

УДК 502.171; 504.054

## ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ОТХОДОВ НЕФТЕДОБЫЧИ МЕТОДАМИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

© 2015 Р.Б. Сипулинов, Ю.В. Карагайчева, Н.А. Шилова, С.М. Рогачева

Саратовский государственный технический университет имени Ю.А. Гагарина

Статья поступила в редакцию 26.11.2015

Проведена оценка токсичности бурового шлама и отработанного бурового раствора на основе полиакриламида с использованием биотестов на основе культуры зеленой протококковой водоросли *Scenedesmus quadricauda* и ветвистоусых рачков *Daphnia magna* Straus. Изучена фитотоксичность водных вытяжек из бурового шлама на редисе *Raphanus sativus* L. Исследуемые образцы были отнесены к 3 классу опасности, показана возможность культивирования растений на почвах, загрязненных отходами бурения.

Ключевые слова: *буровой раствор, буровой шлам, полиакриламид, класс опасности, биотестирование, Scenedesmus quadricauda, Daphnia magna, фитотоксичность*

В настоящее время на территории Российской Федерации происходит активное освоение нефтяных месторождений. Одной из глобальных проблем нефтедобывающей отрасли является загрязнение почв нефтепродуктами, которое происходит при их транспортировке, авариях на нефтепроводах и при размещении отходов бурения в районах нефтедобычи. Большую часть отходов бурения составляют буровые шламы (БШ) и отработанные буровые растворы (ОБР). Их токсичность во многом зависит от первоначальной рецептуры бурового раствора, физико-химический состав и технологические параметры которого определяются условиями бурения [1, 2]. В нашей стране широкое распространение получили буровые растворы на основе полиакриламида, который относится к 3-4 классу опасности [3].

Выбор наиболее оптимального метода ремедиации загрязненных территорий зависит от степени токсичности отходов бурения, оценка которой затруднена из-за отсутствия универсальной рецептуры приготовления буровых растворов и многокомпонентного неконтролируемого состава буровых шламов [4]. Поэтому для определения класса опасности этих отходов решающая роль отводится экспериментальным

биологическим методам, учитывающим комплексное воздействие всех компонентов исследуемой пробы на биоту [5].

**Цель исследования:** определить с помощью методов биотестирования класс опасности БШ и ОБР на основе полиакриламида и оценить фитотоксичность водных вытяжек из буровых шламов.

**Экспериментальная часть.** В экспериментах использовались усредненные пробы БШ и ОБР, отобранные на месторождениях ОАО «Газпромнефть-Ноябрьскнефтегаз» Ямало-Ненецкого автономного округа. При оценке класса опасности отходов в качестве тест-объектов использовались культуры зеленой протококковой водоросли *Scenedesmus quadricauda* и ветвистоусых рачков *Daphnia magna* Straus. Культуру водорослей выращивали на среде Прата в конических плоскодонных колбах объемом 250-500 см<sup>3</sup> в люминостате при стандартных условиях. Культуру рачков дафний выращивали в климатостате Р2, согласно аттестованной методике [6]. Кормом дафний служила зеленая протококковая водоросль *S. quadricauda*. Для определения токсичности БШ и ОБР использовали методики, внесенные в Федеральный реестр [6, 7]. Водные вытяжки из БШ и ОБР для дафний готовили на культивационной воде с рН 7,0 - 7,5, для водорослей – на дистиллированной воде. В качестве показателей токсичности использовали выживаемость дафний и изменение уровня флуоресценции хлорофилла водорослей. Измерения интенсивности флуоресценции проводили на спектрофлуориметре «Флуорат-02-Панорама». При оценке острой токсичности с помощью *D. magna* продолжительность опытов составляла 96 часов, с использованием *S. quadricauda* - 72 часа. Класс

Сипулинов Ринат Батыркатович, аспирант. E-mail: sipulinovrb@mail.ru

Карагайчева Юлия Владимировна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Природная и техносферная безопасность». E-mail: Karagaicheva.julia@yandex.ru

Шилова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Природная и техносферная безопасность». E-mail: shilowa.natalya@yandex.ru

Рогачева Светлана Михайловна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой «Природная и техносферная безопасность». E-mail: smro13@yandex.ru

опасности устанавливали по кратности разбавления водных вытяжек, при которой вредное воздействие на гидробионты отсутствовало [5].

