

Františka Palečková a Jan Nečásek:

## Přelévací metoda pro selekci produkčních kmenů *Streptomyces griseus*

Výzkumný ústav antibiotik, Roztoky u Prahy

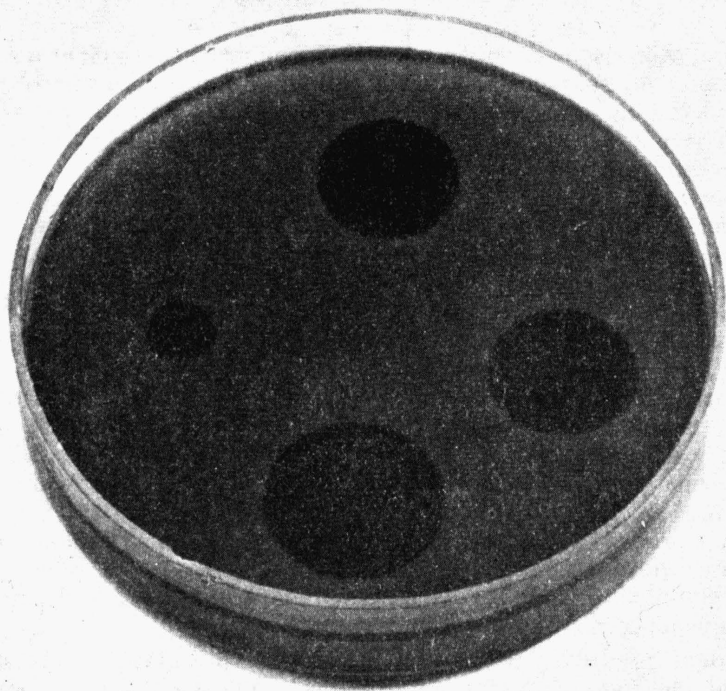
Pronikavá variabilita aktinomycet je skutečností, se kterou nutno neustále počítat zejména tehdy, sledujeme-li jejich antibiotické vlastnosti. Tato proměnlivost zpravidla podmiňuje nejen heterogenitu normálních laboratorních kultur, ale i heterogenitu pečlivě udržovaných kmenů produkčních. V těchto případech se projevuje v první řadě přítomností většího nebo menšího podílu méně produktivních nebo neproduktivních variant v aktivním kmeni, jehož schopnost produkovati příslušné antibiotikum je tím více nebo méně snižována.

Potížím, které jsou spojeny se stoupáním heterogenity kultur a z ní vyplývající sníženou produktivitou, je možno se brániti několika způsoby. V první řadě se vyhýbáme sporovému přeočkování kultur, protože při takovémto pasážování jsou dány možnosti ke vzniku a přerůstání méně produktivních nebo neproduktivních složek kultury (Krasilnikov 1950). Kultury je nutno pěstovati za takových podmínek, které nedovolí vzniknout a nahromadit se nežádoucím variantám, to jest na vhodných půdách a v patřičných ostatních podmínkách vnějšího prostředí. Důležitým faktorem jest dostatečná mohutnost sporového inokula (Foster 1949). S nežádoucím produkčním heterogenitou se však shledáváme v častých případech i tehdy, kdy pracovní postup je tak dokonalý, jak jen za dané situace možno. V těchto případech je pak nejschůdnějším postupem selekce kmene, jejímž cílem jest nalézt izolát, který vykazuje produkčně nejvýhodnější vlastnosti. Selekcího postupu používáme přirozeně i tehdy, chceme-li se pokusit o zvýšení produktivity u kmenů, u nichž její pokles podmíněný heterogenitou dosud nenastal. Krasilnikov (1950) doporučuje provádění několikrát po sobě opakovaného výběru. V takovém případě se pak jedná o zhodnocení tvorby antibiotika u početného souboru isolátů, což je při obvyklém pracovním postupu (submersní fermentací a titrací antibiotika ve fermentační kapalině) úkolem nákladným jak s hlediska časového, tak finančního. Proto k tomu účelu navrhuje zavedení předběžného výběru přelévací metodou.

