ICS 75.160.20
E 31
备案号:

MH

中华人民共和国民用航空行业标准

MH/T 6066—2010

液体油料中能活细菌和真菌的计数 过滤和培养程序

Standard practice for enumeration of viable bacteria and fungi in liquid fuels–Filtration and culture procedure

2010-12-10 发布　　2011-03-01 实施

中国民用航空局　发布

中华人民共和国民用航空
行业标准
液体油料中能活细菌和真菌的计数
过滤和培养程序
MH/T 6066—2010
*
中国科学技术出版社出版
北京市海淀区中关村南大街16号　邮政编码:100081
电话:010－62173865　传真:010－62179148
http://www.kjpbooks.com.cn
科学普及出版社发行部发行
北京长宁印刷有限公司印刷
*
开本:880毫米×1230毫米　1/16　印张:1　字数:28千字
2011年3月第1版　2011年3月第1次印刷
印数:1—500册　定价:25.00元
统一书号:175046·1112/2113

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国民用航空局航空器适航审定司提出。

本标准由中国民用航空局航空器适航审定司批准立项。

本标准由中国民用航空局科学技术研究院归口。

本标准起草单位：中国民用航空局第二研究所。

本标准主要起草人：夏祖西、谢飞、于新华、吴迎伟、刘晓杰、柳华、杨智渊。

液体油料中能活细菌和真菌的计数 过滤和培养程序

1 范围

本标准规定了使用膜过滤程序检测和计数在室温条件下运动粘度小于或等于 24 mm^2/s 的液态油料中的厌氧细菌和真菌数量的试验方法。

本标准适用于在试验室和现场检测细菌和真菌数量。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本(包括所有的修氦革)适用于本文件。

ASTM D 6426 中间馏分油料过滤性的试验方法

ASTM D 7464 用于微生物实验的液体油料，相关材料和油料系统成分的手工取样方法

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

无菌的 aseptic

洁净的，没有受到活体微生物污染的。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CFU 菌落形成单元(colony forming unit)

HPC 厌氧菌平皿计数(heterotrophic plate count)

MEA 麦芽提取物琼脂(malt extract agar)

MF 过滤膜(membrane filter)

TNTC 数量太多无法计数(too numerous to count)

TSA 胰蛋白大豆琼脂(tryptone soy agar)

4 测试方法

4.1 用分液漏斗分离油料样品中的游离水。游离水分被分离后，可用三种方法中的任一种通过膜片过滤装置无菌过滤的方式过滤出一定体积的剩余油料。

4.2 油料中的细菌留在了过滤膜上。通过更换新滤膜进行重复试验或在其他营养介质中进行培养，或二者同时进行的方法，可从过滤器重复得到油料样本。

4.3 过滤油样后，在指定的温度下，将每个过滤膜分别放在两种不同的琼脂培养基上培养 3d，然后检查每个培养基上的菌落形成单元。

4.4 将各种琼脂培养基继续培养 2d，再检查每个培养基上的菌落形成单元。

4.5 手工或者用电子计数器来计数菌落数。

如果条件允许，可根据菌落的颜色、形态和显微镜检查来鉴别不同琼脂媒介上的菌落类型。

将细菌菌落数和真菌菌落数转换成每升油料中的菌落形成单元数。

5 干扰因素

5.1 大量非生物的微粒可能阻塞过滤膜并影响过滤。

5.2 在实验中假定一个单一的微生物细胞形成一个菌落单元。实际上，微生物通常会形成聚集体而看起来像一个菌落单元。因此，活体微生物的计数值就有可能比油料样品中实际的活体微生物的数量低。

5.3 单个微生物的新陈代谢状态可能受到油料中许多物理、化学因素的影响。在试验期间受损的或者有较长寿命的微生物可能不会形成菌落，而导致原始样品中活体微生物的计数值低于实际值。