Фитотоксичность БШ оценивали с использованием семян редиса посевного *Raphanus sativus* L. (сорт Корунд). Подготовленные семена закладывали в чашки Петри на фильтровальную бумагу и заливали 5 мл исследуемого раствора. Контролем служили семена, помещенные в дистиллированную воду. Семена инкубировали в термостате при температуре 20°C в течение 72 часов. В эксперименте оценивали всхожесть семян (в %), среднюю длину ростка и корня в мм. Разницу показателей до 10% по сравнению с контролем не принимали во внимание, и образец считали экологически чистым, разница в 10–30% указывала на слабую токсичность почвы, от 30 до 50% – на среднюю степень, а выше 50% – на высокую степень фитотоксичности пробы [8].

Все эксперименты проводились в 3-кратной повторности. Математическую обработку полученных данных проводили с использованием компьютерной программы MS Excel 2000. Рассчитывали среднее арифметическое, доверительный интервал и стандартное отклонение. Статистическая достоверность всех представленных результатов оценивалась с использованием t-критерия Стьюдента и составляла 95%.

**Результаты и их обсуждение.** Для определения класса опасности отходов с помощью методов биотестирования обязательным является использование не менее двух тест-объектов из разных биологических таксонов или групп [5]. Если разные тест-системы проявляют неодинаковую реакцию, в качестве результата следует учитывать наиболее чувствительный ответ [9]. В работе для определения класса опасности БШ и ОБР на полиакриламидной основе в качестве тест-объектов использовались следующие культуры: зеленые протококковые водоросли *Scenedesmus quadricauda*, и ветвистоусые рачки *Daphnia magna* Straus; оценку фитотоксичности проводили на редисе посевном *R. sativus* L.

Первоначально определяли класс опасности ОБР. В качестве показателя токсичности использовали смертность дафний и изменение уровня флуоресценции хлорофилла водорослей. На рис. 1 представлена диаграмма, описывающая зависимость выживаемости дафний от концентрации суспензии ОБР и времени проведения эксперимента. Острая токсичность (гибель более 50% организмов) была обнаружена на 2-е сутки эксперимента в растворах с содержанием ОБР выше 1%. При экспозиции 96 ч острый токсический эффект отмечен в растворах с концентрацией 0,001-0,1%. Отсутствие смертности наблюдалось в растворе с минимальной концентрацией 0,0001%.

Далее было изучено влияние растворов водных вытяжек ОБР на снижение численности водорослей *S. quadricauda*, которое фиксировали по уменьшению интенсивности флуоресценции их хлорофилла. На рис. 2 представлена диаграмма, описывающая зависимость интенсивности флуоресценции хлорофилла водорослей от концентрации водной вытяжки ОБР. В исследуемых растворах с содержанием ОБР от 10,0% до 0,001% наблюдалось снижение численности клеток в среднем на 45-50%, при концентрации ОБР 0,0001% – на 27%. При 50%-ной концентрации ОБР – число клеток водорослей уменьшалось на 87%.

Таким образом, по итогам биотестирования было установлено, что водная вытяжка исследуемого ОБР оказывает токсическое действие на *S. quadricauda* и *D. magna*. Исследуемые тест-организмы проявили различную чувствительность по отношению к анализируемым пробам, наиболее чувствительными оказались водоросли. Так как согласно [9] в качестве окончательного результата берется наиболее чувствительный ответ, а установление класса опасности ведется в зависимости от кратности разведения водной вытяжки, при которой не выявлено воздействия на гидробионтов, то исследуемый ОБР был отнесен к 3 классу опасности.

