

# 由原油及其制品生产细菌胞外多糖的研究

## 1. 菌株 74-230 的鉴定\*

王修垣 刘秀芳 王先极 田新玉

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从南京炼油厂的油污土样中分离出一株革兰氏阳性、无芽孢、无分枝、不运动、不抗酸、能从原油或其制品大量合成胞外多糖的杆菌。在培养过程中, 形态无明显周期性变化。在营养琼脂平板上培养, 菌落圆形, 微凸起, 淡粉至浅桔红色, 表面光滑、润泽, 边缘整齐。该菌还原硝酸盐为亚硝酸盐, 不液化明胶, 石蕊牛奶还原, 由葡萄糖氧化产酸, 由乳糖不产酸。DNA 中 G-C 含量在 SSC 系统中为  $63.12 \pm 2.02$  克分子%。经鉴定为一新种, 由于它具有合成胞外多糖的能力, 把它定名为产粘短杆菌 74-230 (*Brevibacterium viscogenes* nov. sp. 74-230)。

微生物能产生多种胞外多糖。在五十年代末和六十年代初, 微生物胞外多糖的生产即已作为新的发酵工业而兴起, 并正在迅速发展。这一方面是由于多糖在工业(食品、医药、纺织、造纸、冶金和石油等等)和农业中<sup>[1-7]</sup>用途广泛, 另一方面是由于微生物多糖的性能良好, 生产不受自然条件的影响, 而且便于工业化。现在, 以碳水化合物为碳源进行生产的有右旋糖酐、甘蓝黑腐病黄单胞菌胶(Xanthan gum)和茁黴多糖(Pullulan)等<sup>[8]</sup>。

关于微生物由正-链烷或液体石蜡生成多糖的研究, 自六十年代以来, 发表的一些研究报告<sup>[6-11]</sup>指出, 在节杆菌(*Arthrobacter*)、棒状杆菌(*Corynebacterium*)、分枝杆菌(*Mycobacterium*)、产碱杆菌(*Alcaligenes*)和短杆菌(*Brevibacterium*)等属中, 有些菌种具有这种能力。尚未见到以原油为碳源发酵生产多糖的报告。

鉴于以原油及其制品为碳源生产胞外多糖等有用物质的研究, 不仅具有理论的意义, 而且对于石油工业具有重要的实用

价值, 本文报道一株利用原油及其制品生产胞外多糖的细菌菌株 74-230 的分类鉴定结果。

## 材料和方法

### (一) 菌株的分离

将取自江汉油田、大庆油田、杭州炼油厂、南京炼油厂、大庆炼油厂等的油污土样 0.5—1.0 克或水样 1.0 毫升接入以原油为碳源的培养基中, 摇床培养 2—3 天, 取出培养液, 稀释倒平板, 置 28℃ 培养 5—7 天。挑出单个菌落接于液体石蜡为碳源的琼脂斜面上, 生长后, 移接至营养琼脂斜面上, 培养 2—3 天。此培养物用于以原油为碳源产生胞外多糖的菌株的筛选。

### (二) 培养基和培养条件

筛选用两种培养基进行, 得到产多糖菌株的培养基<sup>[11]</sup>成份为(克/升):  $\text{NaNO}_3$  10.0,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  4.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.6,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03,  $\text{CaCl}_2$  0.06, 酵母膏

本文于 1979 年 12 月 20 日收到。

\* 电镜照片为本所技术室电镜组所摄, 在工作中, 与王大粗、战立克同志进行过有益的讨论, 一并致谢。

0.1,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   $1.5 \times 10^{-3}$ ,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$   $3.0 \times 10^{-3}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   $6.0 \times 10^{-5}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $1.5 \times 10^{-4}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $3.0 \times 10^{-3}$ , 原油 10% (W/V), 自来水 1 升, pH 7.0—7.5, 250 毫升三角瓶装 50 毫升培养基, 8 磅 30 分钟灭菌。

培养物置 200 转/分旋转式摇床上 30—33°C 培养 4 天后, 用毛细管粘度计在 45°C 下测定培养液的粘度, 以粘度的明显增加作为筛选菌株的标准。

### (三) 鉴定方法

按照《一般细菌常用鉴定方法》<sup>[13]</sup>和《伯杰 (Bergey) 氏鉴定细菌学手册》<sup>[14]</sup> (以下简称《手册》) 第七版进行。

