

链霉菌 1254 及其变株 113 的分类研究

张月琴* 李焕葵 吕婉瑜

(中国医学科学院医药生物技术研究所以, 北京 100050)

从浙江省天目山土样中分离到无抗菌活性的放线菌菌株 1254。经诱变处理, 得到变株 113。该菌株产生一组新萜环类化合物, 定名为变活霉素。菌株 1254 的细胞水解物中含 LL-DAP, 无特征性糖, 磷脂 II 型, 甲基萜醌为 MK9(H4, H6, H8), 因而被归于链霉菌属。根据数值分类结果, 认为它接近于 *S. omiyensis*。变株 113 含 DL-DAP, 阿拉伯糖, 半乳糖和鼠李糖, 磷脂 II 型, 甲基萜醌以 MK9(H4) 为主。与胞壁 IV 型菌各属相比, 均有差异。从脂肪酸聚类分析结果看, 接近于糖丝菌属 *Saccharothrix*。

关键词 化学分类; 链霉菌; 变株

活化放线菌沉默基因, 以寻找新抗生物物质, 是近年来抗生素筛选的新途径之一。李焕葵等采用紫外线诱变手段, 从一株土壤来源的无抗菌活性放线菌 1254 的变株中, 筛选出二株有抗菌活性的变株。其中变株 113 所产生的抗生素已被鉴定为一组新萜环类抗生素, 命名为变活霉素^[1]。作者对菌株 1254 及其变株 113 进行了分类学比较, 现报道如下。

材料和方法

(一) 菌株

菌株 1254 系我室自浙江省天目山土样中分离得到。变株 113 为该菌的活性变株。其它试验菌由 DSM** 提供。

(二) 形态特征

在 ISP2、ISP3、ISP4 培养基上培养 2—4 周后观察其形态特征。

(三) 培养特征和生理生化特性

采用 Williams S. T. 等^[2]的培养基和方法。

(四) 细胞组分的化学分析

将菌株接种 GPYB 肉汤 (葡萄糖 1%, 蛋白胨 0.5%, 酵母膏 0.5%, 牛肉膏 0.5%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.074%, pH7.2), 于 28℃ 旋转摇床培养 4 天。无菌检查后离心, 用蒸馏水洗菌体二次, 冷干后用作化学分析。

1. DAP 分析: 采用 Lechevalier M. P.^[3] 的方法。

2. 糖的分析: 采用 Stanek 和 Roberts^[4] 修改的 Lechevalier^[3] 的方法。

3. 磷脂的分析: 采用 Minnikin 等^[5] 的方法。层析系统: 1. 氯仿: 甲醇: 水 = 65:25:

本文于 1991 年 3 月 25 日收到。

* 大部分实验系张月琴在德国 DSM 进修期间完成。承 Dr. Kroppenstedt, R. M. 指导和帮助; DSM 提供仪器设备和药品, 特此致谢。

** DSM: German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.

4; 2. 氯仿:醋酸:甲醇:水=80:15:12:4。

4. 醌的分析: MK 的提取和纯化按照 Kroppenstedt^[7] 所描述的方法。MK 混合组分的分离和鉴别采用反相高压液相层析。层析条件: 柱长 250mm (o.d. 8mm, i. d. 4mm); 固定相: 18 碳硅烷 (ODS), 颗粒 5 μ m; 流动相: 乙腈:异丙醇=65:35(V/V); 温度 40℃; 压力: 20 巴; 流速 1ml/min; 紫外监测波长 254nm; 纸速 0.5cm/min; 进样 1—5 μ l。

5. 脂肪酸分析: 采用 Kuykendall^[8] 修改的 Miller^[9] 的方法制备脂肪酸甲酯。所得脂肪酸甲酯的定性和定量分析采用美国 Hewlett Packard 公司的 5898A 型 MIS 气相色谱鉴定仪 (Microbial Identification System)。MIS 仪的组成如下: Hewlett Packard 5890 型气相色谱仪; 211 型火焰离子检测器; Hewlett Packard 3390 型积分仪; Hewlett Packard 7673 型自动进样仪; Hewlett Packard 216 型计算机和 2225A Thinkjet 打印机。层析条件: 高纯度载气 (N₂), 高纯度 H₂, 柱压 60kPa 进样 2 μ l, 柱温 170℃—5℃/min—270℃; 汽化室温度 250℃, 检测器温度 300℃。

