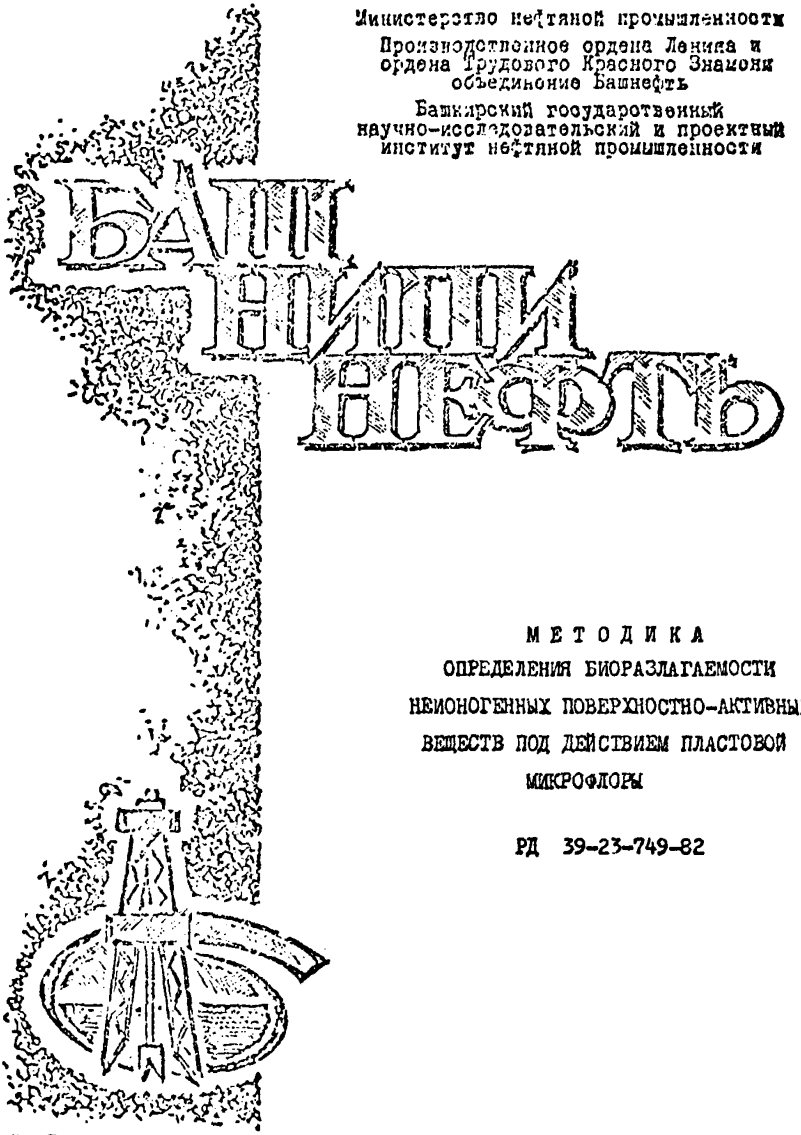
Министерство нефтяной промышленности
Производственное ордена Ленина и ордена Трудового Красного Знамени объединение Башнефть
Башкирский государственный научно-исследовательский и проектный институт нефтяной промышленности



МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОРАЗЛАГАЕМОСТИ НЕИОНОГЕННЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПЛАСТОВОЙ МИКРОФЛОРЫ

РД 39-23-749-82

Уфа · 1982

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО НЕФТЯНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Утверждаю:
Заместитель Министра нефтяной промышленности
_____ В.И.Юдин
"17" мая 1982 г.

РУКОВОДЯЩИЙ ДОКУМЕНТ

Методика определения биоразлагаемости неионогенных поверхностно-активных веществ под действием пластовой микрофлоры

РД 39-23-749-82

Настоящий документ разработан:
Башкирским государственным научно-исследовательским и проектным институтом нефтяной промышленности (Башнипинефть)
Директор, канд.техн.наук Н.Г.Кагарманов

Ответственные исполнители:
Зав.лабораторией прикладной экологии, канд.техн.наук Р.Х.Хазипов
Ст.инженер Н.В.Жданова
Инженер В.Н.Кравчук

