

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

ЕДИНАЯ СИСТЕМА ЗАЩИТЫ ОТ КОРРОЗИИ И СТАРЕНИЯ. ТОПЛИВА НЕФТЯНЫЕ

МЕТОД ЛАБОРАТОРНЫХ ИСПЫТАНИЙ БИОСТОЙКОСТИ ТОПЛИВ, ЗАЩИЩЕННЫХ ПРОТИВОМИКРОБНЫМИ ПРИСАДКАМИ

ГОСТ 9.023—74

Издание официальное

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СТАНДАРТОВ
СОВЕТА МИНИСТРОВ СССР
Москва

gost.e-ecolog.ru

Группа Т99

УДК 662.753.001.4(083.74)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ЕДИНАЯ СИСТЕМА ЗАЩИТЫ ОТ КОРРОЗИИ И СТАРЕНИЯ

ТОПЛИВА НЕФТЯНЫЕ

Метод лабораторных испытаний биостойкости топлив, защищенных противомикробными присадками

Unified system of corrosion and ageing protection. Oil fuels. Method of laboratory testing biostability of fuels protected by antimicrobe additives

ГОСТ 9.023—74

Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 16 апреля 1974 г. № 900 срок действия установлен

с 01.07 1975 г.
до 01.07 1980 г.

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на нефтяные дистиллятные топлива и устанавливает метод лабораторных испытаний биостойкости топлив, защищенных противомикробными присадками.

Метод применяют также для определения противомикробного действия различных присадок.

Сущность метода заключается в инкубации топлив с присадкой в контакте с водно-минеральной средой (в дальнейшем — среда), зараженной специально подобранными микроорганизмами, активно развивающимися за счет данного топлива без присадки. Инкубацию проводят в условиях, оптимальных для развития микроорганизмов.

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ОБРАЗЦОВ

1.1. Образцами являются:

топливо, защищенное противомикробной присадкой — при оценке его биостойкости;

топливо, не защищенное присадкой — при оценке противомикробного действия присадок.

1.2. Образцы топлив отбирают по ГОСТ 2517—69 в количестве 500 мл и испытывают без предварительной очистки и стерилизации.

Перепечатка воспрещена

Издание официальное

Переиздание. Декабрь 1974 г.

© Издательство стандартов, 1975

2. КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

2.1. Для испытаний применяют чистые культуры гриба Cladosporium resinae и бактерии Pseudomonas aeruginosa (pyocyanea).

Кроме того, допускается применять чистые культуры различных видов микобактерий (род Mycobacterium) и дрожжей Candida (C. guilliermondii, C. lipolytica, C. tropicalis), а также накопительные культуры, состав которых определяется источником их получения и нефтепродуктом, за счет которого они формируются.

2.2. Чистые культуры грибов и бактерий получают из коллекций или выделяют из накопительных культур.

2.3. Накопительные культуры выращивают на минеральной среде с испытуемым топливом без присадки; для этого зараженную минеральную среду смешивают с топливом в следующих соотношениях:

при выращивании на дизельных топливах и топливах для реактивных двигателей (в дальнейшем реактивное топливо) — по 3 мл среды и топлива;

при выращивании на бензинах — 10 мл среды и 1 мл бензина.

2.4. Заражение минеральной среды производят почвой, загрязненной нефтепродуктами, или водно-топливной смесью, пораженной микроорганизмами.

2.5. Для испытаний отбирают наиболее агрессивные штаммы чистых культур микроорганизмов и накопительные культуры, которые дают обильный рост на топливе без присадки не более чем через 14 суток культивирования. Для гриба Cladosporium resinae, допустимо получение обильного роста не более чем через 30 суток.

2.6. Для испытаний отбирают культуры, дающие одинаково обильный рост при многократных последовательных пересевах на среду с топливом без присадки.

2.7. Культуры микроорганизмов, отобранных для испытаний, хранят на среде с топливом без присадки; пересев культур производят не реже одного раза в 4 месяца, а в перерывах между пересевами хранят при 2—5°С. Число пересевов не должно превышать 10.

3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЯМ

3.1. Материалы, реактивы, оборудование и посуда, применяемые для испытаний, приведены в приложении 1.

