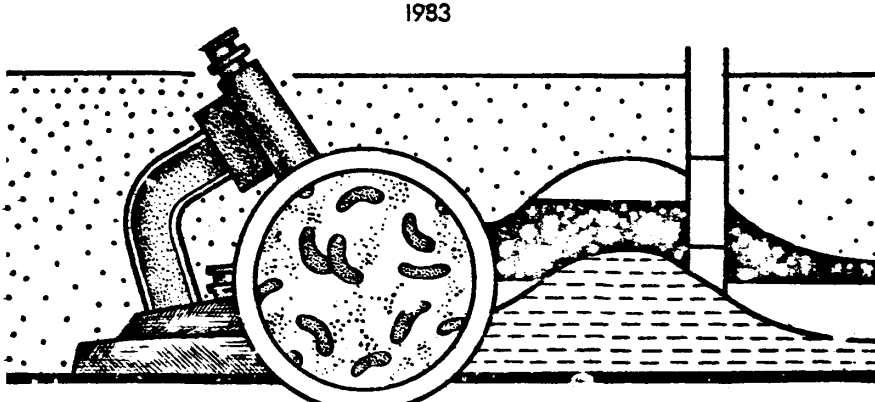
Министерство нефтяной промышленности

МЕТОДИКА
ИСПЫТАНИЙ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ РЕАГЕНТОВ С РАЗЛИЧНОЙ РАСТВОРИМОСТЬЮ В ВОДЕ

РД 39-3-897-83

1983



gost.e-ecolog.ru

Министерство нефтяной промышленности

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра
нефтяной промышленности
В.И.Игревский
"08" 07 1983 г.

МЕТОДИКА
ИСПЫТАНИЙ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ РЕАГЕНТОВ С РАЗЛИЧНОЙ РАСТВОРИМОСТЬЮ В ВОДЕ

РД 39-3-897-83

НАСТОЯЩИЙ ДОКУМЕНТ РАЗРАБОТАН:

Сибирским научно-исследовательским институтом нефтяной промышленности (Сибниинп)

Зам.директора по научной работе в области добычи нефти, к.т.н. Н.С.Маринин

Ответственный исполнитель:

Зав.сектором микробиологических исследований отдела техники и технологии добычи нефти и газа, к.б.н. Б.Б.Банзаракцаев

СОГЛАСОВАНО:

Начальник Технического управления Миннефтепрома Ю.Н.Байдиков

Начальник управления по добыче нефти и газа Главтюменнефтегаза В.М.Кудр..

1983

Продолжение на следующем листе

Продолжение титульного листа

Руководящий документ

РД 39 - 3-897-83

Заместитель начальника
Управления по повышению
нефтеотдачи пластов



В.Д.Москвин

Методика определения бактерицидной активности реагентов с различной растворимостью в воде на культуре микроорганизмов, выделенных из нефтепромысловой среды, основана на способах, позволяющих получать устойчивые диспергированные растворы испытуемых реагентов, увеличить возможность взаимодействия бактерий с реагентом, устранять воздействие их на клетки бактерий в питательной среде. В итоге повышается воспроизводимость опытов и их достоверность.

Настоящая методика должна применяться в отраслевых институтах и центральных научно-исследовательских лабораториях нефтедобывающих предприятий Миннефтепрома, занимающихся подбором бактерицидов для опытно-промышленных испытаний. Методика разработана в секторе микробиологических исследований отдела техники и технологии добычи нефти Сибниинп. В ее разработке принимали участие отдел коррозии ЦНИЛ Главтюменнефтегаза, Всесоюзный научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии.

Авторы: Б.Б.Банзаракцаев, Л.С.Дьякова, В.М.Котляров, З.И.Кудряшова, Н.У.Минеева, Ю.В.Опарин, Л.И.Чириков, С.Н.Файзуллина, П.Н.Ташлева.

© Сибирский научно-исследовательский институт нефтяной промышленности (Сибниинп), 1983

РУКОВОДЯЩИЙ ДОКУМЕНТ

МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЙ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ РЕАГЕНТОВ С РАЗЛИЧНОЙ РАСТВОРИМОСТЬЮ В ВОДЕ

РД 39-3-897-83

Вводится впервые

Приказом Министерства нефтяной промышленности
от 25.07.1983г. № 395 Срок введения установлен с 15.09.83
Срок действия по 15.09.87 г.

I. ОБЩАЯ ЧАСТЬ

I.I. Методика разработана в соответствии с письмами Министерства нефтяной промышленности от II.04.1977, ЖНЕ-2326 и Главтюменнефтегаза от 26.04.1977 № 013-4-62, а также решением Всесоюзного научно-технического семинара "Особенности заражения нефтяных пластов микроорганизмами, совершенствование систем подготовки воды для закачки ее в продуктивные пласты и методы борьбы с микробиологической коррозией (1980 г.)", обязывающими усилить микробиологический контроль за качеством воды, используемой в системах заводнения нефтяных пластов и подобрать бактерицид для ее обработки.

Предлагаемая методика разработана в целях:

изучения бактерицидной активности химических реагентов с различной растворимостью в воде и подбора химических бактерицидов для опытно-промышленных испытаний;

выявления среди реагентов, применяющихся при добыче нефти, соединений, которые являются бактерицидами или, наоборот, стимуляторами роста сульфатвосстанавливающих бактерий (СВБ) и других микроорганизмов;

поиска эффективных бактерицидов среди веществ биологического происхождения (антибиотиков).

I.2. По рассматриваемому вопросу имеется два методических руководства [I,2] . Согласно им вначале готовится желаемая концентрация испытуемого химического бактерицида из 0,5 или I,0% водного раствора. Затем бактерицид в течение определенного времени контактирует с клетками СВБ, после чего клетки бактерий переносятся на питательную среду для инкубации в термостатирующих условиях.

В вышеотмеченных руководствах имеются следующие методические недочеты, которые в процессе испытаний бактерицидов и других химических реагентов, применяющихся при добыче нефти, отрицательно сказываются на воспроизводимости и результаты их испытаний. Во-первых, невозможно приготовить желаемую концентрацию реагента, плохо растворимого в воде. Во-вторых, не учитывается фактор воздействия бактерицида на СВБ в культуральной среде. При отборе для посева клеток СВБ, проконтактировавших с бактерицидом, в питательную среду вместе с ними вносится часть раствора бактерицида, который в какой-то мере продолжает воздействовать на рост и развитие СВБ в питательной среде. В зависимости от его концентрации действие реагента в культуральной среде может быть различным, т.е. оно выражается в виде эффекта стимуляции или подавления роста СВБ.

Руководствуясь данной методикой, можно испытывать реагенты с различной растворимостью в воде и устранять воздействие испытуемого реагента в культуральной среде. Она является первым руководством для испытания бактерицидной активности химических реагентов не только на культуре сульфатвосстанавливающих бактерий (СВБ), но и на культуре аэробных гетеротрофных микроорга-

низмов и углеводородокисляющих бактерий. Кроме того, методика предусматривает испытания бактерицидной активности веществ биологического происхождения (антибиотиков).

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ РЕАГЕНТОВ С РАЗЛИЧНОЙ РАСТВОРИМОСТЬЮ В ВОДЕ

Сущность метода

2.1. Метод основан на приготовлении желаемой концентрации испытуемого реагента из 0,5 - 1%-ной водной эмульсии или суспензии, приготовленной методом ультразвуковой обработки и разделении клеток бактерий от испытуемого реагента центрифугированием, осаждением и промыванием клеток бактерий мембранном фильтре.

Аппаратура, материалы, посуда, растворы испытуемых реагентов, накопительная культура бактерий, пробы нефтепромысловых сред

2.2. Аппаратура:

ультразвуковой генератор УЗГ-3-04 с ванной очистки;

мембранные фильтры № 1 или № 2;

центрифуга;

автоклав или аппарат Коха;

суховоздушный сушильный шкаф;

термостат.