6 试验仪器

6.1 玻璃分液漏斗，容量为 500 ml。

6.2 玻璃量筒，容量分别为 100 ml 和 1 L。

6.3 玻璃或一次性无菌塑料滴管，容量为 10 ml 或容量可调。

6.4 过滤膜，预先消毒的混合纤维素酯，膜的直径为 47 mm，孔径为 0.45 μm。

宜使用混合的纤维素酯作为膜分离材料，也可根据油料类型和试验人员来选择膜分离材料。

6.5 过滤装置，可选择以下任意一种：

——如 ASTM D 6426 所述的过滤装置，具备预先灭菌的在线过滤装置；

——注射器，无菌，100 ml，具备预先灭菌的在线过滤器；

——预先灭菌的过滤装置，材质为玻璃、不锈钢或聚丙烯材质。

若选用真空过滤，真空负压应不超过－66 kPa。

6.6 平头无齿镊子。

6.7 过滤用烧瓶，应有足够大的容量来接收过滤出的所有样品和洗涤液。

6.8 一次性塑料培养皿或玻璃培养皿，直径大于或等于 50 mm。

注： 商用的预先浇注好的培养皿含有下面提到的培养基，可替代 6.8 中的培养皿。

6.9 培养箱，温度能保持在(25±2)℃或如有必要能保持到其他温度(从室温到 60 ℃)。

6.10 水浴器，温度能保持在(47±2)℃且能容纳 500 ml 的容器，水浴器的容积应至少容纳一个装有琼脂培养基的样品瓶。

6.11 气密性良好的、带螺纹帽的玻璃瓶，容量为 500 ml。

6.12 管口带螺纹的玻璃培养试管，直径 16 mm，长度 125 mm。

6.13 压力反应釜，能容纳直立的 500 ml 玻璃瓶。

注： 如 6.8 的注中所提及的，如果使用商用皮式培养皿，可不选用 6.10～6.13。

7 试剂和材料

7.1 试剂的纯度

本标准中的所有试验均采用试剂级化学品，除非另外提及，试验中所有试剂性能应符合相关规定。

7.2 培养媒介

制备培养媒介用的琼脂应是微生物级的，如有可能可使用商用培养媒介。

7.3 水的纯度

除非另外提及，所有试剂水都应为 ASTM D 1193 Ⅲ型水。

7.4 0.1%(w/v)金霉素溶液

将 0.1 g 金霉素溶入水中稀释至 100 ml。溶液通过过滤膜(膜孔直径为 0.2 μm)灭菌。

7.5 0.1% (v/v)清洗液

将 10 ml 聚氧乙烯失水山梨醇油酸酯溶解到 990 ml 水中。溶液通过过滤膜(膜孔直径为 0.2 μm)灭菌或者通过在压力反应釜中 121 ℃条件下保持 15 min 来灭菌。

7.6 盐酸溶液

浓度为 1 mol/L 。

7.7 10% (w/v)乳酸溶液

溶解 10 g 乳酸到水中然后稀释至 100 ml。溶液通过过滤膜(膜孔直径为 0.2 μm)灭菌。

7.8 麦芽提取物琼脂 (MEA)