3.2. Посуду, вымытую и высушенную, закрывают ватными пробками, заворачивают в бумагу и стерилизуют в сушильном шкафу при 160°С в течение 2 ч.

3.3. Для выращивания культур и испытаний готовят среды в соответствии с приложением 2.

3.4. Минеральные среды для предварительного выращивания Pseudomonas aeruginosa, микобактерий, дрожжей и накопительных культур разливают в пробирки:

для испытаний реактивных и дизельных топлив — по 3 мл;

для испытаний бензинов — по 10 мл.

3.5. Для предварительного выращивания гриба Cladosporium resinae сусловый агар разливают в пробирки по 7—8 мл.

3.6. Минеральные среды, водопроводную воду и корковые пробки стерилизуют в автоклаве при 121°С (1 ати), а сусловый агар при 112°С (0,5 ати) в течение 20—30 мин.

После стерилизации сусловый агар охлаждают в наклонном положении для получения скошенной поверхности.

3.7. В пробирки со средами, приготовленными по пп. 3.3 и 3.5, добавляют испытуемое топливо без присадки (каждое в отдельную пробирку):

реактивного или дизельного топлива — 3 мл;

неэтилированного бензина — 1 мл.

В приготовленные среды с топливом пересевают пипеткой культуры бактерий, дрожжей или накопительные культуры в количестве 0,3 мл.

3.8. На скошенную поверхность суслового агара, приготовленного по пп. 3.4—3.5, пересевают бактериологической петлей гриб Cladosporium resinae, 1 петлю на пробирку.

3.9. Пробирки с пересеянными культурами помещают в термостат на 10 суток при 29±2°С для выращивания культур, которые служат посевным материалом для испытаний.

Содержание клеток в 1 мл посевного материала для культур Pseudomonas aeruginosa, микобактерий, дрожжей и накопительных культур должно быть не менее $1 \cdot 10^6$.

3.10. Для испытаний допускается использовать ранее выращенные культуры, хранящиеся в холодильнике по п. 2.7.

3.11. Для испытаний готовят суспензию спор гриба Cladosporium resinae, выращенного по п. 3.9, переносом их бактериологической петлей со скошенного суслового агара в стерильную водопроводную воду из расчета 3—4 петли на 10 мл воды.

Суспензия пригодна для использования в течение 6 ч с момента приготовления.

3.12. Для определения противомикробного действия других присадок их вносят в образцы топлив в количествах, соответствующих программе испытаний.

3.13. Минеральные среды для испытаний разливают:

для испытаний реактивных и дизельных топлив — в колбы вместимостью 100 мл по 20 мл;

для испытаний бензинов — в колбы вместимостью 250—300 мл по 50 мл.

Количество колб для испытаний каждого вида топлива соответствует числу видов микроорганизмов, применяемых для испытаний.

Среды в колбах стерилизуют перед испытаниями, как указано в п. 3.6.

4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ

4.1. В колбы со средами по п. 3.13 вносят чистые культуры микроорганизмов, выращенные по п. 4.9, каждую в отдельную колбу:

для испытаний реактивных и дизельных топлив 0,2—0,3 мл культуры;

для испытаний бензинов 0,5 мл культуры.

Одну колбу оставляют со стерильной средой (для контроля).

Культуру Pseudomonas aeruginosa для заражения среды отбирают из водного слоя; суспензию гриба Cladosporium resinae предварительно взбалтывают.

4.2. Зараженные среды в каждой колбе взбалтывают для равномерного распределения посевного материала, разливают в пробирки и смешивают с испытуемыми образцами в следующих соотношениях:

для реактивных и дизельных топлив — по 3 мл среды и образца;

для бензинов — 10 мл среды и 1 мл образца; пробирки немедленно закупоривают корковыми пробками.

4.3. Стерильную среду разливают в пробирки в тех же количествах, что в п. 4.2, и применяют для контроля.

4.4. Для контроля жизнеспособности используемых микроорганизмов в пробирки с зараженной средой добавляют незащищенное топливо.

4.5. Для контроля изменений образцов за счет действия присадки в пробирки со стерильной средой добавляют защищенное топливо.

4.6. Для контроля изменений образцов за счет температурного режима условий испытаний в пробирки со стерильной средой добавляют незащищенное топливо.