Provádění předběžných produkčních testů u isolátů, pěstovaných na tuhých půdách, bylo v některých případech použito při vyhledávání výše produktivních kultur Penicillii (Raper, Alexander a Coghill 1944, Kei Arima 1950, Wakaki se sp. 1949, Uchida 1950). Postup tohoto „screening testu“ jest založen na vykrojení několika válečků agarové půdy v radiálním směru od vykultivované kolonie a na jejich přenesení na plotnu naočkovanou testujícím mikroblem. Ukazatelem produktivity kolonií jsou pak velikosti inhibičních zon. Pokud lze z literárních pramenů soudit, je účinnost

této metody — měřeno vztahem mezi hodnotou testu a produkcí penicilinu při submersní fermentaci — značně nízká.

Principem povrchové přelévací metody jest převrstvení izolovaných kolonií aktinomycet na agarové plotně suspenzí testujícího mikroba v agarové živné půdě. Obdobné metody jsou založeny na rozprášení testující kultury na povrch plotny s koloniemi antibioticky aktivní kultury (Stanly 1947, Wilska 1947, Torao Ohtsuki a Morieko Imai 1951). Při těchto postupech jest však vyloučeno používati k testování kultur, které obvykle slouží ke kvantitativnímu biologickému stanovení antibiotik, protože jsou příliš citlivé. Význam těchto method pro vyhledávání antibioticky aktivních kultur v přirozeném materiále (na př. hlíně) přirozeně touto nevýhodou zmenšen není. Pro výběr produkčně vynikajících isolátů z produktivních kmenů je tedy nutno buď se uchýliti k používání kultury na příslušné antibiotikum méně citlivé, anebo použít způsobu K e l n e r o v a (1948), který je založen na položení absorpční vrstvy mezi agarovou plotnu s koloniemi a povrchovou půdu se suspenzí testujícího mikroba.



Obr. 1. Plotna se 4 koloniemi po přelítí absorpční vrstvou a suspenzí testujícího organismu po inkubaci. (Foto F. A. Lokvence).

Účinnost této metody je podmiňována dvěma faktory: a) dosažením úzkého vztahu mezi hodnotou rychlého testu na tuhé kultivační půdě a vyšší produkce antibiotika při submersním fermentačním postupu, a b) takovou úpravou pracovního postupu, který dovoluje bez závad zpracovati v co nejkratším čase dostatečně rozsáhlý soubor isolátů. Aby byl splněn první požadavek, je nutno vybrati zejména pečlivě vhodnou tuhou kultivační půdu a upravití patřičně i ostatní podmínky vnějšího prostředí.

V naší práci jsme se pokusili dosáhnout této paralelity, resp. vyhodnotiti sílu uvedeného vztahu. Při pracovním postupu jsme spojili konkrétní údaje K r a s i l n i k o v o v y (1950) s výhodami postupu K e l n e r o v a (1948).\*

## Pracovní postup

K základním selekcím pokusům byl určen streptomycin produkujející kmen *Streptomyces griseus* R. Jako sporulační půdy bylo k jeho kultivaci používáno glukoso-bramborového agaru, připravovaného podle běžného předpisu. Vhodně naředěná suspence spor byla očkována po 0,5 ml na Petriho misky průměru 10 cm, obsahující cca 20 ml půdy složení

masová voda	1000 ml
pepton Spofa	10 g
NaCl	0,5 g
agar	30 g
pH před sterilisací	7,2
sterilisace 40 min. při	1,3 atp.

Přirozeně nutno pečovati o to, aby vrstva této půdy v jednotlivých miskách byla pokud možno stejná a aby suspence spor byla rozptýlena stejnoměrně po celém povrchu živné půdy. Suspence spor je před ředěním přefiltrována pipetou s vatovým uzávěrem a je tvořena z převážně většiny jednotlivými spory, v ojedinělých případech páry spor anebo několikačlennými řetízky.

