

# Rychlé selekční metody při šlechtění producentů antibiotik

RNDr. KAREL ZELENÝ, CSc., Ing. PAVEL VYSKOČIL, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací,  
Rožtoky u Prahy

Genetická variabilita je základní podmínkou rozsáhlých programů zlepšování produkce průmyslových kmenů, ale variabilita sama nemůže mít žádný přínos, pokud není k dispozici vhodná selekční metoda. Selekční techniky jsou tedy velmi důležité, avšak pro jejich vhodné použití je nutno zachovat některé základní podmínky.

Každou selekční techniku je nutno upravit pro daný mikroorganismus a současně pro podmínky, v nichž je technika používána a v neposlední řadě je nutno uvažovat i látku, jejíž produkce je sledována.

Mikrobiální genetici obvykle selektují na kvalitativní charakteristiky (např. schopnost růstu na určitém mé-



diu), zatímco průmysloví genetici mají mnohem těžší úkol — vytvořit selekční techniku na kvantitativní diference, které jsou často v rozsahu několika málo procent.

To platí pro všechny selekční metody používané v genetice průmyslových mikroorganismů. U rychlých selekčních metod (screeningových metod) k tomu přistupuje ještě nutnost vytvořit relativně jednoduchý postup, který by umožňoval hodnocení podstatně vyššího počtu kmenů při zachování co nejvyšší standardnosti a současně co nejnižší chyby stanovení.

Screeningové metody je možno rozdělit do několika skupin, z nichž pouze některé jsou nebo byly použity pro základní produkční hodnocení kmenů produkujících antibiotika.

### Morfologie kolonií

Všechny kmeny *Penicillium chrysogenum* se zvýšenou produkcí mají do jisté míry alterovanou morfologii kolonií [Aytoun 1970]. Ovšem nebylo možno nalézt takový morfologický typ, který by byl v naprosté korelaci s produkcí [Stauffer a Backus 1954]. Předpokládá se, že za to je zodpovědná částečná chromozomální duplikace [Ball 1973a, b]. To by prokazovala i nestabilita při částečné chromozomální duplikaci prokázané u *Aspergillus nidulans* [Nga a Roper 1969].

### Změny pigmentů a barva kolonií

Tato problematika je nejdůkladněji propracována u kmenů druhu *Streptomyces rimosus* — producenta oxytetracyklinu. U těchto kmenů byla prokázána těsná vazba mezi tvorbou pigmentu a produkcí antibiotika [Alikhanian 1973].

První produkční kmeny *P. chrysogenum* až do roku 1947 produkovaly žlutý pigment chrysogenin. V tomto období byly patrně vzhledem k těsné vazbě mezi genem pro syntézu chrysogenu a některým z genů zúčastněných na biosyntéze penicilinu všechny nepigmentující mutanty neprodukcí. Až byl izolován kmen Wis BL 3-D 10 — nepigmentující a vykazující produkci jen o málo nižší než jeho předchůdce [Backus a Stauffer 1955].

### Metody vycházející z hodnocení izolátů na tuhých půdách

#### 1. Hodnocení v malých objemech

Jeden z nových principů stanovení produkce izolátů získaných v průběhu šlechtitelských programů vychází z kultivace produkčních kmenů na tuhých půdách a následné biologické detekce antibiotika produkovaného do tohoto média. Tato metoda byla použita poprvé při šlechtění producenta kasugamycinu — *Streptomyces kasugaensis* a bylo dosaženo vynikajících výsledků [Ichikawa et al., 1970, Ichikawa et al., 1971]. Obdobně techniky bylo použito i pro kmeny druhu *Aspergillus nidulans* při modelovém studiu produkce penicilinu, a to jak v původní podobě odpovídající práci Ichikawy, tak v přepracované formě [Ditchburn et al., 1974].

#### 2. Hodnocení izolátů přelévací metodou

Dalším přístupem ke screeningu produkčních kmenů jsou přelévací metody. Stauffer et al. [1966] modifikovali rychlou plotnovou metodu Elandera et al. [1960] pro screening izolátů produkujících cefalosporin C u druhu *Cephalosporium* sp. Po kultivaci na povrchu média byly kolonie přelity kulturou bakterie *Alcaligenes faecalis* a inkubovány. U každé kolonie byl stanoven tzv. „potency index“ poměr mezi průměrem zóny a průměrem kolonie. Z těchto prací vycházeli Ball a McGonagle

[1978], kteří testovali produkci kmenů *Penicillium chrysogenum* po mutagenním zásahu přímo na plotně přelítím suspenzí spor kmene *Bacillus subtilis* za přítomnosti penicilinázy ke snížení koncentrace penicilinu v půdě.

### Screeningové metody ve šlechtitelských programech VÚAB

Při dlouhodobém šlechtitelském programu získávání vysokoprodukčních kmenů druhu *Penicillium chrysogenum* jsme se zaměřili na screeningové metody vycházející z hodnocení izolátů na tuhých půdách.

