

SELEKCIJA I POBOLJŠANJE ANTIBIOTSKE  
AKTIVNOSTI STREPTOMYCES ERYTHREUS  
E-29 SOJA NAKON DJELOVANJA MUTAGENIH  
SREDSTAVA

*With Summary in English*

MILAN HOLJEVAC i VLADIMIR DELIĆ

(Istraživački institut Tvornice farmaceutskih i kemijskih proizvoda »Pliva« u Zagrebu)

*Uvod*

Osnova za usmjerenu selekciju mikroorganizama je njihova varijabilnost. Primjena mutagenih faktora, faga kao prenosilaca genetskog materijala, a u novije vrijeme i hibridizacija povećavaju mikrobne varijacije pa time pružaju veću mogućnost za selekciju korisnih formi.

Selekcija na osnovu prirodne varijacije u određenom momentu više ne pruža daljnjih izgleda za uspjeh, jer prestaje promjena stečenih svojstava. Krivulja svojstva pokazuje stagnaciju ili u nekim slučajevima mijenja tok u protivnom smjeru. Da se nastavi s povećanjem takvih stečenih svojstava, danas se s uspjehom upotrebljavaju mnoga mutagena sredstva.

Naročita se pažnja posljednjih 15 godina poklanjala kemijskim i fizičkim mutagenim sredstvima nakon sve značajnije uloge i primjene mikroorganizama u dobivanju korisnih tvari (enzima, vitamina, antibiotika, aminokiselina itd.).

Prvi rezultati o upotrebi mutagenih sredstava u selekciji mikroorganizama u svrhu povećanja antibiotske aktivnosti su od Demerca (1945). Djelovanjem x-zraka na plijesan *Penicillium chrysogenum*, proizvođača penicilina, od soja s aktivnošću 200 j/ml dobiven je izolat od 500 j/ml. Visoko proizvodni soj *P. chrysogenum* dobiven je upotrebom derivata iperita kao mutagenog sredstva (B a c k u s et al. 1955).

Intenzivnija ispitivanja o primjeni mutagenih sredstava kod roda *Streptomyces* u svrhu poboljšanja antibiotske aktivnosti započinjju nakon otkrića streptomiceina.

S a v a g e (1949) upotrebljava ultraljubičasto zračenje za poboljšanje antibiotske aktivnosti *S. griseus* i povećava mu aktivnost za 3 puta. D u l a n e y (1953) na istoj vrsti istim mutagenim sredstvima po-

visuje aktivnost od 1000 j/ml na 1500 j/ml. Katagiri (1954) uspješno upotrebljava ultraljubičasto zračenje u selekciji *S. aureofaciens*.

Nakon toga dolazi do upotrebe različitih mutagenih sredstava za poboljšanje drugih *Streptomyces* vrsta, uglavnom onih koji pobuđuju interes zbog svoje antibiotske aktivnosti. Najviše radova s tog područja potječe od sovjetskih autora, koji detaljno opisuju primjenu različitih mutagenih sredstava u selekciji streptomiceta, proizvođača antibiotika.

Selekciju *S. rimosus* opisuju Mindlin et al. (1959). Pomoću ultraljubičastog zračenja, x-zraka, etilenimina i njihovom kombinacijom uspješno je izvršeno povećanje prinosa oksitetraciklina od 1820 j/ml na 3040 j/ml. Gol'dat (1961) upotrebljava ista mutagena sredstva kod *S. aureofaciens*. Soj s kojim je selekcija započela imao je aktivnost od 600 j/ml. Poslije svake obrade mutagenim sredstvom najaktivniji izolat dalje je obrađivan. Bilo je ispitano 7791 izolata, a kao rezultat višestepenog izbora dobiven je soj čija je aktivnost 3500 j/ml. Poboljšanje antibiotske aktivnosti pokazuje *S. antibioticus* (oleandomicin) nakon djelovanja kombinacije etilenimina i ultraljubičastog zračenja (Alihanjan et al. 1961), *S. subtropicus* (albomicin) poslije obrade ultraljubičastim zrakama, x-zrakama, etileniminom, brzim neutronima (Klepikova et al. 1963), te *S. spheroides* (novobiocin) nakon ultraljubičastog zračenja, x-zraka i etilenimina (Gol'dat et al. 1963).

