МИНИСТЕРСТВО НЕФТЯНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

ВНИИСПТ НЕФТЬ



ОЦЕНКА БАКТЕРИЦИДНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕАГЕНТОВ ОТНОСИТЕЛЬНО АДГЕЗИРОВАННЫХ КЛЕТОК СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ БАКТЕРИЙ ПРИ ЛАБОРАТОРНЫХ ИСПЫТАНИЯХ

РД 39 - 0147103 - 350 - 89

г.Уфа

gost.e-ecolog.ru

Министерство нефтяной промышленности

ВНИИСПТнефть

УТВЕРЖДЕН

начальником Главного научно-
технического управления
Довжком Е.М.

9 марта 1989г.

РУКОВОДЯЩИЙ ДОКУМЕНТ

ОЦЕНКА БАКТЕРИЦИДНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕАГЕНТОВ ОТНОСИТЕЛЬНО АДГЕЗИРОВАННЫХ КЛЕТОК СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ БАКТЕРИЙ ПРИ ЛАБОРАТОРНЫХ ИСПЫТАНИЯХ

РД 39-0147103-350-89

Руководящий документ "Оценка бактерицидной эффективности реагентов относительно адгезированных клеток сульфатвосстанавливающих бактерий при лабораторных испытаниях" разработан ВНИИСПТнефть при участии ОБЦ Башкирского научного центра УрО АН СССР.

Исполнители:

от ВНИИСПТнефть - с.н.с.Мурзагильдин З.Г., м.н.с.Юдина Е.Г., м.н.с.Сабирова А.Х.;

от ОБЦ Башкирского научного центра УрО АН СССР - вед.научн. сотр.Кмагужин М.С.

РУКОВОДЯЩИЙ ДОКУМЕНТ

Оценка бактерицидной эффективности реагентов относительно адгезированных клеток сульфатвосстанавливающих бактерий при лабораторных испытаниях

РД 39-0147103-350-89

Вводится впервые

Срок введения установлен с I мая 1989г.

Настоящий руководящий документ предназначен для инженерно-технических и научных работников предприятий (организаций) Миннефтепрома, занимающихся проблемами защиты нефтепромыслового оборудования и коммуникаций от микробиологической коррозии.

I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

I.I. Значительная часть коррозионных повреждений нефтепромыслового оборудования и коммуникаций обусловлена жизнедеятельностью микробных сообществ, формирующихся в условиях нефтяного месторождения. Среди микроорганизмов, инициирующих процесс разрушения металла, главная роль принадлежит сульфатвосстанавливающим бактериям (СВБ). При этом большая часть СВБ, содержащаяся в нефтепромысловых водах, адгезирована на твердой поверхности и лишь небольшое количество представлено свободно-плавающими (планктонными) клетками. Адгезия бактериальных клеток на поверхности осуществляется с помощью продуцируемых ими внеклеточных биополимеров - полисахаридов, которые играют роль барьера, предохраняющего клетки от воздействия неблагоприятных факторов внешней среды, в том числе и бактерицидов. Бактерициды оказывают избирательное действие на клетки бактерий. Как правило, адгезированные СВБ бо-

лее устойчивы к их действию, чем планктонные клетки.

Следовательно, для оценки реальной эффективности бактерицидов необходимы исследования как на планктонных, так и на адгезированных клетках СВБ.

I.2. Данная методика разработана для скрининга реагентов относительно адгезированных на металлической поверхности СВБ в лабораторных условиях.

I.3. Сущность метода заключается в следующем: образцы из малоуглеродистой стали выдерживают в активной культуре СВБ. Затем их обрабатывают бактерицидом и асептически переносят в культуральные сосуды с питательной средой и определяют минимальную летальную концентрацию реагента. Испытания проводятся в статических условиях.

2. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

2.I. Для работы с адгезированными на металлической поверхности сульфатвосстанавливающими бактериями необходимо следующее оборудование:

автоклав электрический	- по ГОСТ 9586-75Е
термостат суховоздушный ТС-80М-2	- по ТУ 64-I-I382-83
шкаф сушильный лабораторный	- по ТУ I6-53I.097-67
диспергатор ультразвуковой	- по ТУ 25-05.2I70-77
приспособление для закручивания алюминиевых колпачков	-
шприцы медицинские, емкостью I,2 мл, с набором инъекционных игл	- ГОСТ 22967-82Е - ГОСТ 25377-82Е

пипетки - по ГОСТ 20292-74Е

колбы плоскодонные - по ГОСТ 25336-82Е

склянки пенициллиновые с плоскими резиновыми пробками -

пробирки химические - по ГОСТ 25336-82Е

стерилизатор медицинский - по ГОСТ I9569-80Е

пробки резиновые - по ГОСТ 7852-76

спиртовки - по ГОСТ 25336-82Е

спирт этиловый ректификованный технический - ГОСТ I8300-87

рН-метр-милливольтметр типа рН-673М - ГОСТ I5I50-69

бумага индикаторная универсальная

алюминиевые колпачки

образцы плоские диаметром I0 мм (h = 2 мм) из малоуглеродистой стали 3

камера с ламинарным течением воздуха типа УО-БГ или УНБК-I - ТУ 46-22-562-80

2.2. Для обнаружения СВБ и поддержания культуры с целью сохранения жизнеспособности клеток, а также таксономических свойств бактерий используется среда Постгейта В:

основная среда

калий фосфорнокислый однозамещенный KH_2PO_4-0,5 г - по ГОСТ 4I98-75

аммоний хлористый - I г NH_4Cl - по ГОСТ 3773-72

кальций сернокислый - I,0 г $CaSO_4$ - по ГОСТ 32I0-77

магний сернокислый 7-водный
$MgSO_4.7H_2O$ - 2,0 г - - по ГОСТ 4523-77
натрий молочнокислый $C_2H_5O_3Na$ -
3,5 г - ТУ 6-09-3664-74
натрий хлористый $NaCl$ - 5 г - по ГОСТ 4233-77
Добавки:
дрожжевой экстракт(5% водный
экстракт)- I г - по ТУ 6-09-3979-75
железо сернокислое закисное
7-водное $FeSO_4.7H_2O$ - 0,5 г - по ГОСТ 4148-78
натрий углекислый кислый $NaHCO_3$ - по ГОСТ 4201-79
натрий сернистый $Na_2S.9H_2O$ - 0,2 г - по ГОСТ 2053-77

В качестве восстановителей для питательных сред можно использовать сульфид натрия, аскорбиновую кислоту и другие.

Все реактивы основной среды растворяют в I л водопроводной воды. Добавки готовят каждую в отдельности.

2.3. Для накопления клеток СВБ в лабораторной практике для исследовательских целей используется среда Постгейта С:

калий фосфорнокислый однозаме-
щенный KH_2PO_4 - 0,5 г - по ГОСТ 4198-75
аммоний хлористый NH_4Cl - I г - по ГОСТ 3773-72
натрий сернокислый Na_2SO_4 - 4,5 г - по ГОСТ 6053-77
кальций хлористый 6-водный
$CaCl_2.6H_2O$ - 0,06 г - по ГОСТ 4209-77
магний сернокислый 7-водный
$MgSO_4.7H_2O$ - 0,06 г - по ГОСТ 4523-77
натрий молочнокислый $C_2H_5O_3Na$ - 6 г - по ТУ 6-09-3664-74
натрий лимоннокислый $C_6H_5O_7Na$ -
0,3 г - по ГОСТ 22280-76
дрожжевой экстракт - 0,I г - по ТУ 6-09-3979-75

железо сернокислое - 7-водное
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,004 г - по ГОСТ 4148-78
дистиллированная вода - 1 л
хлористый натрий $NaCl$ - по мере надобности

3. ПОДГОТОВКА И СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, ДОБАВОК И ПОСУДЫ

3.1. Приготовление добавок

Навеску дрожжевого экстракта, растворенную в дистиллированной воде, тщательно перемешивают, кипятят 20 мин и фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат вновь кипятят 20 мин и фильтруют через мелкопористый бумажный фильтр.

