

血清反應在放綫菌分類上的應用* **

梁漱芳 蔡潤生 沈麗君 徐子淵*** W. 庫里洛維奇****

(中國科學院藥物研究所, 上海)

尋找新抗生素的過程中, 首先必須能確定新種的分類學地位。過去, 放綫菌的分類方法主要根據形態、培養及生理特性等^[1]; 最近, Скрибин 氏^[2] 也採用交叉拮抗試驗。雖然文獻[3—8]中曾報導, 可以用血清學的方法區別放綫菌的某些菌種。但由於抗元的製備及抗元性的研究未開展, 使血清學在放綫菌的分類上未能廣泛應用。

本文目的是以若干不同種的放綫菌, 以及形態、培養特性上極相似的同類型放綫菌, 用血清學的方法加以區分鑑別; 並用免疫化學的方法對放綫菌的抗元性作了一些探討。

材 料 和 方 法

(一)試驗用的菌株 計有:

<i>Streptomyces aureofaciens</i> NCIB 10762	
<i>Streptomyces chrysomallus</i> CBS 3657	
<i>Streptomyces diastaticus</i> NCIB 3315	
<i>Streptomyces melanochromogenes</i> 1779	本實驗室分離
<i>Streptomyces flavus</i> 2	本實驗室分離
<i>Streptomyces griseus</i> 1169	本實驗室分離
<i>Streptomyces griseus</i> 6111	日本分離
<i>Streptomyces griseus</i> 9004	波蘭華沙衛生研究所抗生素系分離
<i>Streptomyces rimosus</i> NCIB 8229	
<i>Streptomyces</i> sp. 39	本院菌種保藏委員會分離
<i>Streptomyces</i> sp. 423	本實驗室分離
<i>Streptomyces</i> sp. 639	本實驗室分離
<i>Streptomyces</i> sp. 1756	本實驗室分離
<i>Streptomyces</i> sp. 1857	本實驗室分離
<i>Streptomyces venezuelae</i> NCIB 10595	

S. sp. 423, *S. sp. 639*, *S. sp. 1756* 及 *S. sp. 1857* 與標準種 *S. griseus* 6111 在形態及培養特性上極相似, 作為同類型的菌株。 *S. griseus* 1169 也歸入此類型作比較。

(二)培養基 為避免在免疫血清中有非特異性的抗體產生^[5], 我們採用液體綜合培養基, 其成分如下:

* 承本院生理生化研究所曹天欽先生為我們做微量電泳; 植物生理研究所殷宏章副所長及本所學術委員章 村先生對本文提供寶貴意見, 特此致謝。

** 鄭之新、唐金奎、陸敬心同志參加部分技術工作。

*** 現為中國科學院植物生理研究所研究生。

**** 庫里洛維奇通訊院士波蘭的工作地址: Prof. W. Kurylowicz, Department of Antibiotics, State Institute of Hygiene, Warsaw, Poland.

1957年11月11日收到。

硫酸銨	1 克	天門冬酰胺	1 克
味精粉	5 克	磷酸二氫鉀	1 克
麥芽糖	20 克	硫酸鎂	0.5 克
蒸餾水	加至 1,000 毫升		

(三)菌體抗元的製備 將斜面上孢子接種於液體綜合培養基。27°C 搖瓶培養 72 小時。用離心法取出菌體，以生理鹽水洗滌 3—4 次。Potter 氏研磨器磨碎菌體，加適量生理鹽水製成懸浮液。以汞硫雷防腐，濃度為 1×10^{-5} ，保存於 0—5°C 冰箱備用。

(四)免疫方法 體重 2 公斤左右的雄家兔，隔天注射 1 次。除第 1 次是腹腔注射外，其餘均為靜脈注射。免疫全程共 9 天。抗元注射量依次為 0.5, 0.5, 1, 2, 3 毫升。以微量 Kjeldahl 氏法^[9]測定全氮量表示抗元濃度。注射用抗元含全氮 200—250 微克/毫升。

(五)免疫血清的電泳分佈 用 Antweiler 微量電泳器。巴比妥緩衝液的離子強度為 0.1, pH 8.6。

(六)凝集試驗 0.5 毫升的抗元(含全氮 150 微克/毫升)加至等量的呈倍數順序稀釋的免疫血清中，37°C 水浴保溫 2 小時。置冰箱過夜後，觀察結果。

(七)絮凝試驗 依 Douglas 和 Garrard 氏法^[10,11]，抗元含全氮 150 微克/毫升。

(八)吸收試驗 用作吸收的菌體濃度，是取比該免疫血清最高效價高一倍的絮凝效價乘 6 後的含全氮量的菌體抗元懸浮液(以微克計算)，加至免疫血清中(血清最終稀釋度為 1:10)。置 37°C 溫箱 2—3 小時。離心後取上層清液，進行相互交叉絮凝試驗。