2.3. Материалы:

пробки ватные;

пробки резиновые.

2.4. Посуда стеклянная:

колбы емкостью 100, 500, 1000, 2000 мл;

пипетки мерные емкостью 1, 2, 5 $см^3$;

пробирки бактериологические и центрифужные;

чашки Петри;

покровные и предметные стекла.

2.5. Водные растворы испытуемых реагентов.

2.6. Пробы нефтепромысловых вод, зараженные бактериями:

вода сточная;

вода пресная;

вода пластовая и нефть;

вода из призабойной зоны нагнетательных скважин.

2.7. Питательная среда для СВБ:

среда Постгейта.

2.8. Среда для аэробных гетеротрофов:

пептонно-дрожжевая жидкая среда (ПДЖС);

пептонно-дрожжевая плотная среда (ПДПС).

2.9. Среда для аэробных углеводородокислящих бактерий:

минеральная среда.

П о д г о т о в к а р е а г е н т о в к и с п ы т а н и я м

2.10. Приготовление 0,5-ной или 1%-ной водной эмульсии или суспензии:

на аналитических весах отвешивают навеску испытуемого реагента, помещенную на оттарированное покровное стекло. Затем навеску реагента вместе с покровным стеклом переносят в колбу емкостью на 200-250 мл. В колбу приливают дистиллированную воду, объем которой доводят до 150-200 мл. Если реагент маслообразной консистенции и плохо растворим в воде, его эмульгируют ультразвуковой обработкой. Аналогично поступают, если реагент порошковидный и также плохо растворяется в воде. В том случае, когда испытуемый реагент хорошо растворим в воде ограничиваются обыч-

ным встряхиванием колбы с содержимым или перемешиванием магнитной мешалкой в течение I-2 минут.

Эмульгирование или суспензирование испытуемого реагента производят генератором ультразвука типа УЗГ-3-04 или другого типа до получения устойчивой эмульсии (суспензии). Обработку производят при частоте I9 кГц и мощности 400 Вт в течение I0-60 минут. Например, время экспозиции для реагента Север-I составляет 20-30 мин, в течение которого получается устойчивая водная эмульсия этого реагента.

Из приготовленной эмульсии (или суспензии) составляют несколько концентраций испытуемого реагента в расчете на I литр воды. Причем одну концентрацию реагента (500 или 200 мг/л и т.д.) готовят минимум в четырехкратной повторности и используют немедленно охлажденной до комнатной температуры.

П р и г о т о в л е н и е п и т а т е л ь н ы х с р е д д л я б а к т е р и й

2.II. Среду Постгейта для СВБ готовят согласно прописи, указанной в методике [I] (приложение I).

2.I2.Среды ПДМС и ПДПС для аэробных бактерий гетеротрофов готовят согласно рецептуре, приведенной в приложении 2.

2.I3. Минеральную среду для накопительной культуры углеводородокисляющих бактерий готовят по рецептуре, описанной в руководстве [4] (приложение 3).

С т е р и л и з а ц и я п и т а т е л ь н ы х с р е д, п о с у д ы, м а т е р и а л о в и о т б о р п р о б н е ф т е п р о м ы с л о в о й в о д ы

2.I4. Производится согласно методическим руководствам [I,3,4] (приложение 4).

Выделение накопительной культуры СВБ

2.15. Накопительную культуру выделяют из нефтепромысловой среды того месторождения, где предполагается использование бактерицида и другого реагента. Для этого из отобранной пробы промысловой среды стерильным шприцем отбирают 1 мл воды и впрыскивают в пенициллиновую бутылочку, наполненную питательной средой, и тщательно перемешивают. Перед впрыскиванием пробы пенициллиновые бутылочки, закрытые полиэтиленовой пленкой, протирают спиртом. Для испытаний бактерицидной активности реагентов используют четырех- или пятисуточные культуры СВБ после предварительного трехразового пересева на свежую питательную среду исходной лабораторной культуры, выделенной из нефтепромысловой воды и поддерживаемой периодическим пересевом (раз в один месяц) на свежую питательную среду и хранящейся при температуре 1-5^{0}С (в холодильнике).

Бутылочки с питательной средой после отбора пробы или пересева СВБ помещают в термостат при температуре 30-35^{0}С на 4-5 суток. Для контроля стерильности питательной среды в каждом случае термостатируют в тех же условиях две-три бутылочки со средой без добавления промысловой воды или пересеваемой культуры СВБ.

Для испытаний используют водную среду, содержащую СВБ в количестве 10^{6} клеток в 1 мл, определенных методом разведения или фильтрования исходной пробы (приложение 5).

Выделение накопительной культуры гетеротрофов

2.16. Выделение накопительной культуры аэробных бактерий-гетеротрофов производится следующим образом. Готовят 50-100 мл ПДС, разливают в пробирки низким слоем (2/3 объема пробирки).

Туда же вносят по 2-3 мл нефтепромысловой воды, зараженной бактериями; пробирки закрывают ватными пробками и помещают в термостат при температуре 30°С на 7 сут. Для испытаний реагентов используют пяти-шестисуточную лабораторную культуру гетеротрофных бактерий, выделенную из нефтепромысловой воды и поддерживаемую периодическим пересевом на скошенную ПДПО в пробирке (раз в 2-3 месяца) и хранящуюся под слоем стерильного технического вазелина [5] (приложение 6).

Для испытания используется 1-5 млн. клеток бактерий в 1 мл воды, определенных методом, приведенным в приложении 7. Следует отметить, что количество клеток бактерий гетеротрофов устанавливается для опытов по д м предварительных исследований нефтепромысловых вод.

Выделение накопительной культуры аэробных углеводородокисляющих бактерий (УОБ)

2.17. Накопительная культура УОБ выделяется по методике [4] (приложение 3).

3. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ РЕАГЕНТОВ

Испытания на накопительной культуре СВВ

3.1. Выдержка (контактирование) испытуемого реагента с клетками СВБ

3.1.1. В ряд маркированных пробирок известного объема (20-26 мл) наливают по 10 мл кипяченой и охлажденной пресной воды.

3.1.2. Накопительную культуру СВБ, находящихся в бутылочке или пробирке, тщательно перемешивают, выдерживают до оседания

осадка сульфидов, отбирают стерильной пипеткой жидкость над осадком, в которой определяют количество клеток в I мл методом разведения исходной пробы или фильтрования на мембранном фильтре (приложение 5).

Из раствора, содержащего клетки СВБ (10^6 клеток в I мл раствора), отбирают стерильной пипеткой по 0,5 мл и вводят в каждую пробирку с пресной водой и дозируют туда же эмульсию (или суспензию) испытуемого реагента с таким расчетом, чтобы концентрация его в пересчете на объем пробирки составляла 200, 150, 100, 50 мг/л (можно брать и другие желаемые концентрации). Затем пробирки закрывают стеклянными притертыми или резиновыми пробками без пузырьков воздуха, выдерживают при температуре 20-22°С от 2 до 24 ч.

3.2. Разделение клеток СВБ от бактерицида

3.2.1. При разделении бактерицида (хорошо растворимого в воде) от проконтактировавших с ним клеток СВБ поступают следующим образом. По истечении времени контактирования стерильной пипеткой отбирают из пробирок по 5 мл жидкости и переносят на мембранные фильтры (см.приложение 5, п.2-5). Осадок (бактерии) на фильтрах промывают 2-3 раза пресной стерильной водой путем ее фильтрования через фильтр с осадком.

3.2.2. Разделение бактерицида (плохо растворимого в воде) от СВБ проводят следующим образом.

После выдержки (контактирования бактерицида с СВБ) стерильными пипетками отбирают из пробок по 5 мл жидкости, переносят в стерильные центрифужные пробирки, которые закрывают ватными пробками. Затем растворы бактерицидов с клетками СВБ дважды центрифугируют в течение 20-30 мин при 800-1000 об/мин в целях осаждения клеток СВБ и их промывания. Промывание производят сле-

дующим образом. После разового двадцати-тридцатиминутного центрифугирования растворов бактерицида с клетками СВБ верхнюю часть раствора в пробирке сливают или отбирают стерильным шприцем и снова доливают восстановленной средой до первоначального уровня. Затем центрифугирование раствора повторяется.