7.8.1 每升溶液组分

每升溶液组分为：

——麦芽提取物 30 g；

——真菌蛋白胨 5 g；

——琼脂 15 g；

——水 1 L。

7.8.2 制备

将麦芽提取物、真菌蛋白胨和琼脂放入 1 L 水中，煮沸溶解。使用 1 mol/L 的盐酸溶液 (7.6)或者 10%(w/v)的氢氧化钠溶液调节麦芽提取物琼脂溶液的 pH 值至 5.4±0.2。取 250 ml 麦芽提取物琼脂溶液到 500 ml 玻璃瓶(6.11)中，盖好盖子，在温度为(121±2)℃的压力反应釜中灭菌 10 min，接着在(47±2)℃的水浴器中(6.10)冷却。另外，当麦芽提取物琼脂溶液冷却到(47±2)℃时，每 100 ml 麦芽提取物琼脂溶液再加入 1 ml 0.1%的金霉素溶液(溶液通过膜孔直径为 0.2 μm 的过滤膜灭菌，见 7.4)并混合均匀。如果试验要求培养媒介的 pH 值为 3.5，则再加入 10%的乳酸溶液(溶液通过膜孔直径为 0.2 μm 的过滤膜灭菌，见 7.7)来调节麦芽提取物琼脂溶液的 pH 值。一旦麦芽提取物琼脂溶液被酸化以后，则不应再加热。将足量的麦芽提取物琼脂倒入无菌培养皿中，保持琼脂的厚度为 4 mm 左右，自然冷却备用。

注 1： 很多麦芽提取物琼脂制造商能提供各种性能的麦芽提取物琼脂(脱水型，预先浇注型，有抗菌素，无抗菌素)，这些麦芽提取物琼脂类型都可能在试验中用到。当使用商用的预先脱水型的麦芽提取物琼脂时，灭菌的程序要按照制造商的手册来进行同时不要过度加热。

注 2： 有些试验样品中存在霉菌和酵母，在试验中可能要用其他非麦芽提取物琼脂的培养媒介，因为这些培养媒

介有助于酵母和霉菌的生长。

注 3： 在试验中也可用其他抗菌素来抑制细菌的生长，但未证实他们能抑制酵母和霉菌的生长。

7.9 浓度 25%的林格溶液

7.9.1 每升溶液组分

每升溶液组分为：

——氯化钠 2.25 g；

——氯化钾 0.105 g；

——氯化钙 0.12 g；

——碳酸氢钠 0.05 g；

——水 1 L。

7.9.2 制备

按 7.9.1 的要求配制 1 L 溶液，取 10 ml 溶液放入培养试管(6.12)中并盖好，121 ℃条件下在压力反应釜中灭菌 15 min。

注： 很多制造商都可提供浓度为 25%的林格盐片剂。

7.10 10% (w/v)氢氧化钠溶液

在水中溶解 10 g 氢氧化钠，然后稀释到 100 ml。

7.11 胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA)

7.11.1 每升溶液组分

每升溶液组分为：

——胰蛋白胨 15 g；

——大豆蛋白 5 g；

——氯化钠 5 g；

——琼脂 15 g；

——水 1 L。

7.11.2 制备

按 7.11.1 的要求配制 1 L 的溶液，煮沸溶解。取出 250 ml 胰蛋白胨大豆琼脂溶液，倒入 500 ml 玻璃瓶(6.11)中并盖好。在(121±2)℃的压力反应釜中，灭菌 10 min。在(47±2)℃的水浴器(6.10)中冷却，测试 pH 值。如果样品的 pH 值在 7.3±0.3 的范围内，应重新制样。将足量的胰蛋白胨大豆琼脂倒入无菌培养皿中，保持琼脂的厚度为 4 mm 左右，自然冷却备用。

注 1： 很多制造商能提供脱水型或预先浇注型的胰蛋白胨大豆琼脂。

注 2： 在试验中可用其他胰蛋白胨大豆琼脂的培养媒介，因为这些培养媒介也有助于细菌的生长。

8 程序

8.1 取样

8.1.1 按 ASTM D 7464 准备油料样品。

8.1.2 为了降低偶然污染的风险，用于计数活体菌落数量的样品在进行计数试验以前不应用于其他试验。

8.1.3 现场可能不能完成灭菌，为了降低油料样品的交叉感染，在取样前，应用70%浓度的醇溶液（乙醇溶液、甲醇溶液或者异丙醇溶液）洗涤与油料样品接触的设备表面。为了降低将微生物污染引入油料样品的可能性，应用醇溶液洗涤所有油料样品和油料样品的相关设备。

