

A Previously Unknown Antibiotic Complex from the Fungus *Cyathus helenae*¹

A previously undescribed Bird's Nest fungus was recently discovered and named *Cyathus helenae* BRODIE². OLCHOWECKI³ was the first to observe that cultures of the new fungus checked the growth of bacteria when some cultures accidentally became contaminated. A few preliminary tests of the antimicrobial action of the filtrate were made. Further investigation of the antibiotic activity of culture filtrate of *C. helenae* has been carried out and is the subject of this preliminary report.

A completely defined liquid medium with the following composition was developed for growing the fungus under static conditions: dextrose, 30 g; asparagine, 1.5 g; potassium phosphate (dibasic), 1 g; calcium nitrate, 0.5 g; magnesium sulphate, 0.5 g; zinc sulphate, 0.25 mg; thiamine, 0.15 mg; distilled water to make 1 l. The brownish antibiotic complex tentatively named cyathin, was isolated from the culture filtrate by extraction with ethyl acetate. Maximum yield was usually obtained in 22 to 25 days at 22–25°C. Physical factors of the environment appeared not to alter the yield appreciably. When different combinations of carbon and nitrogen sources were used, it was found that the proportions of the various components of the cyathin were altered. Cyathin is heat-stable, relatively pH stable, and is not highly soluble in water. It has a low diffusion rate on agar.

The cyathin complex has a broad spectrum of antimicrobial activity. It was found to inhibit the growth of actinomycetales, gram-positive and gram-negative bacteria, and fungi including 'dermatophytes'.

Not all cultures of *C. helenae* were found to produce the cyathin complex. Moreover, many single-spore cultures were found to undergo marked sectoring⁴ and isolates from various sectors varied in the yield of cyathin. An unexpected observation was that apparently only single-spore monokaryon mycelia of *C. helenae* produced cyathin; to date no dikaryon mycelium has been observed to be biologically active.

Thin-layer chromatography on silica gel revealed that the complex consisted of several components. By means of preparative thin-layer chromatography and column chromatography 7 active substances have been obtained and their apparent molecular formulae have been determined⁵ as follows: cyathin A₃ (C₂₀H₃₀O₃), IR-spectrum: 3580, 3400, 1710, 1650 cm⁻¹; cyathin A₄ (C₂₀H₃₀O₃), IR-spectrum: 3600, 3400, 1700 (w), 1650 (m), 1375 cm⁻¹; allocyathin A₄ (C₂₀H₃₀O₄), IR-spectrum: 3600, 3490, 1710 (broad) cm⁻¹; cyathin B₃ (C₂₀H₂₈O₃), IR-spectrum: 3590, 1680 cm⁻¹; cyathin B₄ (C₂₀H₂₈O₄), IR-spectrum: 3570,

1675, 1595 cm⁻¹; cyathin C₅ (C₂₀H₂₆O₅), IR-spectrum: 3400, 3200, 1695, 1675, 1235, 1220 cm⁻¹; chromocyathin (C₇H₈O₄), IR-spectrum: 3380, 3160, 1630, 1610, 1590 cm⁻¹. When these compounds were tested for antimicrobial activity, all proved to be active although there were some differences in the action spectrum and biologically effective concentrations.

It has been shown that chromocyathin is identical with 2,4,5-trihydroxybenzaldehyde⁶. This substance has been synthesized from hydroxyhydroquinone using the ADAMS' modification⁶ of the GATTERMAN synthesis⁷ and the synthetic product found to have antimicrobial activity.

Studies of the structure of the C₂₀ compounds are in progress. These compounds appear to be closely related members of a new group of diterpenoids, and elucidation of their structure is of interest from a chemical as well as a biological point of view⁸.

Résumé. *Cyathus helenae* produit un complexe antibiotique à action générale. Le complexe comprend 7 constituants qui ont été séparés par chromatographie en couche mince et dont les formules moléculaires ont été déterminées. Les constituants possèdent 20 atomes de carbone à l'exception d'un seul dont la formule est C₇H₈O₄.