Protože pro hodnocení produkce antibiotika jest důležité, aby jednotlivé kolonie rostly na plotně v dostatečných rozestupech, byl postup upraven tak, že pro výsev byla volena taková suspence, aby kolonie rostly asi v centimetrových nebo půlcentimetrových rozestupech. Po dvoudenní inkubaci při 28 °C byly kolonie odstraněny pomocí vhodně upravené lancety a přesazeny na nové plotny zpravidla po čtyřech v pravidelných vzdálenostech. Přitom nutno dbáti toho, aby byly přenášeny kolonie bez částí agarové půdy, protože by tím byl podmíněn nerovnoměrný a nepravidelný růst i nepravidelná produkce a difuze antibiotika do půdy. Přesazování kolonií je zde usnadněno tím, že na uvedeném masopeptonové půdě nedochází ke sporulaci a že kolonie mají kožovitou nebo gumovitou konsistenci. Jejich snímání s povrchu agarové půdy lze tedy provádět snadno a i po krátké době nácviku bez částic agarového substrátu.

\*) Publikace R. C. Pittenger a sp. (J. Bact. 65 : 56—64, 1953) byla uveřejněna po dokončení naší práce. Tento autor používá přelévací techniky pro hodnocení isolátů získaných po ozařování UV-světlem. Paralelita přelévacího testu se submersní fermentací není uvedena.

Po další zpravidla sedmidenní inkubaci při 28 °C přeléváme plotny s vyrostlými přesazenými koloniemi 15 ml absorpčního agaru, který má složení

agar	30 g
aktivní uhlí	7 g
destilovaná voda	1 litr.

Absorpční agar přitom musí být pokud možno co nejméně teplý a při pipetování na jednotlivé misky jím neustále mícháme, aby nedošlo k nerovnoměrnému rozložení adsorbující látky. Procento aktivního uhlí jest závislé v zásadě jednak na jeho adsorpční schopnosti, jednak na produktivitě jednotlivých isolátů. Čím menší jest jeho adsorpční schopnost (která se podstatně liší u různých vzorků) a čím více streptomycinu jednotlivé kolonie produkují, tím větší jsou inhibiční zony. Proto nutno procento aktivního uhlí upravit tak, aby inhibiční zony byly asi dvou- až čtyřcentimetrové. Jsou-li později vzniklé zony příliš malé, jest znesnadněno jejich spolehlivé odečtení stejně jako tehdy, jsou-li příliš velké a na plotně se překrývají.

Po utužení absorpční vrstvy přeléváme plotny 4 ml příslušně zředěné suspence spor kmene *Bacillus subtilis* F D A 6633 ve 45 °C teplé živné půdě složení

masová voda	150 ml
pepton Spofa	6 g
kvasniční extrakt	3 g
agar	10 g
destilovaná voda do	1 litru
pH po sterilisaci	7,9.

Tuto testovací půdu rovnoměrně rozptýlíme po povrchu absorpční vrstvy. Po jejím utužení uložíme Petriho misky na cca 16 hodin do teploty 28 °C a pak hodnotíme velikosti vzniklých inhibičních zon. Vybrané isoláty přeočkujeme k dalšímu ověření produktivity.

Nad příslušnými koloniemi odstraníme skalpelem vrchní agarové vrstvy tak, aby kolonie byly dokonale odkryty. Pro snadné odstranění těchto agarových vrstev nutno dbáti na stejnou tuhost absorpční vrstvy a masopeptonové kultivační půdy. Nesplníme-li tento požadavek, činí odkrývání kolonií potíže. Obnažené kolonie sejmete očkovací kličkou a masivně rozetřeme na další živnou půdu na Petriho misce. Z půd, zásadně vhodných pro tuto kultivaci, se nejlépe osvědčil glukoso-bramborový agar s přídavkem 100 gamma streptomycinbase na 1 ml. Přídavek streptomycinu má dvojí účel: V první řadě potlačí kontaminaci testujícím mikroblem, ke které může dojít i při nejpečlivější práci, v druhé řadě brání vzniku neprodukcí variant. Jak jest obecně známo (W a k s m a n 1950, K r a s i l n i k o v 1950), jsou tyto streptomycin neprodukcující varianty citlivé na toto antibiotikum, které potlačuje jejich růst. Proto bývá i doporučováno pro zvýšení produktivity přepěstování produkčních kmenů na tekutých nebo tuhých půdách, obsahujících streptomycin (Č h r i s t e n s e n 1947, K r a s i l n i k o v 1950, M e D a n i e l 1951, T a k a h a s h i 1952), i když jest v některých pracích o této možnosti pochybováno (R e i l l y 1947, W a k s m a n se sp. 1948).