Mikroorganizam *S. erythreus* proizvodi antibiotik eritromicin (Mc Guire et al. 1952), koji je naročito aktivan protiv bakterija rezistentnih na penicilin i streptomicin. Prvi podaci o selekciji *S. erythreus* navode kombinaciju djelovanja etilenimina i ultraljubičastog zračenja kao povoljnu za selekciju (Alihanjan et al. 1959). Daljnjim istraživanjima je pokazano da brzi neutroni imaju bolje mutageno djelovanje u smislu povećanja antibiotske aktivnosti od ultraljubičastog zračenja, x-zraka, dietilsulfata, odnosno njihovih međusobnih kombinacija (Alihanjan 1962).

Upotrebom etilenimina, ultraljubičastog zračenja i 1,4-diepoksi-butana željeli smo izvršiti selekciju *S. erythreus* E-29 soja u svrhu povećanja njegove antibiotske aktivnosti. Naročiti interes pobuđuje dobro poznati mutagen 1,4-diepoksi-butan, o čijoj upotrebi u selekcijske svrhe kod roda *Streptomyces* nema podataka.

## Materijal i metode

Kao ishodna kultura služio je soj *Streptomyces erythreus* E-29, koji je dobiven selekcijom soja E-04 (Holjevac 1964), iz mikrobiološke zbirke Istraživačkog instituta »Pliva«. Taj soj odgovara po svim svojim morfološkim i fiziološkim karakteristikama tipskoj kulturi *S. erythreus* opisanoj po Waksmanu (1960, II. 204).

Mikroorganizam je uzgajan na podlozi ovog sastava: sladni ekstrakt 10 g, dekstroza 4 g, agar 20 g, dest. voda do 1000 ml. Nakon rasta od 12 dana na temperaturi od 32°C, pripremljena je vodena suspenzija spora koja je služila za obradu mutagenim sredstvima.

U našem radu upotrijebljena su tri mutagena sredstva: 1,4-diepok-sibutan («Fluka») u koncentraciji 1%, etilenimin u koncentraciji 0,1%, te ultraljubičasto zračenje («Philips» TUV 15).

Vodenoj suspenziji spora, koja je prethodno filtrirana kroz filter od vate da se odstrane komadići micelija i nakupine spora, dodana je određena količina 1,4-diepoksibutana ili etilenimina tako da konačni volumen sadrži gore navedene koncentracije. Uzorci su nakon toga uzimani u određenim vremenskim razmacima, razrijeđivani sterilnom vodom i nacjepljivani na hranjivu agarnu podlogu u Petrijevim zdjelicama. Zračenje je provedeno u vodenoj suspenziji uz stalno miješanje za vrijeme zračenja pomoću ultraljubičaste svjetiljke (2537 Å).

Poslije inkubacije od 12 dana obrađene spore izrasle su u kolonije, čije su morfološke osobine pregledane. Od svake primijenjene doze izolirano je oko 100—130 kolonija na kose agarne podloge.

Proizvodnja antibiotika vršena je u tikvicama po Erlenmyeru od 500 ml s 50 ml podloge. Dio kose agarne podloge na kojem je izrasla kultura izoliranog mikroorganizma služio je kao inokulum za pretfermentacijsku podlogu sastava: glukoza 15 g, sojino brašno 15 g, kukuruzni ekstrakt 5 g, CaCO<sub>3</sub> 1 g na 1000 ml vode. Nakon inkubacije od 24 sata 5% pretfermentacijske podloge s razvijenim mikroorganizmom inokulira se fermentaciona podloga sastava: škrob 15 g, sojino brašno 10 g, sojino ulje 0,5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g, kukuruzni ekstrakt 5 g, CaCO<sub>3</sub> 1 g na 1000 ml vode i 0,4% propilnog alkohola. Fermentacija je provodena na tresilici kod 250 o/min i temperature 32° C a prekinuta nakon 144 sati.