B. N. JOHRI⁹, H. J. BRODIE, A. D. ALLBUTT,
W. A. AYER and H. TAUBE

Department of Botany and Department of Chemistry,
University of Alberta, Edmonton 7 (Alberta, Canada),
12 January 1971.

¹ Based on a Ph.D. thesis submitted by B. N. Johri to the University of Alberta, May 1969.

² H. J. BRODIE, Can. J. Bot. 44, 1235 (1966).

³ A. OLCHOWECKI, Culture studies and mating reaction in *Cyathus helenae* BRODIE and related species. Master's thesis, University of Alberta, September 1967.

⁴ A. OLCHOWECKI and H. J. BRODIE, Can. J. Bot. 46, 1423 (1968).

⁵ Molecular formulae were determined by combustion analysis and high resolution mass spectrometry.

⁶ R. ADAMS and I. LEVIN, J. Am. chem. Soc. 45, 2373 (1923).

⁷ L. GATTERMAN and M. KÖBNER, Chem. Ber. 32, 278 (1899).

⁸ This study was supported by funds provided by the National Research Council of Canada.

⁹ Present address: Department of Botany, University of British Columbia, Vancouver 8 (British Columbia, Canada).

Effets immédiats de quelques antibiotiques sur l'électro-osmose chez *Nitella flexilis* L.

Chez *Nitella*, l'électro-osmose est conditionnée principalement par la structure de la membrane cellulaire. Celle-ci serait percée de pores chargés négativement, remplis d'eau¹⁻³. Les variations du flux d'eau électro-osmotique en présence de substances ajoutées au milieu peuvent éventuellement trahir les interactions de celles-ci avec les composantes de la membrane cellulaire ou encore avec des processus métaboliques intervenant dans ce phénomène. Dans ce but, nous avons testé l'effet de trois antibiotiques, choisis pour leur mode d'action différent sur la cellule⁴. Il s'agit du chloramphénicol, un inhibiteur de la synthèse protéinique, de l'oligomycine, un découplant des phosphorylations oxydatives et de la

polymyxine, un composé cationique actif sur la surface membranaire.

Les expériences ont porté sur *Nitella flexilis* L., recueillie dans une ancienne carrière à Wood Point N.B. (Canada). Au moment de l'essai, une cellule internodale est isolée du télome et placée dans un électro-osmomètre de même type que celui décrit par FENSOM et DAINTY¹. L'ensemble est plongé dans un bain thermostabilisé à 23°C. Les deux compartiments de l'électro-osmomètre, l'extérieur débouchant directement à l'air et l'intérieur, via un capillaire, sont remplis d'une solution minérale (APW) dont la composition est la suivante: 0,1 mM KCl, 1,0 mM NaCl et 0,1 mM CaCl₂. Le mouvement d'eau en

l'absence de courant électrique («basic flow») et le mouvement d'eau sous l'action d'un courant d'1 μA (valeur choisie pour éviter un potentiel d'action) sont successivement mesurés chacun pendant 2 ou 3 périodes de 5 min, au rythme de 1 mesure à la minute. Leurs moyennes respectives sont calculées. Puis l'APW est remplacé par une solution d'antibiotique dans le compartiment extérieur de l'électro-osmomètre et, de la même façon, après 15 min, les deux mouvements d'eau sont mesurés. L'efficacité électro-osmotique, c'est-à-dire le nombre de molécules d'eau entraînées par ions positifs est calculé dans les deux cas. Les antibiotiques sont utilisés à la concentration $10^{-6} M$, le chloramphénicol et le sulfate de polymyxine sont directement dissouts dans l'APW; l'oligomycine A + B a été préalablement dissoute dans 0,5 cm^3 d'éthanol absolu et cette solution amenée à 100 cm^3 avec de l'APW. (Pour cette substance, le témoin APW contient en plus 0,5% d'éthanol absolu.) Les essais ont porté sur 23 cellules et eurent lieu en juillet et août.