Po zpravidla desetidenní inkubaci přeočkujeme dokonale vysporulované isoláty na glukoso-bramborový šikmý agar do zkumavek a pokračujeme v jejich vyhodnocení obvyklým způsobem submersní fermentací.

## Zhodnocení metody

Produkce vybraných isolátů za submersních fermentačních podmínek byla zjišťována za použití fermentační půdy obsahující glukosu, corn-steep, sojovou mouku, chlorid sodný a uhličitán vápenatý (F o r t u n e se sp. 1950). Varné baňky o obsahu 500 ml byly plněny po osmdesáti ml této půdy, sterilisovány a naočkovány dvěma ml standardně připravované sporové suspence jednotlivých isolátů. Kultivace byla prováděna při 28 °C na reciproké třepače o cca 96 kyvech za minutu při délce kyvu 7,5 cm. Produkce streptomycinu byla sledována modifikovanou plotnovou difusní metodou (L o o se sp. 1945).\*

Jako příklad jsou uvedeny výsledky opakovaného produkčního hodnocení dvou serií isolátů. Obě serie byly vybrány vždy z přibližně jednoho sta kolonií. Každý z isolátů byl naočkován současně do tří baněk. Uvedené výsledky jsou průměry dosažených maximálních produkcí.

Tabulka 1

Isolát	Velikost zony v cm	1. hodnocení produkce v j./ml	2. hodnocení produkce v j./ml
1	5	287	144
2	4	139	71
3	4	119	
4	4	130	
5	4	152	
6	3	140	
7	2	131	
8	2	118	104

Tabulka 2

Isolát	Velikost zony v cm	1. hodnocení produkce v j./ml	2. hodnocení produkce v j./ml
9	6	234	175
10	5	256	180
11	4,5	115	133
12	4	159	120
13	4	107	97
14	3	122	137

Jak jest zřejmé z výsledků uvedených v tabulce 1 a tabulce 2, není těsného vztahu mezi hodnotou přelévacího testu na tuhé půdě a produkcí streptomycinu za submersních kultivačních podmínek. V obou seriích isolátů lze však poz-

\*) Stanovení provedl J. Hess s pracovníci titrační laboratoře mikrobiologického oddělení VÚA.

rovat, že izoláty dávající mimořádně velkou inhibiční zonu při přelévacím testu dávají nejvyšší produkci při submersní fermentaci. Tyto izoláty číslo 1, 9 a 10 produkují přitom o 50—100 % více než izoláty se zonami průměrné velikosti (asi 4 cm). Z toho lze vyvodit, že u kmene R možno selekční cestou produkci úspěšně zvýšit vzhledem k jeho zjevné produkční heterogenitě.

S jinou situací jsme se shledali u podstatně výše produkujícího kmene *Streptomyces griseus* 9. Zde při otestování asi 400 kolonií jsme zjistili variabilitu v rozpětí 9—35 mm, při čemž nebyly nalezeny kolonie se zonami mimořádně velkými, jako tomu bylo u kmene R. Z uvedeného materiálu jsme vybrali 3 skupiny kolonií se zonami malými (9—17 mm), středními (20—24 mm) a velkými (25—35 mm). Produkční hodnocení provedené analogickým způsobem přineslo v procentech kontroly tyto výsledky (tab. 3):

Tabulka 3.

Izolát	Velikost zony v mm	1. hodnocení produkce v %	2. hodnocení produkce v %	Průměrná produkce	Průměr skupiny
1	9	68	14	41,0	
2	10	101	98	99,5	
3	11	87	88	87,5	
4	14	93	82	87,5	
5	17	96	84	90,0	
6	17	98	89	93,5	83,1
7	20	99	96	97,5	
8	20	104	99	101,5	
9	22	105	97	101,0	
10	22	100	98	99,0	
11	23	79	90	84,5	
12	24	106	100	103,0	97,4
13	25	101	97	99,0	
14	26	108	103	105,5	
15	26	110	100	105,0	
16	27	98	104	101,0	
17	31	106	85	95,5	
18	35	103	94	98,5	100,0