(五) 菌株的鉴定

按照 Langham、Williams 等^[10]的概率鉴定特征表 (The probability matrix) 测定了菌株的形态、理化特性等 50 多项指标, 进行“种”水平上的鉴定。

结果与讨论

(一) 形态特征与孢子表面结构

菌株 1254 的孢子链为 RF 型 (Rectiflexibiles) (图 1), 孢子柱形, 表面光滑。基丝无横隔也不断裂。没有观察到菌核、孢囊或假孢囊等结构。变株 113 的孢子丝略长而波曲, 环形。孢子表面光滑 (图 2), 基丝无横隔, 不断裂, 无菌核、孢囊等。

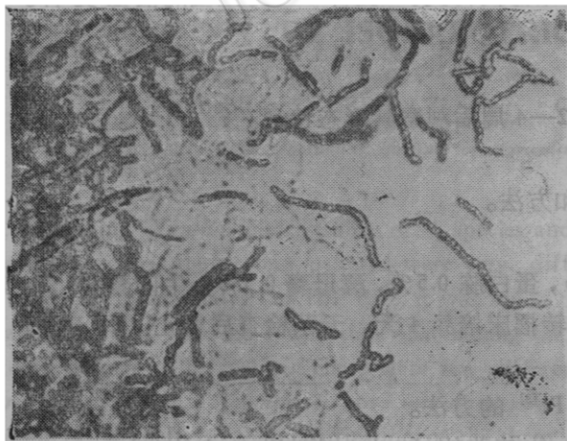


图 1 菌株 1254 的形态特征
(ISP2 10d, 1600 $\times$)



图 2 变株 113 的形态特征
(ISP2, 10d, 1600 $\times$)

Fig. 1 Photomicrograph of the strain 1254

Fig. 2 Photomicrograph of the mutant 113

(二) 培养特征

菌株 1254 和变株 113 在 ISP2、ISP3、ISP4 上的培养特征见表 1。

表 1 菌株 1254 与其变株 113 的培养特征比较

Table 1 Comparison of strain 1254 with its mutant 113 in cultural characteristics

培养基	菌株 1254		变株 113	
酵母胨麦芽膏琼脂 ISP2	V. S. P.	生长良好, 深褐色 丰富, 灰色 —	V. S. P.	生长良好, 深桔色 良好, 粉色 浅桔色
麦片琼脂 ISP3	V. S. P.	生长良好, 深褐色 丰富, 灰色 —	V. S. P.	生长良好, 桔色 良好, 粉色 浅桔色
无机盐淀粉琼脂 ISP4	V. S. P.	一般, 褐色 一般, 灰色 —	V. S. P.	一般, 桔色 一般, 桔色 浅桔色

注: V. 营养菌丝 Vegetative mycelium; S. 孢子 Spores; P. 可溶色素 Soluble pigment.

表 2 菌株 1254 和变株 113 的理化特性

Table 2 Physicochemical properties of 1254 and 113

生理生化特性 Physicochemical properties	菌株 1254	变株 113
黑色素形成 Melanin production		
ISP6	+	—
ISP7	+	—
抗菌活性 Antimicrobial activity		
枯草杆菌 <i>Bac. subtilis</i> (NCIB 3610)	—	+
藤黄微球菌 <i>Microc. luteus</i> (NCIB 196)	—	+
白色念珠菌 <i>Cand. albicans</i> (CBS 562)	—	—
酿酒酵母 <i>Sacch. cerevisiae</i> (CBS 1171)	—	—
鼠灰链霉菌 <i>S. murinus</i> (ISP 5091)	—	—
黑曲霉 <i>Asp. niger</i> (LIV 131)	—	—
大肠杆菌 <i>E. coli</i> (NCIB 9132)	—	—
酶活性 Enzyme activity		
卵磷脂酶 Lecithinase	—	—
脂解酶 Lipolynase	+	+
果胶酶 Pectinase	+	+
硝酸还原 Nitrate reduction	+	+
硫化氢产生 H_2S production	—	+
马尿酸盐水解 Hippurate hydrolysis	—	+
降解作用 Degradation		
黄嘌呤降解 Xanthine degradation	+	—
熊果苷降解 Arbutin degradation	+	—
对抗生素的耐受性 Resistance to antibiotics		
新霉素 Neomycin (50 μ /ml)	—	—
利福平 Rifampicin (50 μ /ml)	—	—
竹桃霉素 Oleandomycin (100 μ /ml)	—	—
青霉素 G Penicillin (10iu)	+	—
生长温度 Growth at 37 $^{\circ}C$	+	+