Если раствор состоит из мельчайших суспензированных твердых веществ, то необходимо эти частицы вначале осадить легким центрифугированием в течение 1-3 мин при 500-700 оборотах в минуту. Затем верхнюю часть жидкости надо слить в другую стерильную центрифужную пробирку и осаждение клеток бактерий производить, как описано выше.

Если же испытуемый реагент эмульгирован в воде и его удельный вес больше удельного веса воды, то его необходимо также осадить легким центрифугированием в течение 1-5 мин при 500-1000 оборотах ротора центрифуги в минуту. Дальнейшие операции производятся, как описано выше.

Когда удельный вес эмульгированного или суспензированного в воде реагента меньше удельного веса воды, поступают следующим образом. После окончания контактирования клеток СВБ с реагентом раствор следует оставить на 3-5 ч в покое. За это время мельчайшие пузырьки реагента всплывут на поверхность. Они удаляются стерильной пипеткой. Дальнейшая операция по разделению клеток СВБ от частично растворенных в воде компонентов исходного реагента производится, как описано выше.

3.3. Определение степени подавления роста СВБ бактерицидом

3.3.1. После двух-трехразового промывания осадка (СВБ) на мембранных фильтрах последние переносят в стерильные маркированные пробирки фламбированным пинцетом. Затем пробирки доливают питательной средой до верха, закрывают пробками и термостатиру-

ются при 32-35°С. Каждой концентрации соответствуют две параллельные пробирки со средой. Две пробирки с питательной средой и культурой СВБ, не побывавшие в контакте с реагентом, являются контрольными.

За пробирками наблюдают в течение пятнадцати суток, отмечая ежедневно появление черной окраски. Эффективными считаются реагенты, не дающие потемнения или слегка окрашенные. Они отбираются для дальнейших заключительных испытаний. Реагенты, вызвавшие интенсивное потемнение окраски среды за короткий период времени (по сравнению с контролем), также отбираются для дальнейших испытаний.

Через пятнадцать суток в пробирках определяют количественное содержание сероводорода и рассчитывают степень подавления по методике [I] (см. приложение 8).

3.3.2. Окончательные выводы о степени подавления роста СВБ испытуемым реагентом делают после определения жизнеспособных клеток СВБ методом микроскопирования осадка на мембранных фильтрах и посева их на плотную питательную среду (см. приложение 5, п.2-4).

После окончания фильтрования пробы и двух-трехразового промывания осадка на фильтре последние помещают на плотную питательную среду (среда Постгейта с добавлением 2-3% выщелоченного агара, приложение 5, п.5.3) вниз стороной, на которой осаждены бактерии. Сверху фильтр заливают толстым слоем агара, охлажденного до 45°С. Испытания лучше проводить в глубоких чашках Коха.

Количество жизнеспособных клеток СВБ колониеобразующие единицы (КОЕ) выражают в процентах по отношению к КОЕ в контроле (контроль-СВБ, не побывавшие в контакте с испытуемым реагентом).

При микроскопировании осадка на мембранном фильтре и подсчете живых и мертвых клеток СВБ следует иметь в виду, что СВБ обоих родов(неспорообразующие *Desulfovibrio* и спорообразующие *Desulfotomaculum*)имеют вид прямых или изогнутых палочек 0,3-3 х 2-6 мкм. Первые часто имеют изогнутые спирилловидные клетки, вторые - вздутые клетки веретенообразной формы.Грамотрицательны, подвижны. Споры овальные или круглые, расположение субтермальное и терминальное. Жгутики полярные или перетрихальные.

После окончания испытаний проводят статистическую обработку полученных данных одним из известных в микробиологии и токсикологии методом.

Испытания на промысловой воде, зараженной СВБ

3.4. Бактерициды, показавшие положительный эффект и реагенты, стимулирующие рост СВБ на накопительной культуре, испытывают непосредственно на свежевзятой промысловой воде, зараженной СВБ.

3.5. Промысловую воду отбирают в стерильные маркированные колбы емкостью 100 мл, при этом вытесняется несколько объемов воды, быстро дозируют в них определенное количество приготовленного (как описано выше) испытуемого реагента с таким расчетом, чтобы концентрация его в пересчете на объем колбы составляла 5, 10, 25, 50... мг/л. Колбы закрывают стеклянными притертыми пробками без пузырьков воздуха и выдерживают от 2 до 24 ч.

3.6. После выдержки стерильными пипетками отбирается из колб по 5 мл жидкости, переносятся в стерильные центрифужные пробирки для центрифугирования и также для фильтрования на мембранных фильтрах.Дальнейшие операции проводят так, как описано выше (см.п.3.1-3.3).

Испытания реагентов на накопительной культуре аэробных гетеротрофных бактерий к нефтепромысловой воде,зараженной бактериями

3.7. Выдержка (контактирование) испытуемого реагента с бактериями.

3.7.1. Из накопительной культуры бактерий гетеротрофов, находящихся в пробирке с пептонно-дрожжевой жидкой средой,отбирают 2-3 мл среды. Среду разбавляют стерильной пресной водой до концентрации в ней 1-5 млн. клеток бактерий в 1 мл воды.Количество клеток в пробе определяется по методике, приведенной в приложении 7. Затем по 2 мл культуральной среды вводится в ряд маркированных стерильных колб объемом 100 $см^3$, заполненных кипяченой и охлажденной пресной водой (по 50 мл), и дозируют туда же испытуемый бактерицид в виде раствора, эмульсии или суспензии. Колбы закрывают стерильными ватными пробками, выдерживают в термостате при температуре 28-30^0 С от 2 до 24 ч при постоянном перемешивании на магнитных мешалках. До перемешивания среды стеклянные ампулы с металлическими магнитными стержнями промываются дистиллированной водой, высушиваются и стерилизуются над пламенем спиртовки.

3.8. Способы разделения клеток бактерий от испытуемого реагента.

3.8.1. При разделении реагента (хорошо растворимого в воде) от проконтактировавших с ним клеток бактерий поступают следующим образом. После выдержки реагента с бактериями в течение 2-24 ч стерильными пипетками отбирают из колб по 5 мл жидкости, переносят на стерильные мембранные фильтры (см.приложение 5,

п.2-5). Осадок (бактерии) на фильтрах промывают 2-3 раза пресной стерильной водой путем ее фильтрования через фильтр с бактериями.

3.8.2. Другой способ разделения клеток бактерий от реагента заключается в осаждении бактерии центрифугированием среды, как описано выше (см.раздел 3 2.) После выдержки испытуемого реагента (хорошо растворимого в воде) отбирают из колб по 5 мл жидкости переносят в стерильные центрифужные пробирки, которые закрываются ватными пробками. Осаждение клеток центрифугированием производится дважды в течение 20-30 мин при 3000-5000 об/мин ротора центрифуги. Промывание клеток стерильной пресной водой производится следующим образом. После разового 20-30-минутного центрифугирования жидкости часть раствора в пробирке сливают или отбирают стерильным шприцем и пипеткой и снова доливают водой до первоначального уровня. Затем центрифугирование повторяется.

3.8.3. Разделение клеток бактерий от бактерицида, плохо растворимого в воде, проводят так же, как описано в разделе 3.2.2, с той лишь разницей, что осаждение с последующим промыванием клеток бактерий делают при 3000-5000 тыс. оборотов ротора центрифуги в минуту.

3.9. Определение степени подавления роста бактерий

3.9.1. После двух-трехразового промывания осадка (бактерии) на мембранных фильтрах, последние переносят в стерильные маркированные чашки Петри с плотной питательной средой (ПДПС) вверх стороной, на которой осаждены бактерии. После инкубации посевного материала при температуре 28-30°С подсчитывают выросшие колонии бактерий через 24 ч и на третьи сутки. Степень подавления роста бактерий испытуемым бактерицидом выражают в процентах по отношению к контролю. Контроль-колбы с бактериями, не побывавшими в контакте с бактерицидом.