(九)放綫菌多醣體的提取及其紙上層析 用 *S. griseus* 6111 和 *S. rimosus* 8229 兩菌株，分別以強鹼法、醋酸法提取其多醣體。

1. 強鹼法：經搖瓶培養後的菌絲，用蒸餾水洗滌 3—4 次後，加 30% 氫氧化鈉於菌絲懸浮液，使成 pH 10。煮沸 1 小時。以 10 N 硫酸校正為 pH 7.0—7.5。過濾。加熱濾液，再過濾 1 次。用 96% 乙醇全部沉澱。取此沉澱溶於水，再用 96% 乙醇沉澱 2 次。將沉澱物取出乾燥。

2. 醋酸法：加 10% 醋酸至菌絲懸浮液，使成 pH 4。以後的步驟同前法。

以上兩法所提取的多醣體，均測定其全氮量及仿 Shaffer 和 Somgyi 氏法^[12]測定其還原糖的含量。並經 Fehling 氏試驗、Molisch 氏試驗、縮式脲試驗、茚三酮試驗及脲黃試驗。此外，尚用沉澱反應和補體結合反應以肯定其半抗元性。

依 Dzulyńska 和 Mikulaszek 氏的紙上層析法^[13]鑑別多醣體的組成部分。

(十)放綫菌的蛋白性全抗元和無菌體蛋白性全抗元的提取

1. 蛋白性全抗元的提取：菌絲洗滌後，用超音波(頻率為 1,000,000 次/秒)振盪 30 分鐘。離心後取其上層清液，再用每分鐘 18,000 轉高速離心 10 分鐘。用硫酸銨沉澱高速離心後的上層清液。置冰箱透析備用。

2. 無菌體蛋白性全抗元的提取：取已洗滌的菌絲真空冷凍乾燥後研磨，以蒸餾水提取。通過 Seitz 氏 EK 濾器。濾液用丙酮沉澱脫水。乾燥後呈棕黃色固體。

(十一)被動過敏性試驗 由於在豚鼠用一般方法免疫不容易產生沉澱素^[14, 25]，因此我們採用被動免疫。取體重 300 克左右的豚鼠，分別腹腔注射 *S. griseus* 6111 及 *S. rimosus* 8229 的免疫血清 3—4 毫升。24 小時後，從心臟注入不同量的多醣體、菌體

抗元及蛋白性全抗元,以比較其反應。

(十二)同類型放綫菌菌株間特性的比較 計進行形態、碳源利用、交叉拮抗試驗、對5種鏈霉素產生菌噬菌體的敏感性、發酵液的紙上層析和電泳以及抗菌譜的比較。試驗方法見本實驗室沈麗君等的報告^[16]。

結 果

(一)免疫血清的電泳分佈 從 *S. griseus* 6111, *S. sp.* 1756 及 *S. rimosus* 8229

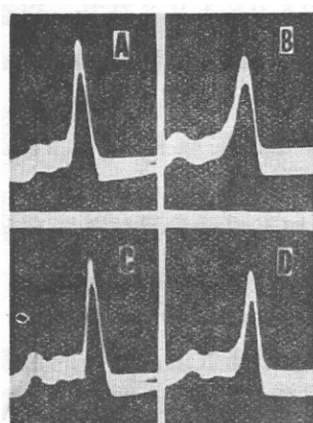


圖 1. 放綫菌免疫血清及兔正常血清的電泳分佈

A 兔正常血清。

B *S. griseus* 6111 的免疫血清。

C *S. sp.* 1756 的免疫血清。

D *S. rimosus* 8229 的免疫血清。

的免疫血清和兔正常兔血清在電泳分佈上的結果看出,兩者之間有所不同,免疫血清的 γ —球蛋白部分增高(見圖1)。這種現象也說明了放綫菌的免疫血清與細菌的免疫血清相似,即經免疫後,血清的蛋白部分比例上發生變化。

