроорганизмы, использование выявленных стресс-реакций отдельных видов с учетом всех взаимодействий проблематично [85].

Альтернативой искусственным питательным средам может стать стандартная почва, которая применяется в биотестировании в качестве референтного образца. Стандартная или, так называемая, искусственная почва согласно ISO 11268-1, состоит из торфа (10%), каолиновой глины (20%) и кварцевого песка (70%); с добавлением некоторого количества  $\text{CaCO}_3$  [84, 100].

*Флуоресцентные методы в альяготестировании.* Биотестирование с применением культуры водорослей (*Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*, *Phaeodactylum tricoratum* и *Skeletonema costatum*), широко применяется благодаря доступности условий культивирования и высокой воспроизводимости [38, 39]. В настоящее время активно развиваются флуоресцентные методы, характеризующиеся как удобные, поскольку тест-параметры регистрируются высокоточными приборами [17, 18, 22, 38, 45]. Однако они имеют целый ряд особенностей, которые необходимо учитывать и детально анализировать при формулировке заключения о токсичности.

В практике экологического мониторинга альяготестирование базируется на нескольких флуоресцентных тест-функциях.

Наиболее часто токсичность проб оценивают по изменению интенсивности флуоресценции хлорофилла относительно контроля. При этом считываемый с флуориметра положительный индекс токсичности свидетельствует об ингибировании, а отрицательный индекс — о стимуляции флуоресценции. Изменение интенсивности флуоресценции хлорофилла водорослей как тест-функция указана в нескольких методиках биотестирования, применяемых для целей государственного экологического контроля [5, 24, 43, 44]. Как правило, критерием острой токсичности служит положительный индекс токсичности  $\geq 50\%$ . За пороговый уровень токсичности воды принимают уменьшение величины интенсивности замедленной флуоресценции водорослевой тест-культуры на 20% и более или увеличение на 30% и более [24].

Особенность альяготестирования проб, содержащих растворенные органические вещества (**РОВ**), заключается в стимуляции роста численности клеток и, следовательно, интенсивности флуоресценции хлорофилла водорослей [6, 21, 80]. В проведенных экспериментах в качестве проб, содержащих РОВ, использовались водные вытяжки из почв и грунтов и образцы морской природной воды. Во всех пробах наибольшая флуоресценция наблюдалась в образцах с наибольшим содержанием РОВ и/или веществ гуминовой природы, что маскировало токсический эффект загрязняющих веществ, присутствующих в пробе. Таким образом, РОВ в пробах, стимулируя рост водорослей и интенсивность флуоресценции хлорофилла, способны оказывать существенное влияние на результат альяготестирования, а значит на решение о наличии или отсутствии токсического эффекта [39]. На этом основании использование водорослей в качестве тест-культуры для оценки эффективности применения ГП воспринимается критически [39]. Однако в целом в питательных средах, содержащих сниженные концентрации минеральных солей, можно повысить чувствительность водорослей к токсикантам [41].

Для количественного анализа характеристик фотосинтеза используются и более сложные расчеты, оперирующие параметрами кинетической кривой индукции флуоресценции при разной интенсивности (так называемый ЛР-тест) [18]. Анализ флуоресценции (максимальная переменная флуоресценция и максимальный квантовый выход) на разных фазах кинетической кривой позволяет получать характеристики первичных процессов фотосинтеза. Изменения в функционировании фотосинтетического аппарата также можно исследовать с помощью световых зависимостей па-

раметров флуоресценции: относительная скорость нециклического электронного транспорта (ЕТР) и нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ), отражающее изменение электрохимического протонного градиента на мембране [4, 17].

С использованием описанного выше набора флуоресцентных параметров проведена оценка влияния ГВ на световые реакции фотосинтеза микроводорослей *S. quadricauda* [4]. Скорость роста микроводорослей *S. quadricauda* под действием ГВ оценивали по параметру флуоресценции ( $F_0$ ) и установили, что ГВ обладают стимулирующим воздействием на рост микроводорослей в стрессовых ситуациях. Анализ световых зависимостей параметров флуоресценции показал, что ГВ оказывают некоторое положительное влияние на первичные процессы фотосинтеза. При измерении ЕТР обнаружили, что ГВ ведут к увеличению его скорости. При этом гуминовые кислоты (ГК) черноземов в большей степени стимулировали электронный транспорт по сравнению с фульвокислотами (ФК). Было установлено, что ГК влияют на состояние фотосинтетических мембран, что привело к увеличению NPQ. При этом ФК практически не оказывали воздействие на фотосинтетические мембраны. Сделан вывод, что исследование параметров индукционных кривых флуоресценции подтверждают тот факт, что ГВ могут оказывать влияние на функционирование фотосинтетического аппарата микроводорослей *S. quadricauda*. В этой связи способ измерения процессов фотосинтеза по параметрам индукции флуоресценции отнесен к чувствительным методам, который может быть предложен для оценки разрабатываемых для сельского хозяйства гуминсодержащих препаратов [4].

**Расчет индексов эффективности и безопасности ГП.** В настоящее время не существует единого способа определения активности ГП в природных средах. Актуальной представляется задача интегрирования совокупности данных, согласно которым возможно было бы оценить характер воздействия ГП и безопасность их применения, в том числе для целей ремедиации. Оценку воздействия ГП на подвижность токсикантов можно проводить путем расчетов и определения различных констант связывания и комплексообразования, основанных на законах аналитической и физической химии, однако такой подход не отображает реального влияния, которое оказывают ГП, попадая в сложные циклы природных веществ и взаимодействуя с микробными сообществами. Важным является поиск информативных, экспрессных, стабильных, а также комплексных показателей, учитывающих воздействие ГП на биологические параметры.