Podobně jako u kmene R nebyla ani u kmene 9 pozorována těsnější souvislost mezi velikostí zony při přelévacím testu a produkcí při submersní fermentaci. Přitom však v jednotlivých skupinách (izoláty 1—6, 7—12 a 13—18) jest z celkového průměru skupin patrné postupné stoupání produkce v soulase s velikostí zon. U skupiny s největšími průměry zon je však produkce totožná s kontrolou neselektovaného kmene a u skupiny se středními průměry

zon je produkce nepatrně nižší. Vyplývá proto z toho, že v neselektovaném kmeni se jeho méně produktivní složky, reprezentované v našem případě isoláty 1—6, na snížení produkce neuplatňují. Na druhé straně nutno však současně počítati s tím, že u tohoto kmene jest dosažení vyšší produkce selekčním postupem neselektivním úkolem, jak vyplývá z jeho relativně malé produkční heterogenity.

## Souhrn

Selekce isolátů z antibioticky aktivních kmenů je jednou z cest, která při správném postupu může vésti k úspěšnému zvýšení produkce antibiotika. Přitom však tento postup vyžaduje zpravidla rozsáhlého zhodnocení souboru isolátů, takže se stává úkolem nákladným jak s hlediska časového, tak materiálového. Proto je výhodné zavedení orientačního rychlého testu, který dovoluje zredukovat obsáhlý soubor kultur na relativně málo kmenů, se kterými pak lze provést podrobné vyšetření cestou submersní fermentace. Přirozeným předpokladem pro použití takovéto metody je její spolehlivost. Výsledky předběžného testu musí býti alespoň přibližně paralelní s vyšší produkce antibiotika při fermentaci na tekuté živné půdě. Příkladem rychlého produkčního testu, použitelného pro selekci aktinomycet, jest přelévací metoda Krasilnikovova nebo Kelnerova.

Tuto metodu jsme použili pro 2 streptomycin produkující kmeny *Streptomyces griseus*. Cílem bylo ověření míry souběžnosti předběžného testu s produkcí antibiotika za obvyklých podmínek submersní fermentace. Pracovní postup byl upraven tak, že z ploten, naočkováných suspenzí spor a inkubovaných 48 hodin, byly kolonie přesazeny pomocí lancety na masopeptonový agar na Petriho misky, po další týdenní inkubaci přelity absorpční agarovou vrstvou, obsahující aktivní uhlí, a po utužení této vrstvy přelity suspenzí spor testujícího mikroba. Po zhodnocení velikosti inhibičních zon byly vybrané kolonie přeočkovány na glukoso-bramborový agar obsahující 100 jednotek streptomycinbase na 1 ml a po dokonalém vysporulování přeočkovány na normální šikmý glukoso-bramborový agar.

Při hodnocení produkce jednotlivých isolátů s ohledem na velikost inhibičních zon bylo zjištěno, že mezi hodnotou testu a submersní produkcí antibiotika není těsné závislosti. Isoláty s mimořádně velkými zónami při přelévacím testu však dávají podstatně vyšší produkce i při submersní fermentaci. Na druhé straně však platí, že soubor kolonií s průměrně menšími zónami dává při submersní fermentaci průměrně nižší produkci, než soubor kolonií se zónami průměrně většími. Možno proto míti za to, že přelévací metoda jest při selekci vhodným postupem, který umožňuje provedení výběru z rozsáhlého souboru isolátů.

## Literatura :

- Fortune W. B. se sp. (1950): Antibiotics development. Ind. Eng. Chem. 42 : 191—198.
- Foster J. W. (1949): Chemical activities of fungi. Acad. Press, New York.
- Christensen G. L. se sp. (1947): Effect of addition of streptomycin to submerged cultures of *Streptomyces griseus*. J. Bact. 53 : 502.
- Kei Arima (1950) : Microbiological studies of penicillin production. I. A new simple method of screening test for selecting penicillin producing molds. J. Antib. 3 : 285—291.
- Kelner A. (1948): A method for investigating large microbial populations for antibiotic activity. J. Bact. 56 : 157—162.
- Krasilnikov N. A. (1950) : Aktinomicety — antagonisty i antibiotičeskije vščestva. Izd. AN SSSR, Moskva.
- Loo Y. H. se sp. (1945): Assay of streptomycin by the paper-disc plate method. J. Bact. 50 : 701—709.
- McDaniel L. E. se sp. (1951): Production of streptomycin-resistant strains of *Streptomyces griseus*. US pat. 2,545,554.
- Raper K. B. se sp. (1944): Natural variation and penicillin production in *Penicillium notatum* and allied species. J. Bact. 48 : 639—659.
- Reilly H. Chr. (1947): Isolation of streptomycin-producing strains of *Streptomyces griseus*. J. Bact. 54 : 27.
- Stanly P. G. (1947): A bacterial spray apparatus useful in searching for antibiotics-producing microorganisms. J. Bact. 54 : 443—445.