(二)凝集反應與絮凝反應 與 *S. griseus* 6111 同一類型放綫菌及其他放綫菌間凝集反應的結果見表1。

由表1可以看出,同一類型放綫菌的免疫血清均有交叉現象。而異種的放綫菌如 *S. aureofaciens* 10762, *S. venezuelae* 10595, *S. rimosus* 8229 及 *S. flavus* 2 的抗原,在生理鹽水中下沉,有假凝集現象,因此無法比較結果。

絮凝反應的效價較低,但結果明顯,易於區分。在異種放綫菌間,除 *S. diastaticus* 3315 與 *S. griseus* 6111 及其同類型的菌株有交叉現象外,其他異種放綫菌間均無反應。同類型放綫菌間的交叉現象則顯著。見表2。

表1 同類型放綫菌菌株的凝集反應

免 疫 血 清	抗 元			
	<i>S. griseus</i> 6111	<i>S. sp.</i> 1857	<i>S. diastaticus</i> 3315	<i>S. sp.</i> 1756
<i>S. griseus</i> 6111	1:2560	1: 40	1:1280	1:2560
<i>S. sp.</i> 1857	1: 320	1: 640	1: 320	1: 160
<i>S. diastaticus</i> 3315	1: 640	1: 320	1: 640	1: 640
<i>S. sp.</i> 1756	1:1280	1: 160	1:1280	1:2560
正 常 血 清	0	0	0	0

(三)吸收試驗 在絮凝反應中, *S. griseus* 6111 和其同類型放綫菌及 *S. diastaticus* 3315 之間有相互交叉現象。但經用菌體抗元吸收後,再進行絮凝試驗,則各菌株的抗元仍具其特異性。結果見表3。

(四)放綫菌的多醣體 用強鹼或醋酸法所提取的 *S. griseus* 6111 及 *S. rimosus* 8229 的多醣體,都含有少量氮。Fehling 氏試驗陰性。這些多醣體水解後紙上層析的結果,均含有 D-葡萄糖、L-阿拉伯糖及 D-氨基葡萄糖。兩種提取法所得的多醣體,進行生

表2 不同放綫菌菌株的絮凝反應

免 疫 血 清	抗 元										
	<i>S. gri- seus</i> 6111	<i>S. griseus</i> 9004	<i>S. griseus</i> 1169	<i>S. sp. 1857</i> 1756	<i>S. diasta- ticus</i> 3315	<i>S. venez- uelae</i> 10595	<i>S. aure- ofaciens</i> 10762	<i>S. ri- mosus</i> 8229	<i>S. flavus</i> 2	<i>S. chry- somalus</i> 3657	<i>S. melach- romogenes</i> 1779
<i>S. griseus</i> 6111	1:640	1:640	1:640	1:40 1:640	1:640	0	0	0	0	0	1:40
<i>S. sp. 1857</i>	1:80	1:40	1:40	1:320 1:80	1:80	0	0	0	0	—	—
<i>S. sp. 1756</i>	1:320	1:320	1:320	1:80 1:640	1:320	0	0	0	0	—	—
<i>S. diastaticus</i> 3315	1:80	1:80	1:80	1:40 1:160	1:160	0	0	0	0	—	—
<i>S. venezuelae</i> 10595	0	0	0	0 0	0	1:160	0	0	0	—	—
<i>S. aureofaciens</i> 10762	0	0	0	0 0	0	0	1:40	0	0	—	—
<i>S. rimosus</i> 8229	0	0	0	0 0	0	0	0	1:640	0	0	0
<i>S. flavus</i> 2	0	0	0	0 0	0	0	0	0	1:8	—	—
<i>S. chrysomalus</i> 3657	0	—	—	— —	—	—	—	0	—	1:640	0
<i>S. sp. 39</i>	0	—	—	— —	—	—	—	0	—	0	0
<i>S. melanochromogenes</i> 1779	0	—	—	— —	—	—	—	0	—	0	1:2560
正 常 血 清	0	0	0	0 0	0	0	0	0	0	0	0