3.9.2. После окончания осаждения клеток бактерий центрифугированием и промывания в содержимом каждой пробирки определяют количество жизнеспособных клеток бактерий по методике, приведенной в приложении 7.

3.10. Реагенты, показавшие бактерицидный эффект на накопительной культуре гетеротрофных бактерий, испытывают непосредственно на свежевзятой нефтепромысловой воде, зараженной ими.

3.10.1. Промысловую воду в объеме 50-60 мл отбирают в стерильные маркированные колбы емкостью 100 мл, которые закрывают стерильными ватными пробками (в целях доступа воздуха). В колбы с нефтепромысловой водой дозируется эмульсия (или суспензия) испытуемого реагента с таким расчетом, чтобы концентрация его в пересчете на объем колбы составляла 5, 10, 25, 50 мг/л и т.д. После выдержки проводят разделение клеток бактерий от испытуемого реагента и определение степени подавления роста бактерий одним из способов, описанных выше (п.3.7-3.10).

испытание реагентов на накопительной культуре аэробных углеводородокисляющих бактерий и нефтепромысловой воде, зараженной УОБ

3.11. Испытания на накопительной культуре УОБ и промысловой среде, зараженной ими, проводятся аналогично испытаниям реагентов на накопительной культуре аэробных гетеротрофных бактерий (п.3.7-3-10) с той лишь разницей, что в опытах используются УОБ, выращенные в минеральной среде (приложение 3) и на этой же среде с добавлением 2-3% выщелоченного агара. На внутренней поверхности крышки чашки Петри наносят 2-3 капли нефти, которую растирают стеклянным шпателем по поверхности, или чашки Петри с посев-

ным материалом помещаются в эксикатор, на дно которого заливается 100-200 мл нефти. Для испытаний используют 1-2 млн жизнеспособных клеток аэробных УОБ в 1 мл среды, определенных по методике, рекомендуемой в приложении 7.

4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ ВЕЩЕСТВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ (АНТИБИОТИКОВ)

С у щ н о с т ь м е т о д а

4.1. Метод основан на способности диффундированного в агар антибиотика подавлять рост колоний бактерий. В микробиологической практике методом диффузии в агар определяют количество антибиотиков, продуцирующих микроскопическими грибами и другими микроорганизмами. Нами рекомендуется этот метод для определения бактерицидной активности антибиотиков, а также вводится в качестве контроля наиболее активный антибиотик, эффективность которого принимается за 100%. Эффективность испытуемого соединения рассчитывается (в сравнении с контрольным) по формуле, приведенной ниже (раздел 4.2).

И с п ы т а н и я а н т и б и о т и к о в н а н а к о п и т е л ь н о й к у л ь т у р е б а к т е р и й г е т е р о т р о ф о в

4.2. На горизонтальную поверхность стола ставят стерильные чашки Петри одинакового размера. Расплавляют ПДПС в колбе, охлаждают до 50-55^{0}С и вносят ее в эти чашки. После застывания среды в чашках в последние вносят 5-6 мл густой суспензии аэробных бактерий гетеротрофов, отобранных путем смыва со скошенной среды ПДПС в пробирках. Суспензию бактерий на поверхности среды в чашках Петри растирают стерильным стеклянным шпателем по всей поверхности среды. Затем чашки помещают на бумажный трафарет, на

котором нанесены точки на расстоянии 2 см друг от друга, и над этими точками вырезают в агаризованной среде стерильным металлическим сверлом или стеклянной трубкой лунки. Агаровые столбики из сверла выталкиваются стеклянной палочкой. Затем микропипеткой вносится в лунки строго определенный объем раствора испытуемого реагента, подготовленного к анализу.

Каждую рабочую концентрацию раствора реагента вносят параллельно в две лунки. В качестве контроля в две лунки вносится определенный объем раствора антибиотика, наиболее активного для данной культуры бактерий. Контрольные лунки делают в каждой чашке. Затем чашки помещают в термостат при температуре 28-30°С и через 24 ч измеряют (в мм) диаметры зон отсутствия роста бактерий вокруг лунок. Чашки при инкубации бактерий переворачивают крышкой вниз.

Средняя величина диаметров зон отсутствия роста бактерий вокруг лунок с раствором контрольного антибиотика берется за 100%. Эффективность испытуемых реагентов (S) рассчитывают по формуле:

$$S\ (\%) = \frac{в \cdot 100}{а},$$

где в - средняя величина диаметров зон отсутствия роста бактерий вокруг лунок с раствором испытуемого вещества, мм;

а - средняя величина диаметров зон отсутствия роста бактерий вокруг лунок с контрольным антибиотиком, мм.

Летальную концентрацию антибиотика определяют статистическим методом.

Испытания антибиотиков на накопительной культуре аэробных углеводородокисляющих бактерий.

4.3. Используют тот же способ и метод расчета, описанный

выше (п.4.2), с той лишь разницей, что в расплавленную плотную минеральную среду вносят 5-6 мл смывы густой суспензии накопительной культуры углеводородокисляющих бактерий. На внутреннюю поверхность крышки чашки Петри наносят 3-4 капли нефти, которая затем разглаживается стерильным шпателем.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

5.1. Сравнительные испытания бактерицидной активности химических бактерицидов и веществ биологического происхождения рекомендуется проводить на одних и тех же лабораторных накопительных культурах бактерий, выделенных из нефтепромысловой воды.

Испытывать бактерицидную активность реагентов описанными методами можно также на чистых культурах отдельных видов бактерий, выделенных известными в микробиологии методами [3,4].

5.2. Заключительные лабораторные испытания отобранных бактерицидов необходимо проводить на накопительной культуре бактерий, отобранных из свежевзятой нефтепромысловой воды того месторождения, где предполагаются их промышленные испытания. Минимальная лабораторная эффективная летальная концентрация выбранных бактерицидов уточняется (за 1-2 недели до проведения опытно-промышленных испытаний) на свежеотобранной промысловой воде, зараженной бактериями. Это связано с изменением активности и количественного содержания бактерий в средах, где предполагается применить бактерицид, а также с возможным отличием (по сравнению с предыдущими анализами) химического состава закачиваемой в нефтяной пласт воды.

6. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

6.1. При взвешивании бактерицидов и других реактивов не допускать поражения кожи и глаз, навеску брать в резиновых перчатках вдали от открытых участков огня в вытяжном шкафу.

6.2. При попадании раствора испытываемого реагента на кожу рук необходимо нейтрализовать его (нейтрализаторы: слабый раствор соды, нейтральных кислот, марганцово-кислого калия, нашатырного спирта). Затем пораженное место тщательно промывается водой. Перед началом испытаний необходимо ознакомить исполнителей с данными о свойствах испытуемых реагентов.

6.3. Установка автоклава и центрифуги, а также работа с ними производится при строгом и точном исполнении прилагаемых к аппаратам инструкций. К работе с автоклавом допускаются только подготовленные лица. Периодический контроль за ним осуществляется котлонадзором.

ЛИТЕРАТУРА

I. Методика определения сульфатвосстанавливающих бактерий в нефтепромысловых средах. Уфа, 1975, I7 с.

2. Рекомендации по проведению контроля за заражением нефтяных пластов сульфатвосстанавливающими бактериями и промысловым испытаниям бактерицидов. Тюмень, 1977, 28 с.

3. Пименова М.Н., Гречушкина Н.Н., Азова Л.Г. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М., изд-во Московского государственного университета, 1971, 250 с.

4. Практикум по микробиологии. Под ред. Н.С.Егорова. М., изд-во Московского государственного университета, 1976, 306 с.

5. Методы хранения коллекционных культур микроорганизмов. Под ред. Н.А.Красильникова. М., Наука, 1976, 150 с.

