

燃料油贮存过程中的微生物学研究*

王修垣 田新玉 王先极

(中国科学院微生物研究所)

燃料油主要是汽油、煤油和柴油,它们基本上是由脂肪烃和环烃组成的。Bushnell 和 Haas 于1941年报道,他们在汽油和煤油贮罐的罐底水中发现了相当大量的细菌,其中有几株假单胞菌能利用煤油作碳源。Allen (1945) 指出,应该注意罐底水中的微生物对汽油的变质作用。Bakanaukas (1958, 据 Davis, 1967, p.504) 的研究结果表明,微生物是喷气燃料(航空煤油)贮罐淤泥的主要组份,淤泥可使加油设备和飞机的燃料系统失灵,从而引起飞行事故的原因之一。Prince (1961) 和 Churchill (1963) 在喷气燃料中发现了硫酸盐还原菌和其它微生物,探讨了该菌和其它好气微生物之间的关系。由于微生物的活动可导致机翼油箱和贮油设备的腐蚀,并可采用诸如加杀菌剂等措施加以克服(Ward, 1963)。因此,关于燃料油贮运系统的微生物学研究引起了有关机构的重视。研究涉及燃料油贮运过程中微生物的存在、种类、生存状况,对燃料油的性质和贮油设备的影响,以及其防止措施等方面(Leathen and Kinsel, 1962; Hedrick *et al.*, 1963; London *et al.*, 1964; Davis, 1967; Berner and Ahearn, 1977; Tiwari, *et al.*, 1977)。在我国,尚未见到这方面的研究报告。

本文报道了我们从八个大型燃料贮罐中所采样品的微生物分析结果,部分菌株的鉴定,以及在试验室条件下,一些生态因子对其在航空煤油中存活状态的影响等。

一、材料和方法

1. 取样

把适用于大型贮油罐的取样器作无菌处理后,投入贮油罐的一定深度,油样或罐底油-水样在罐内直接进入灭菌的玻璃瓶内。样品尽快运至试验室进行微生物分析。

2. 微生物计量

油-水样品,用十级稀释五管重复培养法计算细菌活菌量,用稀释平板法计算真菌菌量。油样取30毫升通过细菌薄膜过滤器(2号滤纸)过滤后,将滤纸放在倒有相应培养基的培养皿内的平板上培养,一周后统计菌落数。

3. 培养基和培养条件

好气腐生细菌用肉汁蛋白胨琼脂培养基。真菌用马丁氏琼脂培养基和土豆汁琼脂培养基。液体石蜡氧化菌用 Bushnell-Haas (1941) 无机盐培养基,加几滴液体石蜡作碳源。硫酸盐还原菌用 Starkey 培养基 (1938),接种后倒入无菌培养基充满试管,以橡皮塞密封,创造厌气条件。铁细菌用柠檬酸铁铵培养基。

接种物置25℃恒温培养7—14天,依菌群的不同而异。

* 承齐祖同,陈庆涛同志鉴定真菌菌株,钟跃明同志提供四株胶片污染菌,石油化工研究院沈杉松、邓巍同志提供了特制的取样器,总后勤部油料科技处李振放等同志协助取样,一并致谢。

4. 一些生态因子对微生物在航空煤油中生存状况的影响

把分离自燃料油的真菌和细菌菌株反接入燃料油中制成悬浮液。在无菌的、容积为125毫升的具塞玻璃瓶中,加入100毫升过滤灭菌的2号喷气燃料油,一式四份:其一为纯燃料油,另外三瓶分别加入1%无菌水、1%无菌水+小块橡胶衬里片和1%蛋白胨水溶液,使蛋白胨含量等于总油量的0.01%。接入菌悬液后,强烈振荡,置室温暗处保存。定期振荡培养瓶,取样,以0.1%琼脂水作稀释液,用相应的培养基倒平板,测定菌量的变化。

二、结 果

1. 燃料油中的活菌量

从8个不同类型的贮油罐中共取样49个,其中航空煤油20个,灯用煤油6个,柴油9个,汽油14个。兹将其微生物分析的结果分述如下。

(1) 航空煤油和灯用煤油 从表1的资料可以看出,在20个航空煤油样品中有11个样品不存在所分析的任一菌群。5个样品(8、10、15、16和19)中的腐生细菌和真菌也很少,在30毫升样品中只有1—12个细菌或真菌。只是在罐底油(11和12)和罐底油-水样(9和14)中发现腐生细菌和真菌数量较高,腐生细菌最高达 2.0×10^6 /毫升(14),真菌最高达 7.0×10^3 /毫升(11)。在两个样品(9和14)中发现有液体石蜡氧化菌和硫酸盐还原菌,1个样品(14)中存在有铁细菌。