註：一爲未做。

表 3 同類型放綫菌菌株及 *S. diastaticus* 3315 間的相互交叉吸收試驗

免 疫 血 清	吸 收 用 的 抗 元	抗 元			
		<i>S. griseus</i> 6111	<i>S. sp.</i> 1756	<i>S. diastaticus</i> 3315	<i>S. sp.</i> 1857
<i>S. griseus</i> 6111		1:640	1:640	1:640	1:40
<i>S. griseus</i> 6111	<i>S. griseus</i> 6111	0	0	0	0
	<i>S. sp.</i> 1756	0	0	—	—
	<i>S. diastaticus</i> 3315	0	—	0	—
	<i>S. sp.</i> 1857	1:80	—	—	0
<i>S. sp.</i> 1756		1:320	1:640	1:320	1:80
<i>S. sp.</i> 1756	<i>S. sp.</i> 1756	0	0	0	—
	<i>S. griseus</i> 6111	0	1:40	—	—
	<i>S. diastaticus</i> 3315	—	1:40	0	—
<i>S. diastaticus</i> 3315		1:80	1:160	1:160	1:40
<i>S. diastaticus</i> 3315	<i>S. diastaticus</i> 3315	0	0	0	—
	<i>S. griseus</i> 6111	0	—	1:20	—
	<i>S. sp.</i> 1756	—	0	0	—
<i>S. sp.</i> 1857		1:80	1:80	1:80	1:320
<i>S. sp.</i> 1857	<i>S. sp.</i> 1857	0	—	—	0
	<i>S. griseus</i> 6111	0	—	—	1:80

註：—爲未做。

表 4 不同方法提取的多醣體生化反應的比較

方 法	菌 株	全氮%	水解後還原糖含量%	Molisch 氏試驗	Fehling 氏試驗	縮式脲 試驗	庫三酮 試驗	脫黃反應
30% NaOH	<i>S. griseus</i> 6111	6.25	35	++	—	+	+	+
	<i>S. rimosus</i> 8229	5.18	45	++	—	+	+	+
10% CH ₃ COOH	<i>S. griseus</i> 6111	3.1	50	+++	—	+	+	+
	<i>S. rimosus</i> 8229	4.03	57.5	+++	—	+	+	+

表 5 不同方法提取的多醣體血清反應的比較

方 法	菌 株	血 清 效 價		正 常 血 清
		沉 澱 反 應	補 體 結 合 反 應	
30% NaOH	<i>S. griseus</i> 6111	4×10^{-3}	1:2	0
	<i>S. rimosus</i> 8229	8×10^{-3}	1:4	0
10% CH ₃ COOH	<i>S. griseus</i> 6111	128×10^{-3}	1:32	0
	<i>S. rimosus</i> 8229	64×10^{-3}	1:16	0

化及血清反應比較的結果見表 4 及表 5。

從表 4、表 5 看出，醋酸法提取放綫菌的多醣體較純。在血清反應中，也顯示有多醣

體的特異性存在。

(五)放綫菌的蛋白性全抗原及無菌體蛋白性全抗原 以 *S. griseus* 6111 爲代表, 不論是提取其蛋白性全抗原或無菌體蛋白性全抗原, 其生化特性及沉澱反應的結果仍極相似(見表 6)。這兩種方法提得的抗原, 對 Molisch 氏試驗都是陽性反應。

表 6 *S. griseus* 6111 兩種不同製備的抗原的特性比較

抗 原	全氮%	水解後還原糖 含量%	Molisch 氏試驗	縮式脲試 驗	卽三酮試 驗	阮黃反應	沉澱反應效價
蛋白性全抗原	10.7	40.6	++	+	+	+	64×10^{-8}
無菌體蛋白性全抗原	11.5	42	++	+	+	+	64×10^{-8}

(六)被動過敏性反應 爲了確定放綫菌抗原特異性的所在, 我們分別用 *S. griseus* 6111 和 *S. rimosus* 8229 的多醣體、菌體抗原及蛋白性全抗原, 進行被動過敏性反應的觀察。結果見表 7。

試驗結果指出, 放綫菌的多醣體不能產生休克, 而菌體抗原及蛋白性全抗原均有休克表現。

表 7 不同菌體成分的被動過敏性反應

菌 體 成 分	多 醣 體								菌 體 抗 元*			蛋 白 性 全 抗 元	
	<i>S. griseus</i> 6111				<i>S. rimosus</i> 8229				<i>S. griseus</i> 6111	<i>S. rimosus</i> 8229	<i>S. griseus</i> 6111	<i>S. rimosus</i> 8229	
菌 株													
提 取 方 法	10% CH ₃ COOH								研磨後的懸浮液			超音波振盪後 (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉澱	
每只豚鼠注射量 (毫克)	0.5	1	2	4	0.5	1	2	4	0.65	1.3	1.1	4.5	2.5
免 疫 血 清													
<i>S. griseus</i> 6111	—	—	—	—	—	—	—	—	++++	+++	—	++	—
<i>S. rimosus</i> 8229	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	—	++
正 常 血 清	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* 以含全氮量計算