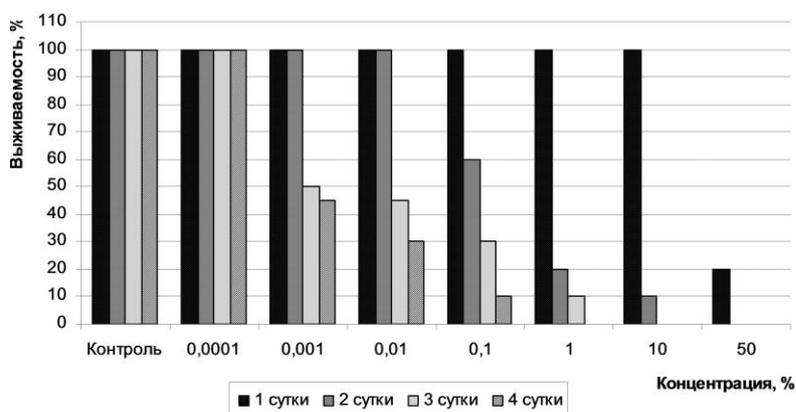
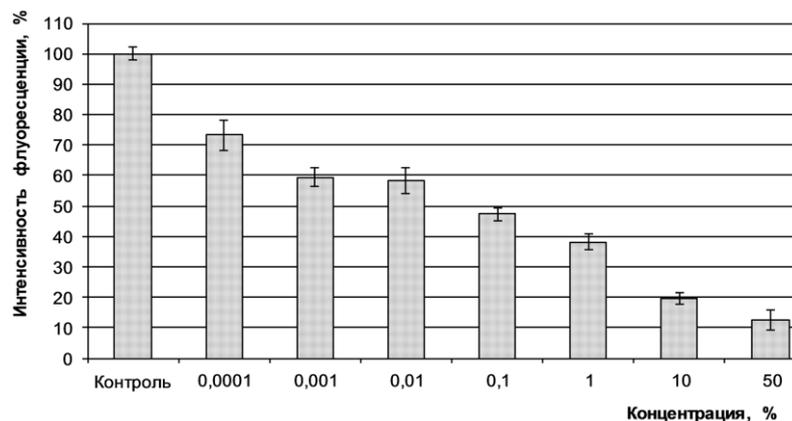


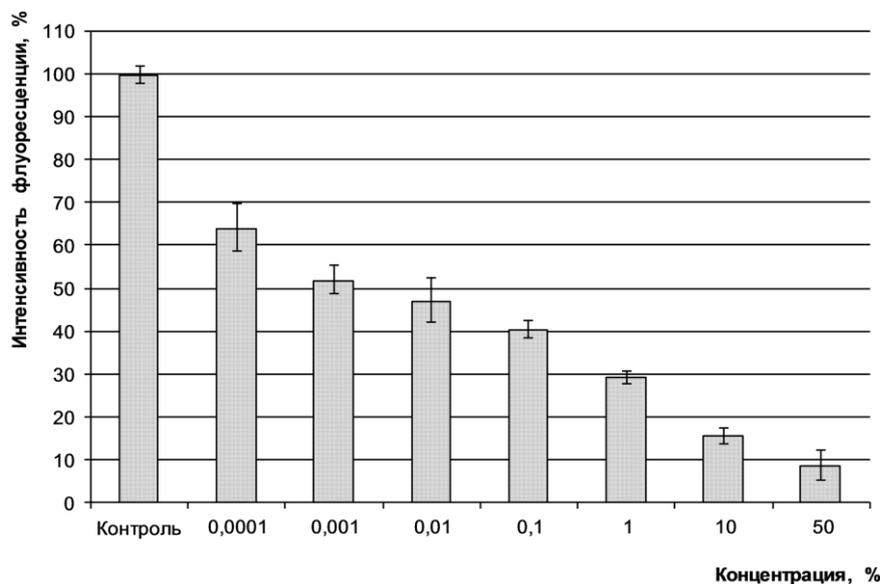
Рис. 1. Зависимость выживаемости *D. magna* от концентрации водной вытяжки ОБР и времени проведения эксперимента



**Рис. 2.** Зависимость интенсивности флуоресценции хлорофилла *S. quadricauda* от концентрации водной вытяжки ОБР

На следующем этапе нашей работы была проведена оценка степени токсичности БШ. Проводимые ранее эксперименты показали, что наиболее чувствительным тест-объектом к действию ОБР является *S. quadricauda*, поэтому дальнейшие исследования было решено проводить на данном организме. Известно, что зелёные протококковые водоросли *S. quadricauda*, являются первичным звеном пищевой цепи в пресных водоёмах, выполняя роль продуцентов. Аналогичную функцию в наземных экосистемах выполняют зеленые растения. Поэтому в качестве второго

биотеста было выбрано однолетнее растение редис посевной *R. sativus L.*, являющееся стандартным биотестом. Диаграмма зависимости интенсивности флуоресценции хлорофилла *S. quadricauda* от концентрации водной вытяжки БШ представлена на рис. 3. Острый токсический эффект, т.е. снижение отклика биотеста на 50% и более, отмечен в растворах с содержанием БШ 0,01%. Минимальная из исследуемых концентраций 0,0001% приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции хлорофилла на 17%.



