

棒杆菌属的两个新种

凌代文 王大帮

(中国科学院微生物研究所, 北京)

高鸿图 魏柳根

(中国科学院新疆生物土壤沙漠研究所, 乌鲁木齐)

谭维业 张孝珍 王继谔

(新疆独山子炼油厂, 克拉玛依)

从我国海南岛崖城温泉土壤中分离到 482 株耐高温的氧化烃细菌。选用三种油品及三个发酵时间进行了摇瓶试验, 从中筛选出脱蜡效果较好的两株菌——F76 (AS 1.1504) 及 F761 (AS 1.1505), 能将中质润滑油凝固点从 26℃ 下降到 -37℃。这两株菌为革兰氏阳性、非致病性无芽孢杆菌。根据其性状属于棒杆菌属, 而又有别于该属中腐生性的已知种, 因此认为是两个新种, 定名为嗜热棒杆菌 (*Corynebacterium thermophilum* nov. sp.) 和脱蜡棒杆菌 (*Corynebacterium deparaffinicum* nov. sp.)。

1963 年法国人 Champagnat 发表了利用微生物进行馏份油脱蜡的研究, 并首次投产应用, 既生产低凝固点油品, 又回收菌体蛋白^[1]。随后不久, 我国微生物学工作者亦开始进行这方面的研究, 并很快应用于石油工业的生产中。目前世界各国对石油微生物的研究颇为重视, 并逐渐形成了发酵工业中的一个新的领域。

从国内外的报道来看, 对馏份油脱蜡应用的微生物主要是酵母菌, 而对氧化烃细菌的研究较少。为了提高脱蜡效果, 生产更多高质量的油品和菌体蛋白, 我们分离和筛选到两株棒杆菌属的细菌, 其主要特点是耐高温、脱蜡效果好、无致病性, 经鉴定为两个新种。现将鉴定结果报道如下。

材料和方法

(一) 菌种分离

培养基成份(%): 尿素 0.2, K_2HPO_4 0.25,

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, NaCl 0.01, $CaCl_2$ 0.01, $FeSO_4$ 0.0001, $ZnSO_4$ 0.0001, $MnSO_4$ 0.0001, 吐温 80 0.05, 直馏润滑油数滴, 琼脂 2。pH 7.4。

摇瓶培养基成份同上, 仅不加琼脂。500 ml 三角瓶装 100 ml 培养基, 5000 ml 三角瓶装 1000 ml 培养基, 投油比均为 5%。45°±1℃ 振荡培养(振幅 10 cm, 频率 110 次/分)。

脱蜡油品系新疆独山子炼油厂生产的直馏润滑油馏份, 其性质见表 1。

取土壤样品进行富集培养, 先接入 500 ml 三角瓶培养基, 振荡培养 4 天, 从其中取 1 ml 菌液接入 5000 ml 三角瓶培养基, 增殖培养 2 天, 再用平板稀释分离、纯化。菌种接至含油斜面培养基, 备用。另外接种肉汁酵母膏斜面, 并做成冷冻干燥管保存。

本文于 1980 年 11 月 27 日收到。

新疆独山子炼油厂李戈南、李月英、李子权同志参加部分工作。F76 菌株的致病性试验由新疆流行病防治研究所赵飞、徐兵同志完成, F761 菌株的致病性试验承中国医学科学院抗菌素研究所阎桂华同志指导。电镜照片由中国科学院微生物研究所技术室电镜组协助摄制, 特此致谢。

表 1 脱蜡试验用油品的性质

Table 1 The Properties of Lubricating Oil for Dewaxation Tests

油 品 Lubricating oil	馏份(°C) Distillation fraction	正烷烃% (采用尿素络合法) Alkanes % (urea adduction)	凝固点(°C) Solidifying point	粘度 V_{30} Viscosity
A-4	300—380	8.87	+17	12.91
B-1	361—425	20.01	+26	23.45
Y-2	—	5.27	+20	17.55

(二) 菌种筛选

将分离到的 482 株耐高温氧化烃细菌, 选用三种油品及三个发酵时间进行摇瓶筛选。用 2 支含油斜面上的菌种接种 500ml 三角瓶培养基, 培养 24 小时, 接入 5000ml 三角瓶培养基(投油比为 7%)。培养基成份和培养条件同前。

