



**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

Цена 3 коп.

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СТАНДАРТОВ
СОВЕТА МИНИСТРОВ СССР
Москва**

**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.

2. КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

2.1. Для испытаний применяют чистые культуры гриба *Cladosporium gesinae* и бактерии *Pseudomonas aeruginosa* (пуосупеа).

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 gesinae*, 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°C. 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°C 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°C (1 атм), а сусловый агар при 112°C (0,5 атм) 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 сулового 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 $29 \pm 2^\circ\text{C}$ 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 $1 \cdot 10^8$.

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 сулового 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 $29 \pm 2^\circ\text{C}$.

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

4.9. Образцы, зараженные *Pseudomonas aeruginosa*, микробактериями, 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 катарамми 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 атм (121°C) 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.

**МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ, ОБОРУДОВАНИЕ И ПОСУДА,
ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ИСПЫТАНИЙ**

1. Перечень приборов:

автоклав, обеспечивающий давление внутри рабочей камеры до 2,5 атм;
шкаф сушильный лабораторный по ГОСТ 7365—55;
термостат с температурой внутри рабочей камеры 28—56°C;
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 9085—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 двузамещенный 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;
этиловый спирт 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 16/V 1976 г.

СОСТАВ СРЕД ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ И ИСПЫТАНИЯ

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

Наименование компонентов	Количество, %	
	Для <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Cladosporium resinae</i> , <i>Mycobacterium</i> , накопительных культур pH 6,9—7,2*	Для <i>Candida</i> pH 6,0—6,5*
Калий азотнокислый	0,3—0,4	—
Магний сернокислый	0,04	0,05
Калий фосфорнокислый однозамещенный	0,03	0,05
Натрий фосфорнокислый двузамещенный	0,07	—
Аммоний фосфорнокислый двузамещенный	—	0,25
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

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

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