## 结 果

从 110 个油污土、水样中共分离出约 700 株菌, 从中筛选出一株以原油为碳源产生胞外多糖较好的菌株 74-230。该菌分离自南京炼油厂油污土, 其分类鉴定结果如下。

### (一) 细胞形态

将普通牛肉汁琼脂斜面上培养不同时间的培养物涂片染色, 置光学显微镜和电子显微镜下观察。细胞杆状, 有的微曲, 两端钝圆, 无分枝, 单个、成对、少数多个相联, 排列有时呈 V 形。16—24 小时, 细胞大小为  $0.5 \times 1.3$ — $4.5$  微米。随着培养时间的延长, 细胞变短, 但不成球形, 72 小时为  $0.5 \times 0.8$ — $1.7$  微米 (图 1)。

在培养过程中, 细胞革兰氏染色阳性, 无变化。吕氏美蓝染色表明, 细胞内有异染质粒。该菌不运动, 不形成芽孢, 抗酸染色负反应。

### (二) 培养特征

1. 普通牛肉汁琼脂斜面: 中度生长, 菌苔线形, 边缘整齐。24—48 小时, 菌苔着色不明显, 随着培养时间的延长, 色度从淡粉至浅桔红。菌苔表面, 通常光滑、润

泽, 有时出现粗糙型, 无粘性, 不产生水溶性色素。

2. 普通牛肉汁琼脂平板: 24—48 小时, 菌落点状, 4 天直径约 3 毫米, 一周达 7 毫米。菌落圆形, 边缘整齐, 稍隆起, 淡粉至浅桔红, 表面光滑、润泽, 无粘性。不形成水溶性色素。有时出现粗糙型菌落。

3. 普通牛肉汁: 稍混浊, 沿管壁呈薄环, 液面有薄菌膜, 摇之絮状下沉, 管底有少量沉淀。

4. 马铃薯块: 菌苔线形, 中度生长, 光滑、润泽、边齐, 肉粉色, 无水溶性色素。马铃薯块无变化。

5. 土豆汁琼脂斜面: 菌苔线形, 中度生长, 浅粉色, 光滑, 润泽, 边齐。

6. 天门冬素琼脂斜面: 菌苔线形, 中度生长, 光滑, 润泽, 边齐, 淡粉色。

7. 明胶穿刺培养: 细菌在表面并沿穿刺线生长逐渐减弱, 淡粉至桔红色。

8. 普通牛肉汁琼脂穿刺培养: 细菌在表面并沿穿刺线生长逐渐减弱, 淡粉至浅桔红色。

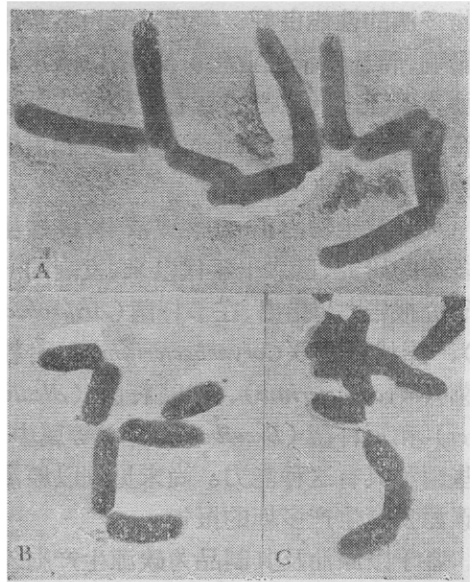


图 1 *Brevibacterium viscogenes* nov. sp. 74-230 的电镜照片 ( $\times 9000$ )

A. 24 小时 B. 48 小时 C. 96 小时

9. 在以液体石蜡为碳源的琼脂斜面上: 菌苔线形, 中度生长, 淡粉至浅桔红, 光滑, 润泽, 边齐。

10. 在以原油或液体石蜡为碳源的摇瓶中: 培养初期, 该菌把原油或液体石蜡乳化成粒度不一的油滴, 悬浮于培养液中。随着培养期的延长, 乳化程度愈来愈好, 至 36—48 小时, 培养液开始变稠, 到培养结束(4 天), 形成褐色(原油为碳源)或浅桔红色的粘滞性胶状液。开始得到此菌时, 在 45℃ 测得原油发酵液粘度为 19.4 厘沩。