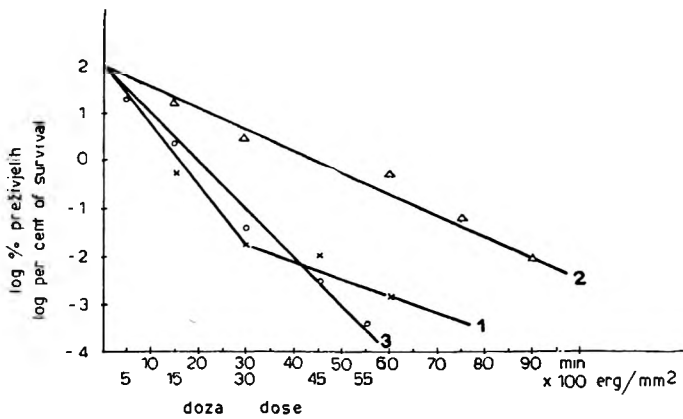
Antibiotska aktivnost određivana je metodom difuzije u agar. Kao pokusni mikroorganizam služio je *Bacillus mycoides* HB2 (T e b j a k i n a et al. 1959), iz mikrobiološke zbirke Svesaveznog naučnoistraživačkog instituta za antibiotike u Moskvi. Antibiotska aktivnost istraživanih izolata izračunavana je pomoću tablica (D m i t r i j e v a 1958).

## Rezultati i diskusija

Mutagena sredstva upotrebljavana su u takvim koncentracijama i vremenskim razmacima da se dobiju različiti stupnjevi smrtnosti spora.

Povećanje doze ultraljubičastog zračenja, 1,4-diepoksibutana i etilenimina ima za posljedicu linearan pad krivulje (sl. 1). A l i h a n j a n et al. (1959) navode sigmoidalni tip krivulje smrtnosti kod *S. rimosus* poslije ultraljubičastog zračenja.

Sa selekcionog stanovišta naročiti interes predstavlja pojava morfološki promijenjenih varijanata. Soj E-29 pokazuje stabilnost morfoloških značajki. Pojavljuje se oko 1% promijenjenih kolonija. Među morfološki promijenjene kolonije ubrajamo one koje se svojim karakteristikama razlikuju od tipske kulture *S. erythreus*. Najčešće osobine morfološki promijenjenih kolonija bile su: promjena boje zračnog micelija, odsustvo topljivog pigmenta, pojava asporogenih oblika i patuljastog oblika kolonija.



Sl. 1. Krivulja smrtnosti *S. erythreus* E-29 pod djelovanjem 1,4-diepoksi-butana (1), etilenimina (2), i ultraljubičastog zračenja (3).

Fig. 1. Survival curve of *S. erythreus* E-29 under the effect of 1,4-diepoxybutane (1), ethylenimine (2) and ultraviolet irradiation (3).

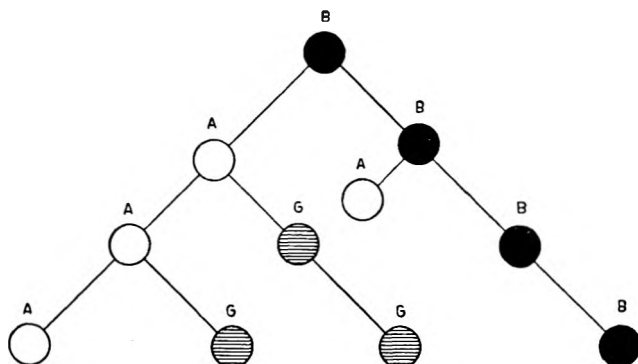
Novo nastale morfološke osobine inducirane mutagenim sredstvima zadržavaju svoju karakteristiku u svojoj genetskoj konstituciji i prenose je na daljnje generacije. Tipičan primjer je pojava bijelih kolonija nakon obrade spora 1,4-diepoksi-butanom.