Согласовано:
Зам.директора Всесоюзного нефтегазового научно-исследовательского института (ВНИИ), д-р техн.наук М.Л.Сургучев
Зам.директора Института биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, член.-корр. АН СССР М.В.Иванов
Начальник Технического Управления МНП Г.Н.Байдиков
Зам.начальника Управления по повышению нефтеотдачи пластов В.Д.Москвин

РУКОВОДЯЩИЙ ДОКУМЕНТ

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОРАЗЛАГАЕМОСТИ НЕИОНОГЕННЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПЛАСТОВОЙ МИКРОФЛОРЫ

РД 39-23-749-82

Вводится впервые

Приказом Министерства нефтяной промышленности от 01.10.82 № 515

Срок введения установлен с 01.11.82

Настоящий руководящий документ устанавливает правила и последовательность определения биоразлагаемости неионогенных поверхностно-активных веществ под действием пластовой микрофлоры.

Существующие методики оценки степени биохимического распада ПАВ [1] разработаны для условий аэротенков, для систем очистки сточных вод. Данная методика составлена с целью изучения биоразрушения, применяемых в настоящее время и новых неионогенных ПАВ, под действием пластовой микрофлоры и разработки мероприятий по их бактерицидной или иной защите от биоповреждений.

А Н Н О Т А Ц И Я

Настоящая методика предназначена для определения степени биоразрушения неионогенных поверхностно-активных веществ (ПАВ) под действием пластовой микрофлоры с целью оценки перспективности их применения для увеличения нефтеотдачи, разработки мероприятий по предотвращению биоповреждения и расхода реагента и повышения эффективности процесса добычи нефти путем закачки в пласт водных растворов ПАВ.

Методика предназначена для использования научно-исследовательскими и производственными организациями, занимающимися вопросами разработки нефтяных месторождений с применением водных растворов ПАВ.

Данная методика разработана во исполнение протокола № I заседания секции научно-технических проблем внедрения химических продуктов в нефтяной и газовой промышленности Научного совета по проблемам нефти и газа ГКНТ СМ СССР от 07.12.77г., рекомендации ГКНТ СМ СССР № 6-7/04 от 07.02.78 г. и решения Центральной комиссии № 805 от 21.02.79 г., обсуждена на заседании Ученого совета института БашНИПИнефть и рекомендована к утверждению в качестве руководящего документа. Проблема 0.Ц.015, подпрограмма 0.II.05.Ц этап IIIб. (постановление ГКНТ № 492 от 8.12.82).

I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

I.I. Одним из требований к НПАВ, применяемых для увеличения нефтеотдачи, с точки зрения охраны окружающей среды, является повышенная биоразлагаемость.

I.2. При высокой бактериальной зараженности [2] пластовых вод биологически "мягкие" НПАВ могут подвергаться биопревращению, в результате которого снижается их поверхностная активность и концентрация. Поэтому, одним из новых требований предъявляемых к НПАВ является способность сохранять длительное время технологические свойства и заданную концентрацию в условиях применения на промыслах.

I.3. Лабораторные исследования, выполненные при разработке данной методики в Башнипинефти показали, что под действием микрофлоры содержащейся в пробах, отобранных из призабойных зон нагнетательных скважин, снижается концентрация и поверхностная активность НПАВ [3] типа ОП-10, 2ВI3I7-12, АФ-14 [3].

2. ЦЕЛЬ И ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

2.I. Целью проводимых испытаний является определение величины изменения поверхностной активности и концентрации неионогенных ПАВ под действием микроорганизмов нефтяных месторождений.

2.2. Испытаниям могут быть подвергнуты практически все основные типы неионогенных ПАВ [4]. Технология применения неионогенных ПАВ для увеличения нефтеотдачи пластов и физико-химические свойства некоторых из них представлены в РД 39-I-I99-75 [5].

2.3. До начала испытаний проводится определение бактериальной зараженности месторождения, для чего осуществляют отбор проб для анализов из водоводов на кустовой насосной станции (КНС), из устьев нагнетательных и эксплуатационных скважин.

Из нагнетательной скважины отбор проб пластовой воды может производиться методом самоизлива или с использованием глубинных насосов.