### (三) 生理、生化特性

生长温度 10℃ 生长较弱, 28—32℃ 生长最适, 37℃ 能生长, 42℃ 不生长。在脱脂牛奶中 63℃ 热处理 30 分钟后生长或不生长; 72℃ 热处理 15 分钟不生长。

初始生长 pH 值 pH 4.5—11 均可生长, 7.0—8.5 生长良好, 9.5 以上生长延迟, 4.0 以下不生长。

对氧的要求 在盖以液体石蜡高层的液体培养基中, 在两液相的界面上缓慢出现菌膜, 表明该菌可在好气—微厌气条件下生长。

硝酸盐还原 弱阳性, 在厌气条件下不产气。

石蕊牛奶 还原。

明胶 不液化。

淀粉 不水解。

吲哚 不产生。

M. R. 试验 阴性。

V. P. 反应 阴性。

纤维素 不分解。

丙二酸盐 不利用。

柠檬酸盐 不利用。

硫化氢形成 阳性。

尿酶试验 弱阳性。

过氧化氢酶 阳性。

氧化酶 阴性。

精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸脱羧酶 阴性。

精氨酸双水解酶 阴性。

酪氨酸酶 阴性。

脱氨酶 不存在。

氧化葡萄糖酸盐试验 阴性。

产酸基质的测定 在休和利夫森二氏培养基上穿刺接种, 该菌氧化葡萄糖、蔗糖、半乳糖、鼠李糖产酸; 由麦芽糖、棉子糖、乳糖、菊糖不产酸。由上述糖类均不产气。

在加杜氏小管的合成培养基中, 该菌由葡萄糖、蔗糖、半乳糖、麦芽糖、果糖、甘露糖和甘油产酸, 不产气; 由乳糖、阿拉伯糖、木糖、卫矛醇、糊精不产酸和气。

糖同化试验 在分别加入上述基质 1% 的合成培养基中, 除卫矛醇和糊精生长较弱外, 均能良好生长。

由烃类形成多糖的试验 在以原油为碳源的培养液中, 50 和 240 升罐发酵, 用酒精沉淀法得到粗多糖 8.0 克/升, 对原油收率为 6.7%。该菌可由 C<sub>11</sub>—C<sub>22</sub> 的正链烷生成胞外多糖, 而以 C<sub>12</sub>—C<sub>19</sub> 较好, C<sub>16</sub> 和 C<sub>18</sub> 最好; 奇数碳链烷均比相邻的偶数碳链烷差<sup>[16]</sup>。在由 C<sub>12</sub>—C<sub>19</sub> 的正链烷所组成的锦西重液体石蜡为基质的培养基中, 纯多糖产量为 12 克/升或更多, 对重液体石蜡的收率为 40% 左右。

### (四) DNA 中 G-C 含量的测定

DNA 中 G-C 克分子百分含量的测定是用紫外分光光度计测定解链温度(T<sub>m</sub>)的方法, 在自由蒸发条件下<sup>[17]</sup>在 SSC 系统中进行的, 并校正了膨胀效应(校正方法, 另文报道)。共测定四次, 结果经统计学处理, 得到菌株 74-230 DNA 的 G-C 含量为 63.12 ± 2.02 克分子%; 该菌的 DNA 增色曲线如图 2。

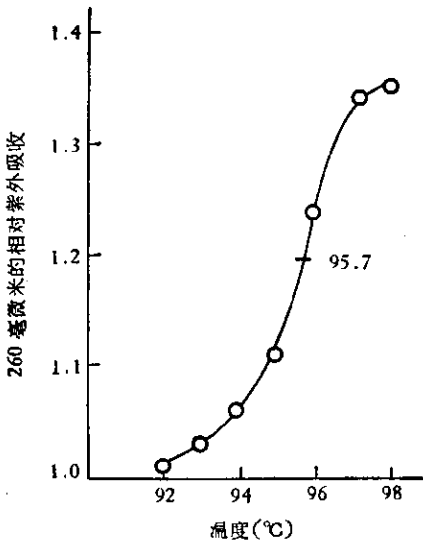


图2 菌株74-230的DNA增色曲线

## 讨 论

综上所述,菌株74-230细胞形态杆状,有的微曲,端圆,单个、成对、少数多个相联,排列有时呈V形。细胞无分枝,从未成球形。革兰氏染色阳性,不运动,不形成芽孢,不抗酸。在琼脂培养基上形成淡粉至浅桔红色色素。该菌氧化葡萄糖和麦芽糖产酸,不产气,从乳糖不产酸,石蕊牛奶