Na ploči na kojoj su izrasle kolonije iz spora obrađenih 1,4-diepoksi-butanom pojavila su se dva tipa kolonija: tip B kolonija odgovara tipskoj kulturi *S. erythreus* i cijepa se na B i A. Kolonije pod oznakom A karakterizira zračni micelij bijele boje, odsustvo topljivog pigmenta i glatka površina kolonije polukuglastog oblika. Oba tipa kolonija izolirana su i ponovo naciepljena na površinu agarne podloge. Tip A kolonija dao je novi tip potpuno asporogenih kolonija (G), dok se tip B cijepao na A i B. Slična pojava uočena je kod *S. rimosus* (Alihanjan et al. 1959), čija je ishodna kultura bila sektorima podijeljena na dva morfološki različita dijela. U našem slučaju monomorfna kolonija cijepa se u nekoliko morfološki različitih oblika (sl. 2).

Antibiotska aktivnost sva tri tipa kolonija također je istražena. Pokazalo se da izolati koji pripadaju A i B tipu kolonija imaju antibiotsku aktivnost koja je u granicama početnog soja, dok tip kolonija G nema antibiotske aktivnosti.

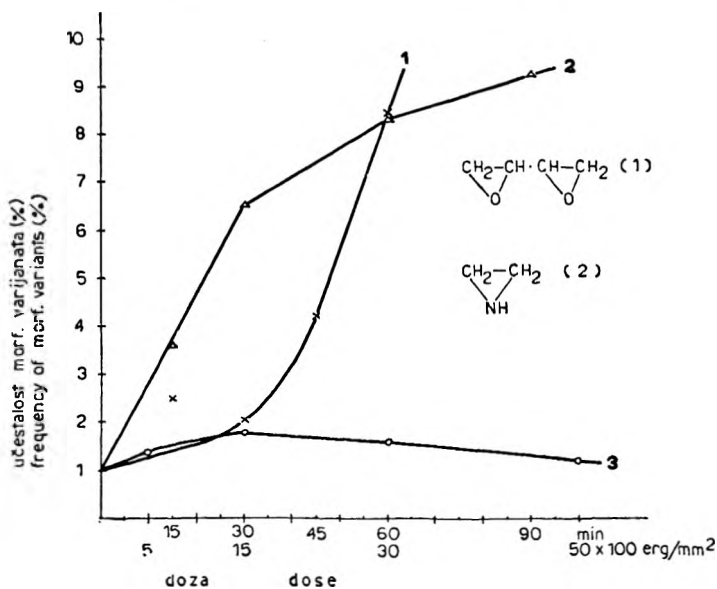
Pri obradi spora *S. erythreus* etileniminom i 1,4-diepoksi-butanom uz produljeno trajanje djelovanja, raste i broj morfološki promijenjenih oblika. Slični rezultati opisani su poslije upotrebe drugih mutagenih sredstava i kod drugih *Streptomyces* vrsta (Garina 1963, Gol'dat et al. 1964). Poslije ultraljubičastog zračenja broj morfološki promijenjenih varijanata nije se povećao (sl. 3).

Uporedo s ispitivanjem morfološki promijenjenih varijanata ispitana je aktivnost izolata nakon obrade pojedinim mutagenim sredstvima.



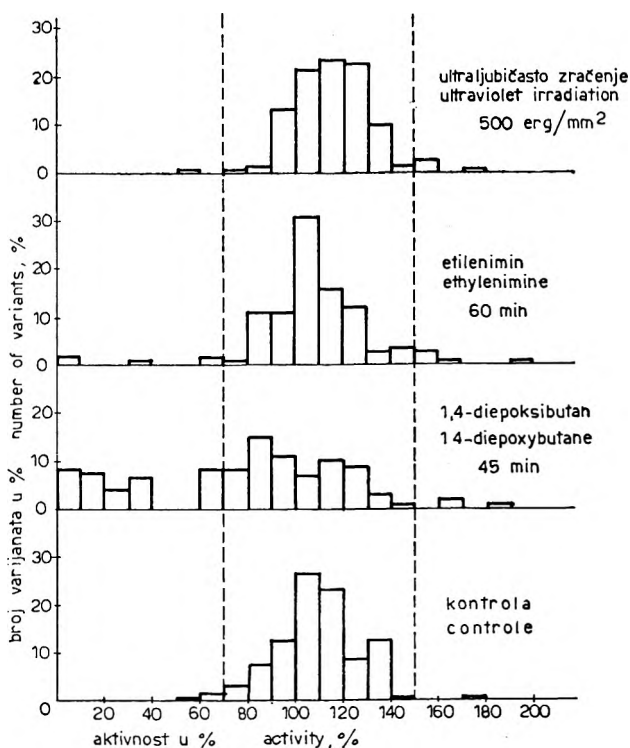
Sl. 2. Shema cijepanja nestabilne varijante soja E-29 poslije djelovanja 1,4-diepoksibutana. Ključ: G-asporogene kolonije; B-tipične kolonije; A-kolonije bijele boje.