*Определение физиологической активности ГП.* Одним из показателей физиологической активности ГП служит оценка реакций водорослей

*Chlorella vulgaris* [38, 47]. В расчетах используются величины валового фотосинтеза, потребления кислорода (дыхание) и прироста биомассы альгокультуры, значения которых сравниваются между контрольным и вариантами с внесением ГП. Такая мера оценки, безусловно, является экспрессной, стабильной и удобной, однако, на наш взгляд, связана с реальными эффектами ГП на одной узкой группе биоты, что недостаточно для понимания активности ГВ в природных средах, особенно таких гетерогенных и изменчивых как почва.

*Определение ростостимулирующей активности ГП.* К известным способам определения ростостимулирующей активности ГП относится расчет интегрального индекса фитоактивности (ИФ) по формуле (1) [3]:

$$\text{ИФ} = \frac{\text{ЭП} + \text{ДК} + \text{ВК}}{3 \times 100}, \quad (1)$$

где ЭП – энергия прорастания семян, ДК – длина корня проростка, ВК – высота проростка, выраженные в процентах от контроля.

Установлено, что при ИФ > 1.2 препарат можно характеризовать как качественный и рекомендовать для последующих испытаний в вегетационных и полевых опытах.

*Расчет констант детоксикации и биоактивных свойств ГП.* Способ оценки влияния ГП (или ГВ) на экотоксичность почв при фитотестировании путем расчета “константы детоксикации” предложен в работе Перминовой [23]. как показатель, отражающий изменение уровня токсичности в присутствии ГВ по сравнению с токсичностью проб в контроле (без ГП). Куликовой [13] предложено проводить аналогичные расчеты путем оценки биоактивных свойств собственно гуминовых препаратов в образцах без добавления токсикантов.

Для количественной оценки защитных свойств ГВ в присутствии токсикантов рассчитывают коэффициент детоксикации  $D$  по формуле (2):

$$D = 1 - \frac{T_{\text{ГВ}}}{T_{\text{ГВ}}}, \quad (2)$$

где  $T_{\text{Г}}$  – токсичность пробы в отсутствие гуминовых веществ;  $T_{\text{Г+ГВ}}$  – токсичность пробы в присутствии ГВ.

Токсичность пробы в присутствии токсиканта считают по формуле (3):

$$T_{\text{Г}} = \frac{R_0 - R_{\text{Г}}}{R_0}, \quad (3)$$

где  $R_0$  – тест-отклик в контроле,  $R_{\text{Г}}$  – тест-отклик в присутствии токсиканта.

Токсичность пробы в присутствии токсиканта и ГВ считают по формуле (4):

$$T_{\text{Г+ГВ}} = \frac{R_{\text{ГВ}} - R_{\text{Г+ГВ}}}{R_{\text{ГВ}}}, \quad (4)$$

где  $R_{ГВ}$  – тест-отклик в присутствии ГВ,  $R_{Т+ГВ}$  – тест-отклик в присутствии токсиканта и ГВ.

Особенность такого подхода в том, что учитываются не только изменения фитотоксичности загрязненных почв под воздействием гуминовых продуктов (детоксикация), но и непосредственное влияние на растения самого ГП.

**Расчет индекса ремедиации.** Разработка универсального индекса и комплексной экспериментально обоснованной системы оценки влияния ГП – необходимый этап в расширении внедрения природоподобных технологий. Такие технологии важны как для сопоставления качества производимых ГП, так и для обеспечения устойчивого функционирования экосистем при их применении. Для рекомендаций ГП к применению в ремедиационных целях необходим анализ их эффектов на химические, биоиндикационные и экотоксикологические свойства биогеоценозов.

В этой связи целесообразно обратиться к такому показателю, как интегральный индекс состояния загрязненных почв, рассчитываемый по междисциплинарной методологии Триад [56, 62, 68]. На основе такой методологии для характеристики ремедиационного потенциала ГП, их вклада в восстановление экологических функций почв предложен индекс ремедиации (ИР) [19, 34].

Согласно запатентованному способу расчета ИР проводятся исследования свойств почв, подвергнутых воздействию ГП, по следующим показателям:

- химические – изменение подвижности ТМ (доступная для растений фракция, результат экстракции в ацетатно-аммонийном буфере);
- биоиндикационные – респирометрические характеристики (анализ активности микробиома);
- экотоксикологические – выживаемость гидробионтов в водных экстрактах образцов почв и фитоэффект на рост корней проростков высших растений аппликатным способом.

Полученные экспериментальные данные нормируются по шкале от 0 до 1, согласно формуле (5):

$$P_i = \frac{|T_i - T_{фонi}|}{T_{фонi}}, \quad (5)$$

где  $P_i$  – степень отклонения значения тест-функции (концентрация ТМ, респирометрические параметры, длина корня, выживаемость гидробионтов, и т. п.) в опытном образце от фона;  $T_i$  – значение тест-функции в опытном образце,  $T_{фонi}$  – значение в фоновом образце (вариант без внесения токсикантов и ГП). В случае, когда  $P_i > 1$  принимаем  $P_i = 1$ .

Далее рассчитываются, так называемые, частные индексы состояния почв по химическим

(ИСх) биоиндикационным (ИСб) и токсикологическим (ИСт) данным как среднее арифметическое из  $P_i$  для каждого блока данных. Затем рассчитывается итоговый индекс состояния (ИС) согласно методологии Триад по формуле (6):

$$ИС = \frac{ИСх + 1.5 \times ИСт + 2.0 \times ИСб}{1 + 1.5 + 2.5}, \quad (6)$$

где ИС – индекс состояния; ИСх – частный индекс состояния по химическим данным; ИСт – токсикологическим; ИСб – биоиндикационным.

