

诺卡氏菌形放线菌与有关分类单位的 枝菌酸和磷酸类脂分析

刘志恒 阮继生

(中国科学院微生物研究所, 北京)

通过对 14 株胞壁为 I 型和 IV 型的诺卡氏菌形放线菌与有关分类单位的枝菌酸和磷酸类脂的分析, 发现胞壁 IV 型原名为空腔诺卡氏菌 *N. coeliaca* KCC A-0007 菌株不含枝菌酸, 磷酸类脂不属于任何已知类型(除含 PE 外, 还含有 PC), 萜醌类型为 MK-8(H₄)。指出这株菌应从诺卡氏菌属转入无枝菌酸菌属, 改定为空腔无枝菌酸菌 *Amycolata coeliaca* [(Gray) Waksman et Henrici] comb. nov. Liu & Ruan, 1986。另外还提出, 区分类诺卡氏菌与链霉菌时, 磷酸类脂类型比形态断裂特征更为重要。为此, 将一株原定名为阿勒泰类诺卡氏菌 *Nocardioides altaiensis* (Wang, 1982), 依其磷酸类脂分析结果, 与链霉菌(II 型)相同, 而与类诺卡氏菌(I 型)不同, 改定为阿勒泰链霉菌 *Sireptomyces altaiensis* (Wang) comb. nov. Liu & Ruan, 1986。

关键词 诺卡氏菌形放线菌; 枝菌酸; 磷酸类脂

细胞壁化学组分分析已成为放线菌分类中越来越重要的指标^[1]。根据细胞壁氨基酸和糖分组成, 可将放线菌划分成 9 个类型群, 4 个糖型^[2,3]。根据枝菌酸组分, 可将胞壁 IV 型的放线菌相互区别, 也可以区别于其它的放线菌^[4]。根据磷酸类脂组分, 可以将好气放线菌区分为 5 个类群^[5]。因此, 在分类学中随着化学指标与形态特征相结合的运用, 导致了許多放线菌新属的建立^[6-14]。

本文报告细胞壁属于 I 型和 IV 型, 形态学上表现菌体分隔并断裂的诺卡氏菌形放线菌和有关分类单位, 共 14 株菌的枝菌酸和磷酸类脂分析结果, 并探讨了化学分类指标在放线菌分类中的作用。

材料和方法

(一) 菌株

试验菌株列于表 1。所有菌株均接种在加有 0.5% 的酵母膏葡萄糖天门冬素液体培养基中,

28℃ 摇床培养 3—5 天, 离心收集菌体, 洗净、冻干备用。

(二) 胞壁氨基酸和糖分的分析

参照 Becker^[15]和 Lechevalier^[16]的全细胞水解液纸层析方法。

(三) 枝菌酸分析

参照 Minnikin 等人 (1980) 的全细胞甲基酯薄板层析方法^[17]。

1. 全细胞甲基酯的抽提: 称取冻干菌体 50 mg 放入螺口试管中, 加入甲醇-甲苯-硫酸 (30: 15: 1, 体积比) 混和试剂 3ml, 然后放在 75℃ 水浴中过夜 (约 16—18 小时), 取出冷却至室温, 再加入石油醚 (B. P. 60—90℃) 2ml, 充分混合, 低速离心 (3000 r/min) 10 分钟。取上层石油醚抽提液通过堵有棉塞的巴斯德吸管制备的碳酸氢铵 (NH₄HCO₃) 小柱 (2ml 乙醚预洗 2 次), 收集洗脱液于指形管里 (残留物可用石油醚重复抽提, 上柱和洗脱), 小柱最后用 1ml 乙醚洗脱。合并所有洗脱液, 最后在室温下真空干燥。将得到的甲基