2.4. Для относительной оценки бактериальной зараженности добываемых вод и дальнейшего испытания по настоящей методике рекомендуется определить общее количество микроорганизмов и наличие трех физиологических групп бактерий (СВБ, метанообразующих и углеводородокисляющих). Краткая характеристика 3 групп бактерий, рекомендуемых для экспериментального определения с целью оценки и контроля бактериальной зараженности, описана в литературе [3 6, 7] . При возможности для контроля наличия жизнеспособных клеток могут быть определены и другие группы микроорганизмов.

2.5. Общее количествобактерий в I мл жидкости определяется микроскопированием (приложение I).

2.6. Для количественного учета бактерий используют метод предельных разведений [8] . Для этого готовят пробирки с 9 мл стерильной водопроводной воды. Пробирки нумеруют. Стерильной пипеткой берут I мл исследуемой воды и вносят в пробирку № I с 9 мл стерильной воды, обжигая при этом горлышко пробирки над пламенем спиртовки (разведение будет I:I0). Затем, после перемешивания в течение I мин. свежей стерильной пипеткой берут I мл из пробирки № I и вносят в пробирку № 2 (разведение будет I:I00). Таким же образом готовят разведения I:I 000, I:I0 000 и т.д. Каждое разведение высевают в трех повторностях в пробирках с питательной средой стерильной пипеткой и термостатируют при 20°С.

Для определения и подсчета наиболее вероятного числа микроорганизмов в I мл используют таблицу Мак-Креди [9] .

2.7. Подготовку питательных сред желательно проводить в специализированных организациях. Готовят навески питательных сред, растворяют их в водопроводной воде и доводят pH раствора до необходимого значения. Бутыли со средой стерилизуют в автоклаве в течение 30 мин. при 0,07 МПа. Охлажденную среду разливают в боксе в I0 миллилитровые пенициллиновые флаконы для дальнейшего количественного учета бактерий по методу предель-

ных разведений. Флаконы закрывают стерильными резиновыми пробками, закрепляя их далее алюминиевыми колпачками. Составы питательных сред приведены в приложении 2.

2.8. В случае обнаружения микроорганизмов опыты по определению степени биоразрушения проводятся с использованием пластовой воды месторождения, рекомендованного к разработке с применением водных растворов ПАВ.

2.9. Поверхностная активность оценивается по величине межфазного натяжения на границе раздела раствор ПАВ в пластовой воде - очищенный керосин. Для измерения межфазного натяжения рекомендуется использовать сталагмометр по методике [5].

2.10. Определение концентрации ПАВ проводится колориметрическим методом с использование фосфорновольфрамовой кислоты [10] (приложение 3). Кроме этого, в качестве вспомогательного метода возможно определение концентрации ПАВ по графику ее зависимости от поверхностного натяжения.

2.11. Анализы по определению концентрации водородных ионов (pH) и окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) проводятся известными методами [9] .

3. ПРИБОРЫ, ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ

-термостат электрический для выращивания бактерий с автоматическим терморегулятором до 50°С.
-автоклав электрический по ГОСТ 9586-75
-pH-метр лабораторный "pH-262"
-микроскоп биологический по ГОСТ 8284-78
-центрифуга на 6-7 тыс.об./мин.
-фотоэлектроколориметр ФЭК-56 М
-пробирки на 20 мл по ГОСТ 10515-75
-пипетки на 1 и 10 мл по ГОСТ 20292-74
-спиртовки по ГОСТ 10090-74
-склянка Вульфа на 5 л по ГОСТ 10378-73
-мембранные фильтры № 1-3

- предметные стекла по ГОСТ 9284-75
- покровные стекла по ГОСТ 21400-75
- прибор ЗЕЙТЦА по ГОСТ 9775-69
- водоструйный насос по ГОСТ 10696-75
- чашки Петри по ГОСТ 10973-75
- пинцет по ГОСТ 21241-77
- стеклянные стаканы на 50 мл по ГОСТ 10394-72