Les résultats sont notés dans le Tableau. Ils ont fait l'objet d'une analyse statistique par paires. Le seuil de probabilité adopté est de 5% (S). Les efficacités électro-osmotiques sont celles du complexe paroi-membrane. Toutefois, comme leurs valeurs sont proches de 100 moles F^{-1} , on peut admettre⁵ qu'elles correspondent pratiquement aux valeurs de l'efficacité électro-osmotique de la membrane seule.

Discussion et conclusions. Le chloramphénicol (coefficient de perméabilité chez *Nitella*⁸: $1,5 \times 10^{-7} \text{ cm sec}^{-1}$) et les polymyxines augmentent le «basic flow». Comme WANLESS, GRANT et FENSOM⁷ l'ont proposé, cela signifie-t-il que ces antibiotiques agissent sur le métabolisme par les biais de l'activité de la pompe chlorure? Voyons si cette hypothèse rend compte de nos résultats. Dans l'électro-osmomètre, la surface de la cellule exposée aux antibiotiques est de l'ordre de 0,5 cm^2 . L'augmentation du «basic flow» après traitement est en moyenne de: $20 \times 10^{-9} \text{ cm}^3 \text{ sec}^{-1}$. L'accroissement du flux de volume d'eau est donc de $4 \times 10^{-8} \text{ cm}^3 \text{ sec}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ou encore de $2,2 \times 10^3 \text{ pM cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$. En admettant que celui-ci soit lié à un phénomène électro-osmotique dû aux ions chlorures, ce résultat impliquerait une augmentation de 4 fois l'influx de Cl^- . (L'efficacité électro-osmotique choisie pour ce calcul est de $550 \text{ H}_2\text{O} \times \text{F}^{-1}$. Elle correspond en effet d'après MACROBBIE et FENSOM³ à une densité de courant de 0,2 μA , soit précisément au courant transporté par l'influx mesuré de chlorures chez *Nitella*.) Une telle augmentation de l'influx de Cl^- est douteuse. C'est pourquoi en nous basant sur l'existence de connections directes entre chloroplastes et le plasmalemma^{8,9}, nous préférons rendre compte de l'accroissement du «basic flow» en postulant une faible augmentation de l'osmolarité de la moitié cellulaire en contact avec les antibio-

tiques, due à l'activité métabolique perturbée des chloroplastes. Il suffit que la molarité du cytoplasme au contact du plasmalemma s'élève de 0,16 mM pour déclencher l'accroissement du basic flow observé. En effet, lorsque la différence de potentiel aux bornes de l'électro-osmomètre est nulle ($E = 0$), on a d'après les équations d'Onsager¹⁰: $\Delta J = L_{pp} \times \Delta P$, avec ΔJ : la variation du flux d'eau en $\text{cm}^3 \times \text{sec}^{-1} \times \text{cm}^{-2}$; L_{pp} = la conductivité hydraulique pour la membrane (elle est égale¹¹ à $1,07 \times 10^{-5} \text{ cm sec}^{-1} \text{ atm}^{-1}$); ΔP = la variation de pression en atm. C'est-à-dire qu'une ΔP de $4 \times 10^{-3} \text{ atm}$. (ou encore un accroissement molaire de 0,16 mM à 23°C) est suffisante pour provoquer le ΔJ observé de $4 \times 10^{-8} \text{ cm}^3 \text{ sec}^{-1} \text{ cm}^{-2}$.

Seules les polymyxines modifient l'efficacité électro-osmotique. Ce résultat confirme l'action postulée de ces antibiotiques: ils dissocient les couches lipoprotéiques de la membrane¹². Comme il ressort du modèle de «friction» appliqué aux équations d'Onsager¹³, cette efficacité électro-osmotique plus grande doit être déterminée par un élargissement du diamètre des pores ou peut-être par une augmentation de leur nombre.