Нормоконтролер А.В.Кашникова
17.12.82

ПРИЛОЖЕНИЕ I

Рекомендуемое

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ СВБ И ОТБОР ПРОБ НЕФТЕПРОМЫСЛОВОЙ ВОДЫ

I. Среда Постгейта для СВБ готовится из следующих реактивов (в граммах на I литр дистиллированной воды):

KH_2PO_4	– 0,5
NH_4Cl	– I,0
Na_2SO_4	– 4,0
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	– 0,06
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	– 0,06
$C_3H_5O_3Na$	– 6,0
$NaCl$	– 5,0
$C_6H_5O_7Na \cdot 7H_2O$	– 0,3
агар – агар	– 0,08

2. Добавки (готовятся отдельно и добавляются перед употреблением):

дрожжевой автолизат – 5%–ный водный раствор – 5,0 мл;

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ –0,5%–ный раствор в 2%–ном растворе HCI – 2 мл;

$NaHCO_3$ – 5%–ный водный раствор – 5–I0 мл;

HCl – I%–ный водный раствор – I–3 капли;

аскорбиновая кислота– I%–ный водный раствор – 5 мл.

Добавки, как и основная среда, приготавливаются на дистиллированной воде и стерилизуются отдельно. Для предотвращения окисления дрожжевой автолизат запаивается в стеклянные ампулы (по 5 мл) и стерилизуются.

3. К стерильной питательной среде (без добавок) перед ее употреблением приливается 300 мл стерилизованной пластовой воды,

смесь нагревается до кипения и быстро охлаждается под струей холодной воды (для удаления кислорода). Затем приливаются добавки: дрожжевой автолизат, раствор сернокислого железа, аскорбиновой кислоты- и устанавливается pH до 7-7,5, добавляется стерильный раствор $NaHCO_3$ и при необходимости 1%-ный раствор HCl. Величина pH проверяется по универсальной индикаторной бумаге. Подготовленной таким образом питательной средой заполняются стерильные пенициллиновые бутылочки. При этом в них оставляется минимальное количество воздуха. Затем они закрываются стерилизованными плоскими резиновыми пробками. Горлышко и пробка каждой бутылочки заворачиваются полиэтиленовой пленкой и закрепляются резинкой. Бутылочки маркируются.

4. Все манипуляции производятся над пламенем спиртовки или газовой горелки. Обжигаются в пламени горлышки колб, пробки, концы пипеток. При желании питательная среда для СВБ по вышеприведенной методике может быть приготовлена на специализированном предприятии.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2
Рекомендуемое

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ АЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ ГЕТЕРОТРОФОВ

I. Приготовление пептонно-дрожжевой жидкости (ПДЖС) и плотной (ПДПС) среды.

Для приготовления сред используют неорганические соли квалификации ЧДА, ХЧ или ОСЧ; пептон (г. Семипалатинск), дрожжевой экстракт очищенный (г. Олайне Латвийской ССР) и агар-агар (г.Корсаков).

Наименование	ГОСТ	Вес,г
Экстракт дрожжевой	ТУ 6-09-10-1105-76	2,0
Пептон ферментативный	138-06	2,0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4161-77	0,08
K_2HPO_4	2493-75	0,5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4523-77	0,4
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	435-77	0,1
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	4174-77	0,01
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	4165-78	0,01
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	4148-78	0,001
$(NH_4)_2SO_4$	3769-78	2,0
Агар-агар вымороженный	17206-71	20,0
Дистиллированная вода	-	1000 мл

Компоненты растворяют в воде в той же последовательности, в которой они указаны в таблице. $MnSO_4$ в количестве 0,1 г растворяют в 20 мл дистиллированной воды, доводят pH среды до

7,I (если не соответствует этой величине) добавлением I%-ного раствора NaOH. Среду и раствор сернокислого марганца стерилизуют автоклавированием при I20°C отдельно в течение 30 минут. Раствор $MnSO_4$ добавляют к остывшей среде. ПДЖС готовят без добавления агара. Среды можно хранить при + 4°C в течение года.

2. При проведении бактериологических исследований можно использовать также тиогликолевую среду, изготавливаемую предприятием по производству бактерийных препаратов Московского научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова. На этой среде успешно культивируются аэробные и анаэробные микроорганизмы. Способ ее приготовления указан на этикетке упаковки.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Рекомендуемое

СРЕДА ДЛЯ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Готовят 100 мл синтетической среды состава (г/л):

KNO_3 – 4,0

KH_2PO_4 – 0,6

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ – 1,4

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,8

вода дистиллированная или водопроводная.

pH среды 6,9–7,2 (проверить по бромтимол-блау); установить, добавляя $NaHCO_3$ (5%-ный) или HCl (5%-ная); нефть – 2 мл.

Среду заражают небольшим количеством (5 мл) нефтепромысловой воды. Колбу помещают на качалку (200–300 об/мин) в термостат при температуре 30°С на 7 суток. Наличие смеси углеводородов в среде в качестве единственного источника углерода и хорошая аэрация способствуют развитию углеводородокисляющих микроорганизмов. Через 7 суток отмечают и записывают изменения, которые произошли со средой.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Рекомендуемое

СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, ПОСУДЫ И МАТЕРИАЛОВ И ОТБОР ПРОБ НЕФТЕПРОМЫСЛОВОЙ ВОДЫ

I. Посуда перед стерилизацией тщательно промывается водой и заворачивается в бумагу для сохранения стерильности после прогревания. Колбы и пробирки закрываются ватными пробками, обернутыми в марлю. В концы пипеток вставляются ватные тампоны, затем пипетки заворачиваются в длинные полоски бумаги шириной 4–5 см. Резиновые пробки также заворачиваются в бумагу.

Пенициллиновые бутылочки промываются водой и выдерживаются сутки в хромовой смеси (10 частей серной кислоты, I часть двухромовокислого калия), затем они тщательно промываются водой. Плоские резиновые пробки промываются горячей водой с добавлением соды, предметные и часовые–хромовой смесью, водой, высушиваются бумагой и стерилизуются.

2. Посуду стерилизуют горячим воздухом в сушильном шкафу при 165–170°С в течение двух часов.

3. Стерилизация питательных сред, досавок и других жидкостей производится нагреванием насыщенным водяным паром в автоклаве. Обычно среды наливаются не выше, чем на половину высоты сосуда, и закрываются ватными пробками. Стерилизация производится при 0,I МПа (120–121°С) 30 мин. Резиновые пробки стерилизуются также в автоклаве.

При отсутствии автоклава среды можно стерилизовать методом дробной стерилизации, используя аппарат Коха либо металлический сосуд цилиндрической формы с крышкой, внутри которого находится

сетчатая подставка на ножках, куда помещается стерилизуемый материал. На дно сосуда наливается вода так, чтобы уровень ее не доходил до дна подставки. Сосуд закрывается крышкой с отверстием для выхода пара и нагревается на электроплитке. Обработка среды паром проводится три раза по 30–40 мин. В промежутках между нагреванием среды помещаются на сутки в термостат при температуре 30–35°С.

4. Пробы нефтепромысловой воды (резервуары, отстойники, выкид насоса, изливающаяся нагнетательная скважина) отбираются из пробоотборного крана из струи в стерильные бутылки, которые заполняются полностью, закрываются резиновой пробкой без пузырьков воздуха и доставляются в лабораторию.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5
Рекомендуемое

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА БАКТЕРИЙ В ИСХОДНОЙ ПРОБЕ

I. Метод разведения исходной пробы

I.I. Приготовление разведений. Разведение проводят в стерильной водопроводной воде, пользуясь постоянным коэффициентом разведения, равным IO.

Для приготовления разведения стерильную водопроводную воду, предварительно прокипяченную и быстро охлажденную разливают по 9 мл в маркированные сухие стерильные пенициллиновые бутылочки, закрывают резиновыми пробками.

