

Q/SY

中国石油天然气集团公司企业标准

Q/SY 111—2007

油田化学剂、钻井液生物毒性 分级及检测方法 发光细菌法

Grading and determination of the biotoxicity of
chemicals and drilling fluids—luminescent bacteria test

2007—09—29 发布

2007—09—29 实施

中国石油天然气集团公司 发布

再版说明

为了整合标准化资源，建立统一的集团公司企业标准化体系，推进集团公司整体协调发展，2007年下半年集团公司启用了新的集团公司企业标准代号（中油质字〔2007〕416号），重新发布了334项集团公司企业标准（中油质字〔2007〕509号、中油质字〔2007〕510号）。

根据《中华人民共和国标准化法》、《企业标准化管理办法》、《中国石油天然气集团公司标准化管理办法》等规定，为便于各单位使用重新发布的集团公司企业标准，经集团公司质量管理与节能部同意，石油工业出版社重新出版印刷了部分重新发布的集团公司企业标准。在本次重新出版印刷中，进行了以下编辑性修改：

- 按照中油质字〔2007〕509号和中油质字〔2007〕510号文件，修改了标准的编号、年号、发布日期、实施日期等；
- 修改了标准的技术归口单位；
- 对部分标准的第1章“适用范围”进行了适当修改；
- 对部分标准的第2章“规范性引用文件”中的废止、替代标准进行了修改，并对正文中相应的条文也进行了修改；
- 将部分标准的修改单的内容直接修改到标准的相应条文上。

石油工业出版社
2008年5月

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 1

5 生物毒性分级 1

6 生物毒性检测方法 2

7 样品的采集、包装、运输与保存 4

附录 A(规范性附录) 发光细菌毒性检测报告格式 5

附录 B(规范性附录) 相关系数 r 检验表 6

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准由中国石油天然气股份有限公司质量安全环保部提出。

本标准由中国石油天然气集团公司油田化学剂及材料专业标准化直属工作组归口。

本标准起草单位：中国石油天然气股份有限公司环境监测总站、石油工业油田化学剂质量监督检验中心。

本标准主要起草人：李秀珍、于晓丽、曹治中、杜卫东、李斌莲、范俊欣。

油田化学剂、钻井液生物毒性 分级及检测方法 发光细菌法

1 范围

本标准规定了陆上油田使用的油田化学剂、钻井液生物毒性分级及检测方法。

本标准适用于陆上油田使用的水溶性油田化学剂、钻井液生物毒性分级及检测；不适用于对细菌有抑制作用的油田化学剂的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 5005—2001 钻井液材料规范

GB/T 6679—2003 固体化工产品采样通则

GB/T 6680—2003 液体化工产品采样通则

国家环保局《水和废水监测分析方法》（第四版）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

生物毒性分级 biotoxicity grading

根据被测物与生物体群接触后导致生物体群死亡的程度，划分生物毒性的不同等级。本标准是根据在一定条件下，导致发光菌的相对发光度被抑制至一半时样品液的浓度不同，来划分生物毒性的不同等级。本方法与其他生物测试方法的测试结果不完全一一对应。

3.2

生物毒性检测 biotoxicity testing

通过将生物体在试验条件下施加污染物的影响来判定试验结果的一种方法。

3.3

半有效浓度 (EC_{50}) half effective concentration

发光细菌在一定条件下与被测样品接触 15min 后，发光细菌的相对发光度被抑制一半时样品液的浓度。

4 原理

根据发光细菌的相对发光度随样品毒性总体浓度的增高而呈线性降低的特性，测定发光细菌在接触被测样品 15min 后的相对发光度，得出油田化学剂及钻井液的毒性等级。

5 生物毒性分级

生物毒性分级见表 1。

表 1 油田化学剂及钻井液生物毒性分级 单位: mg/L

生物毒性等级	发光细菌 EC ₅₀
剧毒	<1
重毒	1~100
中毒	101~1000
微毒	1001~25000
无毒	>25000

6 生物毒性检测方法

6.1 试剂、测试生物和标准物质

6.1.1 试剂:

