

中华人民共和国民用航空行业标准

MH/T 6119—2018

燃油和含水燃油中可繁殖的好氧微生物含量测定-触变凝胶培养法

Determination of the viable aerobic microbial content of fuels and associated water
-Thixotropic Gel Culture Method

2018 – 02 – 08 发布

2018 – 05 – 01 实施

中国民用航空局 发布

前 言

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。

本标准由中国民航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：仇义霞、刘晓杰、肖勇、邓川、向海、胡晓佳、柳华、陈凯。

MH

燃油和含水燃油中可繁殖的好氧微生物含量测定 —触变凝胶培养法

1 范围

本标准规定了使用触变凝胶培养法测定燃油和含水燃油中可繁殖的好氧微生物含量。

本标准适用于现场或者实验室条件下，测定航空煤油、中间馏分燃料、汽油、掺混生物燃料和重质组分燃油、含水燃油中可繁殖的好氧微生物含量。

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（包括所有的修改单）适用于本文件。

ASTM D 4057 石油和石油产品的手工取样方法

GB/T 4756 石油液体手工取样法

MH/T 6068 航空燃料中游离水、固体颗粒和其他污染物现场检测方法

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

微生物 **microorganisms**

在有氧条件下，能够在培养基中生长的细菌和真菌（酵母菌和霉菌）。

3.2

菌落 **colony**

可繁殖微生物或者含可繁殖微生物的颗粒，被引入到培养基中，逐渐繁殖形成的微小可见的微生物聚集体。

4 方法概要

将一定体积待测样品加入到装有触变凝胶培养基的玻璃瓶（见 6.1）中，摇晃玻璃瓶，使样品与培养基混合均匀。随后，将培养基在玻璃瓶的其中一个最大面上重新铺展成一平面，再将该玻璃瓶放在恒温避光环境中培育。培育一段时间后，培养基中呈现出肉眼可见的红色或者紫色菌落斑点。以 CFU 为单位表示微生物的菌落数量，形成菌落的数量与测试样品体积有关，以 CFU/L 为单位表示油样中微生物含量，或者以 CFU/mL 为单位表示水样中微生物含量。

5 材料与试剂

5.1 培养基

该培养基为触变凝胶培养基，培养基中含有能够维持液体燃油和其他石油产品中多种微生物生长的营养物质和对菌落进行染色的反应性化合物。培养基应按16 mL等分分装至玻璃瓶（见6.1）中，并加盖密封。

5.2 异丙醇溶液

70%异丙醇水溶液

6 设备

6.1 玻璃瓶

无菌、透明、方形，带盖和密封条，容量约为60 mL。

6.2 注射器

无菌的一次性注射器，适用于燃油，容量为1 mL，最小刻度单位为0.1 mL。

6.3 环形分液器

无菌的一次性环形分液器，适用于燃油，容量为0.01 mL。

6.4 移液器

无菌的移液器（或带一次性吸头），适用于燃油，容量分别为0.01 mL、0.1 mL至1 mL。

6.5 恒温箱

应确保培养基在恒温培育期间避光，可控温至 (25 ± 3) °C。

6.6 样品容器

无菌、透明，适用于燃油，应足以使抽取待检样品的设备插入至燃油表面以下约3厘米的深度。若同时对燃油中水相进行检测，应足以使抽取待检样品的设备接触样品底部沉积水。

7 取样

7.1 应按 GB/T 4756 或 ASTM D4057 的要求进行取样。

7.2 取样时应注意：

——应使用异丙醇溶液清洗或擦拭取样阀和其他取样设备，取样前应确保异丙醇挥发完全，残留的异丙醇会干扰检测结果；

——从排放管路进行取样时，应在排放管路内存油放完后尽快取样，取油罐或过滤器中最先排出的燃油或含水燃油。

注：微生物含量检测结果受到燃油类型、取样位置、取样设备及其特定的操作环境影响。大多数微生物存在于罐底或油路系统的低点，尤其是在燃油与水的界面、燃油中游离水沉淀或悬浮的位置。

