

SY

中华人民共和国石油天然气行业标准

SY/T 0532—93

油田注入水细菌分析方法 绝迹稀释法

1994-01-06发布

1994-06-01实施

中国石油天然气总公司 发布

油田注入水细菌分析方法 绝迹稀释法

1 主题内容与适用范围

本标准规定了油田注入水中细菌分析的术语、方法原理、试剂和材料、仪器和设备、操作步骤、细菌计数方法、精密度和分析结果。

本标准适用于油田注入水中腐生菌、硫酸盐还原菌、铁细菌的分析。油田其他水中细菌分析可参照执行。

2 引用标准

SY 5329 碎屑岩油藏注水水质推荐指标及分析方法。

3 术语

干热灭菌：将待灭菌的物品放入烘箱中，逐渐升温至140~160℃，维持2~3h，达到灭菌目的。

湿热灭菌：将培养基和其他不宜于干热灭菌的物品放入高压灭菌锅内，加热，使锅内蒸汽压力达0.1MPa，持续20~30min，达到灭菌目的。

4 方法原理

腐生菌、硫酸盐还原菌和铁细菌的测定均采用绝迹稀释法。即将待测定的水样逐级注入到测试瓶或试管中进行接种稀释，直到最后一个测试瓶或试管中无菌生长为止，然后根据细菌生长情况和稀释倍数，计算出水样中细菌的数目。

5 试剂和材料

a. 化学试剂（均为分析纯）：乳酸钠、硫酸钠、氯化钙、硫酸亚铁铵、磷酸二氢钾、氢氧化钠、氯化钠、氯化铵、硫酸镁、硫酸铵、硝酸钠、柠檬酸铁铵、磷酸氢二钾。

b. 酒精溶液：浓度为75%。

c. 生物试剂：牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、葡萄糖；

d. 材料：纱布、脱脂棉、牛皮纸、线绳、00号胶塞、6号针头。

6 仪器和设备

a. 电热恒温培养箱：使用温度30~60℃±1℃；

b. 电热鼓风干燥箱：使用温度30~300℃±5℃；

c. 高压灭菌锅；

d. 托盘天平：最大称量100g，感量0.1g；

e. 冰箱；

f. 酸度计：刻度为0.1pH单位；

g. 电炉：1000~2000W；

h. 烧杯：100，500，1000ml；

- i. 三角瓶：500，1000ml；
- j. 量筒：250，500ml；
- k. 试管：150mm×15mm若干个；
- l. 移液管：1ml；
- m. 酒精灯；
- n. 注射器：1ml；
- o. 细口瓶：125ml；
- p. 硫酸盐还原菌测试瓶、腐生菌测试瓶、铁细菌测试瓶。

7 采样

- 7.1 采集的水样应具有代表性，防止细菌污染。
- 7.2 将细口瓶刷洗干净后用牛皮纸将瓶口包好。进行干热或湿热灭菌。
- 7.3 取样前将取样阀打开使水以5~6l/min的流速畅流3min后，用已灭菌的细口瓶取样至瓶口，加塞。
- 7.4 从取样到检测样品的时间，不得超过24h。
- 7.5 采样后随即贴上标签，注明取样日期、时间、地点、取样条件及取样人。

8 分析步骤

8.1 测试瓶法

- 8.1.1 根据水样中腐生菌、硫酸盐还原菌、铁细菌的多少，将数个装有相应菌类培养基的测试瓶排成一组并依次编上序号。
- 8.1.2 用75%的酒精溶液将测试瓶瓶盖及操作者的手进行消毒。
- 8.1.3 用无菌注射器吸取1ml水样注入到1号瓶内，摇匀。
- 8.1.4 另取一支无菌注射器，从1号瓶中吸取1ml液体注入到2号瓶中，摇匀。
- 8.1.5 重复上述操作程序，根据含菌量多少稀释到最后所需浓度。放入30~37℃恒温箱中培养。腐生菌培养5~7d，测试瓶中液体由红色变为黄色或混浊，即表示有腐生菌生长。硫酸盐还原菌培养14~21d，测试瓶中液体变为黑色，即表示有硫酸盐还原菌生长。铁细菌培养7~14d，测试瓶中液体产生混浊或红棕色胶状物，即表示有铁细菌生长。

