

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

88 733

Patent dodatkowy
do patentu _____

MKP C12d 9/14

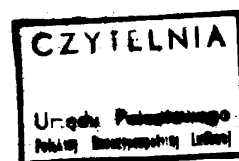
Zgłoszono: 22.04.74 (P. 170 534)

Pierwszeństwo: 23.04.73 Stany
Zjednoczone Ameryki

Int. Cl.². C12D 9/14

Zgłoszenie ogłoszono: 02.06.75

Opis patentowy opublikowano: 31.12.1977



Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: The Upjohn Company Kalamazoo,
Michigan (Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania linkomycyny

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania linkomycyny, polegający na przeprowadzaniu hodowli drobnoustroju *Streptomyces spinosus* i jego biotypów w warunkach podwyższonej temperatury.

Opis patentowy St. Zjedn. Ameryki nr 3086912 podaje się sposób wytwarzania antybiotyku zwanego „lincolnensin” (linkomycyna) polegający na przeprowadzaniu hodowli drobnoustroju *Streptomyces lincolnensis* var. *lincolnensis* NRRL 2936 w temperaturze inkubacji 18–40°C, korzystnie w temperaturze 26–30°C. W opisie patentowym St. Zjedn. Ameryki nr 3697380 przedstawiono sposób wytwarzania linkomycyny za pomocą hodowli drobnoustroju *Streptomyces spinosus* Dietz sp. n. NRRL 3890 również w temperaturze inkubacji 18–40°C. Podczas prowadzenia fermentacji sposobami przedstawionymi w wyżej wymienionych opisach patentowych należy stosować znaczne ilości wody oziębiającej w celu utrzymania koniecznej temperatury procesu. Poza tym jakkolwiek utrzymywanie temperatury w zakresie 18–40°C jest niezbędne dla wytwarzania antybiotyku, co przedstawiono w wymienionych powyżej opisach patentowych, to jednak pociąga za sobą rozwój i rozmnożenia drobnoustrojów, zanieczyszczających naczynia fermentacyjne.

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania linkomycyny przez hodowanie drobnoustroju *Streptomyces spinosus* Dietz sp. n. NRRL 3890 oraz jego biotypów NRRL 5729, NRRL 5730 i NRRL 5731 na wodnej pożywce w warunkach fermentacji powietrznej, w temperaturze inkubacji 44–48°C, korzystnie 45°C.

Sposób według wynalazku pozwala uzyskać znacznie wyższe ilości linkomycyny niż ilości uzyskane w temperaturze inkubacji 28°C.

W tablicy 1 przedstawiono porównanie wydajności fermentacji dla drobnoustrojów szczepu *Streptomyces spinosus*, prowadzonych w temperaturze 45 lub 28°C.

Wyniki przedstawione w tablicy 1 są niespodziewane w porównaniu z wiedzą o wytwarzaniu linkomycyny przez szczep *Streptomyces spinosus*. Także nasze próby wykazują, że szczep *Streptomyces lincolnensis* var. *lincolnensis* NRRL 2936 nie wytwarza linkomycyny w czasie hodowli inkubowanej w temperaturze około 45°C.

Tak więc całkowicie niespodziewanie szczep *Streptomyces espinosus* i jego biotypy wytwarzają linkomycynę w czasie hodowli, prowadzonej sposobem według wynalazku w temperaturze inkubacji 44–45°C.

Dodatkową zaletą zastosowania wymienionych drobnoustrojów do wytwarzania linkomycyny oprócz wyższej wydajności antybiotyku, jaką przedstawiono w tablicy 1, stanowi potrzeba stosowania fermentatora o niższej zdolności do oziębiania się, co jest szczególnie cenną zaletą fermentacji, prowadzonej w klimacie o wysokiej temperaturze oraz na obszarze o ograniczonej możliwości zaopatrzenia w wodę ze względu na fakt stosowania zwykle wody jako środka oziębiającego i utrzymującego na pożądanym poziomie temperaturę fermentacji.

Szczepami promieniowców, hodowanymi sposobem według wynalazku w celu wytwarzania linkomycyny, są *Streptomyces espinosus* NRRL 3890 i jego trzy nowe biotypy. Jedną z ich cech charakterystycznych jest zdolność do wytwarzania linkomycyny w czasie hodowli, prowadzonej w temperaturze 44–48°C. Podhodowle tych żyjących drobnoustrojów można uzyskać z kolekcji Northern, Regional Research Laboratories, Agricultural Research Services, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, USA. Oprócz wymienionego powyżej szczepu *Streptomyces espinosus* stosuje się jego następujące biotypy: NRRL 5729, NRRL 5730 oraz NRRL 5731. Taksonomię szczepu *Streptomyces espinosus* NRRL 3890 przedstawiono w opisie patentowym St. Zjedn. Ameryki nr 3697380. Drobnoustrój ten zbadała i scharakteryzowała Alma Dietz z Upjohn Research Laboratories.

Poniżej przedstawia się charakterystykę następujących biotypów: *Streptomyces espinosus* 21987 a, NRRL 5729, *Streptomyces espinosus* biotyp 22061 a, NRRL 5730, *Streptomyces espinosus* biotyp 22149 a, NRRL 5731.

Grzybnia powletrzna wykazuje barwę szaro-zieloną. Oznaczenie melaniny daje wynik ujemny. Wygląd hodowli według Ektachrome (Dietz A. 1954. Ektachrome transparencies as aids in actinomycete classification. Ann. N. Y. Acad. Sci. 60, 152–54) przedstawiono w tablicy 2. Odnosne charakterystyki barwne przedstawiono w tablicach 3 i 4. Uzyskane hodowle można umieścić w serii o barwie zielonej (GN) według oznaczeń Tresnera i Backusa (Tresner H. D. and Backus E.J. 1963. System of color wheels for streptomycete taxonomy. Applied Microbiol. 11, 335–38).