续表 2

生理生化特性 Physicochemical properties	菌株 1254	变株 113
45℃	—	—
50℃	—	—
对化学抑制剂的耐受性 Resistance to chemical inhibitors		
氯化钠 NaCl	±	—
叠氮化钠 Sodium azide	+	—
苯酚 Phenol	+	+
亚碲酸钾 Potassium tellurite	±	+
醋酸亚砷 Thallous acetate	—	—
碳源利用 Compounds as sole source of nitrogen (0.1% W/V)		
氨基丁酸 Amino-butyric acid	—	+
半胱氨酸 Cysteine	—	—
缬氨酸 Valine	+	+
苯丙氨酸 Phenylalanine	+	—
组氨酸 Histidine	+	+
羟基脯氨酸 Hydroxy-proline	—	—
碳源利用 Compounds as sole source of carbon (1% W/V)		
蔗糖 Sucrose	+	+
肌醇 Inositol	—	—
甘露醇 Mannitol	—	+
鼠李糖 Rhamnose	+	—
蜜二糖 Melibiose	—	—
棉子糖 Raffinose	+	+
葡聚糖 Dextran	—	+
木糖 Xylose	+	—
阿拉伯糖 Arabinose	—	+
葡萄糖 Glucose	+	+
核糖醇 Adonitol	+	—
松三糖 Melezitose	—	—
木糖醇 Xylitol	—	—
果糖 Fructose	+	+

表 3 菌株 1254 和变株 113 的脂肪酸组分含量百分比

Table 3 Percentage fatty acid composition of strain 1254 and mutant 113

Str.	FA	iso 14:0	iso 15:0	anteiso 15:0	15:0	iso 16:0	cis 16:1	16:0	iso 17:0	anteiso 17:0
1254		5.27	8.67	31.57	1.85	22.57	1.10	6.34	4.95	12.55
113		6.80	2.81	3.21	0.88	52.46	1.95	0.74	0.95	2.35

(三) 生理生化特性

菌株 1254 和变株 113 的生理生化特性比较见表 2。

(四) 细胞化学组分分析

菌株 1254 的全细胞水解物中含 LL-DAP, 无特征性糖, 故胞壁为 I 型。磷脂 II 型^[11] (图 3), 三个主要的 MK 为 MK9(H4), MK9(H6), MK9(H8) (图 4), 其中 MK9(H6)

含量最高。变株 113 的全细胞水解物中含有 DL-DAP 和阿拉伯糖、半乳糖、鼠李糖。磷脂 II 型(图 5), 主要的 MK 为 MK9(H4)(图 6)。菌株 1254 的脂肪酸组分以 anteiso-C15:0 和 anteiso-C17:0 为主(图 7), 变株 113 的脂肪酸中 iso-C16:0 的含量最高, 达 52%(图 8)。二者脂肪酸组分比较见表 3。

(五) 菌株的鉴定

根据形态特征与化学分析结果, 菌株 1254 为链霉菌属中的成员。依据 Williams 的概率鉴定特征表, 测定了 50 多项理化特性, 并借助计算机进行数值分类。结果 1254 以 Willcox 系数^[18] 达 98.7274%, 被归于 Williams 的第五种群 (Cluster) 即 *S. exfoliatus* 种群。该种群包括了 17 个典型菌株, 经进一步比较, 认为菌株 1254 相似于 *S. omiyaensis*。但是, 据报道后者对 *E. coli* 等有抗菌作用而菌株 1254 无任何抗菌活性。此外, 在个别碳源和氮源利用上也略有差异(表 4)。