7.3 采取样品体积约为 1 L。

7.4 取样后，应在 24 h 内进行检测。

注：燃油样品中存在的微生物会慢慢死亡，待检时间越长，检测结果越不可靠。

8 试验准备

8.1 培养基

应避免培养基长时间接触阳光或其他强光直射，使用前应使培养基平衡至环境温度，移除盖封，备用。

8.2 移液器

将移液器在 (121 ± 2) °C 温度下高压灭菌 15 min，或放置在 (170 ± 2) °C 的烘箱中灭菌 1 h，该灭菌时间不包括容器平衡至规定温度需要的时间。若使用高压灭菌法，应确保容器在使用前为干燥状态。

8.3 恒温箱

控温至 (25 ± 3) °C。

9 试验步骤

9.1 外观检查

应按 MH/T 6068 要求进行外观检查，并记录结果。若存在游离水，应同时对样品中的油相和水相进行检测。

9.2 样品油相采集

9.2.1 外观检查后，用力摇晃样品约 30 s，然后静置 (12 ± 1) min。若样品中的油相深度小于 6 cm 时，每厘米设置 2 min 的静置时间。

9.2.2 拧下玻璃瓶盖，将瓶盖放置在干净台面上，不应接触瓶盖或瓶颈的内部。

9.2.3 使用取样器（如注射器、环形分液器或移液器）吸取样品油相表面以下约 3 cm 深的燃油。若燃油深度小于 6 cm，在油相中间位置样品。避免吸取样品中油水界面处可见的微粒、水滴或乳液。吸取合适的样品检测量，航空煤油检测量为 0.5 mL，其他中间馏分燃油和汽油检测量为 0.25 mL，重质组分燃油检测量为 0.01 mL。不同取样器的使用方法如下：

- 若使用注射器，应从注射器手柄末端处打开无菌注射器包装，取出注射器，不应接触注射筒下端和注射器针头。用注射器吸取燃油直至超过样品检测量，将注射器针头向上，排出空气和多余燃油，直至剩余检测所需的燃油量；
- 若使用环形分液器，应打开手柄末端处的金属箔消毒密封包装，再取出分液器，不应接触环形结构和下端。将环形结构浸入燃油中，再取出即可；
- 注射器、环形分液器和其他一次性取样器仅可使用一次。如需再次使用取样器，应在每次使用前清洗并重新消毒取样器。

9.2.4 将样品加入玻璃瓶中，立即拧紧瓶盖。并按照 9.4 和 9.5 的要求进行处理和检查。

9.3 样品水相采集

9.3.1 完成样品油相微生物含量测定后，静置样品，直至水相沉降至样品底部。使用注射器或吸液管从样品底部吸取水样，应避免抽取燃油，并将其转移至另一个样品容器中。

- 9.3.2 油水分离后，立即反复翻转盛装水样的样品容器 3 次，以确保水质均匀。
- 9.3.3 拧下玻璃瓶盖，将瓶盖放置在干净台面上，不应接触瓶盖或瓶颈内部。
- 9.3.4 使用取样器（如环形分液器、注射器或吸液管）吸取合适的样品检测量。通常为 0.01 mL，最大值可达 1 mL。取样器使用方法见 9.2.3。
- 9.3.5 将水样加入玻璃瓶后，立即拧紧瓶盖，并按照 9.4 和 9.5 的规定进行。

9.4 培养基处理

- 9.4.1 用手掌或橡皮塞或厚橡胶垫拍打装有被检样品的玻璃瓶，使其中的凝胶培养基变松散。
- 9.4.2 用力摇晃玻璃瓶约 30 s，使凝胶液化，并分散被检样品。处理好的凝胶应稍微粘稠，无块状物，透明度均匀。
注：凝胶中若存在气泡，不会影响试验。
- 9.4.3 快速移动玻璃瓶，使凝胶聚集在玻璃瓶底。
- 9.4.4 用手掌轻拍玻璃瓶，直至凝胶在玻璃瓶的其中一个最大面上形成均匀凝胶层。