**Рис. 3.** Зависимость интенсивности флуоресценции хлорофилла *S. Quadricauda* от концентрации водной вытяжки БШ

Для оценки фитотоксичности водной вытяжки из БШ был использован метод определения скорости прорастания семян *R. sativus L* в чашках Петри. В экспериментах использовались 50, 25, 10, 5, 1%-ные водные растворы вытяжки. Результаты фитотестирования представлены в табл. 1. Из данных, представленных в табл. 1, видно, что увеличение концентрации водной

вытяжки отхода в растворе ведет к снижению степени прорастания семян. Максимальный процент снижения исследуемого показателя - 28% отмечен в пробах с концентрацией вытяжки 50%. Острого токсического эффекта отмечено не было.

При определении ростовых характеристик проростков, было отмечено, что начиная с десятикратного разведения пробы, наблюдается

некоторое угнетение семян [10]. При содержании БШ в пробе в концентрации 1% и 5% наблюдается усиление роста корня на 16-18%, что можно объяснить ответной реакцией растения на присутствие органического углерода в почве. Отмечено, что длина побега по сравнению с контролем не

изменяется. Для наглядности представления результатов исследований (табл. 1) нами построены графики зависимости относительных показателей процента прорастания, длины корня и побега растения от концентрации водной вытяжки БШ в растворах (рис. 4).

Таблица 1. Параметры прорастания семян *R. sativus* в растворах водной вытяжки БШ

Концентрация вытяжки из БШ, %	Показатель					
	всхожесть семян,		средняя длина корня,		средняя длина побега	
	%	% от контроля	мм	% от контроля	мм	% от контроля
контроль	96,0±1,4	100	17,3 ± 1,1	100	14,8 ± 0,8	100
1	93,0±0,9	96,9±1,1	20,0 ± 1,9	115,9±2,4	14,9 ± 0,9	100,2±0,2
5	87,0±1,7	90,6±1,8	20,4 ± 1,4	117,9±1,4	14,5 ± 0,4	97,8±1,1
10	80,0±2,1	83,3±1,9	12,0 ± 0,4	69,0±1,1	11,0 ± 1,0	74,2±1,2
25	73,0±1,7	76,0±2,1	10,9 ± 0,9	63,0±2,4	11,7 ± 0,6	78,8±1,5
50	69,0±1,7	71,9±0,4	11,2 ± 0,7	64,9±0,4	9,1 ± 1,4	61±1,7

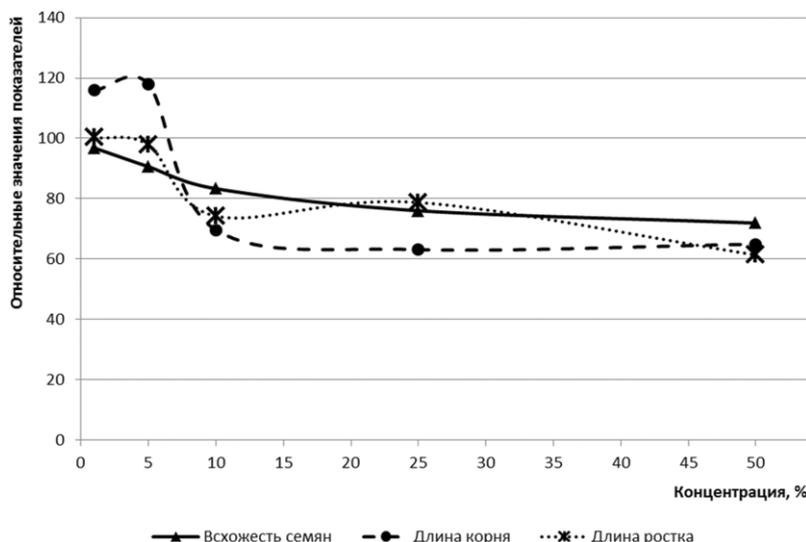


Рис. 4. Зависимость относительных показателей прорастания, массы корня и побега *R. sativus* от концентрации водной вытяжки БШ