- формалин по ГОСТ 1625-75
- керосин по ГОСТ 4753-68
- соляная кислота по ГОСТ 3118-77
- эритрозин ТУ 6-09-07-369-75
- фенол по ГОСТ 23519-79
- иммерсионное масло по ГОСТ 13739-78
- фосфорнокислый калий однозамещенный по ГОСТ 4198-75
- хлористый аммоний по ГОСТ 3210-77
- сернокислый магний по ГОСТ 4523-77
- молочнокислый натрий по ТУ 6-09-3664-74
- хлористый натрий по ГОСТ 4233-77
- дрожжевой автолизат по ТУ 6-09-39-79-75
- аскорбиновая кислота по ГОСТ 4815-76
- натрий сернокислый по ГОСТ 429-76
- фосфорнокислый аммоний двузамещенный по ГОСТ 3772-74
- соль Мора по ГОСТ 4208-72
- аммоний молибденовокислый по ГОСТ 3765-78
- хлористый кальций по ГОСТ 4460-77
- хлористый магний по ГОСТ 4209-77
- масляная кислота ТУ 6-09-530-75
- парафин по ГОСТ 23683-79
- вазелиновое масло по ГОСТ 3164-78
- фосфорновольфрамовая кислота по ГОСТ 18290-72
- агар-агар по ГОСТ 17206-71
- хлористый барий ТУ 6-09-3581-74
- серная кислота по ГОСТ 4204-77
- гидрохинон по ГОСТ 19627-74

- спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962-67
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72

Все реактивы должны быть квалификации ч.д.а.

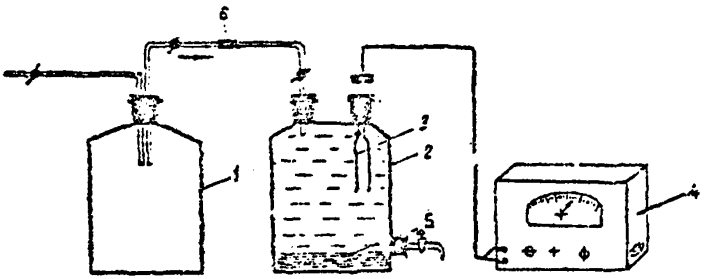
4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ РАЗРУШЕНИЯ

4.1. Оценка величины снижения поверхностной активности осуществляется путем сопоставления поверхностного натяжения на границе раствор ПАВ - очищенный керосин с контролем. Повышение коэффициента поверхностного натяжения указывает на снижение активности ПАВ.

4.2. Определение биоразрушения выполняют в той среде, где предполагается применение ПАВ. Схема лабораторной установки для определения биораспада НПАВ приведена на рисунке. Все эксперименты проводятся в боксе для микробиологических работ над пламенем спиртовки.

Испытания проводят в склянках Вульфа с нижним тубусом (2) емкостью 3 л, окрашенных в черный цвет, полностью заполненных испытуемой водой с добавкой 0,05 % ПАВ. Для предотвращения попадания в систему атмосферного кислорода используют "подушку" инертного газа. В качестве емкости для инертного газа рекомендуется использование резиновой камеры или подключение к системе баллона инертного газа через редуктор. Для предотвращения загрязнения микроорганизмов с инертным газом последний стерилизуют с помощью мембранного фильтра [11] . Продолжительность испытаний определяется, исходя из следующих положений: более высокая интенсивность биоразрушения ПАВ может протекать в призабойной зоне скважин; при средней скорости фильтрации жидкости в пласте 0,5-1,5 м/сут. [12] ; возможная область максимального развития микроорганизмов, равная 5-10 м от забоя скважин [2] , может быть достигнута раствором ПАВ за 15-20 суток. Таким образом, предполагается, что по истечении 30 суток скорость биораспада ПАВ в пластовых условиях практически будет оставаться неизменной и постоянной.

Лабораторная установка для определения биоразрушения ПАВ в анаэробных условиях



1. Ёмкость с инертным газом;
2. Склянка Вульфа с нижним тубусом;
3. Электроды: платиновый, каломелевый, стеклянный;
4. Прибор для определения концентрации водородных ионов (pH) и окислительно-восстановительного потенциала;
5. Раствор ПАВ в пластовой воде;
6. Мембранный фильтр для стерилизации инертного газа.

В исследуемой пробе через каждые 10 суток определяются поверхностное натяжение, концентрация ПАВ, концентрация водородных ионов (pH) и окислительно-восстановительный потенциал (ОВП).