9.5 培育和检查

- 9.5.1 将玻璃瓶转移至避光环境或恒温箱中，在 (25±3) °C 温度下，培育 4 天，不要倾斜玻璃瓶或扰动凝胶。
- 9.5.2 培育期间，每天观察一次。每次观察时，宜使用记号笔在玻璃瓶上标记红色或紫色菌落，计数菌落数量，不应重复计数。培育期间和观察时，应避免扰动凝胶。
- 9.5.3 若因菌落数量太多而无法进行计数，则手持玻璃瓶，与附录 A 图表进行外观对比估计菌落数量，精确至十位数。若菌落数量大于或等于 10000 CFU 时，微生物含量等于或超出最高检出水平。
注：不同类型的微生物在凝胶培养基中生长速率不同，形成菌落的大小不同。有些细菌可活动，在培育期形成不规则菌落，使凝胶呈现红色或紫色的条纹或斑点，每个条纹或斑点中心应计为一个菌落。燃油中的抗氧化剂会干扰凝胶培养基中的微生物生长指示剂，使凝胶呈现均匀的浅桃色或橙色（通常在 12 h 内）。
- 9.5.4 培育观察结束后，应对玻璃瓶进行消毒后再废弃。

10 计算

10.1 油相

使用公式（1）计算燃油中的微生物含量（CFU/L）：

$$N = \frac{C \times 1000}{V} \dots\dots\dots (1)$$

式中：
N——微生物含量，CFU/L；
C——菌落数量，CFU；
V——样品检测量，mL。

结果应保留至十位数。若使用建议的样品检测量，微生物含量应按表1进行保留。菌落数量超过100 CFU时，应在检测报告中说明。

表1 使用建议样品类型和检测量的试验报告

样品类型	检测量 mL	报告结果精确到
航空煤油	0.5	2000 CFU/L
其他中间馏分燃油和汽油	0.25	4000 CFU/L
重质组分燃油	0.01	100000 CFU/L
含水燃油	0.01	100 CFU/mL
注：菌落数量超过100 CFU时，此结果已超过微生物含量定量分析的范围，结果的准确度和精确度可能较低。		

通过与附录A进行外观对比得出的菌落数量仅为半定量估算值，应在报告中注明。计算得出的燃油中的微生物含量（CFU/L）为近似值，结果保留应按科学记数法精确至十的幂次方。

10.2 水相

使用下列公式（2）计算水相中的微生物含量（CFU/mL）：

$$N = \frac{C}{V} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- N——微生物含量，CFU/mL；
- C——菌落数量，CFU；
- V——样品检测量，mL。

结果应保留至十位数。若使用建议的样品检测量，微生物含量应按表2进行保留。菌落数量超过100 CFU时，应在检测报告中说明。

表2 使用建议样品类型和检测量的试验报告

样品类型	检测量 mL	报告结果精确到
燃油中水相	0.01	100 CFU/mL

通过与附录A进行外观对比得出的菌落数量仅为半定量估算值，应在报告中注明。计算得出的水中的微生物含量（CFU/mL）为近似值，结果保留应按科学记数法精确至十的幂次方。