4.7. Пробирки, подготовленные по пп. 4.2—4.5, помещают в термостат при 29±2°С.

4.8. Образцы, зараженные грибом Cladosporium resinae, выдерживают в термостате 21 сутки.

4.9. Образцы, зараженные Pseudomonas aeruginosa, микобактериями, дрожжами и накопительными культурами, выдерживают в термостате 7 суток при непрерывном встряхивании; для этого пробирки с образцами помещают на встряхивательный аппарат (150—300 об/мин), установленный в термостате.

4.10. При появлении признаков роста микроорганизмов в образцах до указанных сроков испытания прекращают.

4.11. Параллельно испытывают не менее трех образцов.

5. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

5.1. По окончании испытаний пробирки извлекают из термостата и производят их осмотр.

5.2. Критериями биостойкости защищенных противомикробными присадками топлив и противомикробных свойств присадок служат:

при испытаниях без встряхивания — прозрачность и отсутствие пигментации среды, отсутствие пленки на границе среда — топливо и осадка.

при испытаниях со встряхиванием — прозрачность и отсутствие пигментации среды, отсутствие осадка.

5.3. Топливо, защищенное противомикробной присадкой, считают стойким к воздействию микроорганизмов, а испытуемую присадку — обладающей противомикробным действием в данном топливе при следующих результатах испытаний:

в пробирках по п. 4.2 среда прозрачна и не пигментирована, отсутствует пленка на границе среда — топливо, осадка нет;

в пробирках по п. 4.4 среда мутная и (или) пигментированная, имеется пленка на границе среда — топливо (при испытаниях без встряхивания) и (или) осадок.

При наличии пленки, незначительной пигментации и (или) помутнения среды и (или) появления осадка не только в пробирках по п. 4.2, но и в пробирках по пп. 4.5 и 4.6 содержимое каждой пробирки перемешивают и микроскопируют. При отсутствии микроорганизмов наличие мутности и пигментации среды, образование пленки и осадка относят за счет изменений топлива, вызванных присадками или температурным режимом испытаний.

6. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

6.1. К работе допускают лиц, прошедших предварительный медицинский осмотр.

6.2. Поскольку испытания проводят с микроорганизмами, среди которых могут быть условнопатогенные, к ним допускают лиц, обученных работе с микроорганизмами и прошедших специальный инструктаж в учреждениях Министерства здравоохранения.

6.3. Работающие во время испытаний должны пользоваться спецодеждой: халатами и шапочками из белой хлопчатобумажной ткани, респираторами или многослойными марлевыми повязками, резиновыми передниками и перчатками. Выход в спецодежде из рабочего помещения не допускается.

6.4. По окончании работы необходимо мыть руки и лицо теплой водой с мылом.

6.5. Сотрудники должны не реже одного раза в год проходить профилактический медицинский осмотр.

6.6. Лица, страдающие хроническими катарами верхних дыхательных путей, а также поражением открытых участков кожи, подлежат специальному обследованию на наличие сенсибилизации к используемым в работе микроорганизмам.

6.7. Помещение, предназначенное для работы с микроорганизмами, должно быть изолированным, иметь естественное освещение и принудительную вентиляцию. Потолок и стены помещения окрашивают масляной краской и не реже одного раза в год промывают 2%-ным раствором фенола. Пол, все предметы и оборудование ежедневно подвергают влажной уборке с использованием 0,5—3,0%-ного раствора хлорамина.

6.8. В помещении, предназначенном для работы с микроорганизмами, не допускается хранение личных вещей и продуктов питания.

6.9. Пересев культур и заражение образцов проводят в специальном боксе.

6.10. До начала, а также по окончании испытаний помещение, бокс и все приборы, которые можно облучать ультрафиолетовыми лучами, подвергают облучению бактерицидными лампами в течение 20 мин. Остальные предметы протирают спиртом или дезинфицирующим раствором.

6.11. Образцы топлив и среды, зараженные микроорганизмами, по окончании испытаний обезвреживают автоклавированием при давлении 1 ати (121°С) в течение 20 мин, затем выливают в специальные сливы, после чего посуду моют.

6.12. Образцы топлив до испытаний хранят в стеклянных сосудах с притертыми или корковыми пробками в помещениях для горючих материалов, металлических шкафах или специально оборудованных вытяжных шкафах, соблюдая правила пожарной безопасности, утвержденные в установленном порядке.