灯用煤油共取样6个(表1),其中3个油样(21,22和24)未发现有腐生细菌和真

表1 煤油贮罐中的微生物分析结果

样号	来 源	样 品 描 述	菌量/30毫升		菌量/毫升		
			腐生细菌	真 菌	液体石蜡 氧化菌	硫酸盐 还原菌	铁细菌
航 空 煤 油							
1	SX922—27M	罐底油, 微含水	0	0	0	0	0
2	SX922—27M	罐底油	0	0	0	0	0
3	SX922—27M	罐底油, 少量残渣	0	0	0	0	0
4	SX922—29M	无色透明油	0	0	0	0	0
5	SX922—29M	罐底油	0	0	0	0	0
6	SX922—39 R	无色透明油	0	0	0	0	0
7	SX922—39 R	罐底油, 微含水	0	0	0	0	0
8	SX922—30 R	无色透明油	2	1			
9	SX922—30 R	罐底油-水样, pH5.1	$2.1 \times 10^{1*}$	$0.11 \times 10^{1*}$	2.5×10^1	0.5×10^1	0
10	SX922—23M	无色透明油	3	2			
11	SX922—23M	罐底油, 微含水和淤渣	$1.0 \times 10^{2*}$	$7.0 \times 10^{3*}$			
12	KM973—26M	罐底油	$6.0 \times 10^{2*}$	$5.0 \times 10^{1*}$			
13	KM973—26M	无色透明油	0	0			
14	NBR	罐底油-水样, pH6.0	$2.0 \times 10^{6*}$	$2.2 \times 10^{2*}$	1.3×10^3	2.5×10^1	1.4×10^3
15	NB6R	罐底油	1	10			
16	NB1R	沉淀油	1	12			
17	NB1R	无色透明油	0	0			
18	NB1R	"	0	0			
19	NB1R	罐底油	1	0			
20	SW1M	无色透明油	0	0			
灯 用 煤 油							
21	SC899—2 R	微黄色油	0	0			
22	SC399—2 R	"	0	0			
23	SC399—2 R	罐底油, 有淤渣	$2.7 \times 10^{6*}$	$4.0 \times 10^*$			
24	SC931—2 M	微黄色油	0	0			
25	SC931—20 M	罐底油, 微含水	$2.0 \times 10^{1*}$	$1.0 \times 10^{4*}$			
26	SC931—25 M	罐底油-水样, pH6.0	$2.2 \times 10^{6*}$	$8.0 \times 10^{4*}$	5.0×10^4	1.2×10^3	0

注: M表示金属罐, R表示橡胶衬里罐,下同。* 菌量/毫升。

菌, 在两个罐底油 (23和 25) 和 1 个罐底油-水样 (26) 中真菌最高达 8.0×10^4 /毫升 (26), 腐生细菌最高达 2.7×10^6 /毫升 (23)。在样品 26 中, 液体石蜡氧化菌和硫酸盐还原菌的菌量均较高。

(2) 柴油 柴油贮罐中微生物分析的结果列在表 2 中。在 9 个样品中有 4 个油样未发现有腐生细菌和真菌。在两个罐底油-水样 (28和 33)、两个罐底水样 (31 和 35) 和 1 个罐底油 (30) 中有腐生细菌或真菌, 最高菌量分别为 2.7×10^7 /毫升 (30) 和 3.0×10^3 /毫升 (28)。液体石蜡氧化菌存在于 33 和 35 号样品中。铁细菌只在样品 33 中被证实。硫酸盐还原菌未发现。

表 2 柴油贮罐中的微生物分析结果

样号	来 源	样 品 描 述	菌量/毫升				
			腐 生 菌	真 菌	液体石蜡氧化菌	硫酸盐还原菌	铁 细 菌
27	NJ634—2 R	棕红色油	0*	0*			
28	SC899—9 R	罐底油-水样, pH6.0	0	3.0×10^3	0	0	0
29	KM973—35 R	棕色油	0*	0*			
30	KM973 M	罐底油	2.7×10^7	1.0×10^1			
31	SW W	水封罐罐底水, pH12	4.0×10^2	2.0×10^1	0	0	0
32	SW W	水封罐棕色油	0*	0*			
33	SW W	水封罐罐底油-水样, pH12	3.0×10^2	0	+	0	+
34	MH小罐 M	棕色油	0*	0*			
35	MH5—1 M	黄色罐底水, pH6.0	5.0×10^3	1.1×10^3	4.0×10^3	0	0