Стерилизация контроля проводится путем введения в пробы формалина в количестве 0,05-0,10 %. Вышеуказанная концентрация в лабораторных условиях полностью подавляет жизнедеятельность бактерий и в настоящей методике проверяется путем контрольных посевов на вышеуказанные три физиологические группы до начала и по истечении 30 суток.

Выбор формалина для стерилизации обусловлен также тем, что он в концентрациях 0,005-0,10 % не изменяет поверхностной активности и сорбции ПАВ типа ОП-10.

4.4. Полученные результаты записывают в виде таблицы и сравнивают с данными контрольных опытов.

Наименование образца ПАВ (контроль)	Поверхностное натяжение мН/м				Концентрация ПАВ, мг/л				Степень биоразрушения %
	Время, сутки				Время, сутки				
	до опыта	10	20	30	до опыта	10	20	30	

4.5. Степень биоразрушения (х), в %, за истекший период определяют по формуле:

$$X = \frac{(C_1 - C_2) \cdot 100}{C_1},$$

где X - степень биоразрушения,

C_1 и C_2 - концентрация ПАВ соответственно до начала и после опыта, мг/л.

4.6. Данные по бактериальной зараженности месторождений, потери активности и концентрации химического продукта учитываются при применении или выборе того или иного типа ПАВ для увеличения нефтеотдачи пластов конкретного месторождения. При обильном содержании бактерий в закачиваемых пластовых водах нерационально использовать реагент с низкой степенью биоразрушения. При наличии высокоэффективных ПАВ, не удовлетворяющих

этому требованию, необходимо применять их с учетом микробиологических факторов.

5. ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С МИКРООРГАНИЗМАМИ, НЕИОНОГЕННЫМИ ПАВ

5.1. Правила работы в микробиологической лаборатории:

- работа с любыми микроорганизмами требует обязательного наличия халатов и колпаков или косынок, а также сменной обуви;
- необходимо следить за тем, чтобы бактериальная масса не загрязняла руки, стол, окружающие предметы;
- ватные пробки, закрывающие сосуды с микроорганизмами, не должны своей внутренней поверхностью соприкасаться со столом или руками;
- если пролилась микробная взвесь, необходимо обезвредить её, используя дезинфицирующие средства, например, карболовую кислоту;
- всю лабораторную посуду, содержавшую живые микроорганизмы, после работы необходимо подвергнуть термической обработке в автоклаве;
- выносить микробные культуры за пределы лаборатории запрещается;
- при работе с любыми микроорганизмами необходимо строго соблюдать личную гигиену, соблюдать чистоту на рабочем месте.

5.2. Меры безопасности при работе с едкими веществами (минеральными кислотами и их твердыми и жидкими ангидридами, едким кали и натром, раствором аммиака и т.д.):

- для предотвращения ожогов все работы с едкими веществами необходимо проводить в защитной спецодежде и пользоваться очками и перчатками;
- при приготовлении растворов серной кислоты необходимо использовать тонкостенную стеклянную или фарфоровую посуду. Приливать кислоту к воде следует тонкой струей при непрерывном помешивании, чтобы не было местного перегрева, растрескивания стекла и выброса кислоты.

- запрещается совместное хранение концентрированных кислот и легковоспламеняющихся жидкостей;

- переливать кислоту и щелочи из бутылей в мелкую тару следует при помощи сифона или ручных насосов различной конструкции;

- разлитые кислоты или щелочи необходимо немедленно засыпать песком, нейтрализовать и лишь после этого проводить уборку.

5.3. При работе с неионогенными ПАВ типа ОП-10 необходимо выполнять следующие правила:

- при работе с концентрированными препаратами ПАВ необходимо пользоваться защитными очками или прозрачными щитками для защиты глаз и кожи лица;

- при попадании ПАВ на кожу или глаза смыть обильным количеством воды;

- загрязненную ПАВ одежду тщательно прополоскать теплой водой до исчезновения пены;

- запрещается применять ПАВ в качестве моющего средства для мытья рук, лица или стирки одежды.

ПРИЛОЖЕНИЕ I
обязательное

6. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ В ПЛАСТОВОЙ ВОДЕ

Ход работы:

Сущность метода заключается в концентрировании бактерий из определенного объема анализируемой воды на мембранный фильтр, окраске и просмотра под микроскопом.