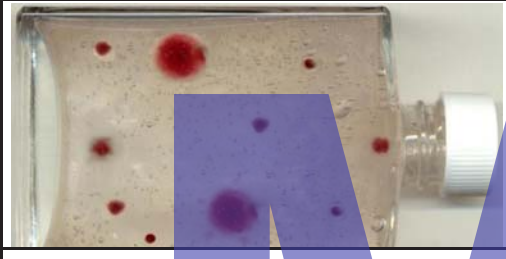
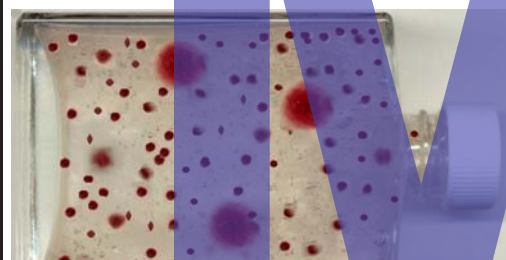
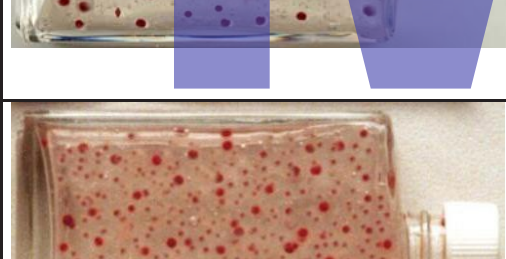
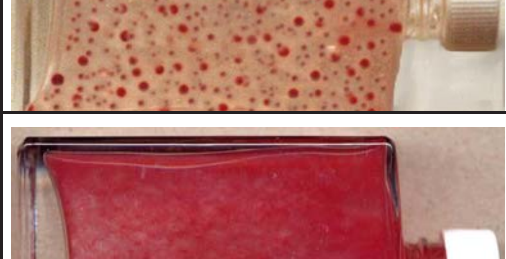
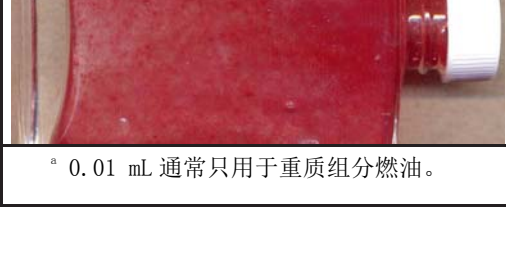
11 报告

报告应至少包含以下信息：

- d) 参考标准；
- e) 检测样品的类型和完整标识；
- f) 样品检测量；
- g) 采样时间和日期（若采样超过 24 h 后进行的检测应注明）；
- h) 采样方法；
- i) 采样点位置；
- j) 检测所用设施或设备类型；

- k) 样品外观检查结果;
- l) 恒温培养条件, 包括培养温度、恒温培养总时间(包含开始检测的日期: 将样品加入培养瓶的日期和完成检测的日期: 在恒温培养期后进行最后观察的日期)、指定范围以外的任何波动;
- m) 检测结果(见第 10 章)。

附 录 A
(规范性附录)
菌落数量目测图表

	全定量检测范围 准确计数菌落数量		
	菌落数量	微生物含量计算值	
	0 CFU 菌落	按照第 10 章计算燃油中油相或水相中的微生物含量： 油相中 $N = \frac{C \times 1000}{V}$ 或水相中	
	10 CFU 菌落	$N = \frac{C}{V}$ 式中： N ——微生物含量； C ——菌落数量； V ——样品检测量。	
	100 CFU 菌落	半定量检测范围 通过对比图片，估计菌落数量	
	菌落数量	检测量	微生物含量近似值精确到
	100 CFU 菌落	0.25 mL 或 0.5 mL 燃油	10^5 CFU/L
		0.01 mL 燃油 ^a	10^7 CFU/L
		0.01 mL 水	10^4 CFU/mL
	1000 CFU 菌落	0.25 mL 或 0.5 mL 燃油	10^6 CFU/L
		0.01 mL 燃油*	10^8 CFU/L
		0.01 mL 水	10^5 CFU/mL
	≥10000 CFU 菌落	0.25 mL 或 0.5 mL 燃油	≥ 10^7 CFU/L
		0.01 mL 燃油 ^a	≥ 10^9 CFU/L
		0.01 mL 水	≥ 10^6 CFU/mL

^a 0.01 mL 通常只用于重质组分燃油。