— 無反應

++ 中等度休克

+++ 嚴重休克

++++ 休克死亡

(七)同類型放綫菌菌株間的絮凝反應及其他特性的比較 我們從國內土壤中分離得到 215 個類似鏈霉素產生菌的菌株, 取出其中的 5 個不同者, 即 *S. griseus* 1169, *S. sp.* 423, *S. sp.* 639, *S. sp.* 1756 及 *S. sp.* 1857, 進行絮凝反應及其他特性的比較。並以鏈霉素產生菌的標準種 *S. griseus* 6111、*S. griseus* 9004 及形態、培養和某些特性上與其極相似的 *S. diastaticus* 3315 作對照。結果見表 8。

討 論

近年來, 放綫菌的分類方法主要參考 Красильников 氏及 Waksman 和 Henrici 氏的分類系統^[17]; 前者着重於菌的構造形態, 而後者則偏於菌的培養特性。由於放綫菌種的

複雜性，並具有各種不同的培養和生理特性，因而在種的鑑定上，根據這些分類方法是不能滿足實際需要的^[1]。從表 8 也可以看出，單靠形態、培養或某一方面相同的特性來決定一個新種的地位是不够全面的。

表 8 同類型放綫菌菌株間絮凝反應及其他特性的比較

菌 株	特 性						抗 菌 譜	絮 凝 反 應
	形態特性及 色素形成	炭源 利用	交叉拮 抗試驗	對鏈霉素的 敏感性	對五種鏈霉 素產生菌噬 菌體的敏感 性	發酵液的紙 上層析及電 泳		
<i>S. griseus</i> 6111	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. griseus</i> 9004	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. griseus</i> 1709	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. sp.</i> 1857	+	+	+	+	+	+	+	±
<i>S. sp.</i> 1756	+	-	-	±	±	-	-	±
<i>S. sp.</i> 423	+	-	-	-	-	*	-	-
<i>S. sp.</i> 639	+	+	-	-	-	*	-	-
<i>S. diastaticus</i> 3315	+	+	+	±	-	±	+	±

* 抗生素活力極微

我們的試驗指出：*S. aureofaciens* 10762, *S. venezuelae* 10595, *S. flavus* 2 及 *S. griseus* 6111 均為異種，血清反應無交叉現象。*S. chrysomallus* 3657, *S. melanochromogenes* 1779 及 *S. sp.* 39 雖然都屬於放綫菌素產生菌^[18]，但用血清反應仍可辨別為三個不同的菌株。*S. griseus* 6111, *S. sp.* 1756, *S. sp.* 1857 及 *S. diastaticus* 3315 在形態和培養特性上有相似之處，血清反應也表現有共同抗元存在，但應用吸收試驗後，又可區分為不同的菌株。因此，我們認為，血清學的方法對於放綫菌新種的鑑定及舊分類系統的重新安排，有其實用意義。

表 8 中各種特性一致的菌株，其血清反應均相符合，獨 *S. sp.* 1857 雖各方面均與鏈霉毒素產生菌相同，但經用吸收試驗後，證明其具有本身的特異性抗元。故 *S. sp.* 1857 的分類學地位是否應歸入鏈霉毒素產生菌一類，值得懷疑。

放綫菌的菌體抗元一般較細菌者粗大。我們試驗所用的菌種中，除 *S. griseus* 類菌株的抗元能做凝集試驗外，其餘菌株的抗元均易下沉，結果不易辨別。但應用絮凝試驗後，則結果明顯。可見絮凝試驗在放綫菌血清反應上是比較可靠的。

從微量電泳的分佈顯示出，放綫菌免疫血清的 r ——球蛋白部分較正常者增高。各種血清學反應（如凝集、絮凝和吸收試驗），多醣體的沉澱反應及補體結合反應都有明顯的結果。可見，放綫菌免疫學的基本原理是與細菌的免疫學一致的。

我們試驗用的菌株，免疫後所產生的效價都不高。雖曾增加免疫次數以延長免疫時間，但血清效價仍未見提高，且家兔又易因休克死亡。所以放綫菌的免疫全程不必過長。

最近，Romano 和 Nickerson 氏^[19]報告 *S. fradiae* 的細胞壁是屬於粘液多醣體。我們的實驗指出：*S. griseus* 6111 及 *S. rimosus* 8229 的多醣體水解後均含有 D-葡