8.1.4 微生物污染物的数量是一个动态值，油料样品中的微生物收集后，在测试前可能繁殖或死亡，因此油料样品应在收集后的24h内按8.2的要求制备。

8.1.5 如果收集的油料样品在4h内没有处理，则处理前应在0 ℃～5 ℃之间冷藏。应避免油样冻结，冷冻的油料样品自然解冻到室温后，按8.2的要求制备。

8.2 准备油料样品

8.2.1 将油料样品放置1h，然后目视检查油料样品。

8.2.2 若油料样品含有游离水，则将样品倒入无菌分液漏斗中(6.1)，分离油料样品中的水和沉淀。当水和沉淀物与油相分离后，将水和沉淀物转入无菌烧瓶中。另一种方法是采用吸液管将水和沉淀物从样品瓶的底部抽出。

分离出来的水分和杂质，可根据ASTM D 6469使用显微镜或者微生物检测手段来做进一步的分析。

8.2.3 将油料样品摇匀，使样品中的微生物分布均匀。

8.2.4 测试油料样品取样时，若样品较多可采用无菌量筒(6.2)，反之则用无菌移液管(6.3)。不应采用嘴吸移液管的方法来移液。

注：通过采用过滤膜过滤不同体积的样品(200 ml、20 ml、2 ml)，来增加过滤膜上获得菌落形成单元在20～60之间的可能性。过滤2 ml油料样品时，需要保证油料在过滤膜上分布均匀。试验结果受到样品生物荷载的异质性和试验程序的易变性的影响，所以对重采样的样品进行测试就给我们提供了对这两种因素的基本判断。

8.3 过滤油料样品

8.3.1 过滤方法

对于A、B、C三种过滤方法，均应采用未使用过的过滤膜(6.4)过滤两个相同体积的样品，以此来计数细菌和真菌的数量。

8.3.2 方法A—使用ASTM D 6426规定的测试设备

8.3.2.1 使用无菌导管连接无菌过滤器组成过滤装置，过滤器中有孔径为0.45 μm过滤膜(6.4)。

8.3.2.2 取一定量的样品到无菌烧杯中。

8.3.2.3 通过ASTM D 6426规定的过滤装置中提取样品，记录过滤样品的总体积。

8.3.2.4 清洗剂清洗过滤器时，用10 ml无菌清洗液(7.5)来清洗掉过滤膜上的油污。

8.3.2.5 冲洗过滤器时，用10 ml浓度为25%的林格溶液来冲洗掉过滤膜上的清洗液，应冲洗三次。

8.3.3 方法B—使用注射器

8.3.3.1 用注射器抽取一定量的油料样品。

8.3.3.2 将注射器的气密口连接到预先组装好的无菌过滤器[过滤器中有孔径0.45 μm的过滤膜(6.4)]上。

8.3.3.3 均匀用力推动注射器的注射塞，将一定量的油料样品推入过滤器中。样品经过滤后流入接收装置中(6.2或6.7)，记录下过滤后的油料样品的体积。

8.3.3.4 小心将注射器和过滤器分开，注意在分开的过程中不应将残留在过滤器内壁的油料溅撒。用注射器抽取 10 ml 清洗液，连接上过滤器，将 10 ml 清洗液(7.3)推入过滤器中，清洗掉过滤膜上的油料。

8.3.3.5 再次小心将注射器和过滤器分开。用注射器抽取 30 ml 浓度为 25%的林格溶液，连接上过滤器，将 30 ml 林格溶液推入过滤器中，清洗掉过滤膜上的洗涤液。