* 菌量/30毫升

(3) 汽油 汽油中的菌量更低。在 14 个样品中只在 3 个罐底油 (39, 43 和 46) 和两个油样 (45 和 48) 中发现有腐生细菌或真菌, 细菌数量为 2—52/30 毫升, 真菌只在两个样品中出现单个菌落 (表 3)

表 3 汽油贮罐中的微生物分析结果

样号	来 源	样 品 描 述	菌量/30毫升		样号	来 源	样 品 描 述	菌量/30毫升	
			腐生菌	真菌				腐生菌	真菌
36	NB9M	黄色油	0	0	43	SC899—15 R	罐底油, 有淤渣	21	0
37	NJ634—2M	微黄色油	0	0	44	SC931—2 R	"	0	0
38	NJ634—2M	"	0	0	45	KM973—1 M	黄色油	2	0
39	NJ634—2M	罐底油	2	1	46	KM973—1 M	罐底油, 有淤渣	52	0
40	SC399—9 R	黄色油	0	0	47	MH4—7 M	罐底油, 微含水	0	0
41	SC399—9 R	罐底油, 有淤渣	0	0	48	MH5 R	微黄色油	0	1
42	SC399—15 R	黄色油	0	0	49	MH7—4 M	罐底油, 有淤渣	0	0

2. 菌株的分离、鉴定及其对燃料油的利用

根据菌落特征的不同, 从上述腐生细菌和真菌计数的培养物中分离出细菌 82 株, 真菌 41 株。在加有航空煤油作为碳源的 Bushnell-Haas 无机培养基中测定了它们利用燃料油的能力。结果表明, 有 6 株细菌和 33 株真菌能利用航空煤油作为唯一碳源生长。

从能够利用航空煤油的菌株中选了 5 株细菌和 9 株真菌按常规方法进行了鉴定。细菌分

别属于假单胞菌(*Pseudomonas* sp.), 棒状杆菌(*Corynebacterium* sp.), 节杆菌(*Arthrobacter* sp.)和产碱菌(*Alcaligenes* sp.)。真菌菌株分别属于下列各种, 它们是: 树脂芽枝霉(*Cladosporium resinae* (Lind.) de Vries), 茄病镰刀霉(*Fusarium Solani* (Mart.) Sacc.), 瓦克青霉(*Penicillium Waksmanii* Zaleski), 杂色曲霉(*Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tirob.)和构巢曲霉(*Aspergillus nidulans* (Eid.) Wint.)

3. 一些生态因子对微生物在航空煤油中存活状况的影响

考虑到燃料油在贮运过程中往往会受到水和有机质的污染并与贮罐橡胶衬里相接触, 我们在试验室条件下, 把10株真菌和5株细菌分别反接到纯航空煤油和附有1.0%水、橡胶片或0.01%蛋白胨的航空煤油中定期测定菌量的变化, 以便通过对比, 确定上述生态因子对它们在航空煤油中存活状况的影响。

反接的菌株中10株是通过上述试验, 筛选出的能够利用航空煤油作为唯一碳源的真菌和细菌, 有4株真菌是橡胶上的污染菌, 1株细菌是能够利用原油及正链烷生产大量胞外多糖的短杆菌(王修垣等, 1980)。

兹以下列两株真菌为例说明它们在不同条件下的发育动态。

(1) 树脂芽枝霉(*Cladosporium resinae* (Lind.) de Vries) 922-23-2-1

该菌分离自SC 922-23航空煤油金属贮罐, 分离初期, 反接到航空煤油中能存活, 在麦芽汁琼脂培养基上移接几代后, 即丧失其在航空煤油中存活的能力。图1表示该菌反接到航