Badania mikroskopowe pozwalają stwierdzić sporofory następujące: krótkie, proste, faliste, spiralne lub o kształcie otwartej spirali (RF, RA, S) według oznaczeń przyjętych przez Pridhama i jego współpracowników (Pridham T. G., Hesseltine C.W. and Benedict R. G. 1958. A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups. Placement of strains in morphological sections. Applied Microbiol. 6, 52–79). Zaobserwowane zarodniki przeważnie kuliste i wykazujące wiele wyraźnych połączeń. Zarodniki powierzchniowe są cierniste do kolczastych według oznaczenia Dietz i Mathews (Dietz A., and Mathews J. 1971. Classification of *Streptomyces* spore surfaces into five groups. Applied Microbiol. 21, 527–533). Niektóre kolce wykazują podobieństwo do włosów. Kolce występują obficie i można je obserwować na sporach, potraktowanych metodą replikacji węglowej Dietz i Mathews (Dietz A. and Mathews J. 1962. Taxonomy by carbon replication. I. An examination of *Streptomyces hygroscopicus*. Applied Microbiol. 10, 258–263).

W tablicy 5 przedstawiono charakterystykę hodowlaną i biochemiczną biotypów. Wpływ związków węgla na wzrost hodowli określano, stosując syntetyczne podłoże według Pridhama i Gottlieba (Pridham T. G., Gottlieb D. 1948. The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination. J. Bacteriol. 56, 52–79) i uzyskane wyniki przedstawiono w tablicy 6, oraz stosując syntetyczne podłoże według Shirlinga i Gottlieba (Shirling E. B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16, 313–40) i uzyskane wyniki przedstawiono w tablicy 7.

Stosując temperaturę inkubacji hodowli 18 i 55°C, uzyskiwano dość dobry wzrost, temperaturę 24°C dobry oraz temperaturę 28–37°C obfity. Inkubując w temperaturze 45°C, uzyskiwano w czasie 24 godzin dość dobry wzrost (wegetatywny) oraz w czasie 72 godzin wzrost obfity (z dobrym zarodnikowaniem). Hodowle prowadzono na podłożu agarowym typu Bennetta, Hickaya – Tresnera (modyfikowany), maltozowotryptonowym oraz zawierającym cukier trzcinowy Czapeka.

Sposobem według wynalazku prowadzono hodowlę szczepu *Streptomyces espinosus* var. *espinosus* Dietz sp.n. NRRL 3890, którego źródłem była gleba z południowo-wschodniego Teksasu.

Hodowlę promieniowca wyizolowano w pracowni badania gleby firmy Upjohn z próbki gleby, pobranej w południowo-wschodnim Teksasie i przedstawiono jako *Streptomyces espinosus* sp. n. w opisie patentowym St. Zjedn. Ameryki nr 3 697 380.

Trzy dodatkowo wyizolowane z gleby pobranej w południowo-wschodnim Teksasie szczepy, wykazują w czasie hodowli identyczne zabarwienie według Ektachrome, jak hodowla typowa. W rozszerzonych badaniach nad wyizolowanymi dodatkowo szczepami stwierdzono, że posiadają one zarówno sporofory i zarodniki, jak również ogólne cechy hodowli, tego samego typu, jak hodowla podstawowa. Wybitnymi cechami charaktery-

stycznymi tych hodowli są: grzybnia powietrzna, zabarwiona szaro-zielono, krótkie sporofory, dające zarodniki pełne kolców, oraz wzrost, wytrzymujący wysokie temperatury. Hodowle te nie są typowymi hodowlami termofilnymi, ponieważ wzrastają w temperaturze około 18°C, podczas gdy drobnoustroje termofilne zwykle wzrastają jedynie w temperaturze powyżej 40°C. Szczepy wyizolowane i stosowane w sposób według wynalazku produkują linkomycynę w temperaturze 45°C.

Różnice w charakterystyce hodowli (patrz tablice) i właściwości antagonistyczne wymienionych powyżej biotypów nie są istotnymi i dostatecznymi kryteriami do wprowadzenia różnych oznaczeń dla tych nowych wyizolowanych drobnoustrojów. Tak więc zostały one określone jako biotypy zgodnie z Rule 8, Recommendation 8a (3/Type) (termin biotyp/typ fizjologiczny) stosuje się dla podgatunkowych form w oparciu o różnice w charakterystykach fizjologicznych lub biochemicznych/ z International Code of Nomenclature of Bacteria (International Code of Nomenclature of Bacteria. 1966. Wydany przez Editorial Board of the Judicial Commission of the International Committee on Nomenclature of Bacteria. Intern. J. System. Bacteriol. 16, 459–90). Wyizolowane szczepy określono jako *Streptomyces espinosus* biotyp 21 987 a, *Streptomyces espinosus* biotyp 22 061 a oraz *Streptomyces espinosus* biotyp 22 149 a.

Sposobem według wynalazku linkomycynę wytwarza się przy użyciu nowych drobnoustrojów, w czasie hodowli na wodnej pożywce, w warunkach napowietrznej fermentacji głębinowej. Oczywiście dla uzyskania określonych ilości linkomycyny stosuje się hodowle powierzchniowe i w kolbach. Drobnoustrój wzrasta na pożywce, zawierającej źródło węgla, na przykład asymilujące się węglowodany oraz źródło azotu, na przykład asymilujące się związki azotu lub materiał białkowy. Jako źródła węgla korzystnie stosuje się glukozę, nierafinowany cukier, sacharozę, glicerynę, skrobię, skrobię kukurydzianą, laktozę, dekstrynę, melasę i tym podobne. Jako źródła azotu korzystnie stosuje się wyciąg z kukurydzy, drożdże, rozpuszczone drożdże browarnicze zmieszane z suchą masą mleka, mączką sojową, mączką z nasion bawełny, mąkę kukurydzianą, suchą masę mleka, kazeinę przetrawioną wyciągiem z trzuskki, suchą masę po destylacji gorzelnianej, roztwór peptonu zwierzęcego, mączkę rybną, odpadki mięsa i kości oraz tym podobne. Korzystnie stosuje się mieszaninę wyżej wymienionych źródeł węgla i azotu. Do podłoża fermentacyjnego nie dodaje się, stosowanych zwykle śladowych ilości takich metali, jak cynk, magnez, mangan, kobalt, żelazo i tym podobnych. Stosuje się natomiast wodę wodociągową i nieoczyszczone inne składniki pożywki.