Dans nos expériences, l'oligomycine n'a pas d'effet ni sur le «basic flow», ni sur l'efficacité électro-osmotique. Il n'est pas impossible que son action soit masquée par l'effet positif de l'alcool présent dans ses solutions¹⁴.

Summary. The short term effects of chloramphenicol, polymyxin sulfate and oligomycin A + B (the latter in 0,5 M alcoholic solution) on the basic flow and the electro-osmosis in *Nitella* were studied. Both chloramphenicol and polymyxin increase the basic flow but only polymyxin increases the electro-osmotic efficiency.

C. GILLET¹⁵, D. S. FENSOM¹⁶
et J. LEFEBVRE¹⁵

Facultés Universitaires de Namur,
Département de Biologie Végétale,
rue de Bruxelles, 61, B-5000 Namur (Belgique) et
Biology Department of the Mount Allison University,
Sackville (N.B., Canada), 21 janvier 1971.

Effets d'antibiotiques sur le «basic flow» et l'efficacité électro-osmotique chez *Nitella flexilis* L.

Antibiotiques $10^{-6} M$	«Basic flow» en $10^{-9} \text{ cm}^3 \text{ sec}^{-1}$			Efficacité électro- osmotique en molécule d'eau par charge +		
	Dans APW	Variation après traitement		Dans APW	Variation après traitement	
Chloramphénicol	44	+ 16	S	138	+ 6	NS
Oligomycine*	74	+ 3	NS	181	+ 8	NS
Polymyxine	50	+ 23	S	145	+ 32	S

* Dans le cas de l'oligomycine, l'APW contient en plus 0,5% d'éthanol absolu.

- D. S. FENSOM et J. DAINTY, Can. J. Bot. 41, 685 (1963).
- D. S. FENSOM et I. R. WANLESS, J. exp. Bot. 18, 563 (1967).
- E. A. C. MACROBBIE et D. S. FENSOM, J. exp. Bot. 20, 466 (1969).
- D. GOTTLIEB et P. D. SHAW, Antibiotics, I. Mechanism of Action (Springer Verlag, New York 1967), p. 785.
- M. T. TYREE et D. C. SPANNER, Can. J. Bot. 47, 1497 (1969).
- D. PRAMER, Expl. Cell. Res. 16, 70 (1959).
- I. R. WANLESS, N. GRANT et D. S. FENSOM, en préparation.
- R. B. C. JOHNSON, communication personnelle.
- J. W. F. COSTERTON et E. A. C. MACROBBIE, J. exp. Bot. 27, 535 (1970).
- M. T. TYREE, J. exp. Bot. 20, 341 (1969).
- J. DAINTY et B. Z. GINZBURG, Biochim. biophys. Acta 79, 102 (1964).
- O. K. SEDREK, Antibiotics, I. Mechanism of Action (Ed. D. GOTTLIEB et P. D. SHAW; Springer Verlag, New York 1967), p. 142.
- J. DAINTY, P. C. CROGHAN et D. S. FENSOM, Can. J. Bot. 41, 953 (1963).
- C. GILLET remercie le Conseil des Arts du Canada et J. LEFEBVRE le Fonds National de la Recherche Scientifique de Belgique pour leur avoir octroyé les subsides nécessaires à leur séjour à la Mount Allison University N.B. (Canada), où cette recherche a été réalisée. Les auteurs sont reconnaissants au Dr. L. VINING (N.R.C. in Halifax) de leur avoir fourni gracieusement les antibiotiques utilisés.
- Facultés Universitaires de Namur, Département de Biologie Végétales, 61, rue de Bruxelles, B-5000 Namur (Belgique).
- Biology Department of Mount Allison University, Sackville (N.B., Canada).