Железо сернокислое закисное готовят в виде 5 % раствора в 2 % растворе соляной кислоты.

Натрий углекислый кислый - 5 % водный раствор, который используют для установления pH среды до 7,2.

Натрий сернистый - 5 % раствор в 5 % растворе натрия углекислого кислого, хранится в холодильнике, после стерилизации используется не более 7 дней.

3.2. Стерилизацию питательных сред, добавок и других материалов проводят насыщенным водяным паром при давлении выше атмосферного в специально предназначенных для этого автоклавах.

Питательную среду и добавки разливают в колбы не выше чем на половину объема колбы и закрывают ватными пробками и бумажными колпачками. Стерилизацию основной среды проводят в автоклаве при температуре 120± 2 °С, избыточном давлении 0,1 МПа, а добавок - при давлении 0,05 МПа. Время стерилизации 30 мин.

3.3. После стерилизации основной раствор питательной среды обескислороживают кипячением с последующим быстрым охлаждением под

струей водопроводной воды. Затем в той же последовательности, которая указана в п.2.2., вносятся добавки.

3.4. Величину pH среды контролируют с помощью pH-метра или по универсальной индикаторной бумаге. Раствор сульфида натрия приливают по каплям стерильной пипеткой до появления темно-серой окраски среды. Разлив сред и добавок проводят с соблюдением правил стерильности над пламенем спиртовки.

3.5. Установка автоклава и работа с ним производится при строгом выполнении правил, указанных в прилагаемой к аппарату инструкции. К работе допускаются только подготовленные лица.

Простерилизованные автоклавированием среды проверяют на стерильность путем термостатирования в течение суток при температуре 30 °С. Если среда сохраняет прозрачность, считают, что она стерильна.

Хранят среды в холодильнике. Срок хранения не более 2-х недель.

3.6. Всю посуду перед стерилизацией тщательно моют и высушивают.

3.7. Колбы, пробирки и пенициллиновые склянки закрывают ватными пробками и заворачивают в бумагу.

3.8. Пробки готовят из медицинской ваты, обертывают слоем марли и завязывают ниткой на свободном конце.

3.9. В концы пипеток вставляют ватные тампоны и заворачивают в длинные полоски бумаги шириной 4-5 см.

3.10. Резиновые пробки моют горячей водой с добавлением соды, затем тщательно промывают водопроводной и дистиллированной водой, помещают в термостойкие стаканы с водой и стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С и избыточном давлении 0,1 МПа.

3.11. Подготовленную посуду стерилизуют сухим паром в сушильном шкафу при 160 °С в течение 2 часов с момента достижения

указанной температуры.

3.12. Простерилизованную посуду вынимают из сушильного шкафа после его охлаждения ниже 60 °С.

4. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АДГЕЗИРОВАННЫХ СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ БАКТЕРИЙ

4.1. Металлические образцы тщательно обезжиривают, промывают водой, опускают на 5 мин в раствор соляной кислоты 1:1, снова промывают водой и затем обрабатывают 70 % раствором этанола.

4.2. Подготовленные образцы помещают на дно стерильного сосуда, вносят питательную среду Постгейта и накопительную культуру СВБ (2–3 суточную) в количестве 5–10 % от объема среды, закрывают пробкой и помещают в термостат (температура 32–35 °С).

4.3. Период инкубации длится 5–7 дней до достижения статических условий роста адгезированных СВБ. Рост СВБ определяется количественно во время всего периода инкубации.

4.4. Количественная оценка адгезированных СВБ производится методом предельных разведений после предварительного удаления клеток с поверхности металлических образцов. Результаты представляются как количество клеток на единицу площади – кл/см^2.

4.5. Удаление адгезированных клеток (биопленки) с поверхности образцов осуществляется следующим образом:

образец помещают в стерильную чашку Петри и, придерживая пинцетом, очищают его поверхность небольшими кусочками (~ 1 см^2) стерильной губки типа "Эффект", загрязненные кусочки губки помещают во флакон со средой Постгейта; или образец помещают в стерильную чашку Петри (или фарфоровую чашку) с питательной средой и, придерживая его пинцетом, делают соскоб стерильным скальпелем. Полученный соскоб переносят в пенициллиновый флакон.