Отбирают I мл анализируемой воды стерильным шприцем и вводят в I-ю бутылочку с водопроводной водой - это разведение I:IO. Перемешивают и новым стерильным шприцем отбирают из этой бутылочки I мл и вводят во 2-ю - это разведение I:I00. Таким же образом готовят и последующие разведения I:I000, I:I0000 и т.д.

I.2. Посев в питательную среду. Из каждого разведения отбирают по I мл жидкости стерильным шприцем и вводят в подготовленные бутылочки с питательной средой.

Посевы разведений можно делать одним шприцем, но начинать следует обязательно с большего разведения. Каждое разведение высевают в 2-3 бутылочки ; термостатируют при 32-35°С и наблюдают 7-I0 суток. Появление темного осадка свидетельствует о наличии СВБ в данном разведении.

I.3. Подсчет количества клеток СВБ. Зараженность выражают обычно количеством клеток СВБ в I мл исходной воды. Принимают что бутылочка с максимальным разбавлением, где отмечается потемнение (рост), содержит единицы СВБ.

Подсчет количества клеток СВБ в исходной воде производится с учетом разбавления по формуле:

$$M = \frac{10^n}{V},$$

где M – количество клеток СВБ в исходной воде;

10 – коэффициент разбавления;

n – порядковый номер разведения, из которого сделан высев в последнюю бутылочку, где отмечен рост СВБ;

V – объем исходной воды, взятый для посева.

2. Метод осаждения бактерий на мембранном фильтре и прямого счета их под микроскопом

2.1. Для определения общего количества СВБ и других бактерий исследуемую пробу фильтруют через мембранные фильтры № 1 или № 2. Если в 1 мл пробы содержится более 30 бактерий, то ее рекомендуется высевать в пробирки (бутылочки, чашки Петри) с питательной средой, а если менее 30, то необходимо обогащение с помощью мембранных фильтров. В зависимости от ожидаемого содержания бактерий фильтруют 10,100 или 1000 мл исследуемой воды. Оптимальное количество колоний бактерий на фильтре диаметром 50 мм около 30–100 колоний. В зависимости от этого надо выбирать фильтруемый объем пробы. Для ускорения фильтрование следует проводить при небольшом вакууме.

2.2. После фильтрации исследуемой пробы фильтры подсушивают, накладывают нижней стороной на кружок фильтровальной бумаги, пропитанной раствором карболового эритрозина (5 г эритрозина на 100 мл 5%-ного водного раствора фенола) и выдерживают 1 ч в закрытой чашке Петри.

2.3. Затем отмывают краску перекладыванием фильтра на смоченную дистиллированной водой фильтровальную бумагу, пока фильтр не перестанет ее окрашивать.

2.4. После подсушивания фильтр накладывают на предметное стекло с каплей иммерсионного масла, его же капают на фильтр и накрывают покровным стеклом. Подсчет проводят с помощью светового микроскопа с иммерсионным объективом и окуляром с сетчатым микрометром. Бактерии окрашены в красный цвет.

3. Метод прямого счета бактерий на фильтрах помощью фазоконтрастной микроскопии

3.1. Устройство КФ-4 предназначено для исследования малоконтрастных объектов, невидимых в световом микроскопе при обычных условиях.

3.2. Фильтр кладут на предметное стекло (сторона, на которой осаждены бактерии, обращена вверх), на него наносят каплю иммерсионного масла, накрывают покровным стеклом. Препарат просматривают при зеленом светофильтре с помощью иммерсионного объектива и окуляра с сетчатым микроскопом (на зеленом фоне видны черные бактерии).

4. Определение количества жизнеспособных бактерий на фильтрах

4.1. Жизнеспособные бактерии, осевшие на мембранном фильтре после фильтрования исследуемой пробы (или пробы, побывавшей в контакте с бактерицидом), могут на питательной среде образовывать колонии, что позволяет подсчитать КОЕ-колониеобразующие единицы, жизнеспособные бактерии.

Для определения жизнеспособных аэробных бактерии фильтры помещают на плотную питательную среду вверх стороной, на которой осаждены микроорганизмы, а для выявления жизнеспособности анаэробных бактерий фильтры помещают на плотную питательную среду вниз стороной, на которой осаждены бактерии, а сверху фильтр заливают агаром (выщелоченным) охлажденным до 45^{0}С.

5. Подготовка мембранных фильтров и фильтрование проб.

5.1. Мембранные фильтры № 2 или № 3, проверенные на отсутствие трещин, отверстий и т.п., помещают по одному на поверхность дистиллированной воды, нагретой до 80°С в стакане (в чашке для выпаривания, эмалированной кастрюле) и медленно доводят до кипения на слабом огне, после чего воду заменяют и кипятят 10 мин. Смену воды и последующее кипячение повторяют 3-5 раз до полного удаления остатков растворителей из фильтров, после чего они готовы к работе. Подготовленные фильтры сохраняют сухими или в широкогорлой банке с дистиллированной водой. Перед употреблением фильтры стерилизуют кипячением в дистиллированной воде.

5.2. Фильтровальный аппарат стерилизуют фламбированием (легкий обжиг в пламени горелки) после обтирания ватным тампоном, смоченным спиртом. После охлаждения на нижнюю часть фильтровального аппарата (столик) кладут фламбированным пинцетом стерильный мембранный фильтр, прижимают его верхней частью прибора (стаканом, воронкой) и закрепляют устройством, предусмотренным конструкцией прибора.

В воронку (стакан) фильтровального прибора при соблюдении правил стерильности наливают необходимый объем воды и создают вакуум в приемном сосуде.

При фильтровании небольших объемов (1мл) в воронку сначала наливают 10 мл стерильной воды, а затем вносят анализируемую среду.

После окончания фильтрования воронку снимают, фильтр осторожно приподнимают за край фламбированным пинцетом при сокращении вакуума для удаления излишка влаги на нижней стороне фильтра, а затем переносят его, не переворачивая на питательную среду, разлитую в чашку Петри.

Под каждым фильтром на дне чашки делают надпись с указанием объема профильтрованной воды, даты посева и номера пробы. На одну чашку Петри можно поместить 3-4 фильтра с условием, чтобы фильтры не соприкасались.

5.3. Выщелачивание агар-агара

Агар-агар всегда содержит примеси органических и минеральных веществ, поэтому агар-агар, предназначенный для введения в среды строго определенного состава, предварительно очищают, выщелачивают. Для этого его помещают в эмалированную или стеклянную посуду, заливают водопроводной водой и ставят в термостат на 30-37°С. Примеси выщелачиваются в воду и разлагаются под влиянием развивающихся в ней микроорганизмов. Через день-два жидкость сливают, агар промывают несколько раз свежей водой, снова заливают водой и ставят в термостат. Когда и эта вода помутнеет, ее опять заменяют новой, и так повторяют до тех пор, пока не исчезнет запах, а вода не перестанет мутнеть. Обычно через 2-3 недели получают чистый агар-агар, почти лишенный растворимых органических веществ. Воду сливают, агар-агар помещают в двойной марлевый мешок и двое-трое суток промывают проточной водопроводной водой. Затем его раскладывают тонким слоем и просушивают на воздухе или в сушильном шкафу при 40-50°С. Выщелоченный агар-агар вносят в среды в количестве 1,5 - 2,0%.

ПРИЛОЖЕНИЕ 6

Рекомендуемое

ХРАНЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР ПОД МИНЕРАЛЬНЫМ МАСЛОМ

Принцип метода заключается в том, что организмы выращиваются на подходящей питательной среде и заливаются минеральным маслом. Для этой цели обычно используют нейтральное медицинское вазелиновое масло. Надежная стерилизация его достигается автоклавированием в течение 45 мин при 0,1 МПа или в сушильном шкафу при температуре 150°С в течение 1,5 ч. В настоящее время используют в основном агаровые среды в виде короткого косяка.