变株 113 的胞壁氨基酸为 DL-DAP, 并含有阿拉伯糖、半乳糖和鼠李糖, 具胞壁 IV 型菌的特征。在 Bergey 手册第九版中^[12], 属

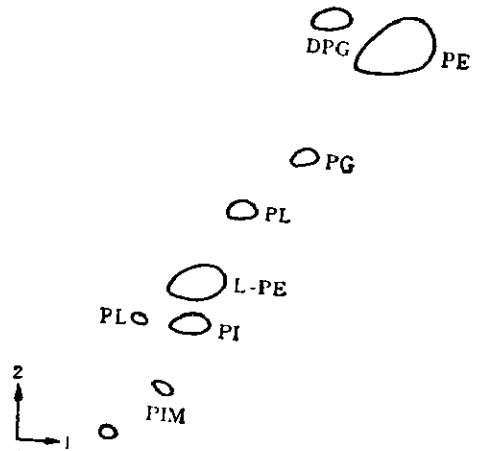


图 3 菌株 1254 的磷脂双向层析谱

Fig. 3 Two-dimensional thin layer chromatogram of phospholipids of strain 1254

PG: 磷脂酰甘油 Phosphatidylglycerol; DPG: 二磷脂酰甘油 Diphosphatidylglycerol; PE: 磷脂酰乙醇胺 Phosphatidylethanolamine; PI: 磷脂酰肌醇 Phosphatidylinositol; L-PE: 赖氨酰磷脂酰乙醇胺 Lys-PE; PIM: 磷脂酰肌醇甘露糖苷 Phosphatidylinositol mannosides; PL: 磷脂 Phospholipids.

表 4 菌株 1254 与 *S. omiyaensis* 的比较

Tabel 4 Comparison of strain 1254 with *S. omiyaensis*

菌株 Strain	孢子颜色 Spore color	孢子链 Spore chain	孢子表面 Spore surface	黑色素 Mel.	糖 AXRRIMFS	有机酸 OMLMCGK	氯化钠 NaCl (%)	温度 T(°C)	抗菌活性 B. E. C.
<i>S. omiyaensis</i>	灰	RF	光滑	—	— + + — 0000	— — 0 + 000	4	37	++—
1254	灰	RF	光滑	—	— + + + — — + +	— — + + — + —	4—7	37	---

注: Mel.: 黑色素形成 Melanin; RF: 直带波曲 Rectiflexiles; A: 阿拉伯糖 Arabinose; X: 木糖 Xylose; R: 鼠李糖 Ramnose; R: 棉子糖 Raffinose; I: 肌醇 Inositol; M: 甘露醇 Mannitol; F: 果糖 Fructose; S: 蔗糖 Sucrose; O: 草酸 Oxalate; M: 丙二酸 Malonate; L: 乳酸 Lactae; M: 苹果酸 Malate; C: 柠檬酸 Citrate; G: 葡萄糖酸 Gluconate; K: 酮葡萄糖酸 Keto-gluconate; B: 枯草杆菌 *B. subtilis*; E: 大肠杆菌 *E. coli*; C: 白色念珠菌 *C. albicans*。

于胞壁 IV 型的放线菌有二个群组: 小多孢菌群组 Micropolysporos group 和诺卡氏形菌群组 Nocardioform group。由于变株 113 不含有枝菌酸 Mycolic acid, 磷脂 II 型, 因而与前一群组中的有关属作进一步比较。在变株 113 的气丝上没有观察到拟孢囊结构和小单孢, 因此形态特征与拟孢囊菌属 *Kibdelosporangium*^[13] 和糖单孢菌属 *Sacharomonospora*^[14] 明显不同。变株 113 与拟无枝菌属 *Amycolatopsis*^[15] 的差异在于脂肪