3%氯化钠溶液: 称氯化钠(化学纯, 以下同) 30g 于烧杯中加蒸馏水至 1000mL, 溶解后备用。
2.5%氯化钠溶液: 称氯化钠 2.5g 于试剂瓶内, 加蒸馏水至 100mL, 溶解后 2℃~5℃保存。

6.1.2 测试生物: 本试验所用测试生物为: 明亮发光杆菌 T₃ 小种 (Photobacterium phosphoreum T₃ spp.) 冻干粉, 安瓿瓶包装, 每瓶 0.5g, 在 2℃~5℃保存, 有效保存期为 6 个月。

6.1.3 标准物质: 十二烷基硫酸钠。

6.2 仪器

6.2.1 生物发光光度计: DXY-2 生物毒性测试仪或其他同类产品。

6.2.2 高速搅拌器: 3000r/min~12000r/min。

6.2.3 冰箱。

6.2.4 试验材料:

测试样品管: 2mL 或 5mL;
注射器: 1mL;
定量加液瓶: 250mL;
可调微量注射器: 2μL~20μL;
移液管: 2mL, 5mL, 10mL;
试剂瓶: 100mL, 200mL;
量筒: 50mL, 100mL;
烧杯: 1000mL;
保温瓶;
天平: 感量 0.01g;
高搅杯;
秒表;
测试管架等。

6.3 测定前的准备

6.3.1 环境条件: 实验室必须干净、无污染, 避免人为的影响因素, 室温控制在 20℃~25℃。同一批样品在测定过程中要求温度波动不超过 ±1℃。所有测试器皿及试剂、溶液测前 1h 均置于控温的测试室内。

6.3.2 稀释液: 所有稀释液均为 3%氯化钠溶液。

6.3.3 样品液制备:

6.3.3.1 水溶性油田化学剂样品液制备：

- a) 实验液的配制：将固体的油田化学剂，按常规使用浓度，用蒸馏水配制成实验液。
- b) 按体积比取 1 份油田化学剂实验液加入 9 份稀释液，用转速为 $1100\text{r/min} \pm 300\text{r/min}$ 搅拌器搅拌 30min，静置 60min 后，取中层混悬液并将其稀释成（通过密度换算所得的）不同浓度的样品液（ 10^6mg/L ， 10^5mg/L ， 10^4mg/L ， $\dots$ ， 10mg/L ， 1mg/L ）。测定样品液的稀释浓度以接近相对发光度为 50% 时为宜。

6.3.3.2 钻井液添加剂样品液制备：

- a) 基浆的配制：取 350mL 蒸馏水于转速为 $11000\text{r/min} \pm 300\text{r/min}$ 高搅杯中，边搅拌边加入 17.50g 钻井液用膨润土，膨润土要求符合 GB/T 5005 规定。搅拌 20min，期间至少中断两次，以刮下粘附在容器壁上的膨润土。然后转移到密闭的玻璃容器中，在 $25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ 下老化 24h。
- b) 实验浆的配制：取上述基浆在高速搅拌器搅拌的同时，加入 1.0g~10.0g 钻井液添加剂（加样量视样品的习惯用量而定），搅拌 20min，期间至少中断两次，以刮下粘附在容器壁上的样品。然后立即转移到密闭的玻璃容器中，在 $25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ 下老化 24h。记下加样量。
- c) 实验浆的稀释：按体积比取 1 份钻井液添加剂实验浆加入 9 份稀释液，用 $1100\text{r/min} \pm 300\text{r/min}$ 搅拌器搅拌 30min，静置 60min 后，取中层混悬液并将其稀释成（通过密度换算所得的）不同浓度的样品液（ 10^6mg/L ， 10^5mg/L ， 10^4mg/L ， $\dots$ ， 10mg/L ， 1mg/L ）。样品的稀释浓度以接近相对发光度为 50% 时为宜。