Подготовка к работе мембранных фильтров производится следующим образом: мембранные фильтры №2, №3, проверенные на отсутствие трещин, отверстий и т.п., помещают по одному на поверхность дистиллированной воды, нагретой до 80°С в стакане, и медленно доводят до кипения на слабом огне и выдерживают в течение 10-15 мин. Смену воды и последующее кипячение повторяют до полного удаления остатков растворителей из фильтров (3-5 раз), после чего они готовы к работе. Подготовленные фильтры сохраняются сухими или в широкогорлой банке с дистиллированной водой. Перед употреблением фильтры стерилизуются кипячением в дистиллированной воде.

Подготовка фильтровального аппарата к анализу: фильтровальный аппарат стерилизуют фламбированием после обтирания ватным тампоном, смоченным спиртом. После охлаждения на нижнюю часть аппарата (столик) кладут фламбированным пинцетом стерильный мембранный фильтр, прижимают его верхней частью прибора и закрепляют устройством, предусмотренным конструкцией прибора.

Фильтрование воды: перед анализом проба в пробирке тщательно взбалтывается и отстаивается в течение 5-10 мин. для отделения нефти от пластовой воды. Затем, не взбалтывая, стерильной пипеткой из нижней части пробирки отбирается 5-10 мл пластовой воды в зависимости от содержания микроорганизмов. Затем, пробы фильтруются.

Фильтр с осевшими на нем микроорганизмами высушивается на фильтровальной бумаге при комнатной температуре или в термоста-

те. Для удаления осадка фильтры обрабатывают 0,1 процентным раствором соляной кислоты.

Микроорганизмы на фильтре фиксируются формалином и после просушки окрашиваются эритрозином в течение 20-30 мин. (время подбирается экспериментально), после чего фильтр промывают в дистиллированной воде до прекращения окраски новых порций воды.

Окрашенные фильтры высушиваются, помещаются на предметное стекло в капли иммерсионного масла, покрываются покровным стеклом и просчитываются под микроскопом с окулярным сетчатым микрометром. Просчитывается 20-40 квадратов сетки с площадью не менее 300 мкм^2.

В каждом поле зрения просчитываются бактерии в 4 маленьких квадратах, расположенных по диагонали. Содержание бактерий не должно превышать 30 в каждом квадрате, но не менее 2-5.

Окончательный подсчет бактерий в 1 мл пластовой воды производится по формуле:

$$X = \frac{\pi R^2 \cdot 10^3 \cdot b}{a \cdot c \cdot e},$$

где X - количество бактерий в 1 мл;

R - радиус фильтрующей поверхности мембранного фильтра, см;

10^3 - переводной коэффициент;

b - число бактерий в полях зрения;

a - число полей зрения;

c - площадь поля зрения, мкм^2;

e - количество профильтрованной воды, мл;

Ошибка определения может заключаться в субъективном учете микроорганизмов исследователем. Кроме того, необходимо учесть, что частицы отличаются от микроорганизмов тем, что они или не воспринимают окраску, или бесформенны. Бактерии в основном имеют форму палочек или кокков и окрашены в красный цвет. Средняя ошибка прямого счета зависит от числа просчитываемых полей зрения и колеблется в пределах 2,8 - 10%.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2
обязательное

7. СОСТАВЫ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Для качественного выявления отдельных физиологических групп бактерий используют жидкие питательные среды: Постгейта -для сульфатвосстанавливающих, Коренковой -для углеводородокисляющих, Баркера -для метанообразующих.

Микроорганизмы	Питательные среды	Признаки роста на средах
Сульфатвосстанавливающие бактерии	Постгейта	Почернение среды с образованием сульфида железа
Углеводородокисляющие бактерии	Коренковой	По толщине бактериальной пленки, помутнение среды и микроскопированием
Метанообразующие бактерии	Баркера	По наличию пленки, осадка, помутнению среды. По образованию метана в количестве не менее $1 \cdot 10^{-2}$% об.