Sposobem według wynalazku, linkomycynę wytwarza się w czasie hodowli, prowadzonej w temperaturze 44–48°C, korzystnie 45°C. Zwykle optymalne wytwarzanie antybiotyku uzyskuje się w okresie 2–10 dni. W czasie fermentacji podłoże wykazuje zwykle odczyn zasadowy. Końcowa wartość pH podłoża zależy częściowo od obecnych w nim związków buforowych, zaś częściowo od początkowej wartości pH podłoża hodowlanego.

Jeżeli hodowlę prowadzi się w dużym naczyniu lub w tanku fermentacyjnym, to korzystnie do zaszczepienia stosuje się fermę wedetatywną, a nie zarodnikową. Zastosowanie inokulacji pozwala unikać opóźnień w wytwarzaniu linkomycyny i towarzyszącego mu niewydajnego wykorzystania aparatury. W tym celu wytwarza się inokulum wegetatywne na wzrostowej pożywce hodowlanej za pomocą inokulacji tej wzrastającej hodowli po wyizolowaniu jej z gleby lub z hodowli na skosach. Tak wyhodowane młode, aktywne, wegetatywne inokulum przeprowadza się aseptycznie do dużych naczyń lub tanków fermentacyjnych. Inokulum wegetatywne wytwarza się na podłożu identycznym lub różnym z podłożem, stosowanym do wytwarzania linkomycyny, w zależności od tego, kiedy uzyskuje się dobry wzrost drobnoustrojów.

Sposobem według wynalazku linkomycynę izoluje się identycznie, jak sposobem przedstawionym w opisie patentowym St. Zjedn. Ameryki nr 3086912.

Korzystny sposób izolacji linkomycyny z podłoża hodowlanego polega na oddzieleniu, za pomocą znanych metod takich, jak sączenie i wirowanie, grzybni i nierozpuszczalnych ciał stałych od ciekłych składników brzoćki. Przesącz lub odwirowany roztwór przeprowadza się przez warstwę niejonowej żywicy, zbudowanej z kopolimeru styrenu, związanego krzyżowo z dwuwinylobenzenem. Żywice tego typu przedstawiono w opisie patentowym St. Zjedn. Ameryki nr 3515717. Przykładem takiej żywicy jest Amberlite XAD–2. Zaadsorbowaną na żywicy linkomycynę wymywa się metanolem, zmieszany z wodą w stosunku objętościowym 95 : 5. Biologicznie aktywne frakcje oznacza się mikrobiologiczną metodą za pomocą krążków przy użyciu drobnoustroju testowego *Sarcina lutea*. Frakcje, wykazujące aktywność biologiczną, łączy się, oddestylowuje z nich metanol, a uzyskany roztwór wodny poddaje liofilizacji. Otrzymany liofilizat uciera się z chlorkiem metylenu. Z uzyskanego ekstraktu oddestylowuje się chlorek metylenu, a pozostałość uciera z acetonem i sączy. Przesącz uciera się z eterem, a wytrącony osad odsącza. Otrzymany kolejny przesącz miesza się z 1 n roztworem chlorowodoru w metanolu, uzyskując chlorowodorek linkomycyny w postaci bezbarwnego osadu. Osad ten odsącza się i krystalizuje ponownie z mieszaniny woda-aceton, uzyskując krystaliczny chlorowodorek linkomycyny.

Poniżej podano przykład, który nie ogranicza jednak zakresu wynalazku. Wszystkie procenty przedstawia się jako procenty wagowe, zaś wszystkie części ciekłych mieszanin jako części objętościowe, jeżeli nie podaje się innego oznaczenia.

Przykład I. Skos gleby, zawierający *Streptomyces espinosus* NRRL 3890 stosuje się do inokulacji kolby Erlenmeyera o pojemności 500 ml, zawierającej 100 ml sterylnego podłoża posiewowego, przygotowanego z następujących składników:

jednowodziań glukozy	25 g/litr
Pharmamedia*	25 g/litr
woda wodociągowa	uzupełnienie
wstępna sterylizacja	pH = 7,2

* Pharmamedia oznacza przemysłowy, uszlachetniony wyciąg z nasion bawełny, produkowany przez firmę Traders Oil Mill Company, Fort Worth, Texas.

Kolby poddaje się inkubacji, w czasie 3 dni w temperaturze 28°C, na wytrząsarce obrotowej.

Uzyskane inokulum stosuje się do inokulacji serii kolb fermentacyjnych Erlenmeyera o pojemności 500 ml, zawierających po 100 ml sterylnego podłoża, przygotowanego z następujących składników:

Kaysoy*	35 g/litr
mleko odtłuszczone	10 g/litr
bulion Czapeka Dox**	10 g/litr
CaCO ₃	3 g/litr
Ucon LB-625***	20 ml/litr
wstępna sterylizacja	pH = 7,2

* Drobnio zmielona, pozbawiona tłuszczu mączka sojowa, dostarczona przez firmę Archer Daniels Midland Company 735 Marquette Avenue, Minneapolis, Minnesota.