6.3.3.3 钻井液样品液制备：现场采集或实验室内配制的钻井液样品液的制备按 6.3.3.1 执行。

6.3.4 发光菌冻干菌剂复苏：从 $2^\circ\text{C} \sim 5^\circ\text{C}$ 冰箱取出含有 0.5g 发光细菌冻干粉安瓿瓶和 2.5% 氯化钠溶液，置于有冰块的保温瓶，用 1mL 冷的 2.5% 氯化钠溶液注入已开口的冻干粉安瓿瓶充分混合。2min 后，菌剂即复苏发光，备用。

6.3.5 仪器的预热和调零：接通生物发光光度计电源，预热 15min，调零，备用。

6.3.6 检验发光细菌冻干粉质量：取 2mL 测试管 1 支，加 2mL 3% 氯化钠，加 $10\mu\text{L}$ 复苏发光菌液，盖上瓶塞，用手颠倒 5 次以达均匀。拔去瓶塞，将该管放入生物发光光度计测试舱内测试，若发光量立即显示 600mV 以上，此瓶冻干粉可用于测试，否则更换冻干粉。

6.4 测定

6.4.1 测试管的排列：于测试管架上按下列顺序排列测试管。前排放置样品测试管（简称样品管），后排放置对照测试管（简称 CK 管）。同一浓度的样品重复测定 3 次。

6.4.2 加 3% 氯化钠溶液：用定量加液瓶给每个 CK 管加 2mL 3% 氯化钠溶液。

6.4.3 加样品液：测定前用 1mol/L NaOH 和 1mol/L HCl 调节样品液的 pH 值至 6.5~8.5。用 2mL 移液管给每个样品管加 2mL 样品液。

6.4.4 加复苏菌液：在发光菌液复苏稳定（约半小时）后，在测试管架上从左到右，按样品管—CK 管—样品管—CK 管……顺序，用微量注射器准确吸取 $10\mu\text{L}$ 复苏菌液，逐一加入各管，盖上瓶塞，用手颠倒 5 次，拔出瓶塞，放回原位。每管在加菌液的同时须精确计时到秒，即样品与发光菌反应起始时间。15min 后，记作各管反应终止时间。

6.4.5 测试与记录：当样品管和 CK 管内的液体与发光菌反应 15min 后，按各管原来加菌液的先后顺序，立即将测试管放入仪器测试舱，并读取记录仪器显示的各自发光量（以毫伏表示）。

6.4.6 数据处理：**6.4.6.1 回归方程法。**

- a) 计算样品相对发光度（%），见式（1）。

$$T = \frac{E_{\text{样品}}}{E_{\text{CK}}} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- T ——相对发光度，%；
- $E_{\text{样品}}$ ——样品管发光量，mV；
- E_{CK} ——对照管发光量，mV。

b) 计算样品相对发光度平均值（%），见式（2）。

$$\bar{T} = \frac{T_1 + T_2 + T_3}{3} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- $\bar{T}$ ——相对发光度平均值，%；
- T_1, T_2, T_3 ——一个样品浓度三次重复的相对发光度，%。

c) 计算 EC_{50} 值，见式（3）。求出一元一次线性回归方程的 a （截距）、 b （斜率、回归系数）和 r （相关系数），并列出方程：

$$\bar{T} = a + b \cdot C_{\text{样品}} \dots\dots\dots (3)$$

查表（见附录 B）。查相关系数显著水平（ P 值），检验所求 r 值的显著水平。若 $P \leq 0.05$ ，则所求相关方程成立，并将 $\bar{T} = 50$ 代入方程（3），则 $EC_{50} = (50 - a) / b$ ，求出样品的 EC_{50} 值。