После чего расчет индекса ремедиации осуществляется по формуле (7):

$$ИР = \frac{ИСт \times 100}{ИСз}, \quad (7)$$

где ИР – индекс ремедиации; ИСт – индекс состояния почвы, обработанной гуминовым продуктом; ИСз – индекс состояния загрязненной почвы, не обработанной ГП (контроль). Ранжирование ИР в процентах, отражающих эффективность гуминовых продуктов, может быть таким, как показано на рис. 1.

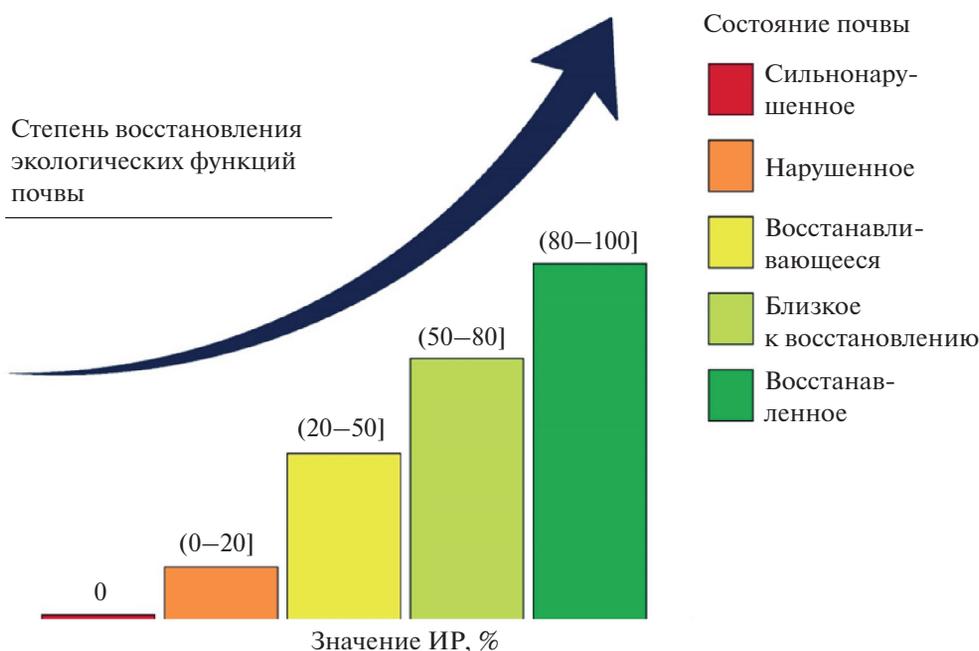
Для определения степени ремедиационной активности ГП предлагаются градации, соответствующие кратности превышения измеряемых значений в опытном варианте над таковыми в контроле, и при значении  $ИР < 20$  – определяют отсутствие способности к ремедиации загрязненной почвы, при значении  $20 < ИР < 50$  – среднюю активность, при значении  $50 < ИР < 80$  – высокую активность и при значении  $ИР > 80$  – очень высокую активность.

Применение ИР представляется удобным и универсальным способом как для сравнения различных ГП между собой, так и для установления наиболее эффективных доз ГП, которые могут быть рекомендованы производителями.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наличие экспериментально обоснованной оценки ремедиационных свойств гуминовых продуктов – важное условие их безопасного и эффективного использования. Проведенный анализ существующих способов биологической оценки гуминовых продуктов свидетельствует о разнообразии подходов и методов, применение которых не дает полного представления о их потенциале в улучшении “здоровья” почвы. Для сертификации и сравнения качества гуминовых продуктов необходима методика расчета количественного показателя их ремедиационной эффективности, которая включает химические, экотоксикологические и биоиндикационные почвенные показатели.

Для оценки качества гуминовых продуктов, рекомендуемых для детоксикации почв, загрязненных тяжелыми металлами, целесообразно исполь-



**Рис. 1.** Ранжирование индекса ремедиации в соответствии со степенью восстановления экологических функций почв и оценкой их состояния (по [19]).

зовать индекс ремедиации, имеющий тесную связь с изменением подвижности ТМ, и экотоксикологическими показателями. В частности, согласно проведенным исследованиям [19], алгоритм первичной оценки гуминовых продуктов должен включать исследования химических характеристик – изменение подвижности тяжелых металлов (доступной для растений фракции как результат экстракции образцов ацетатно-аммонийным буфером), биоиндикационных – респирометрические показатели дыхания почв (анализ активности микробиома) и экотоксикологические – значения тест-функций при биотестировании (выживаемость стандартизованных тест-видов гидробионтов в водных экстрактах почв и фитотоксический эффект ГП на рост корней проростков высших растений) [34].

Универсальной почвенной матрицей для первичной оценки гуминовых продуктов может служить стандартная искусственная почва (по ISO 11268-2). Она является удобной в применении [84, 100], поскольку постоянный состав обеспечивает воспроизводимые данные, а измерения биологических и химических ее характеристик можно в контролируемых условиях проводить круглогодично. Для применения ГП на практике необходим подбор доз внесения ГП в зависимости от степени загрязнения почв и природных почвенных характеристик.

#### БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы благодарят в. н. с. О.С. Якименко, проф. К.А. Кыдралиеву и проф. Н.С. Кудряшеву за обсужде-

ние проблем биотестирования гуминовых продуктов, производственную компанию НПО “РЭТ” за предоставление гуминовых препаратов для исследований.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана РНФ грант 22-24-00666. Исследование выполнено в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова “Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды”.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безуглова О.С., Полиенко Е.А., Горюнов А.В. Гуминовые препараты как стимуляторы роста растений и микроорганизмов (обзор) // Известия Оренбургского гос. аграрного ун-та. 2016. № 4(60) С. 11–14.
2. Водяницкий Ю.Н., Плеханова И.О. Биогеохимия тяжелых металлов в загрязненных переувлажненных почвах (аналитический обзор) // Почвоведение. 2014. № 3. С. 273–282.
3. Воронина Л.П., Якименко О.С., Терехова В.А. Оценка биологической активности промышленных гуминовых препаратов // Агробиология. 2012. № 6. С. 50–57.
4. Габбасова Д.Т., Маторин Д.Н., Братковская Л.Б., Алексеев А.А. Воздействие гуминовых веществ на световые реакции фотосинтеза зеленых микро-

- дорослей // *Агрохимический вестник*. 2018. № 1. С. 56–59.
5. ГОСТ Р 53910-2010/ISO 10253:2006 Методы определения токсичности по замедлению роста морских одноклеточных водорослей *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin и *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve.
  6. Григорьева И.Ю., Федосеева Е.В. Опыт применения экотоксикологических исследований для оценки класса опасности грунтов как отходов // Инженерно-экологические изыскания – нормативно-правовая база, современные методы и оборудование. Мат-лы Общероссийской научно-практической конф. 2019. С. 49–55.
  7. Зубкова Т.А., Карпачевский Л.О. Матричная организация почв. М.: Рускай, 2001. 295 с.
  8. Касимова Л.В., Порываева О.В. Органическое вещество торфа. Микробиологическая активация торфа как основа создания нового вида органического удобрения. ГНУ СибНИСХиТ Российской академии с.-х. н., 2004. 294 с.
  9. Кирюшин В.И. Методология комплексной оценки сельскохозяйственных земель // *Почвоведение*. 2020. № 7. С. 871–879.
  10. Кирюшина А.П., Парамонова А.И., Прудникова Е.В., Королев П.С., Терехова В.А. Фитотестирование ростостимулирующей активности биочара и лигногумата на почвах разного гумусного статуса // *Агрохимия*. 2020. № 11. С. 14–20. <https://doi.org/10.31857/S0002188120110058>
  11. Колосова Е.М., Сутормин О.С., Есимбекова Е.Н., Лоншакова-Мукина В.И., Кратасюк В.А. Комплексный ферментативный биотест для оценки загрязнения почвы // *Доклады академии наук*. 2019. Т. 489. № 1. С. 103–107.
  12. Кратасюк В.А. Биоломинесцентные ферментативные биотесты для экологического мониторинга и образования // *Международ. сателлитная конф. “Экологический мониторинг. Методы и подходы”*. Красноярск, Россия. 2021. С. 124–125.
  13. Куликова Н.А. Защитное действие гуминовых веществ по отношению к растениям в водной и почвенной средах в условиях абиотических стрессов. Дис. ... докт. биол. н. М., 2008. 302 с.
  14. Лыхман В.А., Безуглова О.С., Горюцов А.В., Полиенко Е.А. Влияние гуминового препарата на структурное состояние и биологическую активность чернозема обыкновенного карбонатного в динамике // *Научный журнал Российского НИИ проблем мелиорации*. 2018. № 3(31). С. 100–120. <https://doi.org/10.31774/2222-1816-2018-3-100-120>
  15. Минникова Т.В., Колесников С.И., Денисова Т.В. Влияние азотных и гуминовых удобрений на биохимическое состояние нефтьзагрязненного чернозема // *Юг России: экология, развитие*. 2019. Т. 14. № 2. С. 189–201. <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2019-2-189-201>
  16. Марфенина О.Е. Антропогенная экология почвенных грибов. М.: Медицина для всех, 2005. 195 с.
  17. Маторин Д.Н., Братковская Л.Б., Алексеев А.А. Флуоресценция хлорофилла для оценки состояния водорослей // *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2018. Т. 3(3). С. 686–689.
  18. Маторин Д.Н., Рубин А.Б. Флуоресценции хлорофилла высших растений и водорослей. Ижевск: ИКИ-РХД, 2012. 256 с.
  19. Панова М.И. Экологическая оценка влияния гуминовых продуктов на почвы, загрязненные тяжелыми металлами. Дис... канд. биол. н. М., 2021. 123 с.
  20. Панова М.И., Пукальчик М.А., Терехова В.А. Почвенные ферменты – надежные индикаторы химического загрязнения почв? // *Утилизация отходов производства и потребления: инновационные подходы и технологии*. 2020. С. 123–128.
  21. Парамонова А.И., Поромов А.А., Федосеева Е.В., Хунджуа Д.А., Руднева И.И., Шайда В.Г. Экологическое состояние прибрежных вод черного моря в районе Севастополя // *Использование и охрана природных ресурсов в России*. 2019. № 4(160). С. 85–90.
  22. Пацаева С.В., Полякова И.Б., Хунджуа Д.А., Южаков В.И. Спектральные методы оценки концентрации клеток водорослей в суспензиях с коррекцией на светорассеяние // *Физические проблемы экологии (экологическая физика)* 2010. № 17. С. 260–273.
  23. Перминова И.В. Анализ, классификация и прогноз свойств гумусовых кислот. Дис. ... докт. хим. н. М., 2000. 320 с.
  24. ПНД Ф Т 14.1:2:4.16-09 Т 16.1:2.3:3.14-09 (издание 2014 г.) Методика измерений относительного показателя замедленной флуоресценции 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. Сибирский федеральный университет, 2014.
  25. Пукальчик М.А., Панова М.И., Терехова В.А., Якименко О.С., Федосеева Е.В. Действие гуминовых препаратов на активность почвенных ферментов в модельном опыте // *Агрохимия*. 2017. № 8. С. 84–91. <https://doi.org/10.7868/S0002188117080105>
  26. Ревазова Ю.А., Дanelьян Л.Г., Данилов В.С. Определение токсичности почв с помощью биотеста “Эколюм”. Федеральное агентство по гигиене и эпидемиологии Роспотребнадзора. М., 2007. 17 с.
  27. Ревазова Ю.А., Севостьянова Е.М., Данилов В.С. Методика определения токсичности химических веществ, полимеров, материалов и изделий с помощью биотеста “Эколюм”. Федеральное агентство по гигиене и эпидемиологии Роспотребнадзора. М., 2007. 17 с.
  28. Селивановская С.Ю., Галицкая П.Ю., Латыпова В.З., Семанов Д.А. Оценка эффективности контактного и элюатного методов оценки почв // *Уч. записки Казанского федерального ун-та. Сер. Естественные науки*. 2007. Т. 149. Кн. 1. С. 88–96.
  29. Степанов А.А., Якименко О.С. Ремедиация загрязненных городских почв с применением гуминовых препаратов // *Живые и биокосные системы*. 2016. № 18. <http://www.jbks.ru/archive/issue-18/article-5>
  30. Сусьян Е.А., Ананьева Н.Д., Гавриленко Е.Г., Чернова О.В., Бобровский М.В. Углерод микробной био-