本文于 1987 年 1 月 16 日收到。

本文摘要曾在 1985 年第六届国际放线菌生物学会议上展出。

表 1 试验菌株
Table 1 Tested strains

菌名 Strains	编号 No.	来源 Source
草分枝杆菌 <i>Mycobacterium phlei</i> Lehmann et Neuhmann	A81	Inst. of Tuberculosis, Beijing China
星状诺卡氏菌 <i>Nocardia asteroides</i> (Eppinger) Krass	ATCC 3318	IMRU, USA
星状诺卡氏菌 <i>Nocardia asteroides</i> (Eppinger) Krass	ATCC19247(=IMRU 727)	IMRU, USA
空腔诺卡氏菌 <i>Nocardia coeliaca</i> (Gray et Thornton) Waksman et Henrici	KCCA-0007(=N19119 =IFM0030)	KCC, Japan (KCC→ NI→IFM→N.M.McInlg →P. H. Gray)
灰色链霉菌 <i>Streptomyces griseus</i> (Krausky) Waksman et Henrici	AS 4.139	CCCCM, China
龟裂链霉菌 <i>S. rimosus</i> Sobin et al.	AS 4.69	CCCCM, China
烬灰小链孢菌 <i>Microstreptospora cinerea</i> Yan et al.	G133(=AS 4.1146)	CCCCM, China
白色类诺卡氏菌 <i>Nocardioides albus</i> Prauser	IMET 7807	IMET, G. D. R.
黄色类诺卡氏菌 <i>Nocardioides flavus</i> Ruan & Zhang	71N54(=AS 4.1067)	CCCCM, China
阿勒泰类诺卡氏菌 <i>Nocardioides altaiensis</i> Wang et al.	C63-10	IMXAAS, Ürümqi, China
类诺卡氏菌株 <i>Nocardioides</i> sp.	N12	Unpublished
类诺卡氏菌株 <i>Nocardioides</i> sp.	G341	Unpublished
类诺卡氏菌株 <i>Nocardioides</i> sp.	72N1056	Unpublished
类诺卡氏菌株 <i>Nocardioides</i> sp.	36	Unpublished

注: ATCC = 美国典型菌株保藏中心;
IMRU = 美国拉格斯大学微生物研究所;
KCC = 日本科研理化公司
NI = 日本东京长尾研究所;

IFM = 日本千叶大学生物活性研究所;
CCCCM = 中国菌种保藏中心;
IMXAAS = 新疆农科院微生物研究所。

脂保存备用。

2. 甲基脂薄板层析: 在 $18 \times 18 \text{ cm}$ 的玻璃板上, 使用号型 60HF₂₄ 硅胶 (Art. 7739, Merck Darmstadt, G. F. R.) 6g, 加入 0.5% 羧甲基纤维素水溶液 20ml, 充分调合平铺, 置清洁处室温干燥。使用前需在 110°C 下活化干燥 30 分钟。溶媒推展系统采用石油醚-丙酮(95:5, 体积比), 室温下进行上行单向层析 2 次。用碘熏蒸或 10% 的磷酸铵乙醇溶液喷雾 (120°C , 15 分钟) 显迹。

(四) 磷酸类脂分析

参照 Lechevalier 和 Minnikin 等人的方法^[18-20]。

1. 磷酸类脂的提取: 称取冻干菌体 0.5g, 加蒸馏水 50ml, 超声波破碎 (23.9 KC, $2 \times 5-6 \text{ min}$), 离心 10 分钟 (4000 r/min)。(1) 取出上清液放入 250ml 磨口三角瓶中, 加氯仿 50ml 后塞

紧; (2) 下层破碎细胞同样放入三角瓶中, 加氯仿-甲醇(2:1, 体积比) 50ml。置 28°C 下, 往复摇瓶机 (60/min) 上, 振摇 2-3 天。分别离心, 合并 (1) 的氯仿层和 (2) 的上清液, 45°C 下真空薄膜蒸发干燥。得到的粗类脂, 用适量的氯仿溶解在带塞的 250ml 三角瓶中, 按硅胶(粒度 $10-40 \mu\text{m}$, 青岛)与类脂之比 7/100(g/mg), 加到溶液中(硅胶先在 110°C 活化 2 小时), 使混合液呈糊状, 然后室温下振摇过夜。经钼蓝试剂检查上清液中无磷脂存在(即无蓝色反应)时, 将吸附有磷脂的硅胶装入层析柱。然后依次使用氯仿、丙酮、甲醇洗脱, 最后收集甲醇洗脱液, 真空薄膜蒸发干燥。将得到的磷酸类脂, 用 10-20ml 甲醇溶解, 供薄板层析用。

2. 磷酸类脂薄板层析: 使用号型 60H 硅胶 (Art. 7736, Merck Darmstadt, G. F. R.), 加入 0.5% 羧甲基纤维素 (CMC) 的 0.2% 醋酸钠溶

液,充分混合后铺成 $18 \times 18\text{cm}$ 的薄板(方法同前述)。溶媒推展系统采用氯仿-甲醇-水(70:35:7, 体积比)。使用 Dragendorff 氏试剂、水合茚三酮、茴香醛试剂和钼蓝试剂分别进行磷酸类脂成分显迹。磷酸类脂 PE, PC, DPG 等标准品均为 Sigma 公司产品 (No. P-0503; P-8640; C-5646 Chemical Cop. USA)。

结果和讨论

14 株试验菌的细胞化学组分分析结果(表 2)表明:

1. 细胞壁 IV/A 型的诺卡氏菌代表株 3318, 727 与分枝杆菌的代表株 A81 均含有枝菌酸, 磷酸类脂为 II 型(含 PE)。这与文献中的结果一致^[1]。然而, 原定名为空腔诺卡氏菌 *N. coeliaca* (Gray Thor-

nton) Waksman et Henrici KCC A-0007, 虽然胞壁为 IV/A 型, 但不含枝菌酸, 且磷酸类脂不同于 5 个已知类型中的任何一类, 即含 PE 外还含 PC。这分别同 Goodfellow^[21] 和驹形和男^[22] 报道过的结果一致。此外, 其萜醌类型为 MK-8(H₄)*。因此, 根据化学分类的指标, 我们建议将 A-0007 菌株从诺卡氏菌属 *Nocardia* (Trevisan, 1889) 中划分出来, 暂放入 Lechevalier 等人新建立的无枝菌酸菌属 *Amycolata* Lechevalier et al. 1986^[24], 改定为空腔无枝菌酸菌 *Amycolata coeliaca* (Gray) Waksman et Henrici comb. nov. Liu & Ruan, 1986。

2. 胞壁 I/C 型的 10 株试验菌中, 白色类诺卡氏菌 *Nocardioideis albus* 7807、

表 2 实验菌株细胞化学组分

Table 2 Chemical compositions of testing strains

菌株 Strains	胞壁型 Cell wall type	枝菌酸 Mycolate	磷脂型 Phospholipids type	特征性磷脂 Characteristics of phospholipids				
				PE	PC	DPG	PIM	GluNU's
<i>M. phlei</i> A81	IV/A	+	II	+	-	+	+	-
<i>N. asteroides</i> 3318	IV/A	+	II	+	-	+	+	-
<i>N. asteroides</i> 727	IV/A	+	II	+	-	+	+	-
<i>N. coeliaca</i> A-0007	IV/A	-	?	+	+	+	+	-
<i>S. griseus</i> AS 4.139	I/C	-	II	+	-	+	+	-
<i>S. rinosus</i> AS 4.69	I/C	-	II	+	-	+	+	-
<i>Microstreptospora cinerea</i>	I/C	-	IV	+	-	(-)	+	+
<i>Nocardioideis albus</i> 7807	I/C	-	I	-	-	+	+	-
<i>Nocardioideis flavus</i> 71N-54	I/C	-	I	-	-	+	+	-
<i>Nocardioideis</i> sp. N 12	I/C	-	II	+	-	+	+	-
<i>Nocardioideis</i> sp. G341	I/C	-	II	+	-	+	+	-
<i>Nocardioideis altaiensis</i>	I/C	-	II	+	-	+	+	-
<i>Nocardioideis</i> sp. 72-N1056	I/C	-	?	(+)	-	+	(+)	+
<i>Nocardioideis</i> sp. 36	I/C	-	II	+	-	+	+	-

注: PE = Phosphatidyl ethanolamine 磷脂酰乙醇胺;

PC = Phosphatidyl choline 磷脂酰胆碱;

PIM = Phosphatidyl inositol mannosides 磷脂酰肌醇甘露糖苷;

GluNU's = Phospholipids of unknown structure containing glucosamine 含葡萄糖的未知结构磷酸类脂。

* 尚未发表。

黄色类诺卡氏菌 *Nocardioide flavus* 71N-54, 其磷酸类脂为 I 型(不含 PE), 而区别于磷酸类脂 II 型的灰色链霉菌 *Streptomyces griseus* AS 4.139 和龟裂链霉菌 *Streptomyces rimosus* AS 4.69, 这与 Lechevalier 的结果一致^[5]。然而, 我们实验室以往分离收集到的另外胞壁 I 型, 菌体表现分隔并迟缓型断裂的菌株(如 N12, G 341, 72-N1056, N.36 和阿勒泰类诺卡氏菌 *Nocardioide altaiensis* Wang et al. 1982), 除菌株 72-N1056 外, 磷酸类脂均同链霉菌一样为 II 型; 而不同于磷酸类脂 I 型的类诺卡氏菌。因此, 我们认为, 不应仅以菌体分隔和迟缓型断裂的特征作为区分胞壁 I/C 型的类诺卡氏菌和链霉菌间的唯一特征。建议今后将磷酸类脂指标作为区分这两个属的另一化学指征。根据这一结果, 我们建议将原定名为阿勒泰类诺卡氏菌 *Nocardioide altaiensis* Wang et al. 1982 转到链霉菌属, 称阿勒泰链霉菌 *Streptomyces altaiensis* (Wang et al.) comb. nov. Liu & Ruan 1986。其余菌株, 除 71-N1056 尚不能肯定外, 均为链霉菌。

3. 磷酸类脂分析结果还说明阎逊初等人(1983)建立的一个新属小链孢菌 *Microstreptospora* Yan et al^[24] 的磷酸类脂为 IV 型(含 PE 和 GluNU's)。还指出菌株 71-N1056 的磷酸类脂组分较为特殊, 仅含迹量的 PE 和 PIM, 但在含有氨基葡萄糖的未知磷脂 (GluNU's) 中, 至少有 4 个明显不同的成分。这些成分的分类学意义值得进一步摸清。