Затем для диспергирования биопленки флакон энергично встряхивают в течение (30-60)с или подвергают ультразвуковой обработке на диспергаторе (22 кГц, 0,3-0,4 А, 30-60 с). При этом клетки СВБ сохраняют свою жизнеспособность. Из приготовленной суспензии делают 7-9 разведений. Пробы инкубируют в течение I4 дней при температуре 32-35 °С.

5. ОЦЕНКА БАКТЕРИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ РЕАГЕНТОВ

5.I. В ряд маркированных стерильных пробирок известного объема (20-25 $см^3$) вводят определенное количество исследуемого реагента (например, I00,200...500 мг/$дм^3$ и т.п.) и наливают предварительно прокипяченную и охлажденную минерализованную воду. Состав соответствует сточной воде месторождения, где предполагается дальнейшее испытание реагента.

5.2. Образцы со сформировавшейся на них биопленкой достают из сосуда стерильным пинцетом и промывают их стерильным буферным раствором (pH = 7,0-7,2) 3-4 раза для удаления культуральной среды и планктонных клеток СВБ.

Для сохранения асептических условий эту и последующие операции рекомендуется выполнять в камере с ламинарным течением воздуха или в струе инертного (стерильного) газа, например, гелия.

5.3. Образцы с адгезированными клетками СВБ помещают в пробирки с бактерицидом и закрывают пробирки пробкой. Пробы выдерживают при комнатной температуре от I до 24 часов. Для выбора более оптимальных параметров технологического режима время выдержки и концентрации исследуемого бактерицида варьируют.

5.4. Затем обработанные бактерицидом образцы с адгезированными клетками помещают в пробирки с питательной средой Постгейта и инкубируют в термостате в течение I4 суток при температуре 32-35 °С. Две пробирки с образцами без добавления реагента служат контрольной пробой.

Для каждой концентрации проводят три параллельных испытания.

5.5. Наблюдение за образцами осуществляют визуально, отмечая развитие СВБ по образованию черного осадка сульфида железа, распространяющегося от образца вверх по объему питательной среды. Отсутствие роста СВБ свидетельствует об эффективности действия бактерицида.

5.6. С целью определения эффективности действия бактерицидов на адгезированные клетки бактерий можно рекомендовать количественное выявление жизнеспособных СВБ в биопленке методом предельных разведений. Для этого адгезированные клетки СВБ после воздействия на них бактерицида удаляют с поверхности образцов (п.4.5), готовят суспензию клеток и делают ряд разведений. Затем пенициллиновые флаконы с пробами помещают в термостат при температуре 33 °С и наблюдают за развитием бактерий по образованию осадка сульфида железа. Отсутствие роста СВБ свидетельствует об эффективности действия бактерицида.

С О Д Е Р Ж А Н И Е

	стр.
1.Общие положения	3
2.Оборудование и материалы	4
3.Подготовка и стерилизация питательных сред,добавок и посуды	7
4.Культивирование адгезированных сульфатвосстанавливающих бактерий	9
5.Оценка бактерицидного действия реагентов	IO

РУКОВОДЯЩИЙ ДОКУМЕНТ

ОЦЕНКА БАКТЕРИЦИДНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕАГЕНТОВ ОТНОСИТЕЛЬНО АДГЕЗИРОВАННЫХ КЛЕТОК СУЛЬФАТ-ВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ БАКТЕРИЙ ПРИ ЛАБОРАТОРНЫХ ИСПЫТАНИЯХ

РД 39-0147103-350-89

450055, г.Уфа,просп.Октября,144/3

Подписано к печати 12.04.89г.
Формат 60х90/16. 0,6 уч.-изд.л. Тираж 136 экз.
Заказ № 118
Ротапринт ВНИИСПТнефти

gost.e-ecolog.ru