- массы в профиле лесных почв южной тайги // Почвоведение. 2009. № 10. С. 1233–1240.
31. Таран Д.О., Жданова Г.О., Саксонов М.Н., Бархатова О.А., Быбин В.А., Стом Д.И. Влияние гуминовых веществ на тест-объекты // Acta Biomedica Scientifica. 2013. № 6. С. 164–168.
  32. Терехова В.А. Биотестирование почв: подходы и проблемы // Почвоведение. 2011. № 2. С. 190–198.
  33. Терехова В.А. Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистем. М.: Наука, 2007. 215 с.
  34. Терехова В.А., Панова М.И., Кирюшина А.П., Кулачкова С.А., Кыдралиева К.А., Якименко О.С. Способ определения ремедиационной способности гуминовых продуктов. Патент на изобретение 2762628С1, 22.12.2021. Заявка № 2021113895 от 17.05.2021.
  35. Терехова В.А., Прудникова Е.В., Кирюшина А.П., Карпухин М.М., Плеханова И.О., Якименко О.С. Фитотоксичность тяжелых металлов в дерново-подзолистых почвах разной степени окультуренности // Почвоведение. 2021. Т. 6. С. 757–768.
  36. Терехова В.А., Прудникова Е.В., Кулачкова С.А., Горленко М.В., Учанов П.В., Сушко С.В., Ананьева Н.Д. Микробиологические показатели агродерново-подзолистых почв разной гумусированности при внесении тяжелых металлов и углеродсодержащих препаратов // Почвоведение. 2021. № 3. С. 372–384.
  37. Терехова В.А., Федосеева Е.В., Бельфег Ю.В., Кирюшина А.П., Рычагова А.Г., Верховцева Н.В. Структура микробных комплексов при моделировании полиметаллического загрязнения и ремедиации агродерново-подзолистых почв // Вестник Моск. ун-та. Сер. 17, почвоведение. 2021. № 1. С. 38–45.
  38. Торопкина М.А., Рюмин А.Г., Кечайкина И.О., Чуков С.Н. Влияние гуминовых кислот на метаболизм *Chlorella vulgaris* в модельном опыте // Почвоведение. 2017. № 11. С. 1336–1343.
  39. Федосеева Е.В., Григорьева И.Ю., Николаева О.В., Терехова В.А. Особенности альготестирования проб, содержащих растворенное органическое вещество // Вопросы современной альгологии. 2020. Т. 2. № 23. С. 40–45. [https://doi.org/10.33624/2311-0147-2020-2\(23\)-40-45](https://doi.org/10.33624/2311-0147-2020-2(23)-40-45)
  40. Федосеева Е.В., Пацаева С.В., Терехова В.А. Влияние гумата калия на некоторые физиологические характеристики микроскопических грибов разной пигментации // Микология и фитопатология. 2009. Т. 43. № 3. С. 243–250.
  41. Федосеева Е.В., Терехова В.А., Якименко О.С., Гладкова М.М. Экотоксикологическая оценка гуминовых препаратов разного происхождения с применением микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* // Теоретическая и прикладная экология. 2009. № 4. С. 45–49.
  42. ФР.1.31.2012.11560. Биологические методы контроля. Методика измерений биологической активности гуминовых веществ методом фитотестирования. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2014. 20 с.
  43. ФР.1.31.2009.06596/ПНД Т 16. 3. 15.09 Методика определения токсичности водных вытяжек из галитовых отходов и глинисто-солевых шламов, образующихся при производстве калийных удобрений, по снижению темпа роста (изменению численности клеток) и снижению уровня флуоресценции хлорофилла морских водорослей *Phaeodactylum tricornutum*. М.: Акварос, 2009.
  44. ФР.1.39.2007.03223 Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей. М.: Акварос, 2007.
  45. Хунджиа Д.А., Харчева А.В., Терехова В.А., Гладкова М.М., Попутникова Т.О., Пукальчик М.А., Маторин Д.Н., Полякова И.Б., Пацаева С.В. Применение спектрально-оптических методов для характеристики выращенных при различных условиях микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* // Процессы в геосредах. 2015. № 1. С. 87–95.
  46. Чуков С.Н. Структурно-функциональные параметры органического вещества почв в условиях антропогенного воздействия. СПб.: Изд-во СПб. гос. ун-та, 2001. 216 с.
  47. Чуков С.Н., Голубков М.С. Сравнительное изучение физиологической активности гумусовых кислот почв на культуре водорослей *Chlorella vulgaris* // Вестн. СПб. гос. ун-та. Сер. 3. 2005. Вып. 1. С. 103–113.
  48. Якименко О.С., Терехова В.А. Гуминовые препараты и проблема оценки их биологической активности для целей сертификации // Почвоведение. 2011. № 11. С. 1334–1343.
  49. Abbas M., Adil M., Ehtisham-ul-Haque S., Munir B., Yameen M., Ghaffar A., Shar G.A., Asif Tahir M., Iqbal M. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review // Sci. Total Environ. 2018. № 626. P. 1295–1309. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.066>
  50. Ananyeva N.D., Susyan E.A., Chernova O.V., Wirth S. Microbial respiration activities of soils from different climatic regions of European Russia // European J. of Soil Biology. 2008. V. 44. P. 147–157. <https://doi.org/10.1016/J.EJSOBI.2007.05.002>
  51. Barrios E., Coutinho H.I.C., Medeiros C.A. InPaC-S: Participatory knowledge integration on indicators of soil quality – Methodological guide. World Agroforestry Centre (ICRAF). Embrapa, CIAT, Nairobi, 2012. 178 p.
  52. Begon M., Howarth R.W., Townsend C.R. Essentials of ecology. USA, Wiley, 2014. 510 p.
  53. Billingham K. Humic products – Potential or presumption for agriculture. Orange, NSW: NSW Dept Primary Industries, 2012.
  54. Bondareva L., Kudryasheva N. Direct and indirect detoxification effects of humic substances // Agronomy. 2021. № 11. P. 198. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020198>
  55. Bugg T.D., Ahmad M., Hardiman E.M., Singh R. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation // Curr. Opin. Biotechnol. 2011. V. 22. P. 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.009>
  56. Chapman P.A. Decision making framework for sediment assessment developed for the Great Lakes // Human and Ecological Risk Assessment. 2005. V. 8.