8.2 液体试管法

8.2.1 无菌水及生理盐水的配制

- 8.2.1.1 无菌水：取经干热或湿热灭菌的试管（或三角瓶）若干个，各加入蒸馏水9ml，塞上棉塞用牛皮纸包好，进行湿热灭菌。
- 8.2.1.2 生理盐水：称取0.85g氯化钠，溶解于100ml蒸馏水中，取若干个试管或三角瓶，各加入生理盐水9ml，进行湿热灭菌。

8.2.2 无菌操作技术及接种方法

将灭菌的培养基试管以及稀释水样用的无菌水或无菌生理盐水放入无菌室，打开紫外灯，灭菌30min。

关闭紫外灯，带进水样，用75%酒精棉球擦手，点燃酒精灯，左手拿菌种试管，将棉塞用右手拧转松动，以利于接种时拔开，右手拿移液管，在近火焰处将移液管伸入试管内，送入水样后，立即塞上棉塞。

8.2.3 水样的稀释

- 8.2.3.1 用无菌的移液管吸取1ml水样，放到1号无菌水或生理盐水管中，摇匀，得到稀释度为 10^{-1} 的水样。

8.2.3.2 另取一支无菌的移液管从1号管中吸取1ml水样放到2号管中，得到稀释度为 10^{-2} 的水样，依次类推直到稀释到所需浓度为止。

8.2.4 培养基的配制

8.2.4.1 腐生菌培养基

牛肉膏	3.0g
蛋白胨	5.0g
氯化钠 (NaCl)	5.0g

将上述试剂放入烧杯中，加入1000ml蒸馏水，溶解后用10%氢氧化钠溶液调整pH值至7.4~7.6，分装于试管中，每管5ml，塞上棉塞，用牛皮纸包好，进行湿热灭菌，待用。

8.2.4.2 硫酸盐还原菌培养基

磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)	0.5g
氯化铵 (NH_4Cl)	1.0g
硫酸镁 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	2.0g
硫酸钠 (Na_2SO_4)	0.5g
氯化钙 ($CaCl_2$)	0.1g
酵母膏	1.0g
乳酸钠	4ml

将上述试剂放入烧杯中，加入1000ml蒸馏水，溶解后用10%氢氧化钠溶液调整pH值至7.4~7.6，倒入三角瓶中，塞上棉塞，用牛皮纸包好，进行湿热灭菌，待用。

8.2.4.3 铁细菌培养基

硫酸镁 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5g
硫酸铵 [$(NH_4)_2SO_4$]	0.5g
磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	0.5g
氯化钙 ($CaCl_2$)	0.5g
硝酸钠 ($NaNO_3$)	0.5g
柠檬酸铁铵	10g

将上述试剂放入烧杯中，加入1000ml蒸馏水，用10%氢氧化钠溶液调整pH值至6.6~6.8，分装于试管中，每管5ml，塞上棉塞，用牛皮纸包好，进行湿热灭菌，待用。

8.2.5 腐生菌的测定

将装有腐生菌培养基的试管放入试管架上，取不同稀释度的水样1ml，分别接入试管中，其中有几个试管不接入水样，做为空白对照。

接种后，放入30~37℃培养箱中，培养5~7d，液体呈现混浊或出现白色絮状物或液面上有一层薄膜，即表示有腐生菌生长。如空白样有菌生长，应重做。

8.2.6 硫酸盐还原菌的测定

将胶塞用酒精棉擦洗放入瓷盘中，在紫外灯下灭菌30min。

称取硫酸亚铁铵粉末1.2g摊放在离紫外灯30cm处，灭菌30min。倒入已灭菌的硫酸盐还原菌培养基中，摇匀。

将灭菌的空试管放入试管架上，分别加入不同稀释度的水样1ml。速将已加硫酸亚铁铵的硫酸盐还原菌培养基灌满每个试管，随即塞上胶塞。其中有几个试管不接入水样作为空白样。