Fig. 2. The segregation scheme of unstable variant in E-29 strain under the effect of 1,4-diepoxybutane. Key: G-asporogenic colonies; B-typical colonies; A-white colonies.



Sl. 3. Učestalost morfoloških varijanata u ovisnosti od doze 1,4 diepoksibutana (1), etilenimina (2) i ultraljubičastog zračenja (3).

Fig. 3. Frequency of morphological variants as dependent on the dose of 1,4-diepoxybutane (1), ethylenimine (2) and ultraviolet irradiation (3).



Sl. 4. Histogrami varijacija *S. erythreus* E-29 u odnosu na produkciju antibiotika pod djelovanjem tri mutagena sredstva.

Fig. 4. Histograms of antibiotic production variation in *S. erythreus* under the effect of three mutagenic agents.

Antibiotska aktivnost soja E-29 označena je sa 100, a aktivnost ispitanih izolata izražena je u postocima u odnosu na taj soj.

Najveći broj varijacija nakon jedne doze pojedinog mutagenog sredstva prikazan je na slici 4.

Obrada 1,4-diepoksibutanom pokazuje veliki broj neaktivnih varijanata i pomak cjelokupne grupe istraženih izolata u smjeru smanjenja antibiotske aktivnosti (minus varijante). Manji broj neaktivnih varijanata pojavljuje se nakon obrade etileniminom. Ova pojava tumači se djelovanjem mutagenog sredstva na biosintezu antibiotika, koja je u jednoj svojoj fazi prekinuta. Određeni broj izolata s povećanom aktivnošću u odnosu na kontrolnu grupu (plus varijante) pojavljuje se poslije obrade sa sva tri mutagena sredstva. Najveći pomak u smjeru povećanja aktivnosti pokazuju izolati nakon obrade etileniminom.

Učestalost plus i minus varijanata u odnosu na primijenjene doze kod sva tri mutagena sredstva prikazan je u tabeli 1.

Tabela 1 — Table 1

Učestalost plus i minus varijanata soja E-29 poslije djelovanja 1,4-diepoksibutana, etilenimina i ultraljubičastog zračenja

Frequency of plus and minus variants of E-29 strain after treatment with 1,4-diepoxybutane, ethylenimine and ultraviolet irradiation

	Broj istraženih kolonija Number of tested colonies	Plus varijante Plus variants		Minus varijante Minus variants	
		broj Num-ber	% per cent	broj Num-ber	% per cent
Kontrola Control	130	1	0,7	1	0,7
Intenzitet ultr. ljub. zračenja Intensity of UV-irradiation					
Erg/mm <sup>2</sup> 500	115	4	3,48	2	1,6
Erg/mm <sup>2</sup> 1500	114	2	1,75	3	2,6
Erg/mm <sup>2</sup> 3000	77	1	1,3	6	7,8
Erg/mm <sup>2</sup> 5000	96	3	3,0	4	4,15
Ukupno Total	532	11	2,06	16	3,00
1% -tna otopina 1,4-diepoksibutana 1 per cent solution of 1,4-diepoxybutane					
15 min	112	2	1,78	11	10
30 min	106	2	1,88	21	19
45 min	100	3	3,0	33	33
60 min	75	2	2,67	16	19,8
Ukupno Total	393	9	2,66	81	20,6
0,1% -tna otopina etilenimina 0,1 per cent solution of ethylenimine					
15 min	112	3	2,68	2	1,75
30 min	108	3	2,78	3	2,78
60 min	99	5	5,05	5	5,05
90 min	130	3	2,3	3	2,3
Ukupno Total	449	14	3,12	13	2,9

Kod neobrađenih izolata pojavljuje se 0,7% plus varijanata. Sva tri mutagena sredstva povećavaju broj plus varijanata u odnosu na ishodni soj. Kod obrade 1,4-diepoksibutanom njihov maksimum je 3%, i kod ostalih primijenjenih doza ne pokazuje znatniji porast. U usporedbi s ultraljubičastim zračenjem i etileniminom, 1,4-diepoksibutan je izazvao znatno veći postotak minus varijanata (20,6).