(三) 鉴定方法

一般形态观察和生理生化特性测定按《一般细菌常用鉴定方法》^[12] 进行。只是用于观察形态的普通肉汁培养基及测定有关生理生化特性的培养基中加入 0.3% 的酵母膏。由于棒状细菌类群菌的个体形态从幼龄到老龄生长期间变化较大, 因此于培养 6 小时、24 小时、3 天和 7 天进行观察。检查有无菌丝及观察其发育情况的方法参照《放线菌分类基础》^[13]。

营养和氮源的试验参照 Owens 和 Keddle^[4, 11] 的方法。基础培养基采用无机盐培养基 E 的成分^[5]。维生素混合液的成份与 Owens^[4] 所列相同。测定单一维生素的需要用“减一”法。加入无维生素酪素水解物测定对氨基酸类的需要。

对碳源的利用试验使用 Owens 和 Keddle 的无机基础培养基^[5], 其中加入酵母膏 (0.02%, W/V) 和维生素 B₁₂ (2μg/l)。与营养试验一样用离心法洗涤三次后的菌苔做成菌悬液接种。培养 2、5 天后观察其光密度的变化, 与对照试验比较, 分等级记录。

细胞壁的制备和胞壁物质的水解等的方法主要参照 Cummins^[6, 7] 所述。本试验中分析糖的组分是根据 Keddle^[11] 等使用的方法。采用纤维素板薄层分析氨基酸的组分。溶剂系统为叔丁醇: 丁酮: 氨水: 水 = 5:3:1:1 (V/V) (第一相); 异丙醇: 甲酸: 水 = 20:1:5 (V/V) (第二相)。二氮

基庚二酸异构体的分析是采用 Becker^[9] 等的方法。

DNA 的 G+C 含量的测定是按 Marmur^[10, 11] 等及林万明^[12] 等报道的方法。

结果和讨论

(一) 脱蜡菌株的筛选

从分离到的 482 株耐高温氧化烃细菌中筛选出脱蜡效果较好的 21 株细菌。各菌株的脱蜡结果列于表 2。

表 2 表明, 在相同条件下, F76 和 F761 两菌株发酵油品, 使其凝固点下降快。特别是对中质润滑油 B-1, 脱蜡效果较好, 发酵 30 小时, 凝固点由 +26°C 降到 -37°C。

(二) 菌种鉴定

F76 菌株

1. 形态和培养特征:

个体形态: 革兰氏阳性杆菌, 多形态。菌体从幼龄到老龄其形态从杆状和弯杆状, 经分裂、折断呈现出带角度的“八”字形排列状, 随后菌体略变短。在肉汁酵母膏琼脂斜面上 30°C 培养 6 小时为杆状和弯杆状, 单个或成对, 大小 0.4—0.5 × 2.0—6.0 μm; 24 小时为短杆、楔形和棒状; 单个、成对或“八”字排列, 大小 0.4—0.6 × 0.7—1.5 μm, 也有较长者; 3 天和 7 天的基本形态与 24 小时的相同, 只是菌体趋向于变短 (图 1—4)。用埋片法检查, 未见丝状细胞。

未见鞭毛, 不运动。无内生芽孢, 不抗

表 2 21 株细菌的脱蜡效果
Table 2 Dewaxation Efficiency of 21 Strains of Bacteria

发酵后凝固点(°C) Solidifying point after fermentation	油 品 Lubricating oil	A-4	B-1	Y-2
		发酵 24 小时后 After 24 h. fermentation	发酵 30 小时后 After 30 h. fermentation	发酵 72 小时后 After 72 h. fermentation
菌 株 Strains				
F76		-46	-37	-52
F761		-44	-37	-53
F49		-40	-24	-48
F63		-43	-26	-50
F792		-42	-35	-48
F84		-42	-28	-48
F793		-43	-31	-38
F80		-32	-22	-48
F771		-31	-19	-48
F79		-36	-18	-48
F91		-24	-14	-50
F842		-32	-13	-49
F72		-34	-25	-46
F81		-27	-23	-20
F77		-22	-21	-46
F781		-33	-37	-48
F78		-39	-19	-46
F791		-14	-18	-49
F82		-28	-16	-47
F841		-32	-20	-20
F90		-32	-16	-49

酸。

普通肉汁酵母膏平板上的菌落: 圆形, 表面粗糙, 边缘完整到微波形, 四周平展, 中间成脐形。30°C 培养 2 天直径为 0.5—1mm, 4 天为 1.5—3mm。桔橙色, 不透明。