接种后，放入30~37℃恒温箱培养14~21d，凡生成黑色沉淀并伴有硫化氢味气体，即表示有硫酸盐还原菌生长。如果空白样有菌生长，应重做。

8.2.7 钢细菌的测定

将装有铁细菌培养基的试管放入试管架上。取不同稀释度的水样1ml，分别加入试管中，其中有

几支试管不接入水样作为空白样。

接种后，放入30~37℃恒温箱中培养7~14d，凡生成混浊或红棕色胶状物，即表示有铁细菌生长。如空白样有菌生长，应重做。

9 细菌计数方法

细菌计数方法按附录A（补充件）执行。

10 精密度

同一操作者，在同一实验室按本标准规定的步骤，在连续时间内，对一样品进行重复测定，如样品细菌含量高，所得结果允许误差不得大于10²，如样品细菌含量低，所得结果允许误差不得大于10¹。

11 分析结果

根据需要给出细菌含量范围或准确的细菌计数，个/ml。

附录 A
细菌计数方法
(补充件)

A1 一个试样单组测试瓶(管)细菌计数法

测细菌含量范围,宜用一个试样做五个稀释度,按稀释度的大小依次排列。如1号瓶(管)有细菌生长,其余4个瓶(管)无菌生长,表明细菌含量范围为1~10个/ml。若2号瓶(管)有细菌生长,则细菌含量范围为10~10²个/ml。以此类推,细菌含量范围计数见表A1。

表 A1 细菌计数表

出现细菌生长的瓶(管)	菌数, 个/ml
1	1~10 ¹
2	10 ¹ ~10 ²
3	10 ² ~10 ³
4	10 ³ ~10 ⁴
5	10 ⁴ ~10 ⁵

A2 一个试样多组测试瓶(管)细菌计数法

为较准确的测出细菌数量,应采用三管法,四管法或五管法。三管法是指每个水样,每个稀释倍数做三个平行试验;四管法是指每个水样,每个稀释倍数做四个平行试验;以此类推,水样应稀释到最高稀释度不长菌为宜。

A2.1 细菌计数方法举例1:用三管法分析某水样腐生菌含量,见表A2。

表 A2

稀释倍数	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴
有菌生长管数	3	3	2	0
指数	332			

选相邻三个稀释倍数中有菌生长的管数,得指数为“332”、查表A5细菌数为110个/ml,再乘以第一位上的稀释倍数10¹,即得水样中腐生菌含量为110×10¹个/ml。

A2.2 细菌计数方法举例2:用四管法分析某水样腐生菌含量,见表A3。

表 A3

稀释倍数	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
有菌生长管数	4	4	3	2	1	0
指数	321					

选相邻三个稀释倍数中有菌生长的管数,得指数为“321”,查表A6细菌数为30个/ml,再乘以第一位数上的稀释倍数10³,即得水样中腐生菌含量3×10³个/ml。

A2.3 细菌计数方法举例3:用五管法分析某水样腐生菌含量,见表A4。

表 A4

稀释倍数	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
有菌生长管数	5	5	5	3	1	0
指数	531					

选相邻三个稀释倍数中有菌生长的管数，得指数为“531”，查表A7细菌数为11.0个/ml，再乘以第一位数上的稀释倍数10³，即得水样中腐生菌含量11×10³个/ml。