8.3.4 方法 C—真空过滤

8.3.4.1 用无菌镊子(6.6)将孔径 0.45 μm 的过滤器膜(6.4)放到过滤支架上，然后连接好整个真空过滤系统。

8.3.4.2 取一定量的油料样品，倒入真空过滤系统的容积瓶中准备过滤。抽真空并过滤油料样品，记录过滤后油料样品的体积。

8.3.4.3 清洗剂清洗真空过滤系统，保持过滤系统的真空，倒入 10 ml 无菌清洗液(7.5)，清洗掉过滤膜上的油料。

8.3.4.4 清洗真空过滤系统，保持过滤系统的真空，取 10 ml 浓度为 25%的林格溶液(7.9)，漂洗没有沾染洗涤液的过滤膜，连续漂洗三次。

8.4 转到培养基上

8.4.1 拆开过滤器，过滤膜暴露表面保持朝上。使用平头无齿镊子从过滤器中取出过滤膜。

8.4.2 用滚动的方式将过滤膜(有格子的一面朝上)贴合在培养皿内的相应培养媒介 MEA 或 TSA 的表面，确保过滤膜和培养媒介接触良好。

8.4.3 用记号笔在每个培养皿下标记油料样品和培养媒介的类型。

8.5 培养

8.5.1 将含有 TSA 的培养皿倒置放入培养箱中，培养箱的温度控制在(25±2)℃。

如果被采样系统的温度比培养的标准温度高 5℃以上，那么调节培养箱温度到环境温度可能会有助于活体微生物的恢复。大部分样品被采样系统的温度在 25℃左右，如果被采样系统的温度高于 30℃，培养箱的温度与被采样系统的温度相比最多低 5℃。但培养箱的温度误差应控制在±2℃的范围内。

8.5.2 3d 后检查 TSA 或者 MEA 培养皿上的菌落数，5d 后再检查 MEA 培养皿上的菌落数。

8.6 菌落的计数

8.6.1 使用计数设备计数 3d 后 TSA 中过滤膜上的菌落形成单元的数量、5d 后 MEA 中过滤膜上的菌落形成单元的数量。

8.6.2 依据得到的菌落形成单元的试验结果，使用下面的公式计算每升油料样品中 TSA 培养基上菌落形成单元的数量和 MEA 培养基上真菌菌落形成单元的数量：

$$N = \frac{CC \times 1000}{V} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

N——每升油料样品中菌落形成单元的数量；

CC——培养皿上的菌落数；

V——过滤后的油料样品的体积，单位为毫升(ml)。

8.6.3 如果过滤了多份样品，取平均值并且计算出重复试验中每升油料样品中菌落形成单元数量的标准偏差。

8.6.4 如果在培养基中没有菌落出现，则设定公式(1)中的 CC 为 1，然后计算 N 值，并以“$<N$ CFU bacteria.L^{-1}”或者“$<N$ CFU fungi.L^{-1}”的形式报告试验结果。

9 试验报告

9.1 报告中应列出具体的试验结果。

9.2 应注明样品的培养温度。

附录 A
（资料性附录）
本标准的使用限制

单个微生物在特定的培养基中形成菌落的能力取决于该待计数微生物的分类和生理状态、微生物培养基的化学性质和微生物的培养条件。因此试验结果就不宜为绝对值。最好将这些试验结果作为燃油中微生物污染的诊断或条件监控结果的一部分来使用，这些诊断或条件监控结果包含了与 ASTM D 6469 一致的其他试验参数。

参考文献

[1] ASTM D 1129 Terminology Relating to Water
[2] ASTM D 1193 Specification for Reagent Water
[3] ASTM D 4175 Terminology Relating to Petroleum, Petroleum Products, and Lubricants
[4] ASTM D 5259 Test Method for Isolation and Enumeration of Enterococci from Water by the Membrane Filter Procedure
[5] ASTM D 6469 Guide for Microbial Contamination in Fuels and Fuel Systems
[6] ASTM D 7463 Test Method for Adenosine Triphosphate(ATP) Content of Microorganisms in Fuel, Fuel/Water Mixtures and Fuel Associated Water
[7] ASTM E 1326 Guide for Evaluating Nonconventional Microbiological Tests Used for Enumerating Bacteria
[8] ASTM F 1094 Test Methods for Microbiological Monitoring of Water Used for Processing Electronic and Microelectronic Devices by Direct Pressure Tap Sampling Valve and by the Presterilized Plastic Bag Method