总之, 从我们研究的 14 株诺卡氏菌形放线菌与有关分类单位的细胞化学组分说明, 诺卡氏菌是具有胞壁 IV/A 型, 含枝菌酸, 磷酸类脂 II 型的一类菌体分隔并断裂的放线菌。类诺卡氏菌是胞壁 I/C 型, 无

枝菌酸, 磷酸类脂 I 型的一类菌体分隔并断裂的放线菌。从而为解决形态学上菌体分隔并断裂的一类诺卡氏菌形放线菌的分类问题, 补充了明确的化学指标。

参 考 文 献

- [1] Lechevalier, H. A. et al.: Introduction to Order Actinomycetales, In the Prokaryotes, Ed. by Mortimer, P. S. et al., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1915—1922, 1981.
- [2] Lechevalier, M. P. et al.: *Biology of the Actinomycetes*, 11: 78—92, 1976.
- [3] Lechevalier, M. P.: *J. of Laboratory and Chemical Medicine*, 71: 934—944, 1968.
- [4] Lechevalier, M. P. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 19: 965—972, 1973.
- [5] Lechevalier, M. P. et al.: *Biochemical Systematics & Ecology*, 5: 249—260, 1977.
- [6] Lechevalier, H. A. et al.: The Actinomycetales (Symposium, Jena, DDR, 1968), Gustav Fischer, Jena, pp. 393—405, 1973.
- [7] Prauser, J. et al.: *Appl. Microbiol.*, 19: 534, 1970.
- [8] Lacey, J. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 88: 75, 1975.
- [9] Meyer, J.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 26: 487, 1976.
- [10] Prauser, H.: *ibid.*, 26: 58, 1976.
- [11] Satoshi, O. et al.: *J. Antibiotics*, 35(8): 1013—1019, 1982.
- [12] 张国伟等: *微生物学报*, 24 (3): 189—194, 1984。
- [13] 刘志恒等: *微生物学报*, 24(4): 295, 1984。
- [14] Lechevalier, M. P. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36(1): 29—37, 1986.
- [15] Becker, B. et al.: *Appl. Microbiol.*, 13: 236—243, 1965.
- [16] Lechevalier, M. P.: Chemical Methods as Criteria for the Separation of Nocardiae from other Actinomycetes, Instr. of Waksman Microbiol. USA, 1971.
- [17] Minnikin, D. E. et al.: *J. Chromatography*, 188: 221—233, 1980.
- [18] Lechevalier, M. P. et al.: A University Laboratory Approach, Society for Industrial Microbiology special Publication No. 6, Arlington VA, Ed. by Dietz A. & D. W. Thayer, pp. 277—284, 1980.
- [19] Minnikin, D. E. et al.: *J. Appl. Bacteriol.*, 47: 87—95, 1979.
- [20] John, C. E. et al.: *J. Lipid Res.*, 5(1) 126—149, 1964.
- [21] Goodfellow, M. et al.: Actinomycetes, Classification of Nocardioform Bacteria, Ed. by Klaus

- P. Schaal & Gerhard Pulverer, Gustavfischer Verlag, Stuttgart, New York, p. 11, 1981.
- [22] 驹形和男: 微生物的化学分类实验法, 学会出版社センター, 东京, 第 107 页, 1982。
- [23] 王振兰等: 微生物学报, 23 (2): 102—104, 1983。
- [24] 阎逊初等: 微生物学报, 23 (4): 289—291, 1983。

MYCOLIC ACIDS AND PHOSPHOLIPIDS ANALYSIS OF NOCARDIOFORM ACTINOMYCETES AND RELATED TAXA

Liu Zhiheng Ruan Jisheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Mycolic acid and phospholipid analyses were carried out on 14 strains of Nocardioform Actinomycetes and related taxa. A strain originally named *Nocardia coeliaca* (Gray) Waksman & Henrici and known to have cell wall type IV, lacked mycolic acids, its phospholipid composition did not belong to any known type as both phosphatidyl ethanolamine and phosphatidylcholine were presented, and menaquinone composition is MK-8(H₄). These findings indicate that the strain should be moved from genus *Nocardia* to *Amycolata* genus, and renamed it as *Amycolata coeliaca* [(Gray) Waksman et Henrici]

comb. nov. Liu & Ruan 1986. It was also found that the type of phospholipids is a more important criterion than fragmentation of mycelia for differentiation between *Streptomyces* and *Nocardioform*. So, the species originally named *Nocardioform alaiensis* (Wang, 1982) with phospholipid type II should be altered name as *Streptomyces alaiensis* (Wang) comb. nov. Liu & Ruan 1986.

Key words

Nocardioform-Actinomycetes; Mycolic acid; Phospholipid