- Iss. 7. P. 1641–1655.  
<https://doi.org/10.1080/20028091057538>
57. Clapp C.E., Chen Y., Hayes M.H.B., Cheng H.H. Plant growth promoting activity of humic substances // Understanding and Managing Organic Matter in Soils, Sediments and Waters, International Humic Science Society, Madison. 2004. P. 243–255.
58. Clocchiatti A., Hannula S.E., van den Berg M., Kort-hals G., de Boer W. The hidden potential of saprotrophic fungi in arable soil: Patterns of short-term stimulation by organic amendments // Appl. Soil Ecol. 2020. № 147. P. 103434.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103434>
59. Cozzolino A., Piccolo A. Polymerization of dissolved humic substances catalyzed by peroxidase. Effects of pH and humic composition // Org. Geochem. 2002. V. 33. P. 281–294.  
[https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(01\)00160-7](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(01)00160-7)
60. Creamer R.E., Schulte R., Stone D. et al. Measuring basal soil respiration across Europe: Do incubation temperature and incubation period matter? // Ecological indicators. 2014. V. 36. P. 409–418.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.08.015>
61. Crowther T.W., Boddy L., Maynard D.S. The use of artificial media in fungal ecology // Fungal. Ecol. 2018. № 32. P. 87–91.  
<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.10.007>
62. Dagnino A., Sforzini S., Dondero F. Fenoglio S., Bona E., Jensen J., Viarengo A. A weight-of-evidence approach for the integration of environmental “triad” data to assess ecological risk and biological vulnerability // Integrated Environmental Assessment and Management. 2008. V. 4. № 3. P. 314–326.  
[https://doi.org/10.1897/IEAM\\_2007-067.1](https://doi.org/10.1897/IEAM_2007-067.1)
63. Farouk S., Mosa A.A., Taha A.A., El-gahmery A.M. Protective effect of humic acid and chitosan on radish (*Raphanussativus L. var. sativus*) plants subjected to cadmium stress // J. Stress Physiology & Biochemistry. 2011. V. 7. № 2. P. 99–116.
64. Fedoseeva E.V., Patsaeva S.V., Khundzhua D.A., Pukalchik M.A., Terekhova V.A. Effect of exogenic humic substances on various growth endpoints of *Alternaria alternata* and *Trichoderma harzianum* in the experimental conditions // Waste and Biomass Valorization. 2021. № 12. P. 211–222.  
<https://doi.org/10.1007/s12649-020-00974-x>
65. Fomina M.A., Alexander I.J., Colpaert J.V., Gadd G.M. Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi // Soil Biol Biochem. 2005. № 37. P. 851–866.  
<https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2004.10.013>
66. Gadd G.M. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation // Mycol Res. 2007. № 111. P. 43–49.  
<https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.12.001>
67. Goss M.J., Tubeileh A., Goorahoo D. A review of the use of organic amendments and the risk to human health // Adv. Agron. 2013. № 120. P. 275–379.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407686-0.00005-1>
68. ISO 19204:2017 Soil quality — Procedure for site-specific ecological risk assessment of soil contamination (soil quality TRIAD approach). 2017.
69. Kolosova E.M., Sutormin O.S., Stepanova L.V., Shpedt A.A., Rimatskaya N.V., Sukovataya I.E., Kratasyuk V.A. Bioluminescent enzyme inhibition-based assay for the prediction of toxicity of pollutants in urban soils // Environmental Technology & Innovation. 2021. № 24. P. 101842.  
<https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101842>
70. Korneykova M.V., Lebedeva E.V. Opportunistic fungi in the polluted soils of Kola Peninsula // Geography, Environment, Sustainability. 2018. V. 11(2). P. 125–137.  
<https://doi.org/10.24057/2071-9388-2018-11-2-125-137>
71. Kudryasheva N.S., Kovel E.S., Sachkova A.S., Vorobeveva A.A., Isakova V.G., Churilov G.N. Bioluminescent enzymatic assay as a tool for studying antioxidant activity and toxicity of bioactive compounds // J. Photochem. Photobiol. 2017. № 93. P. 536–540.  
<https://doi.org/10.1111/php.12639>
72. Kudryasheva N.S., Kovel E.S. Monitoring of low-intensity exposures via luminescent bioassays of different complexity: cells, enzyme reactions, and fluorescent proteins // Int. J. Mol. Sci. 2019. № 20. P. 4451.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20184451>
73. Kudryasheva N.S., Tarasova A.S. Pollutant toxicity and detoxification by humic substances: Mechanisms and quantitative assessment via luminescent biomonitoring // Environ. Sci. Pollut. Res. 2015. № 22. P. 155–167.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3459-6>
74. Leitgib L., Kalman J., Gruiz K. Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites // Chemosphere. 2007. V. 66. P. 428–434.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.06.024>
75. Loffredo E., Berloco M., Casulli F., Senesi N. In vitro assessment of the inhibition of humic substances on the growth of two strains of *Fusarium oxysporum* // Biol. Fertil. Soils. 2007. V. 43. P. 759–769.  
<https://doi.org/10.1007/s00374-006-0160-z>
76. Loffredo E., Berloco M., Senesi N. The role of humic fractions from soil and compost in controlling the growth *in vitro* of phytopathogenic and antagonistic soil-borne fungi // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2008. V. 69. P. 350–357.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.11.005>
77. Loffredo E., Senesi N. In vitro and in vivo assessment of the potential of compost and its humic acid fraction to protect ornamental plants from soil-borne pathogenic fungi // Sci. Horticult. 2009. V. 122. P. 432–439.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.05.030>
78. Marfenina O.E., Fomicheva G.M., Vasilenko O.V., Naumova E.M., Kul’ko A.B. Sporulation in saprotrophic and clinical strains of *Aspergillus sydowii* (Bain. & Sart.) Thom & Church under various environmental conditions // Microbiology. 2010. V. 79(6). P. 753–758.  
<https://doi.org/10.1134/S0026261710060056>
79. Martínez-García L.B., Korthals G., Brussaard L., H. Bracht Jørgensen, De Deyna G.B. Organic management and cover crop species steer soil microbial community structure and functionality along with soil organic matter properties // Agriculture, Ecosystems & Environment. 2018. V. 263. P. 1–7.  
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.04.018>
80. Nikolaeva O., Tikhonov V., Kostina N., Astaikina A., Vecherskii M., Fedoseeva E. Ecotoxicological effects of traffic-related pollutants in roadside soils of Moscow //