- Takahashi M. (1952): Single spore isolation of streptomycin-producing strain with streptomycin agar plate. J. Antib. 5 : 101.
- Toraо Ohtsuki a Moriёko Imai (1951): Studies on the monosporous isolation of *Streptomyces griseus* by spray method. J. Antib. 4 : 640.
- Wakaki S. se sp. (1949): Mycological aspects of penicillin production, I. On the screening test. J. Antib. 2 : 599.
- Waksman S. A. se sp. (1948): *Streptomyces griseus* (Krainsky) Waksman and Henrici. J. Bact. 56 : 259—269.
- Waksman S. A. (1950): The Actinomycetes. Chronica Botanica, Waltham.
- Wilska A. (1947): Spray inoculation of plates in the detection of antagonistic micro-organisms. J. Gen. Microbiol. 1 : 368—369.
- Uchida Toyosaburo (1950): On the selection of *P. chrysogenum* Q 176 for the penicillin production I. J. Antib. 3 : 198—201.

Ф. Палечкова и Я. Нечасек:

### Заливной метод селекции продуцирующих штаммов *Streptomyces griseus*

Одним из путей, при помощи которого, при правильной работе можно достичь успешного повышения продукции антибиотика, является селекция изолятов штаммов, обладающих антибиотической активностью. Но этот путь, как правило, требует данных от большого количества изолятов, и, таким образом, становится довольно неэкономным по количеству затраченного времени и материала. Поэтому, представляет интерес введение ориентировочной скорой пробы, которая дает возможность сократить количество изолированных культур до относительно малой величины и только с этими провести подробное исследование путем субмерзной ферментации. Естественным требованием при применении такого рода метода является его надежность. Результаты ориентировочной пробы должны быть хотя-бы приблизительно параллельными с высотой продукции антибиотика при ферментации на жидкой почве. Примером скорой пробы определения продукции, применимой при селекции актиномицетов, является заливной метод Красильникова или Келнера.

Этот метод был применен на двух штаммах *Streptomyces griseus*, продуцирующих стрептомицин. Целью опыта было сравнение степени параллельности ориентировочной пробы с продукцией антибиотика при нормальных условиях субмерзной ферментации. Методика работы заключалась в следующем: с чашек, которые были засеяны взвесью спор и инкубировались 48 часов, были колонии перенесены при помощи ланцета на мясонецтонный агар в чашках Петри, по истечении дальнейшей недельной инкубации залиты адсорбционным слоем агара с активным углем, и, после того, как этот слой застыл, залиты взвесью спор тест-организма. В зависимости от величины образовавшихся ингибиционных зон были отобранные колонии перенесены на глюкозно-картофельный агар, содержащий 100 г. стрептомицина в форме основания в 1 мл и после окончательной споруляции произведен пересев на нормальный косой глюкозно-картофельный агар.



При оценке продукции отдельных изолятов по величине ингибиционных зон было установлено, что нет близкой зависимости между значением пробы и субмерзной продукцией антибиотика. Однако, изоляты, образующие особо большие зоны угнетения при заливной пробе продуцируют также значительно больше антибиотика и при субмерзной ферментации. Кроме того, сумма колоний, в среднем образующих меньшие зоны, дает при субмерзной ферментации в среднем более низкую продукцию, чем сумма колоний, образующих в среднем большие зоны. Исходя из этого можно считать заливной метод выгодным при селекции, т. к. он дает возможность отбора из большого количества изолированных штаммов.