Немаловажное значение имеет высота слоя минерального масла над верхним краем косяка или столбика агара. Слой масла в 1 см достаточен, чтобы воспрепятствовать дегидратации среды и обеспечить сохранение жизни культур в течение долгого времени.

ПРИЛОЖЕНИЕ 7
Рекомендуемое

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ (БК) В ИССЛЕДУЕМОЙ ПРОБЕ

I. Окраска бактерий по методу Грама.

I.I. На обезжиренное смесью спирт + эфир (I:I) предметное стекло наносят бактериологической петлей каплю физиологического раствора NaCl pH 7,2-7,4 (если приготовление препарата из колоний или газона на плотных средах) или каплю культуры бактерий из жидкой среды культивирования.

В каплю физиологического раствора вносят небольшое количество микробных клеток исследуемой колонии или газона. Если на одном стекле приготавливают несколько мазков, то стекло делят на соответствующее число участков, нанося восковым карандашом кружочки, ограничивающие участки.

Затем в каплю взвеси или культуры из жидкой среды на стекле вносят петлей каплю реактива № I, распределяют смесь по стеклу или в пределах кружочка, подсушивают мазок (мазки) при комнатной температуре, фиксируют однократным медленным проведением его над пламенем горелки, промывают дистиллированной водой, просушивают фильтровальной бумагой и наносят реактив № 2, покрывая им всю поверхность стекла на I-3 минуты. Затем тщательно и быстро прополаскивают препарат дистиллированной водой, просушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

I.2. Приготовление реактива № I ;

кристаллический фиолетовый 0,5 г ;

спирт этиловый 96° 100 мл

растворяют и хранят при комнатной температуре.

Приготовление реактива № 2:

Йод кристаллический	0,2 г ;
фуксин основной	0,1 г ;
К J	0,4 г ;
спирт этиловый 96°	100 мл.

Вначале растворяют К J в спирте при нагревании в водяной бане или в течение суток при комнатной температуре. После этого добавляют йод кристаллический и фуксин основной. Хранят во флаконе из темного стекла.

2. Определение общей и биологической концентрации микроорганизмов (вегетативные клетки и споры) в исследуемой пробе.

2.1. Определение процента нежизнеспособных спор. Дифференцировать живые и нежизнеспособные споры можно: а) посредством световой микроскопии мазка, окрашенного по Граму, но при этом следует использовать подогретый реактив № 1.

Жизнеспособные споры имеют голубовато-розовую окраску, нежизнеспособные - фиолетово-черную. Этим методом ориентировочно определяют процент нежизнеспособных спор; б) по светопреломлению: под микроскопом с фазово-контрастным устройством жизнеспособные споры имеют вид слегка голубоватых блестящих овоидов. Нежизнеспособные споры, слабо преломляя свет, выглядят в виде темно-фиолетовых овоидов. Подсчет тех и других спор в камере Горяева позволяет определить процент нежизнеспособных спор в суспензии.

Оба эти метода пригодны лишь для ориентировочного определения процента нежизнеспособных спор. Ниже описаны методы, позволяющие более точно определить концентрацию спор, а также процент нежизнеспособных спор в суспензии.

2.2. Методика определения биологической концентрации (БК) микроорганизмов титрованием на агаровых пластинках.

2.2.1. Материалы: исследуемая проба; забуференный физиоло-

гический раствор (pH 7,2 – 7,4/ или дистиллированная вода; пробирки; пипетки /1 мл/; чашки Петри с питательным агаром, камеры Горяев , микроскоп с фазово-контрастным устройством.

2.2.2. Делают ряд /7 пробирок/ десятикратных последовательных разведений исследуемой пробы в физиологическом растворе. При титровании суспензии вегетативных клеток /спор/ для каждого разведения следует использовать отдельную пипетку. Пренебрежение этой предосторожностью может привести к получению ошибочного результата при работе с вегетативными клетками примерно в 100 раз превышающего истинный, а при работе со споровой суспензией – в 100 раз меньше.

2.2.3. Стерильной пипеткой делают высев из последнего /7-го/ разведения на 3 чашки Петри с питательным агаром, по 0,2 мл на каждую чашку, распределяя суспензию по агару равномерно. Той же пипеткой делают высев из 6-го, 5-го и 4-го разведений.

2.2.4. Засеянные чашки /12 шт./ выдерживают 30 мин. при комнатной температуре, не переворачивая. Затем переворачивают и ставят в термостат.

2.2.5. Производят подсчет выросших колоний. Чашки, где имеется больше 300 и меньше 10 колоний, не учитывают.

2.2.6. Проводят математическую обработку полученных результатов, при этом используют только 2-х и 3-х значные числа подсчета колоний.

Пример.

Разведение	I чашка	2 чашка	3 чашка
7	0	0	0
6	5	5	2

Разведение	I чашка	2 чашка	3 чашка
5	60	66	70 Подлежит учету
4	>500	>500	>500

б) суммируем количество колоний в 5-ом разведении

$$60 + 66 + 70 = 196 ;$$

в) эту сумму делим на количество чашек

$$196 : 3 = 65 ;$$

получаем среднее количество колоний на I чашку;

г) находим абсолютные величины отклонений от 65

$$65 - 60 = (5)$$
$$65 - 66 = (I) \quad \text{Суммируем}$$
$$65 - 70 = (5) \quad \text{отклонения} = (II) ;$$

д) сумму делим на количество чашек $(II) : 3 = (3,7)$

т.е. получаем средний разброс;

е) находим процент разброса $65 \pm 3,7$

$$\begin{array}{c} 65 - 100\% \\ 3,7 - x \end{array} \qquad X = \frac{3,7 \times 100}{65} = 5,7\%.$$

В том случае, если процент разброса превышает I5%, результаты титрования считаются недостоверными.

ж) определяем КИ микроорганизмов в I мл суспензии с оптической плотностью стандарта мутности. Для этого среднее количество колоний, приходящееся на одну чашку, умножаем на 5 (так как в I мл микроорганизмов в 5 раз больше, чем в 0,2 мл, которые мы засевали на каждую чашку) и полученную сумму умножаем на 10^5, потому что подсчет ведется по 5 разведению.

$$\left[(65 \pm 3,7) \cdot 5\right] \cdot 10^5 = (3,2 \pm 0,18) \cdot 10^7$$

или с учетом процента разброса $3,2 \cdot 10^7 \pm 5,7\%$.

2.2.7. Вычисляем КИ микроорганизмов в исходной суспензии.

Для этого нужно знать, какое количество физраствора было использовано при разведении I мл суспензии до оптической плотности стандарта мутности. Допустим, у нас на I мл суспензии израсходовано I2 мл физраствора: I мл + I2мл = I3 мл, т.е. БК микроорганизмов в исходной суспензии в I3 раз больше, чем в суспензии с оптической плотностью стандарта мутности, взятой ия титрования. Следовательно, получаем:

$$\left[(3{,}2 \pm 0{,}18) \cdot 10^7\right] \cdot 13 = (4{,}2 \pm 0{,}23) \cdot 10^8$$

микроорганизмов в I мл исходной суспензии.

2.3. Методика определения общей концентрации микроорганизмов в суспензии с использованием подсчета в камере Горяева.

2.3.I. Исследуемую пробу разводят последовательно I0-кратно физиологическим раствором (дистиллированной водой) до исчезновения в последней пробирке отчетливо видимой мутности. Для каждого разведения используют отдельную пипетку.

2.3.2. Монтируют камеру Горяева. Для этого к камере притирают покровное стекло до образования радужных колец. Если покровное стекло притерто не плотно (нет радужных колец), то результат подсчета резко завышается.

2.3.3. Из последнего разведения тонко оттянутой пастеровской пипеткой под покровное стекло камеры заливают исследуемую пробу (объем камеры ограничен).

2.3.4. Через 3-5 минут (время, необходимое для осаждения микроорганизмов) под микроскопом (окуляр I5, объектив 20) проводят подсчет микроорганизмов в I0 больших квадратах сетки камеры Горяева по диагонали. Производить подсчет в камере необходимо по возможности быстрее, так как суспензия подсыхает, что приводит к завышению результата.