- Ecotoxicol. Environ. Saf. 2019. V. 172. P. 538–546.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.068>
81. *Olk D.C., Dinnes D.L., Scoresby R., Callaway C.R., Darlington J.W.* Humic products in agriculture: potential benefits and research challenges – a review // *J. Soils Sediments*. 2018. V. 18. P. 2881–2891.  
<https://doi.org/10.1007/s11368-018-1916-4>
  82. *Perminova I.V., Frimmel F.H., Kudryavtsev A.V., Kulikova N.A., Abbt-Braun G., Hesse S., Petrosyan V.S.* Molecular weight characteristics of humic substances from different environments as determined by size exclusion chromatography and their statistical evaluation // *Environmental Science and Technology*. 2003. V. 37(11). P. 2477–2485.  
<https://doi.org/10.1021/ES0258069>
  83. *Perminova I.V., Hatfield K., Hertkorn N.* Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice. Springer. Netherlands, 2005. 256 p.
  84. *Persoons G., Janssen C., Coen W. De.* New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring. Kluwer, New York, 2000.
  85. *Pham V.H., Kim J.* Cultivation of unculturable soil bacteria // *Trends Biotechnol.* 2012. V. 30. P. 475–484.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.05.007>
  86. *Polyak Y.M., Bakina L.G., Chugunova M.V., Mayachkina N.V., Gerasimov A.O., Bure V.* Effect of remediation strategies on biological activity of oil-contaminated soils – A field study // *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2018. V. 126. P. 57–68.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.004>
  87. *Prudnikova E.V., Neaman A., Terekhova V.A., Karpukhin M.M., Vorobeichik E.L., Smorkalov I.A., Dovletyarova E.A., Navarro-Villarreal C., Ginocchio R., Peñaloza P.* Root elongation method for the quality assessment of metal-polluted soils: Whole soil or soil-water extract? // *J. Plant Nutrition and Soil Science*. 2020. V. 20. P. 2294–2303.  
<https://doi.org/10.1007/s42729-020-00295-x>
  88. *Pukalchik M., Kydraliev K., Yakimenko O., Terekhova V.A.* Effect of organic substances on wheat (*Triticum* spp.) productivity and soil enzyme functional stability under drought stress conditions // *Research on Crops*. 2020. V. 21. № 2. P. 210–214.  
<https://doi.org/10.31830/2348-7542.2020.036>
  89. *Pukalchik M., Mercl F., Panova M., Břendová K., Terekhova V.A., Tlustoš P.* The improvement of multi-contaminated sandy loam soil chemical and biological properties by the biochar, wood ash, and humic substances amendments // *Environmental Pollution*. 2017. № 229. P. 516–524.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.021>
  90. *Pukalchik M., Panova M., Karpukhin M., Yakimenko O., Kydraliev K., Terekhova V.A.* Using humic products as amendments to restore Zn and Pb polluted soil: a case study using rapid screening phytotest endpoint // *J. Soils and Sediments*. 2018. V. 18. № 3. P. 750–761.  
<https://doi.org/10.1007/s11368-017-1841-y>
  91. *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. V. 52. № 4. P. 507–514.  
<https://doi.org/10.1134/S1064229319040112>
  92. *Pulidindi K., Pandey H.* Humic acid market size by application (Agriculture, Ecological Bioremediation, Horticulture, Dietary Supplements), Industry Analysis Report, Regional Outlook (U.S., Canada, Germany, UK, France, Spain, Italy, China, India, Japan, Australia, Indonesia, Malaysia, Brazil, Mexico, South Africa, GCC), Growth Potential, Price Trends, Competitive Market Share & Forecast, 2017–2024.
  93. *Stefanowicz A.M., Niklińska M., Laskowski R.* Metals affect soil bacterial and fungal functional diversity differently // *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008. V. 27. P. 591–598.  
<https://doi.org/10.1897/07-288.1>
  94. *Tajik S., Ayoubi S., Lorenz N.* Soil microbial communities affected by vegetation, topography and soil properties in a forest ecosystem // *Applied Soil Ecology*. 2020. V. 149. P. 103514.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103514>
  95. *Tarasova A.S., Stom D.I., Kudryasheva N.S.* Antioxidant activity of humic substances via bioluminescent monitoring *in vitro* // *Environ. Monit. Assess.* 2015. V. 187(3). P. 89.  
<https://doi.org/10.1007/s10661-015-4304-1>
  96. *Tarasova A.S., Stom D.I., Kudryasheva N.S.* Effect of humic substances on toxicity of inorganic oxidizer bioluminescent monitoring // *Environ. Toxicol. Chem.* 2011. V. 30. P. 1013–1017.  
<https://doi.org/10.1002/etc.472>
  97. *Vadkertiova R., Slavikova E.* Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments // *J. Basic Microbiol.* 2006. № 46. P. 145–152.  
<https://doi.org/10.1002/jobm.200510609>
  98. *Vala A.K., Sutariya V.* Trivalent arsenic tolerance and accumulation in two facultative marine fungi // *Jundishapur J. Microbiol.* 2012. V. 5(4). P. 542–545.  
<https://doi.org/10.5812/jjm.3383>
  99. *Wallenstein M.D., Burns R.G.* Ecology of extracellular enzyme activities and organic matter degradation in soil: a complex community-driven process // *Methods of Soil Enzymology*. 2011. P. 35–55.  
<https://doi.org/10.2136/sssabookser9.c2>
  100. *Van Gestel C.A.M.* Soil ecotoxicology: state of the art and future directions. *Advances in Terrestrial Isopod Biology* // *ZooKeys*. 2012. V. 176. P. 275–296.  
<https://doi.org/10.3897/zookeys.176.2275>
  101. *Wang G., Post W.M., Mayes M.A., Frerichs J.T., Jagadamma S.* Parameter estimation for models of ligninolytic and cellulolytic enzyme kinetics // *Soil Biol. Biochem.* 2012. V. 48. P. 28–38.  
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.01.011>
  102. *Xu Y., Seshadri B., Bolan N. et al.* Microbial functional diversity and carbon use feedback in soils as affected by heavy metals // *Environment international*. 2019. V. 125. P. 478–488.  
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.071>
  103. *Zhu Z., Bai Y., Lv M., Tian G., Zhang X., Li L., Jiang Y., Ge S.* Soil fertility, microbial biomass, and microbial functional diversity responses to four years fertilization in an apple orchard in North China // *Horticultural Plant J.* 2020. V. 6. № 4. P. 223–230.  
<https://doi.org/10.1016/j.hpj.2020.06.003>