Byly ověřeny metodiky hodnocení kmenů podle Ichikawy et al. [1971] a Ditchburna et al. [1974] a vypracována vlastní metodika, při níž jsou izoláty po mutagenním působení přeočkovávány na připravené agarové disky získané vysekáním ztužené fermentační půdy korkovrtem. Po době nutné k inkubaci v prostředí maximální vlhkosti jsou agarové disky s narostlými koloniemi přeneseny na biologické testovací plotny s použitým testovacím mikroorganismem *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Získaná metodika byla ověřena jednak u modelových kmenů s rozdílnými produkčními charakteristikami a byla zjištěna přímá závislost mezi produkcí v agarových discích a produkcí při fermentaci v baňkách na rotačních třepačkách, jednak u souborů izolátů po mutagenním působení. Vypracovaná metodika přináší výhodu v možnosti paralelního hodnocení produkce jednoho a téhož izolátu v několika agarových discích a současně odstraňuje poměrně pracnou dekontaminaci materiálu [Zelený 1982]. Tato metodika je dlouhodobě využívána ve šlechtitelském programu a po jejím úplném zautomatizování přinese výrazné zvýšení počtu hodnocených kmenů.

Druhou screeningovou metodou, která byla vypracována v souvislosti se šlechtitelskými programy, je metodika přelévání produkčních kmenů citlivým mikroorganismem. V tomto případě bylo s výhodou použito alternativy přeočkovávání jednotlivých izolátů po mutagenním působení na testovací Petriho misky, které byly přelity kulturou *Bacillus subtilis* ATCC 6633 za současné přítomnosti poměrně vysoké koncentrace penicilinázy pro snížení koncentrace produkovaného penicilinu v agaru.

### Literatura

- [1] ALIKHANIAN, S. I.: Genetics of Industrial Microorganisms, (Vaněk Z., Hošťálek Z., Cudlín J., eds.) Academia Prague, 1973, s. 9
- [2] AYTOUN, R. S. C.: Proc. Int. Symp. Genet. Ind. Microorg., Prague 1970, s. 300.
- [3] BALL, C.: In: Genetics of Industrial Microorganisms (Vaněk Z., Hošťálek Z., Cudlín J., eds.) Elsevier, Amsterdam, 1973a, 227.
- [4] BALL, C.: Prog. Ind. Microbiol. **12**, 1973b, s. 47.
- [5] BALL, C., MCGONAGLE, M. P.: J. Appl. Bacteriol. **45**, 1978, s. 67.
- [6] BACKUS, M. P., STAUFFER, J. F.: Mycologia **47**, 1955, s. 428.
- [7] DITCHBURN, P., GIDDINGS, B., MACDONALD, K. D.: J. Appl. Bacteriol. **37**, 1974, s. 514.
- [8] ELANDER, R. E., STAUFFER, J. F., BACKUS, M. P.: In: Antimicrobial Agents Annual, 1960 (Gray P., Tabenkin B., Bradley S. G., eds.), Plenum Press, New York, 1960, s. 91.
- [9] ICHIKAWA, T., DATE, M., ISHIKURA, T., OZAKI, A.: Gen. Ind. Microbiol. Abstract Book, Prague 1970, s. 301.
- [10] ICHIKAWA, T., DATE, M., ISHIKURA, T., OZAKI, A.: Folia Microbiol. **16**, 1971, s. 218.
- [11] NGA, B. H., ROPER, J. A.: Genet. Res. **14**, 1969, s. 66.
- [12] STAUFFER, I. F., BACKUS, M. P.: Ann. N. Y. Acad. Sci., **59**, 1954, s. 34.
- [13] STAUFFER, I. F., SCHWARTZ, L. J., BRADY, C. W.: Dev. Ind. Microbiol. **7**, 1966, s. 104.
- [14] ZELENÝ, K.: Rychlé screeningové metody pro selekci vysokoprodukčních kmenů *Penicillium chrysogenum*. Kandidátská dizertační práce, PFFUK Praha, 1982.

Zelený K., Vyskočil P.: Rychlé selekční metody při šlechtění producentů antibiotik. Kvas. prům. **30**, 1984, č. 9, s. 209—211.



Jsou uvedeny různé screeningové metody hodnocení kmenů ve šlechtitelských programech producentů antibiotik a zkušenosti s využitím těchto metod ve VÚAB.

**Зелены, К., Выходил, П.: Ускоренные методы селекции продуцентов антибиотиков.** Квас. прум. 30, 1984, № 9, стр. 209—211.

Приведены различные методы селекции используемые для оценки штаммов в рамках программы селекции продуцентов антибиотиков, и опыт с использованием этих методов в Научно-исследовательском институте антибиотиков и биотрансформаций.

**Zelený K., Vyskočil P.: Rapid Selection Methods in Strain Improvement Programmes of Antibiotic Producers.** Kvas. prům. 30, 1984, č. 9, pp. 209—211.

Different screening methods used in strain improvement programmes of antibiotic producing microorganisms are discussed and positive experiences with these methods in Research Institute for Antibiotics and Biotransformations in Roztoky are presented.

**Zelený, K., Vyskočil, P.: Schnelle Selektionsmethoden bei der Züchtung von Antibiotikaproduzenten.** Kvas. prům. 30, 1984, No 9, S. 209—211.

Verschiedene Screeningsmethoden der Bewertung von Stämmen in Züchtungsprogrammen der Antibiotikaproduzenten mit Erfahrungen aus der Ausnützung im Forschungsinstitut für Antibiotika und Biotransformationen eingegeben sind.