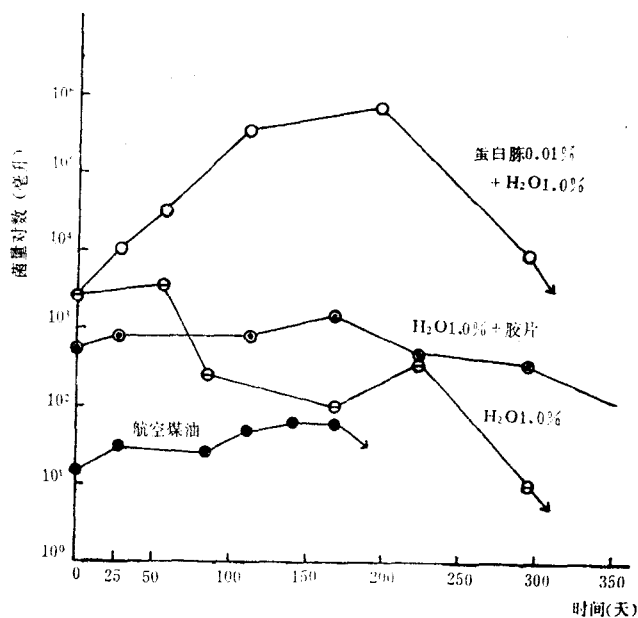


图1 树脂芽枝霉922-23-2-1在航空煤油中的菌量变化

空煤油中菌量变化动态。在纯油中菌量无明显增加, 至168天后死亡。在加有1.0%水和橡胶片的情况下, 菌量亦无明显增加, 但存活时间较长, 分别为294天和406天以上。当加有0.01%蛋白胨时, 菌量明显增加, 半个月后, 在底部出现肉眼可见的菌丝团(图2), 七个月后菌量下降, 至294天后死亡。

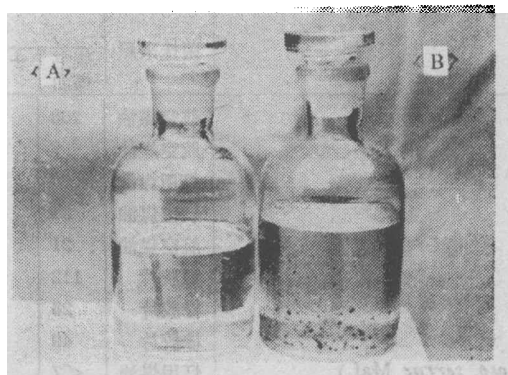


图 2 树脂芽枝霉922-23-2-1在航空煤油 + 0.01%蛋白胨的瓶底形成菌丝团(B), (A)无菌对照

(2) 杂色曲霉(*Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tirob.) 922-23-1

该菌来源与前一株相同, 反接后, 在四种情况下(图 3)菌量均逐渐下降。在纯油中, 21天后即死亡, 在其它三种情况下, 存活时间大致相当, 均超过 300 天。

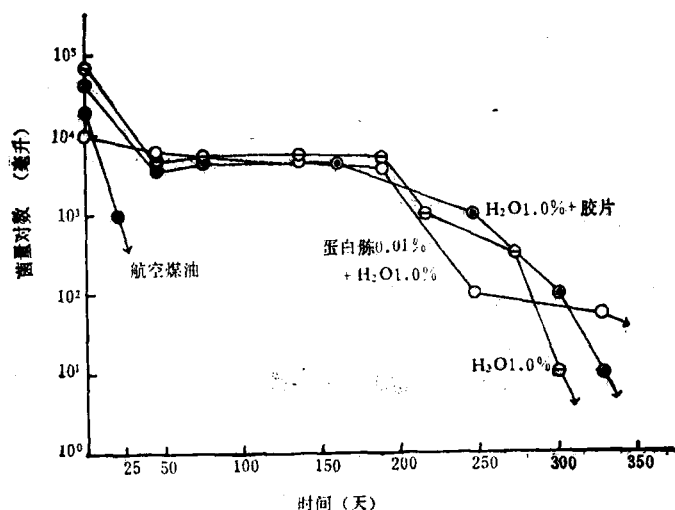


图 3 杂色曲霉(*Aspergillus versicolor* (Vuill.)Tirob.) 922-23-1 在航空煤油中菌量的变化

其它菌株反接后的存活状况综合列于表 4 中。其中, 树脂芽枝霉973-26-1的情况与树脂芽枝霉 922-23-2-1 相似(图 1), 当加有蛋白胨时, 菌量明显增加, 由 1.0×10^2 增加到 5.5×10^4 /毫升, 维持达 7 个月之久。同时, 也在瓶底出现明显可见的菌丝团。在反接的细菌中, 只有假单胞菌(NH8)在加有蛋白胨的航空煤油中菌量增加, 由 5.5×10^3 增加到 5.0×10^5 /毫升, 维持 6 个月后开始下降。除上述情况外, 所有菌量均逐渐下降, 差异在于存活期的长短。