**Bioassay of Humic Products as Potential Remedies (Review)****V. A. Terekhova<sup>1, \*</sup>, E. V. Fedoseeva<sup>2</sup>, M. I. Panova<sup>3</sup>, and S. N. Chukov<sup>4</sup>**<sup>1</sup> *Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*<sup>2</sup> *Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*<sup>3</sup> *Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow Region, Skolkovo, 143025 Russia*<sup>4</sup> *St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia**\*e-mail: vterekhova@gmail.com*

The existence of an experimentally substantiated assessment of the remediation properties of humic products is an important condition for their safe and effective use. The review provides an analysis of existing approaches to biotesting humic products, which make it possible to draw a conclusion about the effectiveness of detoxification of soils and adjacent environments and ensuring the viability of biocenoses when using humic products. The advantages and disadvantages of traditional approaches to biotesting humic products in soil media based on well-known reactions of higher plants and microorganisms, as well as the possibility of algotesting using fluorescent methods and mycotesting humic products in aqueous and artificial nutrient media are discussed. The results of the experimental verification of the remediating ability of humic products during biotesting in environments rich in organic substances indicate the need to standardize the conditions for the quantitative assessment of the quality of humic products. Standard artificial soil (according to ISO 11268-2) can serve as a universal soil matrix for the initial assessment of humic products. To summarize the quality of humic products as potential soil improvers, the remediation index is proposed, calculated from the data of chemical, bioindication and ecotoxicological studies of soil treated with humic products.

*Keywords:* humates, ecology, assessment methods, biotesting, remediation, detoxification, chemical pollution, ecological quality, remediation index