肉汁酵母膏培养液: 表面膜状, 不混浊, 沉落物量少。

氧化发酵培养基穿刺: 好氧培养 2—3 星期, 表面生长厚膜, 而厌氧培养时, 琼脂柱内无明显生长, 培养 6 个月的琼脂柱内才有明显生长物。

2. 生理生化特性:

氧化酶阴性; 接触酶阳性。

不分解纤维素。

V. P. 反应阴性; 甲基红阴性。

还原硝酸盐。产生 H₂S。脲酶阳性。

石蕊牛奶产碱。不液化明胶。不水解淀粉。

在好氧条件下, 在适宜培养基中, 从葡萄糖产酸, 厌氧情况下产酸迟缓, 培养 1—2 月后可显酸性反应。

从甘油、果糖、乳糖、蔗糖、糊精、纤维二糖、甘露醇和卫矛醇产酸。从半乳糖和阿拉伯糖产酸弱。从木糖、麦芽糖、鼠李糖和山梨糖不产酸。从水杨苷和菊糖不产酸或弱产酸。

在 2.5% 和 5% NaCl 中生长, 在 7.5% 和 10% NaCl 中不生长。

在 pH 4.5—10.0 范围内, pH 值每隔



图 1—4 F76 的细胞电镜照片 (在肉汁酵母膏琼脂上生长, 30°C):

1. 6 小时(6000×); 2. 24 小时(6000×); 3. 3 天(6000×); 4. 7 天(7000×)

Fig. 1—4 Electron microphotograph of F76 (growth on beef-yeast extract agar, 30°C):

1. 6 h.; 2. 24 h.; 3. 3 days; 4. 7 days

0.5 配制成的肉汁胨培养液中培养, 在 pH 6.0—9.0 能生长。

在 63°C 下处理 30 分钟仍能存活。在 37°C 和 45°C 生长良好, 50°C 仍能微弱生长。

对碳源的利用: 利用葡萄糖、乙酸盐、丙酸盐和乙醇, 而不利用核糖和琥珀酸钠, 不利用或微弱利用丙二酸盐。

不利用柠檬酸盐。

营养需要: 不利用无机氮作为唯一氮源, 需要有机氮——无维生素酪素水解物。生长无需外源维生素。

3. 细胞壁组份:

含有 DL-DAP (二氨基庚二酸)、丙氨酸、谷氨酸、甘氨酸和赖氨酸, 并含有阿拉伯糖、半乳糖和甘露糖。

4. DNA 的 G+C 含量为 68.0 ± 0.4 克分子%。

5. 致病性:

将 345 只小白鼠与 20 只豚鼠进行皮下及腹腔注射。皮下注射最大剂量为 300 亿个菌体, 腹腔注射最大剂量为 100 亿个菌体。注射后观察 15—20 天, 无死亡; 食欲、增重、毛色光泽度等与对照组无明显差异。经病理观察, 肝、脾、肾等均未见病变。通过消化道、呼吸道的试验, 小白鼠、豚鼠均发育正常, 与对照组比较, 未发现明显的病变。

6. 菌种鉴定:

F76 为革兰氏阳性无芽孢杆菌, 抗酸染色阴性, 幼龄细胞为杆状和弯杆状, 不成丝状, 更不形成菌丝体, 因而不属于库特氏菌属 (*Kurthia*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) 或诺卡氏菌属 (*Nocardia*); 不分解纤维素, 且球状细胞不多, 因而不属于纤维单胞菌属 (*Cellulomonas*) 或节杆菌属 (*Arthrobacter*)。好氧生长良好, 因而不属于丙酸菌属 (*Propionibacterium*)。根据前述性

状,我们认为 F76 菌株属于棒杆菌属 (*Corynebacterium*)。与该属已报道的种比较,它和嗜乙酰棒杆菌 (*C. acetophilum*)^[43]、桔黄棒杆菌 (*C. flavo-aurantiacum*)^[44]、嗜石油棒杆菌 (*C. petrophilum*)^[45]、栖糖蜜棒杆菌 (*C. melassecola*)^[46] 及产胶棒杆菌 (*C. gummiferum*)^[47] 在个体和菌落形态以及产色素方面较相近。在生化特性方面,经测定过的项目中,下列性状也相同:氧化酶阴性,接触酶阳性, V. P. 反应阴性,产脲酶和利用葡萄糖。但是在硝酸盐还原、产 H₂S、明胶水解、石蕊牛奶反应、碳源利用、碳水化合物产酸及生长的 pH 范围等方面又有所不同。相比之下,其生长耐热性尤为突出(表 3)。我们认为该菌株是个新种,定名为嗜热棒杆菌 *Corynebacterium thermophilum* nov. sp.。原菌株存放于中国科学院微生物研究所(菌号为 AS1.1504)和中国科学院新疆生物土壤沙漠研究所。