6.13. Работа с автоклавами, термостатами, сушильными шкафами, встряхивательными аппаратами и бактерицидными лампами производится в соответствии с инструкциями и правилами, утвержденными в установленном порядке, после обучения и инструктажа работающих.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ, ОБОРУДОВАНИЕ И ПОСУДА, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ИСПЫТАНИЙ

1 Перечень приборов:
автоклав, обеспечивающий давление внутри рабочей камеры до 2,5 ати;
шкаф сушильный лабораторный по ГОСТ 7365—55;
термостат с температурой внутри рабочей камеры 28—56°С;
аппарат для встряхивания пробирок и колб;
лампы бактерицидные ртутно-кварцевые;
шкаф вытяжной;
весы технические по ГОСТ 19491—74;
микроскоп биологический по ГОСТ 8284—67 с фазово-контрастным устройством;
лабораторный pH-метр.

2 Перечень посуды, инструментов и вспомогательных материалов:
колбы плоскодонные и конические по ГОСТ 10394—72 и по ГОСТ 10972—64, вместимостью 100; 150, 200, 250 и 300 мл,
пробирки стеклянные по ГОСТ 1770—74,
пипетки стеклянные по ГОСТ 12487—67 на разные емкости — 1, 2, 5 и 10 мл,
вата гигроскопическая по ГОСТ 5556—66;
вата техническая;
бумага по ГОСТ 9095—73;
груши резиновые;
пробки корковые укупорочные по ГОСТ 5541-50;
бактериологическая петля

3 Перечень реактивов
агар микробиологический по ГОСТ 17206—71;
калий азотнокислый по ГОСТ 4217—73*,
магний сернокислый по ГОСТ 4523—67;
калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198—65,
натрий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 4172—66;
аммоний фосфорнокислый двузамещенныи по ГОСТ 3772—74;
натрий хлористый по ГОСТ 4233—66,
натрий двууглекислый по ГОСТ 4201—66,
кислота серная по ГОСТ 4204—66;
кислота соляная по ГОСТ 3118—67;
спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300—72;
фенол по ГОСТ 6417—72;
хлорамин;
сусло пивное неохмеленное.

Замена

ГОСТ 1770—74 введен взамен ГОСТ 1770—64
ГОСТ 3772—74 введен взамен ГОСТ 3774—64
ГОСТ 19491—74 введен взамен ГОСТ 15075—69 и ГОСТ 15076—69

* Действует до 15/V 1976 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

СОСТАВ СРЕД ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ И ИСПЫТАНИЙ

1. Для проведения испытаний готовят минеральные среды, рецептура которых приведена в таблице.

Наименование компонентов	Количество, %	
	Для Pseudomonas aeruginosa, Cladosporium resinae. Mycobacterium, накопительных культур pH 6,9—7,2*	Для Candida pH 6,0—6,5*
Калий азотнокислый	0,2—0,4	—
Магний сернокислый	0,04	0,05
Калий фосфорнокислый однозамещенный	0,03	0,05
Натрий фосфорнокислый двузамещенный	0,07	—
Аммоний фосфорнокислый двузамещенный	—	0,35
Натрий хлористый	—	0,05
Вода водопроводная	До 100	

* При необходимости pH снижают до требуемого значения серной или соляной кислотами или повышают добавлением двууглекислого натрия.

2. Для предварительного выращивания гриба Cladosporium resinae готовят сусловый агар (неохмеленное пивное сусло 7°Б с 2% агар-агара).

Сусловый агар допускается заменять минеральной средой с агаром и сахарозой, добавленными в количестве 3%.

3. Для предварительного выращивания остальных культур используют минеральные среды по п. 1.

Редактор *В. С. Цепкина*
Технический редактор *Л. М. Шнырева*
Корректор *Л. В. Вейнберг*

gost.e-ecolog.ru

Сд. 14.02.75. Подп. в печ. 14.04.75. 0,5 п. л. Тир. 8000. Цена 3 коп.

Издательство стандартов. Москва. Д-22. Новопресненский пер., д. 3.
Вильнюсская типография Издательства стандартов, ул. Миндауго, 12/14. Зак. 645