还原,硝酸盐还原弱阳性,不液化明胶。

由于该菌的细胞形态既不像棒状杆菌科(Corynebacteriaceae)的节杆菌那样,有明显的发育周期,又不像棒状杆菌那样的多形态,参照《手册》第七版<sup>[14]</sup>(第八版无描述)的描述,应把它列入短杆菌科(Brevibacteriaceae)的短杆菌属(*Brevibacterium*)。

该菌DNA的G-C克分子百分含量在SSC系统中为 $63.12 \pm 2.02$ ,位于Yamada等<sup>[17]</sup>所报道的短杆菌属的G-C克分子%的范围(48—72)内。

《手册》第七版,根据菌株的运动性、颜色、对石蕊牛奶的作用、硝酸盐还原的能力和明胶液化等特性,将短杆菌属分为23个种。另外,在文献中可以找到但未列入《手册》的还有25个种。在这48个种中,运动的有14种,菌株74-230以其不运动性与之相区别。

《手册》第七版,把不运动的短杆菌按照琼脂菌落的颜色分为两个群。菌株74-230应列入第一群:产生红、玫瑰红、褐黄或橙色色素。此群又按色素分成两个小群。菌株74-230以形成淡粉至橙红色色

表1 与菌株74-230有关的短杆菌的主要鉴别特征

种名	细胞大小(微米)	菌落颜色	硝酸盐还原	石蕊牛奶	明胶液化	发酵乳糖	硫化氢形成	由烃类产多糖	G-C克分子%	参考文献
<i>Brev. pentose-alanicum</i>	0.4—0.6×1.0—1.5	黄	+	不变或碱	+	-	±			[22]
<i>Brev. lyticum</i>	0.5—0.8×0.8—1.5	黄白—黄	+	硝酸凝固	+	稍产酸	-			[23]
<i>Brev. flavum</i>	0.7—1.0×1.2—3.0	黄—淡黄	+	微碱或不变	-	-	-		54.1	[17],[18]
<i>Brev. lactofermentum</i>	0.7—0.8×1.0—2.4	黄—淡黄	+	酸凝固	-	+	-		52.7—53.7	[17],[18]
<i>Brev. vitarumen</i>	0.5—1.5×0.5—3.0	淡柠檬黄	+	酸,还原	-	-	-		64.4	[13],[17]
<i>Brev. maris</i>	0.7—0.8×1.0—1.2	桔黄—红橙	+	碱—酸	-	-	-		64.6	[13],[17]
<i>Brev. fuscum</i>	0.6×1.5	褐黄,绿黄	+	酸—碱	+	-	-		58.3—60.7	[13],[17]
<i>Brev. saperdae</i>	0.5×1.5	黄—硫黄	+	-	-	-	-		68.5	[17],[19]
<i>Brev. ketoglucanicum</i>	0.7—0.9×0.8—3.0	淡桔红	+	不变—碱	-	-	-	+		[7],[24]
菌株74-230	0.5×1.3—4.5	淡粉—桔红	+	还原	-	-	+	+	63.12±2.02	

素和使石蕊牛奶还原而不同于《手册》中第一小群的两个种以及 Okumura 等<sup>[18]</sup>描述的、可以列入此群的 *Brevibacterium roseum*, 而应列入产生黄至褐黄或橙色色素的小群中。

《手册》根据其能否还原硝酸盐又把此群分为两类, 每类三个种。菌株 74-230 以其还原硝酸盐的能力和对于石蕊牛奶的反应, 不同于不能还原硝酸盐的三个种, 以及其他作者记载的 *Brev. protophormia*<sup>[19]</sup>, *Brev. immariophilum*<sup>[18]</sup>, *Brev. leucinophagum*<sup>[20]</sup> 和 *Brev. divaricatum*<sup>[21]</sup>, 而应列入能还原硝酸盐为亚硝酸盐的一类中。

在此类中,《手册》列入三个种, 其他作者记载的还有: *Brev. pentose-alanicum*<sup>[22]</sup>, *Brev. lyticum*<sup>[23]</sup>, *Brev. flavum*<sup>[18]</sup>, *Brev. lactofermentum*<sup>[18]</sup>, *Brev. saperdae*<sup>[19]</sup> 和 *Brev. ketoglutamicum*<sup>[24]</sup>。兹将菌株 74-230 和这些种的主要鉴别特征比较于表 1。