计算方法用公式表示：

1ml水样中的菌数=菌数个/ml×指数第一位数上的稀释倍数

A2.4 稀释法测数统计表见表A5，A6，A7。

表 A5 三个平行管最大可能的菌数

指数	菌数, 个/ml	指数	菌数, 个/ml	指数	菌数, 个/ml
000	0.0	123	2.2	233	
001	0.3	130	1.6	300	2.5
003	0.8	131	1.9	301	4.0
010	0.3	132	2.1	302	6.5
011	0.6	133	2.4	303	10.0
012	0.8	200	0.9	310	4.5
020	0.6	201	1.4	311	7.5
021	0.8	202	2.0	312	11.5
022	1.0	210	1.5	313	16.0
100	0.4	211	2.0	320	9.5
101	0.7	212	3.0	321	15.0
102	1.1	213	3.4~4.0	322	20.0
110	0.7	220	2.0	323	30.0
111	1.1	221	3.0	330	25.0
112	1.4	222	3.5	331	45.0
113	1.7	223	4.0	332	110.0
120	1.1	230	3.0	333	140.0
121	1.5	231	3.5		
122	1.8	232	4.0		

表 A6 四个平行管最大可能的菌数

指 数	菌数, 个/ml	指 数	菌数, 个/ml	指 数	菌数, 个/ml
000	0.0	140	1.4	331	3.5
001	0.2	141	1.7	332	4.0
002	0.5	200	0.6	333	5.0
003	0.7	201	0.9	340	3.5
010	0.2	202	1.2	341	4.5
011	0.5	203	1.6	400	2.5
012	0.7	210	0.9	401	3.5
013	0.9	211	1.3	402	5.0
020	0.5	212	1.6	403	7.0
021	0.7	213	2.0	410	3.5
022	0.9	220	1.3	411	5.5
030	0.7	221	1.6	412	8.0
031	0.9	222	2.0	413	11.0
040	0.9	230	1.7	414	14.0
100	0.3	231	2.0	420	6.0
101	0.5	240	2.0	421	9.5
102	0.8	241	3.0	422	13.0
103	1.0	300	1.1	423	14.0
110	0.5	301	1.6	424	20.0
111	0.8	302	2.0	430	11.5
112	1.0	303	2.5	431	16.5
113	1.3	310	1.6	432	20.0
120	0.8	311	2.0	434	35.0
121	1.1	312	3.0	440	25.0
122	1.3	313	3.5	441	40.0
123	1.6	320	2.0	442	70.0
130	1.1	321	3.0	443	140.0
131	1.4	322	3.5	444	160.0
132	1.6	330	3.0		

表 A7 五个平行管最大可能的菌数

指 数	菌数, 个/ml	指 数	菌数, 个/ml	指 数	菌数, 个/ml
000	0.0	231	1.4	500	2.5
001	0.2	240	1.4	501	3.0
002	0.4	300	0.8	502	4.0
010	0.2	301	1.1	503	6.0
011	0.4	302	1.4	504	7.5
012	0.6	310	1.1	510	3.5
020	0.4	311	1.4	511	4.5
021	0.6	312	1.7	512	6.0
030	0.6	313	2.0	513	8.5
100	0.2	320	1.4	520	5.0
101	0.4	322	2.0	521	7.0
102	0.6	330	1.7	522	9.5
103	0.8	331	2.0	523	12.0
110	0.4	340	2.0	524	15.0
111	0.6	341	2.5	525	17.5
112	0.8	350	2.5	530	8.0
120	0.6	400	1.3	531	11.0
121	0.8	401	1.7	532	14.0
122	1.0	402	2.0	533	17.5
130	0.8	403	2.5	534	20.0
131	1.0	410	1.7	535	25.0
140	1.1	411	2.0	540	13.0
200	0.5	412	2.5	541	17.0
201	0.7	420	2.0	542	25.0
202	0.9	421	2.5	543	30.0
203	1.2	422	3.0	544	35.0
210	0.7	430	2.5	545	45.0
211	0.9	431	3.0	550	25.0
212	1.2	432	4.0	551	35.0
220	0.9	440	3.5	552	60.0
221	1.2	441	4.9	553	90.0
222	1.4	450	4.0	554	160.0
230	1.2	451	5.0	555	180.0

附加说明：

本标准由中国石油天然气总公司技术监督局提出。

本标准由中国石油天然气总公司规划设计总院归口。

本标准由大庆油田建设设计研究院负责起草。

本标准起草人林淑珍、于淑琴。