Najveći postotak plus varijanata dobiven je obradom etileniminom kod doze od 60 min i iznosi 5,05%, dok je pomak u smjeru smanjenja antibiotske aktivnosti 2,9%.

Sve dobivene plus varijante istražene su na antibiotsku aktivnost u 2 boce, pod istim uvjetima pod kojima se vodila i prva fermentacija. Poslije tog ispitivanja odabrali smo 4 izolata s najvećom aktivnošću i pomoću njih smo proveli fermentaciju u 6 boca. Najaktivniji izolat ponovo je dva puta ispitan u 6 boca. Kao rezultat takvog ispitivanja dobiven je izolat EE-17, čiji je prinos eritromicina veći za 106% od ishodnog soja E-29. Taj izolat dobiven je nakon obrade soja E-29 etileniminom. Najaktivniji sojevi obrađeni 1,4-diepoksibutanom i ultraljubičastim zračenjem imaju povećanu aktivnost prvi za 29%, a drugi za 52% u odnosu na roditeljski soj E-29.

### Z a k l j u č a k

Istraženo je djelovanje etilenimina, 1,4-diepoksibutana i ultraljubičastog zračenja sa svrhom povećanja antibiotske aktivnosti *Streptomyces erythreus* E-29 soja.

Najveće djelovanje u smislu povećanja antibiotske aktivnosti kod *S. erythreus* soja E-29 pokazao je etilenimin. Poslije obrade spora etileniminom u koncentraciji 0,1% dobiveno je od 449 izoliranih kolonija 3,12% plus varijanata. Najaktivniji izolat (plus varijanta) s oznakom EE-17 pokazuje za 106% veću antibiotsku aktivnost od ishodnog soja E-29.

Nakon obrade ultraljubičastim zrakama istraženo je 532 izolata i dobiveno je 2,06% plus varijanata. Najaktivniji izolat pokazivao je 52% veću antibiotsku aktivnost od početnog soja E-29. 1,4-diepoksibutan pokazuje nešto veću učestalost plus varijanata, tj. 2,66% od 393 ispitanih izolata. Međutim, antibiotska aktivnost najaktivnijeg izolata je veća samo za 26% od roditeljskog soja E-29. Veliki broj minus varijanata (33%) pokazuje da pod tim uvjetima obrade 1,4-diepoksibutan u odnosu na etilenimin i ultraljubičasto zračenje nema značajnije djelovanje u smislu povećanja antibiotske aktivnosti.

Zahvaljujemo se Slavki Orešković, med. tehn., i Jasenki Korajliji na tehničkoj suradnji za vrijeme rada.