** Dostarczony przez firmę Difco Laboratories, Detroit, Michigan.

*** Glikol polialkilenowy – płyn gaszący pienienie, dostarczony przez firmę Union Carbide Corp., Chemicals Division, 10 421 W. 7 Mile Road, Detroit, Michigan 48 221

Każdą kolbę szczepi się 5 ml inokulum posiewowego na 100 ml podłoża fermentacyjnego. Niektóre kolby inkubuje się w temperaturze 28°C, zaś inne w temperaturze 45°C, na wytrząsarce obrotowej, pracującej z szybkością 250 obrotów/minutę, z promieniem mimośrodowym 2,5".

Sposób postępowania, opisany powyżej dla *Streptomyces espinosus* NRRL 3890, powtarza się dla biotypów, opisanych powyżej. Wyniki tak prowadzonych fermentacji przedstawia tablica 1.

Całą brzeczkę fermentacyjną o objętości około 4 litrów, otrzymaną sposobem, opisanym powyżej, przesącza się przez warstwę ziemi okrzemkowej. Placek filtracyjny przemycia się wodą w ilości 1 litra i wodę, uzyskaną z przemycia, łączy z przesączem, uzyskując roztwór, który nazywa się „jasne piwo”. Placek filtracyjny uciera się dwukrotnie z 700 ml porcjami metanolu, otrzymując roztwór metanолоwy. Uzyskane powyżej „jasne piwo” przeprowadza się przez kolumnę wypełnioną 250 ml Amberlite XAD-2, stosując szybkość przepływu 25 ml/minutę. Wyciek z kolumny zbiera się jako jedną frakcję (roztwór zużyty). Wypełnienie kolumny przemycia się 500 ml wody. Uzyskany wodny roztwór z przemycia gromadzi się w jednej frakcji (przemycie). Następnie kolumnę eluuje się 95% wodnym roztworem metanolu i zbiera frakcje o objętości 20 ml. Wyniki oznaczenia aktywności biologicznej (próby przeciwko wrażliwemu szczepowi *Sarcina lutea*) przedstawiono w tablicy 8.

Frakcje, oznaczone liczbami 6–80, łączy się. Z uzyskanego roztworu oddestylowuje się rozpuszczalnik i uzyskuje 3,5 g suchej pozostałości, zawierającej 310 mcg linkomycyny/mg. Substancję tę uciera się z chlorkiem metylenu, odsącza i z przesączu oddestylowuje rozpuszczalnik. Uzyskaną suchą pozostałość uciera się z acetonem, sączy i przesącz miesza z eterem. Otrzymany osad odsącza się, zaś przesącz miesza z 1 n metanолоwym roztworem chlorowodoru i uzyskuje bezbarwny osad chlorowodoru. Osad ten odsącza się i krystalizuje z mieszaniny wody i acetonu, otrzymując krystaliczny chlorowodorek linkomycyny.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania linkomycyny przez hodowanie szczepu *Streptomyces espinosus* NRRL 3890 na wodnej pożywie, w warunkach fermentacji powietrznej, z n a m i e n n y t y m, że szczep *Streptomyces espinosus* NRRL 3890 hoduje się w temperaturze inkubacji 44–48°C dotąd, aż w wyniku wytworzenia linkomycyny uzyska się znaczną aktywność antybiotyczną podłoża.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że fermentację prowadzi się w temperaturze inkubacji 45°C.

3. Sposób wytwarzania linkomycyny przez hodowanie szczepu *Streptomyces espinosus* na wodnej pożywie, w warunkach fermentacji powietrznej, z n a m i e n n y t y m, że szczep *Streptomyces espinosus* biotyp 21987a NRRL 5729 hoduje się w temperaturze inkubacji 44–48°C, aż w wyniku wytwarzania linkomycyny uzyska się znaczną aktywność antybiotyczną podłoża.

4. Sposób według zastrz. 3, z n a m i e n n y t y m, że fermentację prowadzi się w temperaturze inkubacji 45°C.

5. Sposób wytwarzania linkomycyny przez hodowanie Szczepu *Streptomyces espinosus* na wodnej pożywce, w warunkach fermentacji powietrznej, z n a m i e n n y t y m, że szczep *Streptomyces espinosus* biotyp 22061a, NRRL 5730 hodzi się w temperaturze inkubacji 44–48°C dotąd, aż w wyniku wytworzenia linkomycyny uzyska się znaczną aktywność antybiotyczną podłoża.

6. Sposób według zastrz. 5, z n a m i e n n y t y m, że fermentację prowadzi się w temperaturze 45°C.

7. Sposób wytwarzania linkomycyny przez hodowanie szczepu *Streptomyces espinosus* na wodnej pożywce w warunkach fermentacji powietrznej, z n a m i e n n y t y m, że szczep *Streptomyces espinosus* biotyp 22 149a NRRL 5731 hodzi się w temperaturze 44–48°C dotąd aż w wyniku wytworzenia linkomycyny uzyska się znaczną aktywność antybiotyczną podłoża.

8. Sposób według zastrz. 7, z n a m i e n n y t y m, że fermentacji prowadzi się w temperaturze 45°C.

Tablica I

Wytwarzanie linkomycyny przez wytrzymujące wysokie temperatury
szczepu *Streptomyces espinosus*

Biotyp	Temperatura	Dni	pH	Linkomycyna $\mu\text{g/ml}$ *
22,149 a	28°C	1	7,7	0
		2	8,7	7
		3	9,0	9
		4	9,0	23
		5	9,0	38
NRRL 5731	45°C	1	8,6	17
		2	9,2	24
		3	9,0	60
		4	8,8	60
		5	8,8	110
S. espinosus	28°C	1	7,8	2
		2	8,8	—
		3	8,9	8
		4	9,0	17
		5	9,1	23
NRRL 3890 (hodowla typowa)	45°C	1	8,8	13
		2	8,7	7
		3	8,8	59
		4	8,5	95
		5	8,3	147
21,987 a	28°C	1	8,1	2
		2	8,6	6
		3	9,0	2
		4	9,0	8
		5	9,1	13
NRRL 5729	45°C	1	8,3	10
		2	9,1	12
		3	8,9	30
		4	8,7	36
		5	8,7	48
22,061 a	28°C	1	7,9	Ślady
		2	8,7	4
		3	9,0	5
		4	9,0	14
		5	9,0	19
NRRL 5730	45°C	1	8,8	Ślady
		2	9,1	30
		3	8,9	33
		4	8,9	54
		5	8,8	76