6.4.6.2 绘制曲线法：若检验相关方程不成立，则按曲线法求出 EC_{50} 值。以浓度（ C ）为横坐标，相对发光度（ $\bar{T}$ ）为纵坐标，绘制 $C-\bar{T}$ 曲线；对照 $C-\bar{T}$ 曲线，找出与样品相对发光度对应的浓度值。

6.4.7 检测报告格式见附录 A。

7 样品的采集、包装、运输与保存

7.1 样品的采集与包装

7.1.1 油田化学剂：按每种油田化学剂产品的标准方法取样。当产品标准没有规定取样方法时，固体产品按 GB/T 6679—2003 执行，液体产品按 GB/T 6680—2003 执行。

7.1.2 钻井液：要求在振动筛后取样。取样时钻井液应处于正常循环状态。为了保证样品的代表性，应在不同的时间分别取样，称为分样，每个分样为 500mL。将每次取样的分样合并、混匀、缩分，形成最终检验样品。每个样品至少由 6 个分样组成，数量不得低于 3000mL。获取分样的时间间隔为整个循环周期除以设计的分样个数。钻井液样品必须用高密度聚乙烯容器包装，整个包装必须被样品充满，不应留有空间。

7.2 标识

所有样品容器上应贴标识，标明样品名称、采样时间、采样地点、采样方式、采样数量、采样人、生产者或使用者等。

7.3 样品的运输与保存

按国家环保局《水和废水监测分析方法》（第四版）第 3 章水样的采集和保存执行。样品应在 24h 内送达实验室；流体样品要求在温度为 2℃～5℃ 的冰箱中冷藏保存，固体样品要保存在阴凉处，并在样品送达实验室后 24h 内开始试验。

附 录 B
(规范性附录)
相关系数 r 检验表

相关系数 r 检验表见表 B. 1。

表 B. 1 相关系数 r 检验表

$n - 2$	显著水平 α		$n - 2$	显著水平 α		$n - 2$	显著水平 α	
	0. 05	0. 01		0. 05	0. 01		0. 05	0. 01
1	0. 997	1. 000	16	0. 468	0. 590	35	0. 325	0. 418
2	0. 950	0. 990	17	0. 456	0. 575	40	0. 304	0. 393
3	0. 878	0. 959	18	0. 444	0. 561	45	0. 288	0. 372
4	0. 811	0. 917	19	0. 433	0. 549	50	0. 273	0. 354
5	0. 754	0. 874	20	0. 423	0. 537	60	0. 250	0. 325
6	0. 707	0. 834	21	0. 413	0. 526	70	0. 232	0. 302
7	0. 666	0. 798	22	0. 404	0. 515	80	0. 217	0. 283
8	0. 632	0. 765	23	0. 396	0. 505	90	0. 205	0. 067
9	0. 602	0. 735	24	0. 388	0. 496	100	0. 195	0. 254
10	0. 576	0. 708	25	0. 381	0. 487	125	0. 174	0. 228
11	0. 553	0. 684	26	0. 374	0. 478	150	0. 159	0. 208
12	0. 532	0. 661	27	0. 367	0. 470	200	0. 138	0. 181
13	0. 514	0. 641	28	0. 361	0. 463	300	0. 113	0. 148
14	0. 497	0. 623	29	0. 355	0. 456	400	0. 098	0. 128
15	0. 482	0. 606	30	0. 449	0. 449	1000	0. 062	0. 081

中国石油天然气集团公司
企业标准
油田化学剂、钻井液生物毒性
分级及检测方法 发光细菌法
Q/SY 111—2007

*

石油工业出版社出版
(北京安定门外安华里二区一号楼)
石油工业出版社印刷厂排版印刷
(内部发行)

*

880×1230毫米 16开本 0.75印张 21千字 印1—300
2008年6月北京第1版 2008年6月北京第1次印刷
书号：155021·16507 定价：11.00元
版权专有 不得翻印