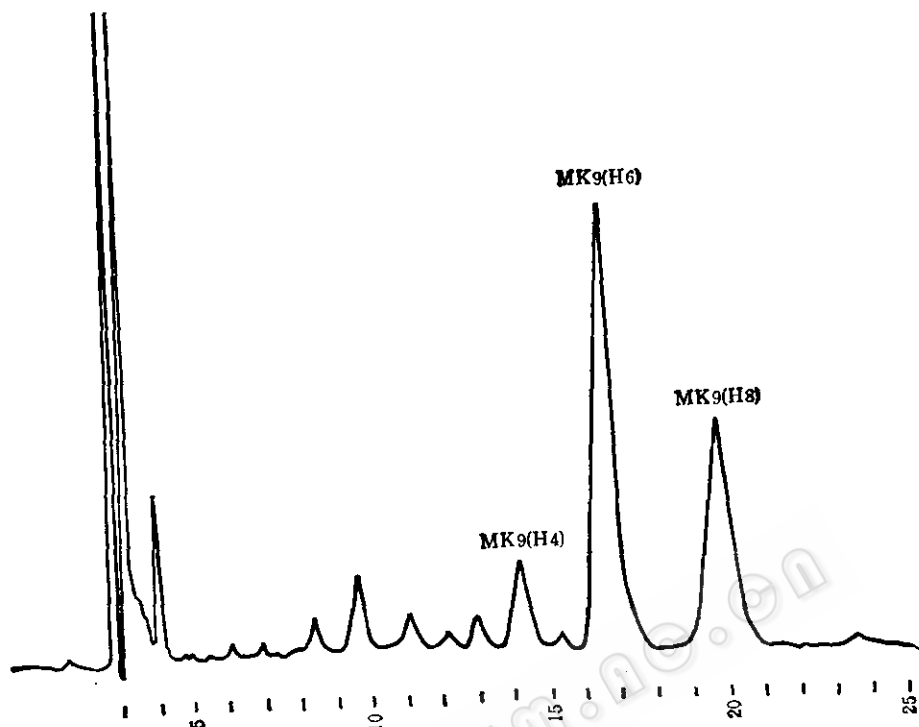


图4 菌株1254的HPLC图谱

Fig. 4 High performance liquid chromatogram of menaquinines of strain 1254

酸型不同。前者以 *iso*-C16:0 为主,而后者以 *iso*-C15, C17 和 *anteiso*-C15, C17 为主,并含有 10-甲基脂肪酸和 2-羟基脂肪酸。据此,变株 113 不能归于胞壁 IV 型菌的某一属内。由于变株 113 的胞壁糖中除阿拉伯糖和半乳糖外,还含有鼠李糖,而该糖是糖丝菌属 *Saccharothrix*^[19] 的特征性糖,因而将变株 113 与该属相比较。虽然糖丝菌属菌的胞壁糖中不含有阿拉伯糖,二者的脂肪酸型也有差异,但仍有许多相似之处,除都含鼠李糖外,其甲基萘醌都以 MK9(H4) 为主。在磷脂的组成中都有 OH-PE 和 Lyso-PE,不含有 PC 和 PME (phosphatidyl-monomethylethanolamine),从脂肪酸聚类分析结果看,二者很接近。变株 113 与上述各属的比较见表 5。

图5 变株113的磷脂双向层析谱(图注同图3)

Fig. 5 Two-dimensional thin layer chromatogram of phospholipids of mutant 113

原株 1254 和变株 113 的分类研究表明,它们之间的差异较大。1254 属于链霉菌属而 113 接近于糖丝菌属。类似这种属间的突变 Grein^[16] 也曾作过报道。他在一株产生