F761 菌株

1. 形态和培养特征:

个体形态:革兰氏阳性杆菌,多形态。在肉汁酵母膏琼脂斜面上,30℃ 培养 6 小时为弯杆状和较长的丝状,有的细胞有分枝。一般大小为 0.5—0.7 × 1.5—15 μm,有时还见到更长的菌体。24 小时为杆状、短杆、类球形,还有极少数菌体呈长丝状,且有分枝。单个,有折断分裂成“八”字排列者,也有成链的。一般大小为 0.5—0.6 × 0.8—5.0 μm。3 天大多为短杆状,也有成类球形的,0.5—0.7 × 0.8—1.2 μm,也有达 2 μm 者。7 天的形态与 3 天的相同,不过趋向于变短(图版 I-1—6)。用埋片法检查表明,有些幼龄细胞呈较短的丝状,但从未发育成菌丝体(图版 I-7—8)。

未见鞭毛,不运动。无内生芽孢,不抗酸。

普通肉汁酵母膏平板上的菌落:圆形,表面基本上是光滑的,有的中间略有皱纹。低凸,以后变为四周低凸或连成珠状,中心有脐。30℃ 培养,2 天直径 1—2mm,4 天为 2—4mm。玉粉红色,不透明。

氧化发酵培养基穿刺:好氧培养 2—3 星期,表面生长厚膜。在厌氧培养基琼脂柱内无明显生长。培养 6 个月,培养基琼脂柱内才有明显的生长物。

2. 生理生化特性:

氧化酶阴性;接触酶阳性。

不分解纤维素。

V. P. 反应阴性;甲基红阴性。

还原硝酸盐。产生 H₂S。脲酶阳性。

石蕊牛奶产碱。

不液化明胶。不水解淀粉。

在好氧条件下,在适宜的培养基中,从葡萄糖产酸。在厌氧情况下,从葡萄糖产酸迟缓,一般 1—2 个月后才显酸。可从半乳糖、乳糖、阿拉伯糖、纤维二糖、菊糖、糊精、甘油、卫矛醇和水杨苷产酸;而不从果糖、木糖、蔗糖、麦芽糖、棉子糖、鼠李糖和山梨糖产酸。

在 2.5%、5% 和 7.5% NaCl 中生长,而在 10% NaCl 中不生长。

在 pH 4.5—10.0 范围内,pH 值每隔 0.5 配制成的肉汁脲培养液中培养,在 pH 6.0—9.5 能生长。

在 63℃ 下处理 30 分钟仍能存活。在 37℃、45℃ 和 50℃ 生长良好,53℃ 仍能生长。

对碳源的利用:利用乙酸盐、琥珀酸盐和乙醇;微弱地利用葡萄糖、丙酸盐;而不利用核糖和丙二酸盐。

营养需要:不利用无机氮作为唯一氮源。需要有机氮——无维生素酪素水解物。生长无需外源维生素。

3. 细胞壁组份:

表 3 嗜热棒杆菌与有关菌的鉴别特性*

Table 3 Distinguishing Characters of Species Related to *C. thermophilum*

种 Species	嗜热棒杆菌 <i>C. thermophilum</i>	嗜乙酰棒杆菌 <i>C. acetophilum</i>	桔黄棒杆菌 <i>C. flavoaurantiacum</i>	嗜石油棒杆菌 <i>C. petrophilum</i>	产胶棒杆菌 <i>C. gummiterum</i>	栖糖蜜棒杆菌 <i>C. mellescola</i>
特征 Characteristics						
菌苔色素 colonies pigments	桔橙 orange	黄白 yellow white	黄橙 yellow orange	黄橙 yellow orange	芙蓉红 lotus red	桔或黄 orange or yellow
硝酸盐还原 NO ₃ reduction	+	+	W	-	-	+
产硫化氢 H ₂ S produced	+	+	+	-	+	-
石蕊牛奶 litmus milk	碱 alkaline	-	稍碱 slight alkaline	-	碱还原 alkaline reduction	-
明胶液化 gelatin liquefaction	-	+	-	-	-	-
碳源的利用 utilization of carbon sources						
琥珀酸盐 succinate	-	+	+	N	+	N
柠檬酸盐 citric acid	-	+	N	N	+	-
从碳水化合物产酸 acid from carbohydrates:						
甘油 glycerol	+	-	-	-	+	+
木糖 xylose	-	+	-	-	-	-
阿拉伯糖 arabinose	W	+	-	N	-	-
半乳糖 galactose	W	+	-	-	-	+
乳糖 lactose	+	-	N	-	-	-
蔗糖 sucrose	+	+	-	-	+	+
麦芽糖 maltose	-	+	-	-	-	+
山梨糖 sorbitose	-	N	+	N	-	N
纤维二糖 cellobiose	+	N	N	N	-	-
糊精 dextrin	+	+	N	N	-	-
淀粉 starch	-	+	N	N	-	-
甘露醇 mannitol	+	+	+	N	+	-
水杨苷 salicin	-	+	-	N	-	-
生长的 pH growth at pH	6.0-9.0	N	5-9; Opt 7-8	Opt 6.0-8.0	5.5-8.0; 7 Gg	5.5-10±

续表 3

种 Species	嗜热棒杆菌 <i>C. thermo- philum</i>	嗜乙酰 棒杆菌 <i>C. aceto- philum</i>	桔黄棒杆菌 <i>C. flavoau- rantiacum</i>	嗜石油 棒杆菌 <i>C. petro- philum</i>	产胶棒杆菌 <i>C. gummi- ferum</i>	栖糖蜜 棒杆菌 <i>C. me- lassecola</i>
特征 Characteristics						
生长温度 temperature for growth	37°C, 45°C Gg; 50°Cg; 63°C 30 分 (min) S	Opt 25—30°C	15—37°Cg; 30°C Opt; 45°C Ng	Opt 30—35°C	24—37°Cg; 30—32°C Gg	25—37°C Gg; 45°C Ng
细胞壁组分 cell wall components	DL-DAP, ala, glu, gly, lys, ar- abi, galac, manno	N	DL-DAP	N	N	N

* + = 阳性 positive; W = 弱阳性 weak positive; - = 阴性 negative; N = 未报道 no report; g = 生长 growth; S = 存活 survival; Gg = 生长良好 good growth; Pg = 生长差 poor growth; Ng = 不生长 no growth; Opt = 最适 optimum; DL-DAP = DL-二氨基庚二酸; ala = 丙氨酸; glu = 谷氨酸; gly = 甘氨酸; lys = 赖氨酸; arabi = 阿拉伯糖; galac = 半乳糖; manno = 甘露糖。

含有 DL-DAP、丙氨酸、谷氨酸和甘氨酸, 还含有阿拉伯糖、半乳糖和甘露糖, 有时可检出微量的鼠李糖。

4. DNA 的 G + C 含量为 68.5 克分子 %。

5. 致病性:

将 180 只健康小白鼠分为 2 组, 一组腹腔注射肉汁培养物, 另一组腹腔注射 5% 胃粘液素稀释的菌液。每只小白鼠注射 0.5ml, 菌液中活菌数为 $1.27-1.88 \times 10^8$ 个/ml。经 2 星期与对照组比较, 小白鼠发育正常, 未见死亡。从注射后一小时开始, 对小白鼠的肺、肾、肝、脾和血液定时进行菌数的观测, 至注射 96 小时后, 各器官和血液均未测出细菌, 且均未发现病变。试验重复两次, 结果相同。由此表明, F761 菌株无致病性。

6. 菌种鉴定:

F761 菌株为革兰氏阳性无芽孢杆菌, 抗酸染色阴性。幼龄细胞虽有的呈较短的分枝丝状, 但不形成菌丝体, 因而不属于库特氏菌属、分枝杆菌属或诺卡氏菌属; 不分解纤维素, 罕见球状细胞, 因而不属于纤维单胞菌属或节杆菌属。好氧生长良好, 因而不属于丙酸菌属。根据前述性状, 我们