表 4 真菌和细菌在航空煤油中的存活状况

菌 株	菌株来源	存 活 时 间 (天)			
		航空煤油	+1.0%水	+1.0%水+胶片	+1.0%水+0.01%蛋白胨
树脂芽枝霉922-23-2-1	航空煤油	168	294	406	294
树脂芽枝霉973-26-1	航空煤油	7	161	329	350
茄病镰刀霉899-2-1	灯用煤油	56	224	224	196
杂色曲霉922-23-1	航空煤油	21	301	329	329
杂色曲霉NH1-1	航空煤油	21	133	161	301
焦曲霉 R3(<i>Asp. ustus</i>)	橡胶片	112	168	196	168
桔青霉 R8(<i>Pen. citrinum</i>)	橡胶片	28	56	56	224
芽枝霉 R2	橡胶片	49	49	49	77
锯状头孢霉931-25-3(<i>Cephalosp. serrae</i> Maf.)	灯用煤油	<7	<7	<7	<7
头孢霉 R5	橡胶片	<7	<7	<7	<7
假单胞菌NH8	航空煤油	<7	<7	<7	224
节杆菌922-30-3	航空煤油	<7	<7	<7	14
产碱杆菌973M-1	汽油	<7	<7	<7	77
棒状杆菌922-30-2	航空煤油	<7	<7	<7	14
产粘短杆菌74-230(<i>Brev. Viscogenes</i> sp. nov.)	油污土	<7	<7	<7	<7

三、讨 论

综如上述,我们调查了8个大型燃料贮罐中腐生细菌和真菌的分布以及部分罐底样品中液体石蜡氧化菌、硫酸盐还原菌和铁细菌的存在。在49个样品中,罐体上部的油样22个,其中大部分没有培养出微生物,只在4个样品中(8,10,45和48)发现了个别细菌和真菌/30毫升。在25个罐底油、油-水、水或微含水和淤渣的样品中,有9个样品没有培养出微生物,在16个样品中微生物数量较多,细菌菌量最高达 2.7×10^7 /毫升,真菌菌量最高达 8.0×10^4 /毫升。有液体石蜡氧化菌和硫酸盐还原菌的样品各5个,只在两个样品中证明有铁细菌。

在燃料贮罐罐底,微生物数量和种类较多,与罐底存在着积水和淤渣有关。油-水界面和固-液界面在这种营养不足的生境中,是营养物相对富集的部位,因此也是微生物集聚的场所(Marshall, 1979)。

对比表1、2和3的资料可以看出,煤油和柴油贮罐罐底样品中微生物的含量比汽油罐底样品多得多,说明煤油和柴油比汽油更容易受到微生物的污染。这是由于前两种油品中含有更容易为微生物利用的C链较长($C_{10}-C_{18}$)的石蜡烃类所致(Johnson, 1964)。因此,我们在工作中重视了航空煤油的试验。

在已鉴定的菌株中,两株树脂芽枝霉是典型的航空煤油污染菌,为许多研究工作者所注意(Hedrick *et al.*, 1963; Teh and Lee, 1973; Tiwari *et al.*, 1977)。其它已鉴定的菌株也多在燃料油中遇到。它们都具有利用燃料油的能力,可以作为筛选用于燃料油的杀菌剂的试验菌株。

用单一纯培养物作的反接试验的结果(表4)表明,从燃料油中分离的菌株在航空煤油中的生存状况是多样的,这与以前原油菌株反接的结果相似(Wang und schwartz, 1961)。

有些菌株, 如锯状头霉菌931-25-3, 棒状杆菌922-30-2和节杆菌922-30-2等, 丧失了存活的能力。加入蛋白胨可促进树脂芽枝霉 922-23-2-1 和973-26-1, 以及假单胞菌 NH8 的菌量增加, 而对于所试验的多数菌株而言, 可延长它们的存活时间。加入水和胶片亦是如此。由此可见, 可给态氮的缺乏是限制微生物发育的因子。在燃料油贮运过程中, 避免水和其它杂质的污染对于防止微生物的破坏作用是重要的。

树脂芽枝霉在航空煤油中形成肉眼可见的菌丝团(图2)的情况表明, 微生物在燃料油中一旦发育起来, 就有可能造成危害。因此, 需要进一步研究解决燃料油的微生物问题的有效方法。