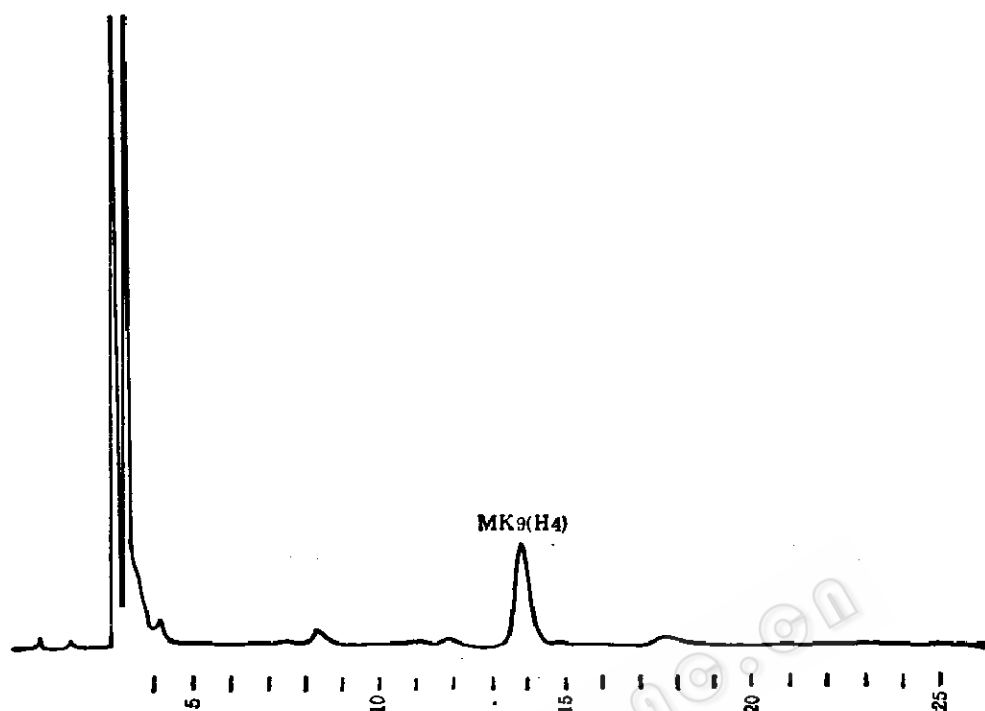


图6 变株 113 的 HPLC 图谱

Fig. 6 High performance liquid chromatogram of menaquinones of mutant 113

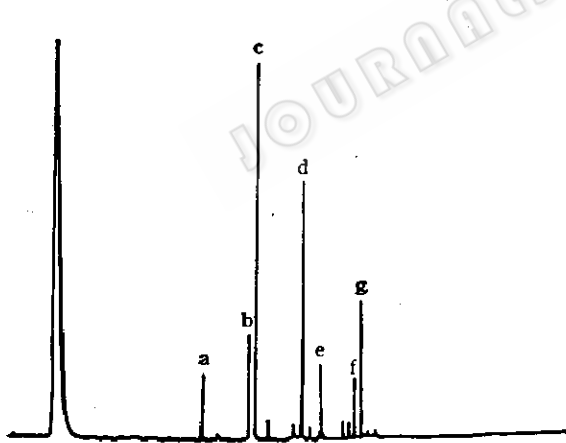


图7 菌株 1254 的脂肪酸甲酯气相层析图谱

Fig. 7 Gas-liquid chromatogram of fatty acid methylesters of strain 1254

a. iso-14:0; b. iso-15:0; c. anteiso-15:0; d. iso-16:0; e. 16:0; f. iso-17:0; g. anteiso-17:0.

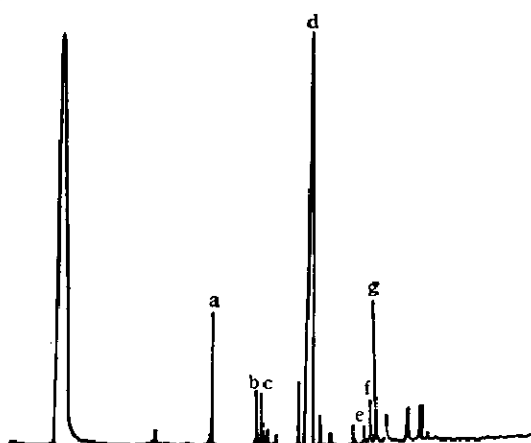


图8 变株 113 的脂肪酸甲酯气相层析图谱

Fig. 8 Gas-liquid chromatogram of fatty acid methylesters of mutant 113

a. iso-14:0; b. iso-15:0; c. anteiso-15:0; d. iso-16:0; e. iso-17:0; f. anteiso-17:0; g. 17:1.