* / Standard linkomycyny (drobnoustrój testowy – *Sarcina lutea*, bufor rozcieńczający – 0,1 M bufor fosforanowy, pH = 7,0, ATCC 9341, UC 130)

Wszystkie fermentacje prowadzono przy zastosowaniu identycznych warunków posiewu i podłoża fermentacyjnego. Stosowany skład podłoża i inne warunki posiewu i fermentacji przedstawiono w przykładzie I.

Tablica 2

Wygląd hodowli *Streptomyces* *espinosus* według Ektachrome

Podłoże agarowe	—	NRRL 3890	NRRL 5729	NRRL 5730	NRRL 5731
Bennetta	S	szaro-zielona	szaro-zielona	szaro-zielona	szaro-zielona
	R	bladożółto-brązowa	bladożółto-brązowa	bladożółta	bladożółto-brązowa
Cukier trzcinowy Czapeka	S	szaro-zielona	szaro-zielona	szaro-zielona	szaro-zielona
	R	bladoszara	bladoszara	bladoszara	bladoszara
Maltozowbtryptonowe	S	szaro-zielona	szaro-zielona	szaro-zielona	szaro-zielona
	R	żółto-brązowa do oliwkowej	żółto-brązowa do oliwkowej	żółta	żółto-brązowa
Peptononowo-żelazowa	S	biała	biała	biała	biała
	R	żółta	żółta	żółta	żółto-brązowa
0,1% tyrozyna	S	bezbarwna	bezbarwna	bezbarwna	szaro-zielona
	R	czerwona	czerwona	czerwona	czerwona
Kazeinowo-skrobiowe	S	szaro-zielona	szaro-zielona	szaro-zielona	szaro-zielona
	R	bladoszaro-zielona	bladoszaro-zielona	bladoszaro-zielona	bladoszaro-zielona

S = grzybnia powierzchniowa

R = grzybnia podstawowa

Tablica 3

System barwnej charakterystyki hodowli *Streptomyces* *espinosus*

Podłoże agarowe ^a	Color Harmony Manual, 3rd ed. 1948 (1) ^b					NBS Circular 553, 1955 (2) ^c				
	NRRL 3890	NRRL 5729	NRRL 5730	NRRL 5731	NRRL 3890	NRRL 5729	NRRL 5730	NRRL 5731		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bennetta	S	a	a	a	24 1/2fe	263 gm	263 gm	263 gm	122 gm	
		24 1/2fe	24 1/2ih	24 1/2ih		122 gm	122 m	122 m		
		1 1/2ge	1 ge			109 gm	127 g	127 g		
							109 gm			
	R	1 1/2ca	1 1/2ca	1 1/2gc	2ec	89 gm	89 gm	102 g	90 gm	
		2fb	2fb		1 1/2ec	87 g	87 g	105 gm	90 gm	
		2ec	2ec			89 m	89 m		93 m	
						90 gm	90 gm			
	P	—	—	—	—					
Zawierające cukier trzcinowy Czapeka	S	1li	1li	2ig	2ig	110 gm	110 gm	110 g	110 g	
		2ig	2ig			110 g	112 m	112 m	112 m	
	R	1ec	1ec	2fe	1ec	112 m	112 m	94 g	121 m	
		2ig	2ig			121 m	121 m	112 gm	122 g	
						122 g	122 g			
						110 g	110 g			
	P	—	—	—	—	112 m	112 m			
Maltozowo-tryptonowe	S	1ig	24 1/2fe	3ba	24 1/2fe	109 gm	122 gm	—	122 gm	
		1 1/2ge	1ih	24 1/2ih		110 g	112 m	122 m		
		1ih				109 gm	113 g	127 g		
						112 m				
						113 g				
	R	2ge	2gc	2ic	1 1/2ie	90 gm	90 gm	87 gm	106 gm	
		2ec	1 1/2ge			90 gm	109 gm			
		2gc				90 gm				
		1 1/2ge				109 gm				
	P	—	—	—	—					
Hickeya-Tresnera (zmodyfikowane)	S	1ig	1ig	3ba	24 1/2ih	109 gm	109 gm	—	122 m	
				24 1/2ih		110 g	110 g	127 g	127 g	
	R	2gc	2ec	2gc	2gc	90 gm	90 gm	90 gm	90 gm	
	P	—	—	—	—					
Stodowo-drożdżowe (ISP-2)	S	24 1/2ih	24 1/2ih	24 1/2ih	24 1/2ih	122 m	122 m	122 m	122 m	
		2ih	2ih			127 g	127 g	127 g	127 g	
						122 m	122 m			
						113 g	113 g			
	R	21e	2gc	21e	2gc	88 gm	90 gm	88 gm	90 gm	
		2gc	2ie			94 g	91 gm	94 g		
						90 gm	94 g			
	P	—	—	—	—					