参 考 文 献

- 王修垣、刘秀芳、王先极、田新玉 1980 由原油及其制品生产细菌胞外多糖的研究 I. 菌株74-230的鉴定. 微生物学报20(4): 345—350.
- Allen, F. H. 1945 The microbiological aspects of gasoline inhibitors. *J. Inst. Petrol.* 31: 9—15.
- Berner, N. H., and D. G. Ahearn 1977 Observation on the growth and survival of *Cladosporium resinae* in jet fuel. *Develop. Ind. Microbiol.* 18: 705—710.
- Bushnell, L. D., and H. F. Haas 1941 The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *J. Bacteriol.* 41(5): 653—673.
- Churchill, A. V. 1963 Microbial fuel tank corrosion: mechanisms and contributing factors. *Mater. Protect.* 2(6): 18—23.
- Davis, J. B. 1967 Petroleum Microbiology, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 499—540.
- Hedrick, H. G., et al. 1963 Viability of selected microorganisms in hydrocarbon fuels. *Appl. Microbiol.* 11: 472—475.
- Johanson, M. L. 1964 Utilization of hydrocarbons by microorganisms. *Chem. Ind.* 36: 1532—1537.
- Leathen, W. W. and N. A. Kinsel 1962 The identification of microorganisms that utilize jet fuel. *Develop. Ind. Microbiol.* 4: 9—16.
- London, S. A., et al. 1964 Microbial activity in air force jetfuel systems. *Develop. Ind. Microbiol.* 6: 61—79.
- Marshall, K. C. 1979 Theoretical and practical significance of bacteria at interfaces. *Developments in Industrial Microbiology* 20: 1—7.
- Prince, A. E. 1961 Microbiological sludge in jet aircraft fuel. *Develop. Ind. Microbiol.* 2: 197—204.
- Starkey, R. L. 1938 A study of spore formation and other morphological characteristics of *Vibrio desulfuricans*. *Arch. Mikrobiologie* 9: 263—304.
- Teh, J. S., and K. H. Lee 1973 Utilization of n-alkanes by *Cladosporium resinae*. *Appl. Microbiol.* 25: 454—457.
- Tiwari, K. C. et al. 1977 Microbiological growth in aviation turbine fuel. *Indian J. Exp. Biol.* 15(7): 579—581.
- Wang Hsiu-yuan and W. Schwartz 1961 Untersuchungen zur Mikrobiologie des Erdöls und der Erdölprodukte IV. Mikrobiologische Untersuchung eines Ölfeldes. *Zeitsch. f. allg. Mikrobiologie* 1: 223—244.
- Ward, C. B. 1963 Corrosion resulting from microbial fuel tank contamination. *Mater. Protect.* 2(6): 10—16.

MICROBIOLOGICAL INVESTIGATIONS ON FUEL OILS DURING THE STORAGE

Wang Xiuyuan Tian Xinyu Wang Xianji

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

The occurrence of viable microorganisms in 49 samples taken from 8 large tanks was examined quantitatively and qualitatively. Different contents of bacteria and fungi have been found in 16 of 25 samples near the tank-bottoms, mainly in that from kerosene- and diesel oil-tanks. The maximum count is up to $2.7 \times 10^7/\text{ml}$ for bacteria, $8.0 \times 10^4/\text{ml}$ for fungi. Liquid paraffin oxidizer, sulfate-reducer and iron bacteria are found only in several samples.

On the basis of microbiological identification some bacterial isolates belong to *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* and *Alcaligenes*, and fungous strains are identified as *Cladosporium resinae* (Lind) de Vries, *Fusarium solani* (Mart) Sacc., *Penicillium waksmanii* Zaleski, *Aspergillus versicolor* (Vuill) Tirob. and *Aspergillus nidulans* (Eid) Wint. The above mentioned species are able to utilize jet aircraft fuel as carbon source for growth.

The results of the growth and survival of bacteria and fungi inoculated back into jet fuel in the presence or absence of additives (water, pepton or a bit of rubber) were different. Several strains lost their survival ability. Addition of water, pepton or rubber lengthened somewhat their survival period. Pepton promoted the growth of *Cladosporium resinae* (Lind) de Vries 922-23-2-1 and 973-26-1 as well as *Pseudomonas* sp. NH8 significantly. Development of visible mycelia in the bottom of jet fuel by the former was observed. These results indicated a further microbiological investigation is necessary.