F. Palečková und J. Nečásek :

### **Eine Übergussmethode zur Selektion von antibiotisch aktiven *Streptomyces griseus*-Stämmen**

Die Selektion von Isolaten, die aus antibiotisch aktiven Stämmen gewonnen wurden, ist einer der möglichen Wege, welcher bei richtiger Arbeitsweise zu einer Steigerung der Produktion des antibiotischen Stoffes führen kann. Allerdings erfordert die Methode die Wertung einer bedeutenden Zahl isolierter Einzelkulturen, was einen erheblichen Aufwand sowohl an Zeit, als auch an Material verursacht. Es ist daher wünschenswert, mit Hilfe eines orientierenden Schnelltestes eine Vorwahl durchführen zu können und so die Gesamtheit der Isolate auf eine relativ geringe Zahl Kulturen zu reduzieren. Erst diese werden dann einer eingehenden Wertung ihrer Produktionsfähigkeit bei submerser Kultivierung unterworfen. Natürlich muss ein solcher Schnelltest genügend verlässlich sein und zumindest in groben Zügen eine annähernde Parallelität seiner Ergebnisse mit der Produktion in submerser Kultur verbürgen. Als Beispiel solcher Schnellteste, die bei der Selektion von Aktinomyceten Verwendung finden können, seien die Übergussmethoden Krasilnikovs und Kelners angeführt.

Wir haben eine Methode dieser Art bei der Selektion von zwei Stämmen *Streptomyces griseus*, die beide Streptomycin produzieren, angewandt. Dabei war vor allem beabsichtigt, zu überprüfen, in welchem Ausmasse die Ergebnisse des Schnelltestes mit der in der üblichen submersen Kultur gefundenen Produktionsfähigkeit übereinstimmen. Die Arbeitsweise war folgende: Petri-Schalen wurden mit einer passend verdünnten Sporensuspension beimpft und 48 Stunden bebrütet. Einzelne ausgewählte Kolonien wurden dann mit einer Lanzette steril auf neue Petri-Schalen übertragen, die mit Fleischwasser-Pepton-Agar beschickt waren. Nach neuerlicher einwöchiger Bebrütung wurden die Platten mit verflüssigter Agarlösung mit einem Zusatz von aktiver Kohle übergossen. Nach dem Erstarren dieser Schichte wurde eine weitere Agarschichte aufgegossen, in der Sporen des Testorganismus suspendiert worden sind, und die Platten neuerlich 24 Stunden bebrütet. Über die *Actinomyces*-Kolonien entstehen kreisrunde Inhibitionszonen, deren Durchmesser in üblicher Weise abgelesen werden können und als Kennzahl der antibiotischen Produktionsleistung dienen. Die Zwischenschichte mit Aktivkohle hat hierbei nur den

Zweck, einen Teil des antibiotischen Stoffes zu absorbieren und so die Grösse der Inhibitionzonen in günstigen Grenzen zu halten. Die zur weiteren Bearbeitung ausgewählten Kolonien werden dann auf Glukose-Kartoffelagar, dem 100 int. E. Streptomycin je 1 ml zugesetzt wurden, überimpft. Die Kulturen werden bis zur optimalen Sporenbildung betrübet und dann auf gewöhnlichen Glukose-Kartoffelschrägagar abgeimpft. Das so gewonnene Material wird zur Anlage von submersen Schüttelkulturen benützt und deren Produktionsleistung in üblicher Weise bestimmt.

Beim Vergleichen der Grösse der Inhibitionszonen der einzelnen Isolate beim Übergusstest und ihrer Produktion in der Schüttelkultur wurde gefunden, dass eine strenge Beziehung beider Ergebnisse nicht festzustellen ist. Jedoch zeigten Isolate mit extrem grossen Inhibitionszonen auch eine wesentlich höhere Produktion in submerser Kultur. Ausserdem stellte sich heraus, dass nach Vornahme einer Gruppierung der Isolate Gruppen, die im Durchschnitt kleinere Inhibitionszonen zeigten, auch bei submerser Kultur einen niedrigeren Produktionsdurchschnitt ergaben, als Gruppen, deren mittlere Zonengrösse höher lag.

Man kann daher annehmen, dass die Übergussmethode wohl geeignet ist, bei der Selektion als Methode zur Vornahme einer Vorwahl aus umfangreichen Kollektionen von Isolaten zu dienen.