**Выводы:** фитотестирование не выявило остро токсического действия БШ на растения, было отмечено, что низкие концентрации обладают стимулирующим воздействием на корневую систему *R. sativus* L.. Это свидетельствует о возможности культивирования растений на почвах, загрязненных отходами бурения. На основе данных биотестирования можно заключить, что наибольшую чувствительность к содержанию ОБР и БШ в водной среде проявляют водоросли *S. quadricauda*, и исследованные образцы БШ и ОБР могут быть отнесены к 3-му классу опасности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Булатов, А.И. Охрана окружающей среды в нефтегазовой промышленности / А.И. Булатов, П.П. Макаренко, В.Ю. Шеметов. – М.: Недра, 1997. 314 с.

2. Мстиславская, Л.П. Основы нефтегазового производства / Л.П. Мстиславская, М.Ф. Павлинич, В.П. Филиппов. – М.: 1996. 248 с.  
 3. РД 51-1-96 Инструкция по охране окружающей среды при строительстве скважин на суше на месторождениях углеводородов поликомпонентного состава, в том числе сероводородсодержащих (утв. Минтопэнерго РФ от 21.01.96, Минприроды РФ от 10.08.96.)  
 4. Мазлова, Е.А. Проблемы утилизации нефтешламов и способы их переработки. – М.: Изд. дом «Ноосфера», 1997. 128 с.  
 5. Критерии отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей природной среды (утв. приказом МПР РФ от 15 июня 2001г. № 511)  
 6. ФР. 1.39.2007.03222. Биологические методы контроля. Методика определения токсичности воды по смертности и изменению плодовитости дафний. – М.: Акварос, 2007. 41с.

7. ФР.1.39.2001.00284 Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей. – М.: Акварос, 2001. 42 с.
8. Галицкая, П.Ю. Тестирование отходов, почв, материалов с использованием живых систем: Учебно-методическое пособие / П.Ю. Галицкая, С.Ю. Селивановская, Р.Х. Гумерова. – Казань: Казанский университет, 2011. 47 с.
9. Терехова, В.А. Биотестирование как метод определения класса опасности отходов // Экология и промышленность России. 2003. №12. С. 27-29.
10. СП 2.1.7.1386-03. Санитарные правила по определению класса опасности токсичных отходов производства и потребления. – М.: Авангард, 2003. 20 с.

### ESTIMATION THE TOXICITY OF OIL PRODUCTION WASTE BY BIOTESTING METHODS

© 2015 R.B. Sipulinov, Yu.V. Karagaycheva, N.A. Shilova, S.M. Rogacheva

Saratov State Technical University named after Yu.A. Gagarin

Estimation the toxicity of boring slime and fulfilled boring solution on the basis of polyacrylamide with use of biotests on the basis of green algae *Scenedesmus quadricauda* culture and cladocerans *Daphnia magna* is carried out. The phytotoxicity of water extracts from boring slime on a garden radish of *Raphanus sativus* L. is studied. The studied samples were carried to the 3-rd class of danger, possibility of cultivation of plants on the soils polluted by drilling waste is shown.

Key words: *boring solution*, *boring slime*, *polyacrylamide*, *danger class*, *biotesting*, *Scenedesmus quadricauda*, *Daphnia magna*, *phytotoxicity*

---

Rinat Sipulinov, Post-graduate Student. E-mail:  
sipulinovrb@mail.ru

Yuliua Karagaycheva, Candidate of Biology, Associate  
Professor at the Department "Natural and Technospheric  
Safety". E-mail: Karagaycheva.julia@yandex.ru

Natalia Shilova, Candidate of Biology, Associate Professor  
at the Department "Natural and Technospheric Safety".  
E-mail: shilowa.natalya@yandex.ru

Svetlana Rogacheva, Doctor of Biology, Professor Head  
of the Department "Natural and Technospheric Safety".  
E-mail: smro13@yandex.ru