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Owslane (ISP - 3)	S	1ig 1 1/2ig	1ig 2fe	24 1/2fe	24 1/2ih	109 gm 110 g —	109 gm 110 g 94 g 112 gm	122 gm	122 gm
	R	1ec 1 1/2ge	1ec 2ec	2ec	2ec	121 m 109 gm	121 m 90 gm	90 gm	90 gm
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
Zawierające sole nieorganiczne i skrobię (ISP-4)	S	24 1/2ih 3ih	24 1/2ih 1ih	24 1/2ih	24 1/2ih	122 m 113 g 265 m	122 m 112 m 113 g	122 m	122 m
	R	2ca 2gc	2gc	2gc	2ec	89 gm 90 gm	90 gm	90 gm	90 gm
	P	2ec	2ec	2ec	2lg	90 gm	90 gm	90 gm	110 g 112 m
xGlicerynowo- asparaginowe (ISP - 5)	S	1ig 2ih	a 2fe	3ba 24 1/2fe	1 1/2ig	109 gm 110 g 112 m 113 g	263 gm 94 g 112 gm	— 122 gm	—
	R	1ec 2ge	2gc 2ge	2ge	2ge	121 m 122 g 94 m 109 gm	90 gm 94 m 109 gm	94 m 109 gm	94 m 109 gm
	P	2ge	—	—	—	—	—	—	—

a S = grzybnia powierzchniowa, R = grzybnia podstawowa, P = pigment

b Odczyt ze skrawka błyszczącej grzybni powierzchniowej

c Skrawek grzybni powierzchniowej: m (matowa), g (błyszcząca), gm (matowa lub błyszcząca)

(1) Jacobson, E., W.C. Granville, and C.E. Foss. 1948. Color harmony manual, 3rd ed. Container Corporation of America Chicago, Illinois.

(2) Kelly, K.L., and D.B. Judd. 1955. The ISCC-NBS method of designating colors and a dictionary of color names. U.S. Dept. Comm. Circ. 553.

Tablica 4

Zestaw barw stosowanych w tablicy 3

Color Harmony Manual 3rd ed., 1948 (1)		NBS Circular 553, 1955 (2)	
Oznaczenie barwy	Nazwa barwy	Oznaczenie barwy	Nazwa barwy
1	2	3	4
a	biała	263 gm	biała
1ec	jasnocytrynowo-szara, kit	121 m	bladożółto-zielona
		122 g	szaro-żółto-zielona
1ge	cytrynowo-szara	109 gm	jasnoszaro-oliwkowa
1ig	oliwkowo-szara	109 gm	jasnoszaro-oliwkowa
		110 g	szaro-oliwkowa
1ih	oliwkowo-szara	112 m	jasnooliwkowo-szara
		113 g	oliwkowo-szara
		127 g	szaro-oliwkowo-zielona
1ii	jasnooliwkowa-jasnobrunatna	110 gm	szaro-oliwkowa
11/2ca	kremowa	89 gm	bladożółta
11/2ec	jasnobrązowa, barwa niebielonego płótna, barwa owsianki, barwa piasku	90 gm	szaro-żółta
		93 m	żółtoszara
11/2gc	brudnożółta	102 g	umiarkowanie-zielono-żółta
		105 gm	szaro-zielono-żółta
11/2ge	jasnooliwkowo-szara	109 gm	jasnoszaro-oliwkowa
11/ie	jasnooliwkowa	196 gm	jasnooliwkowa
11/2ig	oliwkowo-szara	—	—
2ca	jasna barwa skorupki jajka lub kości słoniowej	89 gm	bladożółta
2ba	jasna barwa pszenicy lub jasna barwa kukurydzy	86 gm	jasnożółta
2ec	jasnobrązowa, barwy niebielonego płótna, barwa owsianki, barwa piasku	90 gm	szaro-żółta
2fb	barwa bambusa, ciemnożółta, słomkowa, barwa skorupki jajka	87 g	umiarkowanie żółta
		89 m	bladożółta

1	2	3	4
21e	szara	94 g	jasnooliwkowo-brązowa
		122 gm	jasnooliwkowo szara
2gc	barwa bambusa, irchy	90 gm	szaro-żółta
2ge	jasnobrunatna, griega	94 m	jasnooliwkowo-brązowa
		109 gm	jasnoszaro-oliwkowa
2ic	miodowo-złota, jasnożółta	87 gm	umiarkowanie żółta
2ie	jasnomusztardowa, jasnobrunatna	91 gm	ciemnoszaro-żółta
		94 g	jasnooliwkowo-brązowa
		106 g	jasnooliwkowa
2ig	barwa dachówek, jasnobrunatna	110 g	szaro-oliwkowa
		112 m	jasnooliwkowo-szara
2ih	ciemnoszara	112 m	jasnooliwkowo-szara
		113 g	oliwkowo-szara
21e	musztardowa, starego złota	88 gm	ciemnożółta
3ba	perłowa, odcień muszli	94 g	jasnooliwkowo-brązowa
3ih	beżowoszara, mysia	113 g	oliwkowo-szara
		265 m	średnioszara
241/2fe	jasna barwa jemiołowo-szara	122 gm	szaro-żółto-zielona
241/2ih	jemiołowo-szara	122 m	szaro-żółto-zielona
		127 g	szaro-oliwkowo-zielona

(1) Jacobson E., Granville W.C. and Foss C.E. 1948 Color harmony manual, 3 rd ed. Container Corporation of America, Chicago, Illinois.

(2) Kelly K.L., and Judd D.B. 1955. The ISCC — NBS method of designating colors and a dictionary of color names. U.S. Dept. Comm. Circ. 553.