2.3.5. Проводят математическую обработку полученных результатов.

Пример.

а) суммируем количество микроорганизмов в 10 больших квадратах

16 + 17 + 19 + 20 + 18 + 17 + 16 + 26 + 13 + 20 = 182;

б) эту сумму делим на 10 квадратов 182 : 10 = 18,2;

получаем среднее количество микроорганизмов в 1-м большом квадрате;

в) находим абсолютные величины отклонений от 18,2

18,2 - 16		(2,2)	
18,2 - 17		(1,2)	
18,2 - 19		(0,8)	
18,2 - 20		(1,8)	
18,2 - 18	=	(0,2)	Суммируем отклонения = (24,4)
18,2 - 17		(1,2)	
18,2 - 16		(2,2)	
18,2 - 26		(7,8)	
18,2 - 13		(5,2)	
18,2 - 20		(1,8)	

г) сумму делим на количество квадратов (24,4) : 10 = (2,4) получаем средний разброс;

д) находим процент разброса для самоконтроля

$18{,}2 \pm 2{,}4$ $\quad$ 18,2 - 100%
2,4 - x

$$x = \frac{2{,}4 \cdot 100}{18{,}2} = 13\%.$$

Если полученный процент разброса превышает 20%, то подсчет микроорганизмов следует повторить с большей тщательностью;

е) определяем общую концентрацию микроорганизмов в 1 мл суспензии (N) по формуле: $N = 250000 \cdot n \cdot p$, где n - среднее количество микроорганизмов в 1 большом квадрате $(18{,}2 \pm 2{,}4)$, p - кратность разведения исследуемой суспензии (100).

$$N = [250000 \cdot (18{,}2 \pm 2{,}4)] \cdot 100 = (4{,}5 \pm 0{,}6) \cdot 10^8 .$$

Следовательно, общая концентрация в I мл исходной суспензии составляет $(4,5 \pm 0,6) \cdot 10^8$ микроорганизмов.

Для получения достоверного результата необходимо производить подсчет микроорганизмов в камере по настоящей методике не менее 3 раз, каждый раз заливая в камеру одну и ту же разведенную суспензию. Средний результат 3 подсчетов показывает общую концентрацию микроорганизмов, близкую к истинной.

2.4. Определение количестве нежизнеспособных микроорганизмов в исследуемых суспензиях.

2.4.I. Исследовав суспензию микроорганизмов по описанным методикам (2.2. и 2.3), получили следующие результаты:

- в I мл суспензии общая концентрация $4,5 \cdot 10^8$;
- в I мл суспензии БК $4,2 \cdot 10^8$.

2.4.2. По формуле рассчитываем количество (В) нежизнеспособных микроорганизмов в I мл суспензии

В = Б – А, где

Б – общая концентрация микроорганизмов в I мл суспензии;

А – БК микроорганизмов в I мл суспензии;

$B - 4,5 \cdot 10^8 - 4,2 \cdot 10^8 = 0,3 \cdot 10^8$.

Получаем $B = 0,3 \cdot 10^8$ бак/мл.

2.4.3. Находим процент нежизнеспособных микроорганизмов в суспензии

$4,5 \cdot 10^8 - 100\%$

$0.3 \cdot 10^8 - x$

$$x = \frac{0,3 \cdot 10^8 \cdot 100}{4,5 \cdot 10^8} = 6,6\%,$$

Следовательно, жизнеспособных микроорганизмов в суспензии:

$100\% - 6,6\% = 93,4\%$.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ КОНЦЕНТРАЦИЙ МИКРООРГАНИЗМОВ В СУСПЕНЗИИ

Номер опыта	Общая концентрация (Б)	% разброса	В % к среднему $5,8 \cdot 10^8$	БК (А)	% разброса	В % к среднему $4,8 \cdot 10^8$
I	$6,5 \cdot 10^8$	II	II2	$4,4 \cdot 10^8$	I3	93
2	$6,3 \cdot 10^8$	I7	I09	$4,4 \cdot 10^8$	5	93
3	$5,3 \cdot 10^8$	20	9I	$4,8 \cdot 10^8$	I5	I00
4	$5,9 \cdot 10^8$	I3	I02	$4,2 \cdot 10^8$	5,7	87
5	$6,7 \cdot 10^8$	20	II5	$4,4 \cdot 10^8$	I5	93
6	$5,7 \cdot 10^8$	I8	98	$5,8 \cdot 10^8$	I0	I2I
7	$4,2 \cdot 10^8$	I4	72	$5,0 \cdot 10^8$	6	I04
8	$5,9 \cdot 10^8$	I6	I02	$3,9 \cdot 10^8$	6,6	82
9	$5,3 \cdot 10^8$	27	9I	$5,5 \cdot 10^8$	7	II5
I0	$4,8 \cdot 10^8$	3[illegible]	83	$5,2 \cdot 10^8$	I5	I08

Не учитывать

Следовательно, $Б = 5,8 \cdot 10^8$;

$A = 4,8 \cdot 10^8$.

Рассчитываем В $В = Б - А$

$$В = 5,8 \cdot 10^8 - 4,8 \cdot 10^8 = I \cdot 10^8.$$

Определяем (В) в процентах: $\frac{В \cdot I00\%}{Б}$

$$\frac{I \cdot 10^8 \cdot I00}{5,8 \cdot 10^8} = I7\%.$$

Т.е. в суспензии содержится I7% нежизнеспособных микроорганизмов.

ПРИЛОЖЕНИЕ 8
Рекомендуемое

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕРОВОДОРОДА

Образование сероводорода оценивается количественно. Для этого содержимое бутылочки быстро переносится в колбу, куда предварительно добавлено определенное количество титрованного раствора йода, приливается 1-2 мл 10%-ного водного раствора соляной кислоты, перемешивается и выдерживается 5 мин. Избыток йода титруется раствором тиосульфата до светло-желтой окраски. Затем прибавляется крахмал и дотитровывается до обесцвечивания. Одновременно таким же образом определяется объем раствора тиосульфата, расходуемый на контрольную пробу, в которой нет развития СВБ (содержимое бутылочки, выдержанной в холодильнике, или с добавкой бактерицида), количество образовавшегося сероводорода рассчитывается по формуле:

$$H_2S \text{ мг/л} = \frac{(a-b)\cdot K\, N \cdot 17 \cdot 1000}{V}, \qquad (I)$$

где a – объем раствора тиосульфата, расходуемого на титрование контрольной пробы, мл;

в – объем раствора тиосульфата, израсходованного на титрование избытка йода, мл;

K – поправочный коэффициент раствора тиосульфата;

N – нормальность раствора тиосульфата;

17 – эквивалентный вес H_2S ;

V – объем пробы (содержимое бутылочки), мл.

Степень подавления СВБ рассчитывается по формуле:

$$S\,\% = \frac{(C - C_1)\cdot 100}{C} \quad , \qquad (2)$$

где C – содержание сероводорода в контрольной пробе, мг/л;

C_1 – содержание сероводорода в исследуемой пробе, мг/л.

Содержание

	Стр.
I. Общая часть	I
2. Определение бактерицидной активности химических реагентов с различной растворимостью в воде	3
3. Проведение испытаний бактерицидной активности химических реагентов	7
4. Проведение испытаний бактерицидной активности веществ биологического происхождения (антибиотиков)	I5
5. Заключение	I7
6. Техника безопасности	I8
7. Литература	I9
8. Приложения	20

Методика
испытаний бактерицидной активности реагентов с различной растворимостью в воде

РД 39-3-897-83

Отв. за выпуск, редактор В.А.Брейтер
Подписано в печать 08.07.83 г.
Формат бумаги 60х90 1/16 Объем 2.0 п.л.
Тираж 130 экз. Заказ № 431

Ротапринт Сибниинп
г.Тюмень, ул. Орджоникидзе,35

gost.e-ecolog.ru