柔红霉素的链霉菌菌株诱变获得一株归属于小单孢菌属的变株。该变株除产生柔红霉素外,还产生几个新萜环类抗生素。为了排除菌株 113 来自污染的可能,李焕姿等^[17]进行了原株 1254 与变株 113 的阻断变株 310 之间的共合成实验与 *actI* 基因同源性测定,其结

表 5 变株 113 与有关属的细胞化学组成比较

Tabel 5 Comparison of mutant 113 with related genera in cell chemical composition

菌株/属 Strain/Genera	胞壁化学型 Wall chemotype	二氨基庚二酸 DAP	糖 Sugar	枝菌酸 MA	磷脂 PL	甲基萘醌 MK	脂肪酸	
							10-Me	2-OH
拟无枝酸菌属 <i>Amycolatopsis</i>	IV	DL-DAP	A	—	II	MK9(H2,H4)	±	+
拟孢囊菌属 <i>Kibdelosporangium</i>	IV	DL-DAP	A	—	II	ND*	+	+
糖单孢菌属 <i>Saccharomonospora</i>	IV	DL-DAP	A	—	II	MK8(H4) MK9(H4)	—	+
糖丝菌属 <i>Saccharothrix</i>	III	DL-DAP	C	—	II	MK9(H4)	+	+
113	IV	DL-DAP	A	—	II	MK9(H4)	—	—

* ND 没测定

果已初步肯定变株 113 与原株 1254 的内在联系,但要更深入地揭示二者的关系,还有待于作深入研究。

参 考 文 献

- [1] 金文藻等: 中国抗生素杂志, 15: 399—405, 1990.
- [2] Williams, S. T. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 129: 1743—1813, 1983a.
- [3] Lechevalier, M. P. et al.: *J. Lab. Clin. Med.*, 71: 934—944, 1968.
- [4] Stanek, J. L. et al.: *Appl. Microbiol.*, 28: 228—231, 1974.
- [5] Lechevalier, M. P. et al.: *Int. J. Syst. Bact.*, 20: 435—443, 1970b.
- [6] Minnikin, D. E. et al.: *J. Microbiol. Meth.*, 2: 223—241, 1984.
- [7] Kroppenstedt, R. M.: *J. Liquid Chromat.*, 5: 2359—2367, 1982.
- [8] Kuykendall, L. D. et al.: *Int. J. Syst. Bact.*, 38: 358—361, 1988.
- [9] Miller, L. T.: *J. Clin. Microbiol.*, 16: 584—586, 1982.
- [10] Langham, C. D. et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 135: 121—133, 1989.
- [11] Lechevalier, M. P. et al.: *Biochem. Ecol. Syst.*, 5: 249—260, 1977.
- [12] Williams, S. T. et al.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 4* (ed. Williams, S. T. et al.), pp. 2336—2337, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1989.
- [13] Shearer, M. C. et al.: *Int. J. Syst. Bact.*, 36: 47—54, 1986.
- [14] Nonomura, H. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 49: 895—903, 1971c.
- [15] Lechevalier, M. P. et al.: *Int. J. Syst. Bact.*, 36: 29—37, 1986.
- [16] Grein, A. et al.: *J. Antibiotics*, 33: 1462—1467, 1980.
- [17] 李焕葵等: 微生物学报, 32(5): 353—358, 1992.
- [18] Willcox, W. R. et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 77: 317—330, 1973.
- [19] Labeda, D. P. et al.: *Int. J. Syst. Bact.*, 34: 426—431, 1984.

TAXONOMIC STUDY ON STRAIN 1254 AND ITS MUTANT 113

Zhang Yueqin Li Huanlou Lu Wanyu

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

The mutant 113 was obtained from a natural non-antibiotic producing *Streptomyces* sp. 1254 by UV irradiation. It produced a group of novel anthracycline compounds designated mutactimycins.

Strain 1254 was placed in the genus *Streptomyces* on the basis of its morphological characteristics and chemical properties of cells. According to Williams's numerical taxonomical data based on more than 50 physiological tests of a total of 375 type strains, the strain 1254 is considered to be more resemble to *S. omiyaensis* in the cluster of *S. exfoliatus*.

The whole cell hydrolysate of mutant 113 contains DL-DAP, arabinose, galactose and rhamnose, but its cell envelope does not contain mycolic acids. Comparing with all genera of cell chemotype IV without mycolic acids and with *Saccharothrix* which contains taxonomically significant rhamnose, mutant 113 shows differences with them respectively on FA composition or MK and PL patterns. The conclusion we can draw now is that mutant 113 doesn't belong to the same genus *Streptomyces* as its parent strain 1254 does, and is more close to the genus *Saccharothrix*.

Key words Chemotaxonomy; *Streptomyces*; Mutant