T a b l i c a 5

Hodowlana i biochemiczna charakterystyka
hodowli *Streptomyces epinosus*

Podłoże	NRRL 3890	NRRL 5729	NRRL 5730	NRRL 5731
1	2	3	4	6
Agar				
Peptonowo-żelazowy	S szaro-biała	szaro-biała	szaro-biała	szaro-biała
	do szaro-zielonej	do szaro-zielonej	szaro-zielono-biała	
	R żółta	żółta	żółta	żółta
	O melanina ujemna	melanina ujemna	melanina ujemna	melanina ujemna
	S dość dobra	śladowa	śladowa	śladowa
zawierający jabłczan wapniowy	do dobrej szaro- zielona	szaro-zielona	szaro-zielona	szaro-zielona
	R bladoszara	bladoszara	bladoszara	bladoszara
	O jabłczan	jabłczan	jabłczan	jabłczan
glukozowo- asparaginowy	nie rozpuszcza się	nie rozpuszcza się	nie rozpuszcza się	nie rozpuszcza się
	S szaro-biała	szaro-biała	dość dobra	dość dobra
	do szaro-żółtej	ze śladami zielonej	szaro-biała	szaro-biała
z mleka odtłuszczonego	R jasnożółta	kremowa	kremowa	kremowa
	do kremowej			
	S biała na brzegach	biała na brzegach	biała na brzegach	biała na brzegach
	do jasno-szaro- zielono-żółtej	do jasno-szaro- zielono-żółtej		
	R głęboko-żółta do żółto-jasnobrunatnej	żółto-jasnobrunatna	żółto-jasno-brunatna	żółto-jasno-brunatna
tyrozynowy	O pigment	pigment	pigment	pigment
	o barwie żółtej do żółto-jasno brunatnej	o barwie żółto- jasnobrunatnej	o barwie żółto- jasnobrunatnej	o barwie żółto- jasnobrunatnej
	kazeina rozpuszcza się w czasie wzrostu całkowicie		kazeina rozpuszcza się w czasie wzrostu całkowicie	
	S dobra do obfitej	dobra do obfitej	dobra szaro-zielona	dobra szaro-zielona
	szaro-zielona	szaro-zielona		
	R czerwono-jasnobrunatna do czerwono- brązowej		czerwono-jasnobrunatna	
	O pigment o barwie czerwono-jasnobrunatnej do czerwono-brązowej		pigment o barwie czerwono-jasnobrunatnej	

1	2	3	4	5	6
ksantynowy	S tyrozyna rozpuszcza się dobra o barwie szaro-zielonej do dobrej tylko na obrzeżach		tyrozyna rozpuszcza się dobra o barwie szaro-zielonej		
	R bladeżółta do kremowej	bladeżółtozielona do kremowej	kremowa		kremowa
	O Ksantyna nie rozpuszcza się				
skrobiowy	S dobra, szaro-zielona	dobra, szaro-zielona	dobra, szaro-zielona		dobra, szaro-zielona
	R kremowo-oliwkowa	kremowo-oliwkowa	kremowo-oliwkowa		kremowo-oliwkowa
	O skrobia hydrolizuje	skrobia hydrolizuje	skrobia hydrolizuje		skrobia hydrolizuje
słodowo-drożdżowy	S dobra do obfitej szaro-zielonej	dobra szaro-zielona	dobra szaro-zielona		dobra szaro-zielona
	R bladeżółtojasno- brunatna do kremowo- żółto-jasno- brunatnej	kremowo-żółto-jasnobrunatna			
Benneta	S kremowa do obfitej szaro-zielonej	szaro-zielono-biała do obfitej szaro- zielonej	śladowo szaro- kremowa		kremowa
	R żółta do oliwkowej	żółta do oliwkowej	żółta		żółta
zawierający cukier trzcinowy Czapek'a	S szaro-zielona	szaro-zielona	szaro-zielona		szaro-zielona
	R szaro-zielona	szaro-zielona	szaro-zielona		szaro-zielona
maltozowo- tryptonowy	S obfita szaro-zielona	dobra do obfitej szaro-zielona	szaro-zielono- biała		bladoszaro-zielona
	R oliwkowa do pomarańczowo-żółtej	oliwkowa do kremowej	żółta		żółto-oliwkowa
Hickeya-Tresnera (modyfikowany)	S obfita, szaro-zielona	obfita, szaro-zielona	szaro-zielono-biała		szaro-zielona
	R oliwkowo- pomarańczowa	kremowa	głębokożółto- jasnobrunatna		żółto-oliwkowa
peptonowo-drożdżowo- żelazowy (ISP - 6)	S kremowa do bladoróżowej	bladoróżowa do szarozielonej	kremowa do bladoróżowej		kremowa ze śladami szaro- zielonej do blad- oróżowej
	O melanina ujemna	melanina ujemna	melanina ujemna		melanina ujemna
	S szaro-zielono-biała do szaro-zielonej	szaro-zielono-biała do szaro-zielonej	szaro-zielona		szaro-zielona
	R bladeżółtozielona do jasnobrunatnej	bladeżółtozielona do jednobrunatnej	szaro-kremowa		szaro-kremowa
	O melanina ujemna	melanina ujemna	melanina ujemna		melanina ujemna
żelatyna Zwykła	O grzybnia wegetatywna bezbarna do grzybni powietrznej o barwie szaro- białej, upywnianie 1/2 do całkowitego	grzybnia wegetatywna bezbarna do grzybni powietrznej o barwie szaro- białej, upywnianie 1/2 do całkowitego	grzybnia powietrzna o barwie szaro- białej, upywnianie całkowite		grzybnia powietrzna o barwie szaro- białej, upywnianie całkowite
Odżywcza	O grzybnia powietrzna o barwie szaro-białej, upywnianie 1/3 do całkowitego		grzybnia powietrzna o barwie szaro- białej, upywnianie całkowite		grzybnia powietrzna śladowa o barwie szaro-białej upywnianie całkowite
Bullon Azotanowy syntetyczny	O na powierzchni błonki grzybni powietrzna o barwie białej do różowo- kremowej, wzrost poprzez podłoże azotany nie redukują się do azotynów	na powierzchni błonki śladowy wzrost grzybni powietrznej o barwie białej do różowo- kremowej wzrost poprzez podłoże azotany nie redukują się do azotynów	na powierzchni błonki śladowa grzybni powietrzna o barwie białej wzrost poprzez podłoże, azotany nie redukują się do azotynów		na powierzchni błonki śladowa grzybni powietrzna o barwie białej, śladowy wzrost poprzez podłoże azotany nie redukują się do azotynów
Azotanowy odżywczy	O na powierzchni błonki grzybni	na powierzchni błonki grzybni	na powierzchni błonki grzybni		na powierzchni błonki śladowa