从表 1 的资料可以看出, 菌株 74-230 依其细胞的宽度、菌落的颜色、对石蕊牛奶的反应等而与其它菌种相区别。因此, 它不同于文献中已记载的 48 个种。

由于菌株 74-230 具有从原油及其制品生成胞外多糖的能力, 我们把它定名为产粘短杆菌 *Brevibacterium viscoenes* n. sp. 74-230。

### 参 考 文 献

[1] Andrew, T. R.: In "Extracellular Microbial Polysaccharides" ed. by Sandford P.

- A. and Laskin A., ACS, Washington, 231—241, 1977.
- [2] Harada, T.: *ibid.*, 265—283, 1977.
- [3] Jeanes, A.: *ibid.*, 284—298, 1977.
- [4] Sandvik, E. I. and J. M. Maerker: *ibid.*, 242—264, 1977.
- [5] Wells, J.: *ibid.*, 299—313, 1977.
- [6] Kanamaru, T. and S. Yamamodani: *Agr. Biol. Chem.*, **33**(10): 1521—1522, 1969.
- [7] Kayowa Hakko Kogyo Co. Ltd.: *Fr. Brevet D'Invention*, No. 1, 530, 165.
- [8] Raymond, R. L. and J. B. Davis: *Appl. Microbiol.*, **8**: 329—334, 1960.
- [9] Suzuki, T. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **33**: 190—195, 1969.
- [10] Yamaguchi, M. and A. Sato: *Report of the Fermentation Research Institute*, **49**: 115—120, 1977.
- [11] Гречушкина, Н. Н. и Л. И. Розонова: *Микробиология*, **40**(5): 820—824, 1971.
- [12] Takahashi, J., et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**(1): 32—37, 1970.
- [13] 中国科学院微生物研究所细菌分类组: 《一般细菌常用鉴定方法》, 科学出版社, 北京, 1978。
- [14] Breed, R. S. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 7th ed., London, p. 490—503, 1957.
- [15] 周慧玲: *微生物学报*, **18**(2): 134—139, 1978。
- [16] 王修垣等: *石油学报*, **1**(4): 77—85, 1980。
- [17] Yamada, K. and K. Komagata: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **16**: 215—224, 1970.
- [18] Okumura, S. et al.: *J. Agr. Chem. Soc. Jap.*, **36**: 141—159, 1962.
- [19] Lysenko, O.: *J. Insect. Pathol.*, **1**: 34—42, 1959.
- [20] Kinney, R. W. et al.: *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.*, **10**: 213—217, 1960.
- [21] Su, Y. et al.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Jap.*, **24**: 69—74, 1960.
- [22] Yamada, K. et al.: *ibid.*, **24**: 621—632, 1960.
- [23] Takyama, K. et al.: *J. Agr. Chem. Soc. Jap.*, **34**: 652—656, 1960.
- [24] *Brit. Patent*: 1,085,923.

## STUDIES ON MICROBIAL EXOPOLYSACCHARIDES PRODUCED FROM CRUDE OIL AND OILPRODUCTS

### I. IDENTIFICATION OF STRAIN 74-230

Wang Xiu-yuan   Liu Xiu-fang   Wang Xian-ji

Tian Xin-yu

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

A strain of bacterium 74-230, which produces extra-cellular polysaccharide from crude oil and oilproducts as C-source, was isolated from oil-contaminated soil at Nanjing oil-refinery. The organism is Gram-positive, nonmotile short rods,  $0.5 \times 1.3-4.5 \mu\text{m}$ . The cells are unbranched, non-sporulating, not acid fast, and non-pleomorphic during the development process. Colonies on nutrient agar are circular, raised, edge entire, slightly orange-red, smooth, and moist-glistening. Nitrate is reduced slightly. Gelatine is not

liquefied. Litmus milk is reduced. Glucose is oxidized into acid, but lactose not. The G-C-content of DNA determined in SSC-system is  $63.12 \pm 2.02 \text{ mol.}\%$ . According to taxonomic studies this strain is belong to the genus *Brevibacterium*, but it differs from all known species of that genus. On the ground of its ability to produce exopolysaccharide the strain is considered to be a new species, and was named as *Brevibacterium viscogenes* n. sp. 74-230.