7.1. Состав среды Постгейта (pH =7,0 -7,5)

Соединение	Химическая формула	Количество, г
Фосфорнокислый калий однозамещенный	KH_2PO_4	0,5
Хлористый аммоний	NH_4Cl	1,0
Сернокислый кальций	$CaSO_4$	1,0
Сернокислый магний	$MgSO_4$	1,0
Молочнокислый натрий	$CH_3CHOHCOONa$	3,5
Хлористый натрий	$NaCl$	9,5
Вода водопроводная		1 000,0

Добавки:

5-процентный раствор дрожжевого автолизата - I,0 г/л;
5-процентный раствор $FeSO_4$ в однопроцентной HCI - 0,5 г/л;
5-процентный раствор аскорбиновой кислоты - I,0 г/л
I-процентный раствор Na_2S в однопроцентном Na_2CO_3 - вносить по I-2 капли до образования серого цвета.

Для корректировки pH среды используют 5-процентный раствор HCI и $NaHCO_3$.

7.2. Состав среды Коренковой.

Соединение	Химическая формула	Количество, г
Фосфорнокислый аммоний двухзамещенный	$(NH_4)_2HPO_4$	I,0
Хлористый аммоний	NH_4Cl	0,2
Фосфорнокислый калий двухзамещенный	K_2HPO_4	0,25
Фосфорнокислый калий однозамещенный	KH_2PO_4	0,25
Сернокислый магний	$MgSO_4$	0,02
Соль Мора		0,0I
Молибдат аммония	$(NH_4)_2MoO_4$	0,0052
Нефть		5,0
Хлористый кальций	$CaCl_2$	0,0I
Вода водопроводная		I 000,0

7.3. Состав среды Баркера (pH =7,0)

Соединение	Химическая формула	Количество, г
Хлористый аммоний	NH_4Cl	0,I
Фосфорнокислый калий двухзамещенный	K_2HPO_4	0,04
Хлористый магний	$MgCl_2$	0,0I
Органическое вещество		I-2
Вода дистиллированная		I 000,0

Перед посевом среду кипятят для удаления растворенных газов и, охладив, добавляют 3 процента по объему раствора, содержащего 1% Na_2S в 5 процентном $NaHCO_3$, стерилизованного в автоклаве. Добавлением стерильного раствора соляной кислоты устанавливают pH =7,0. В качестве субстрата используют ацетат или масляную кислоту или метанол. Выделение чистых культур проводят на агаризованной среде указанного состава. Пробирки с застывшей средой заливают смесью равных частей парафина и вазелинового масла, чтобы предохранить от высыхания и проникновения воздуха.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3
обязательное

8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПАВ

Для определения концентрации ПАВ рекомендуется колориметрический метод с фосфорновольфрамовой кислотой.

8.1. Колориметрический метод с фосфорновольфрамовой кислотой-гидрохиноновая модификация. Этот метод применим для определения ПАВ в пределах концентрации от 1 до 25 мг/л при объеме используемой для исследования исходной пробы равном 10 мл.

Определение основано на осаждении ПАВ в виде комплексного соединения с фосфорновольфрамовой кислотой и хлористым барием, который в концентрированной серной кислоте дает с гидрохиноном красно-коричневую окраску. Интенсивность окраски определяется визуально или при помощи фотоколориметра (λ =500 нМ, кювета - 0,5 или 1,0 см). Определению мешают сульфаты при концентрации их более 200 мг/л, их влияние устраняется путем разбавления пробы.

8.2. Аппаратура и стеклянная посуда: фотоколориметр (λ =500 нМ), кюветы 0,5-1,0 см, центрифуга, пробирки центрифуги емкостью 20мл.

8.3. Реактивы:

1. соляная кислота ч.д.а. раствор 1:1;
2. хлористый барий, 10-процентный раствор;
3. фосфорновольфрамовая кислота ч.д.а., 2-процентный раствор
4. серная кислота ч.д.а., уд.вес 1,84 ;
5. гидрохинон, 5-процентный раствор в серной кислоте;
6. основной эталонный раствор ПАВ: растворить 1 г ПАВ в мерной колбе на 1 л и долить до метки дистиллированной водой (1 мл раствора содержит 1 мг ПАВ);
7. рабочий раствор ПАВ: дополнить 10 мл основного раствора ПАВ, содержащегося в мерной колбе, дистиллированной водой до объема 100 мл (1 мл раствора содержит 0,1 мг ПАВ). Приготавливать раствор в день проведения анализа.