1	2	3	4	5	6
	powietrzna o barwie szaro-zielono-białej na dnie grzybnia kłaczkowata, ani azotany ani azotyny nie występują w podłożu lub azotany nie redukują się do azotynów		na dnie grzybnia kłaczkowata, azotany nie redukują się do azotynów		grzybnia powietrzna o barwie białej, zbita kłaczkowata grzybnia na dnie, azotany nie redukują się do azotynów
Mleko lakmusowe	O	grzybnia powietrzna o barwie kremowej do zielonej wzrasta na grzybni powierzchniowej o kształcie pierścieni o barwie żółtej do jasnobrunatnej, lakmus redukuje się, zachodzi peptonizacja, pH = 7,3	na pierścieniach grzybni powierzchniowej wzrasta grzybnia powietrzna o barwie różowo-jasnobrunatnej do szaro-zielonej, lakmus redukuje się, zachodzi peptonizacja, pH = 7,3	na pierścieniach grzybni powierzchniowej wzrasta grzybnia powietrzna o barwie jasnobrunatnej, lakmus redukuje się, zachodzi peptonizacja, pH = 7,3	na pierścieniach grzybni powierzchniowej wzrasta grzybnia powietrzna o barwie zielono-białej, zachodzi częściowa redukcja lakmusu, zachodzi częściowa peptonizacja, pH = 7,3

S = grzybnia powierzchniowa

R = grzybnia podstawowa

P = pigment

O = Inne cechy charakterystyczne

T a b l i c a 6

Wykorzystanie związków węgla przez szczep *Streptomyces espinosus* w czasie hodowli na syntetycznym podłożu według Pridhama i Gottlieba^{1/}

	NRRL 3890	NRRL 5729	NRRL 5730	NRRL 5731
Związek oznaczany	/+/*	/-/*	/+/*	/+/*
1 D-Ksyloza	+	+	+	+
2 L-Arabinnoza	+	+	+	+
3 Ramnoza	+	+	+	+
4 D-Fruktoza	+	/+/,+	+	+
5 D-Galaktoza	+	+	+	+
6 D-Gluktoza	+	+	+	+
7 D-Mannoza	+	+	+	+
8 Maltoza	+	+	+	+
9 Sacharoza	/+/*	/-/,+/*	/+/*	/+/*
10 Laktoza	+	+	+	+
11 Cellobioza	+	+	+	+
12 Rafinoza	/+/*	/-/*	/+/*	/+/*
13 Dekstryna	+	+	+	+
14 Inulina	/+/, -/*	/-/*	/+/*	/+/*
15 Rozpuszczalna skrobia	+	+	+	+
16 Gliceryna	+	+	+	+
17 Ductol	/+/, -/*	/-/*	/+/*	/+/*
18 D-Mannitol	+	+	+	+
19 D-Sorbitol	+, -/*	/-/*	+	+
20 Inositol	+	/+/*	+	+
21 Salicln	/+/*	/+/*	+	/+/*
22 Fenol	/+/, -/*	/-/*	/+/*	/+/*
23 Kresol	-	-	-	-
24 mrówczan sodu	/+/, -	/-/-	/+/*	/+/*
25 szczawian sodu	/+/, -/*	/+/, -/*	/+/*	/+/*
26 winian sodu	/+/, -/*	/-/-	/+/*	/+/*
27 salicylan sodu	-	-	-	-
28 octan sodu	/+/*	/+/*	/+/*	/+/*
29 cytrynian sodu	+	/+/*	+	/+/*
30 bursztynian sodu	/+/, -/*	/-/*	/+/*	/+/*

^{1/} Pridham, T.G., and D. Gottlieb, 1948, The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination, J. Bacteriol. 56 : 107-114.

- + Dobre wykorzystanie
- /+/ Słabe wykorzystanie
- /-/ Wykorzystanie wątpliwe
- Brak wzrostu
- * Wyniki z różnych badań

Tablica 7

Wykorzystanie związków węgla przez szczep *Streptomyces espinosus* w czasie hodowli na syntetycznym podłożu według Shirlinga i Gottlieba /1/

	NRRL 3890	NRRL 5729	NRRL 5730	NRRL 5731
Związek oznaczony				
Podłoże podstawowe, nie- zawierające związków węgla	±*	-, +	±	±
Podłoże podstawowe zawierające glukozę	+	+	+	+
Związki węgla				
L-Arabinosa	±, ++	±, +	±	±
Sacharoza	-	±, -	-	-
D-Ksyloza	++	±, ++	++	++
Inositol	++	±, +	++	++
D-Mannitol	++	++	++	++
D-Fruktoza	++	±, +	++	++
Ramnoza	++	++	++	++
Rafinoza	-	-	-	-
Celuloza	+, ++	±, -	+	+

/1/ Shirling, E.B., and D. Gottlieb, 1966 Methods for characterization of *Streptomyces* species, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16 : 313 - 340.

- ++ Silne wykorzystanie
- + Dodatnie wykorzystanie
- ± Wątpliwe wykorzystanie
- Brak wykorzystania
- * Wyniki z różnych badań.

Tablica 8

	Strefa zahamowania wzrostu (mm)
Jasne piwo	38
Roztwór zużyty	19
Przemycie	20
Fracje numer:	20
2	18
4	14
5	14,5
6	36
7	49
9	52
10	51
12	47
14	43
16	40
19	37
20	34
25	35
30	29
35	30
40	27
45	26
50	24
55	28
60	24
65	19
70	11
75	-

1	2
80	11,5
85	ślady
90	ślady
95	0
100	10