认为 F761 菌株属于棒杆菌属 (*Corynebacterium*)。与已报道的棒杆菌属的菌种比较, 它与橙色棒杆菌 (*Corynebacterium aurantiacum*)^[18]、解烃棒杆菌 (*C. hydrocarboclastus*)^[19]、三聚乙醛棒杆菌 (*C. paraldehydeum*)^[14] 以及玫瑰色棒杆菌 (*C. roseum*)^[18] 较为相近。它们在个体和菌落形态, 产色素方面以及某些生化特征: 如氧化酶为阴性, 接触酶阳性, 不分解纤维素, V.P. 反应阴性, 石蕊牛奶产碱等方面较相似。但 F761 菌株在硝酸还原, 产 H₂S, 产脲酶, 淀粉水解, 耐盐性及碳水化合物产酸等方面与上述的已知种又有所不同, 其生长耐热的特征尤为显著(表 4)。我们认为该菌株是个新种, 定名为脱蜡棒杆菌 *Corynebacterium deparaffinicum* nov. sp. 原菌株存放于中国科学院微生物研究所(菌号为 AS 1.1505)和中国科学院新疆生物土壤沙漠研究所。

以往, 对棒杆菌属中腐生性的种, 其 DNA 的 G+C 含量及细胞壁组份很少测定。而对于该属中致病性的种, 已测定者甚多^[20]。F76 及 F761 菌株测定结果表明, 腐生性棒杆菌不但其 DNA 中 G+C 含量在致病性棒杆菌的范围内, 而且细胞壁组份也类似。

表4 脱蜡棒杆菌与有关菌的鉴别特性

Table 4 Distinguishing Characters of Species Related to *C. deparaffinicum*

种 Species 特征 Characteristics	脱蜡棒杆菌 <i>C. deparaffinicum</i>	橙色棒杆菌 <i>C. aurantiacum</i>	解烃棒杆菌 <i>C. hydrocarbonoclastus</i>	三聚乙醛棒杆菌 <i>C. paraldehydeium</i>	玫瑰色棒杆菌 <i>C. roseum</i>
菌苔色素 colonies pigments	玉粉红 jade pink	红橙 red orange	淡粉 light pink	红橙 red orange	红橙 red orange
硝酸盐还原 NO ₃ reduction	+	W	-	+	+
产硫化氢 H ₂ S produced	+	-	-	+	-
产脲酶 urease produced	+	+	N	-	-
淀粉水解 starch hydrolyzed	-	+	-	-	+
在7% NaCl 中生长 growth in 7% NaCl	+	N	-	W	N
从碳水化合物产酸: acid from carbohydrates:					
葡萄糖 glucose	+	-	+	+	+
甘油 glycerol	+	N	-	+	N
木糖 xylose	-	-	-	-	+
乳糖 lactose	+	-	-	-	+
麦芽糖 maltose	-	-	N	-	+
甘露醇 mannitol	-	-	N	+	W
水杨苷 salicin	+	-	N	-	+
生长温度 temperature for growth	37°C, 45°C, 50°C Gg; 53°C g	20—42°C g; Opt 42°C	37°C Pg; Opt 25—30°C	15—45°C g; Opt 30—37°C; 50°C Ng	20—42°C g; Opt 37°C
细胞壁组分 cell wall components	DL-DAP, ala, glu, gly, lys, arabi, galac, amino	N	N	N	N

Symbols as that used in Table 3.

参 考 文 献

- [1] 石油发酵研究会编 (天津工业微生物所资料组译): 《石油发酵》, 1—70 页, 科学出版社, 北京, 1973.
- [2] 中国科学院微生物所细菌分类组: 《一般细菌常用鉴定方法》, 科学出版社, 北京, 1978.
- [3] 阮继生: 《放线菌分类基础》, 科学出版社, 51—52 页, 北京, 1977.
- [4] Owens, J. D. & R. M. Keddle: *J. Appl. Bact.*, 31: 344—348, 1968.
- [5] Owens, J. D. & R. M. Keddle: *J. Appl. Bact.*, 32: 338—347, 1969.
- [6] Cummins, C. S. & H. Harris: *J. Gen. Microb.*, 14: 583—600, 1956b.
- [7] Cummins, C. S.: *J. Gen. Microb.*, 28(1): 35—50, 1962.