## Literatura

1. Alihanjan, S. I., Garina, K. P., Zdanova, N. I., Vladimirov, L. V., 1961: Selekcija stamma *Act. antibioticus* producenta oleandomicina. Antibiotiki, 10, 867.
2. Alihanjan, S. I., Morozova, E. S., Veselova, S. I., 1961: Sravnitel'noe izučenie izmenčivosti po antibiotikoobrazovaniju u različnyh stammov *Act. streptomycin* pod dajstviem ul'traioletovyh lučej i etilenimina. Antibiotiki, 12, 1055.
3. Alihanjan, S. I., Zdanova, N. I., 1960: Sravnitel'nyj mutagennyj efekt etilenimina, ul'traioletovyh i rentgenovskih lučej. Dokl. AN SSSR, 133, 454.
4. Backus, M. P., and Stauffer, I. F., 1955: The production and selection of a family of strain in *Penicillium chrysogenum*. Mycologia, 47, 429.
5. Demerec, M., 1944-1945: Carnegie Inst. Wash. Year Book, No 44, 147.
6. Dmitrieva, V. S., 1958: Račet biologičeskoj aktivnosti antibiotikov i koncentracii vitamina B 12 s primeneniem tablic. CBTI, Moskva.
7. Dulaney, E. L., 1953: Observation on *Streptomyces griseus*. VI Further studies on strain selection for improved streptomycin production. Mycologia, 45, 481.
8. Garina, K. P., 1963: Izučenie izmenčivosti i selekcija stamma-producenta florimicina (viomicina). Antibiotiki, 10, 867.
9. Gol'dat, S. Ju., 1961: Selekcija *Actinomyces aureofaciens* (producenta hlortetraciklina) s ispol'zovaniem mutagennyh faktorov. Tr. In-ta mikrobiologii AN SSSR. 10, 158.
10. Gol'dat, S. Ju., Sokolova, R. V., Kabakova, A. P., 1964: Inducirovannaja i estestvennaja izmenčivost' *Act. spheroides* (*Streptomyces spheroides*) — producenta novobiocina. Antibiotiki, 3, 211.
11. Holjevac, M. M., 1964: Upotreba etilenimina u selekciji *Streptomyces erythreus* soja E-04. II savjetovanje mikrobiologa Jugoslavije, Zagreb.
12. Katagiri, K. J., 1954: Study on the chlortetracycline improvement of the producing strain by several kinds of methods. J. Antibiotics (Japan), 7, 45.
13. Klepikova, F. S., Alihanjan, S. I., 1963: Sravnitel'noe izučenie dejstvija različnyh mutagenov na kul'turu *Act. subtropicus*. Antibiotiki, 9, 777.
14. McGuire, I. M., Bunch, R. L., Anderson, R. C., Boaz, H. E., Flynn, E. H., Powell, H. S., Smith, I. E. 1952: Ilotycin a new antibiotic. Antibiot. and Chemother., 2, 281.
15. Mindlin, S. Z., Alihanjan, S. I., 1958: Izučenie izmenčivosti inducirovannoj ul'traioletovymi lučani i selekcija *Actinomyces rimosus* (producenta oksitetraciklina). Antibiotiki, 2, 18.
16. Savage, G. M., 1949: Improvement in streptomycin producing strains of *Streptomyces griseus* by ultraviolet and X-ray energy. J. Bacteriol., 57, 429.
17. Tebjakina, A. E., Semenov, M. S., 1959: Opredelenie biologičeskoj aktivnosti eritromicina na vseh stadijah ego polučenija. Antibiotiki, 4, 33.
18. Waksman, S. A., 1960: Description of genera and species of *Actinomycetes*. The Actinomycetes II. Baltimore.

## SUMMARY

### SELECTION AND IMPROVEMENT OF ANTIBIOTIC ACTIVITY IN STREPTOMYCES ERYTHREUS E-29 STRAIN AFTER THE ACTION OF MUTAGENIC AGENTS

*Milan Holjevac and Vladimir Delić*

(Research Department »Pliva« Pharmaceutical and Chemical Works, Zagreb, Croatia,  
Yugoslavia)

*Streptomyces erythreus* E-29 strain was selected by treatment with ultraviolet irradiation, ethylenimine and 1,4-diepoxybutane as mutagenic agents. The most effective in improving of the erythromycin yields was ethylenimine in concentration of 0.1 per cent. After 60 min. of treatment with the mentioned mutagen a new strain EE-17 was isolated. On fermentation this strain showed 106 per cent higher yields than the initial one. By ultraviolet irradiation of the strain, 2.06 per cent plus variants were induced. The best isolate was 52 per cent more active in antibiotic activity than the initial strain.

As a result of 1,4-diepoxybutane treatment of strain E-29 the maximum frequency of plus variants was 2.66 per cent. It has turned out that at this concentration of mutagen, the frequency of minus variants (33 per cent) greatly exceeded the frequency of the same variants in comparison to the ultraviolet irradiation and ethylenimine treatment. The best variant was 26 per cent more active than the initial strain.