8.4. Шкала стандартов. В семь пробирок центрифуги последовательно отмеривают следующие количества рабочего стандартного раствора ПАВ: 0; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мл, что соответствует весовым количествам от 0 до 0,25 мг ПАВ в пробе. Дополнить содержимое пробирок дистиллированной водой до 10 мл, а затем поступать так, как указано в описании хода определения, начиная с добавления 2 капель соляной кислоты.

Шкала стандартов является нестойкой и стандарты для визуального определения следует приготавливать одновременно с исследуемой пробой. При фотоколориметрическом определении использовать приготовленные стандарты для вычерчивания калибровочного графика, откладывая по оси абсцисс концентрацию ПАВ, а по оси ординат -оптическую плотность.

8.5. Ход определения. Отмерить в пробирку центрифуги 10 мл или иное количество исследуемой пробы, соответственно концентрированной или разбавленной с таким расчетом, чтобы содержание неионогенного ПАВ в пробе находилось в пределах от 0 до 0,25 мг. Добавить 2 капли соляной кислоты (1:1), 1 мл раствора хлористого бария и 1 мл раствора фосфорновольфрамовой кислоты, перемешать тонкой стеклянной палочкой (пользуясь ею в дальнейшем для проведения опыта).

Поместить пробирку с исследуемой пробой и стандарты в химический стакан с кипящей водой и нагревать в течение 15 мин., поддерживая воду в стакане в состоянии кипения. Затем, вынуть пробирки и отцентрифугировать осадок в течение 5 мин. при скорости вращения 2500 -3000 $мин^{-1}$. Образовавшийся над осадком слой жидкости осторожно слить, добавить в пробирки по 2 мл горячей дистиллированной воды, перемешать палочкой и снова центрифугировать, как указано выше.

Жидкость слить, как в предыдущем случае, еще раз добавить по 2 мл горячей воды, перемешать, отцентрифугировать и еще раз слить. Осадок высушить в сушильном шкафу при 105-110 °С. Добавить в пробирки с осадком по 3 мл концентрированной серной кис-

лоты, перемешать и после полного растворения осадка добавить по 1 мл раствора гидрохинона и перемешать. Содержимое пробирок дополнить концентрированной серной кислотой до объема 10 мл и перемешать.

Спустя 15 мин. визуально определить интенсивность окраски пробы путем сравнения со шкалой стандартов или определить значение экстинкции и отсчитать содержание ПАВ по калибровочному графику, учитывая поправку на контрольную пробу. Результаты пересчитать на 1 л исследуемой пробы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методика оценки биохимического распада синтетических ПАВ (анионного и неионогенного типа). ОНТИ ВНИИ, ВНИИ, М., 1970.
2. Романова Е.П., Кузнецов С.И. Микрофлора нефтяных месторождений. Наука, М., 1974.
3. Хазипов Р.Х. Микробиологические проблемы при применении химреагентов для увеличения нефтеотдачи. В сб. Биоповреждения.(тезисы докладов 2 Всесоюзной конференции по биоповреждениям). Горьковский гос.университет, Горький, 1981.
4. Бабалян Г.А. и др. Применение поверхностно-активных веществ с целью увеличения нефтеотдачи. Недра, М., 1970.
5. Руководство по проектированию и применению метода заводнения с водорастворимыми поверхностно-активными веществами (ПАВ). РД 39-1-199-79, Уфа, Башнипинефть, 1979.
6. Методика оценки защитного действия реагентов, подавляющих микробиологическую коррозию. Уфа, ВНИИСПНефть, 1977.
7. Кузнецова З.А., Горленко В.А. Прикладная биохимия и микробиология, 1985, 10.
8. Сазанова Л.В. Результаты изучения пластовой микрофлоры нефтяных месторождений Куйбышевской области. Труды института микробиологии АН СССР, 1961.
9. Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. МГУ, М., 1976, с.162-167.
10. Лурье Ю.Ю. Унифицированные методы анализа вод. Химия, М., 1973, с.359-361.
11. Лукиных Н.А. Очистка сточных вод, содержащих синтетические ПАВ. Стройиздат, М., 1972.
12. Муравьев И.М. и др. Разработка и эксплуатация нефтяных и газовых месторождений М., 1970, с.13.

gost.e-ecolog.ru