- [8] Keddie, R. M. et al.: *J. Appl. Bact.*, **29** (1): 17—43, 1966.
- [9] Becker, B. et al.: *Appl. Microb.*, **12**: 421—423, 1964.
- [10] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, **3**: 208—218, 1961.
- [11] Marmur, J. & P. Doty: *J. Mol. Biol.*, **5**: 109—118, 1962.
- [12] 林万明等: 微生物学通报, **8**(5): 245—247, 1981.
- [13] Harada, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **46**(3): 169—176, 1968.
- [14] Takayama, K. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **48**: 669—675, 1970.
- [15] Iguchi, T. et al.: 日本农芸化学会志, **40**(1): 26—32, 1966.
- [16] Goto, T. et al.: U. S. Patent 3355359, 1967.
- [17] 中国科学院微生物所细菌分类组, 南开大学生物系微生物专业: 微生物学报, **19**(4): 341—346, 1979.
- [18] Iizuka, H. et al.: *J. Gen. Appl. Microb.*, **13**(2): 125—137, 1967.
- [19] Iizuka, H. & K. Komagata: *J. Gen. Appl. Microb.*, **10**(3): 207—221, 1964.
- [20] Buchanan, R. E. & N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1974.

TWO NEW SPECIES OF *CORYNEBACTERIUM*

Ling Daiwen Wang Dasi*

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

Gao Hongtu Wei Liugen

(*Xinjiang Institute of Biology, Soil and Desert Science, Academia Sinica, Ürümqi*)

Tan Weiye Zhang Xiaozhen Wang Jie

(*Xinjiang Dushanzi Petroleum Refinery, Karamay*)

Four hundred and eighty two strains of thermophilic hydrocarbon oxidizing bacteria were isolated from the soil around hot springs on Hainan Island, China. Strain F76 (AS 1.1504) and strain F761 (AS 1.1505) were selected with three kinds of lubricating oil and exhibited high dewaxation efficiency. The solidifying point of lubricating oil Type B-1 treated with these two strains was lowered from +26°C to -37°C.

Strains F76 and F761 are Gram-positive, non-acid fast, non-spore forming, non-pathogenic rod shaped bacteria. Short filaments with rudimentary branches are found among the young cells of the these two strains, but no mycelium is found. They, therefore, should not belong to

genera *Kurthia*, *Mycobacterium* and *Nocardia*. Older cultures are not composed entirely or largely of coccoid cells, and hence, are not the member of *Arthrobacter*. They grow well aerobically and do not decompose cellulose, it means that these organisms are not members of *Propionibacterium* and *Cellulomonas*. According to the features examined, these two strains of bacteria should belong to the genus *Corynebacterium* and differ from all known saprophytic species. Accordingly they are considered as two new species and designated by the names of *Corynebacterium thermophilum* nov. sp. (AS 1.1504) and *Corynebacterium depar-*

* i.e. Wang Dasi

affinicum nov. sp. (AS 1.1505) respectively.

Corynebacterium thermophilum nov. sp. is somewhat similar to *C. acetophilum*, *C. flavoaurantiacum*, *C. petrophilum*, *C. melassecola* and *C. gummiferum* in certain morphological and biochemical features, but it reduces nitrate, produces H₂S, does not liquefy gelatin, does not utilize succinic and citric acids, produces more acid from glycerol, lactose, sucrose, cellobiose, dextrin and mannitol and less acid from arabinose, and galactose, does not produce acid from xylose, maltose, sorbose or starch. It grows within the pH range from 6.0 to 9.0 and grows well at 37°C or 45°C, slightly at 50°C. *C. thermophilum* nov. sp. differs from the above mentioned species in these characters. Its cell wall contains DL-DAP, alanine, glutamic acid, glycine, lysine, arabinose, galactose and mannose. G+C content of DNA is 68.0±0.4 mole%.

Corynebacterium deparaffinicum nov.

sp. is similar to *C. aurantiacum*, *C. hydrocarboclastus*, *C. paraldehydium* and *C. roseum* in certain features, but it reduces nitrate, produces H₂S and urease, does not hydrolyze starch, produces acid from glycerol, glucose, lactose and salicin, and does not produce acid from xylose, maltose and mannitol, grows in broth containing 7% NaCl and grows well at 37°C, 45°C and 50°C, and even grows at 53°C. *C. deparaffinicum* nov. sp. differs from the above mentioned species in these characters. Its cell wall contains DL-DAP, alanine, glutamic acid and glycine, arabinose, galactose, mannose and sometimes rhamnose is detected in small amount. G+C content of DNA is 68.5 mole%.

Corynebacterium thermophilum nov. sp. (AS 1.1504) and *Corynebacterium deparaffinicum* nov. sp. (AS 1.1505) have been deposited in Type Culture Collection, Institute of Microbiology, Academia Sinica.