萄糖、*L*-阿拉伯糖及 *D*-氨基葡萄糖，並含有少量的氮。而其蛋白性全抗元和無菌體蛋白性全抗元則含氮較高，但水解後也含有還原糖；在沉澱反應中表現有多醣體的作用。因此，我們認為放綫菌的多醣體，可能是與蛋白部分相結合的。放綫菌的多醣體在沉澱反應及補體結合反應上均表現其特異性。但在被動過敏性試驗中，用菌體抗元及蛋白性全抗元，結果陽性；而用多醣體時雖高到一次注射 4 毫克，仍為陰性，這是由於多醣體的含氮量不足。可見，放綫菌的抗元性，決定於菌體成分中的醣脂部分；其多醣體在免疫學中只是一個弱的半抗元。至於放綫菌醣脂的結構與抗元特異性間的關係，尚待作進一步的探討。

總 結

1.15 株放綫菌中，異種放綫菌的菌株各有其特異抗元，血清反應無交叉現象。形態和培養特性極相似的同類型放綫菌菌株間有共同抗元，但經吸收試驗後，各菌株仍具有其特異抗元。

2. 在被動過敏性試驗中，*S. griseus* 6111 及 *S. rimosus* 8229 的多醣體無反應，改用菌體抗元或蛋白性全抗元，則為陽性結果；其多醣體在試管中的血清反應有特異性表現，可見這些菌株的多醣體是一個弱的半抗元。它們的抗元性可能在醣脂部分。

3. 血清反應可以認為是放綫菌分類和鑑定不可缺少的輔助方法。

參 考 文 獻

- [1] Гаузе, Г. Ф. (ред.): Вопросы классификации актиномицетов-антагонистов. Москва, Медгиз, стр. 1—19, 1957.
- [2] Скрабин, Г. К.: Микробиол., **24**: 690—696, 1955.
- [3] Aoki, M.: Zeitschr. f. Immunitätsf., **87**: 196—199, 1936.
- [4] Aoki, M.: *ibid.*, **87**: 200—201, 1936.
- [5] Ludwig, E. H. and Hutchinson, W. G.: J. Bacteriol., **58**: 89—101, 1949.
- [6] Slack, J. M., Ludwig, E. H., Bird, H. H. and Canby, C. M.: *ibid.*, **61**: 721—735, 1951.
- [7] 秦 藤樹, 大木夏男, 横山康彦, 古賀父若: J. Antibiotics, Ser. B, **6**: 57—60, 1953.
- [8] Соловьева, Н. Е., Эльпинер, Н. Е. и Фадеева, Н. П.: Микробиол., **25**: 684—689, 1956.
- [9] Ma, T. S. and Zuazaga, G.: Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., **14**: 280—282, 1942.
- [10] Douglas, R. J. and Garrard, E. H.: Can. J. Botany, **32**: 38—39, 1954.
- [11] Douglas, R. J. and Garrard, E. H.: *ibid.*, **32**: 480—485, 1954.
- [12] Shaffer, P. A. and Somgyi, M.: J. Biol. Chem., **100**: 695—713, 1933.
- [13] Dzulynska, J. and Mikulaszek, E.: Acta Biochim. Polonica, **1**: 191—195, 1954.
- [14] Opie, E. L.: J. Immunol., **9**: 231—245, 1924.
- [15] Beacerraf, B. and Kabat, E. A.: J. Immunol., **64**: 1—19, 1950.
- [16] 沈麗君等: Streptomyces griseus 類型菌種的分類學研究. 將發表.
- [17] Waksman, S. A. and Lechevalier, H. A.: Guide to the Classification and Identification of the Actinomycetes and their Antibiotics. Baltimore, Williams & Wilkins Co., pp. 6—20, 1953.
- [18] 蔡潤生、徐子淵、包琴珠、梁漱芳、W. 庫里洛維奇: 放綫菌素 K 的研究 I. 新種 Streptomyces melanochromogenes 1779——放綫菌素 K 的來源. 將發表.
- [19] Romano, A. H. and Nickerson, W. J.: J. Bacteriol., **72**: 478—482, 1956.

THE SEROLOGICAL METHODS AS AN AID TO THE CLASSIFICATION OF STREPTOMYCES SPECIES

LIANG SHU-FONG, TSAI JUNG-SHENG, SHEN LI-CHUN

SU TSU-YUAN and W. KURYLOWICZ

(Institute of Materia Medica, Academia Sinica, Shanghai)

The serological reactions applied to genus *Streptomyces* were based on the same immunological and immunochemical principles used for classifying *Eubacteriales* (Fig. 1, Tab. 1,2,3).

By the application of flocculation test according to Douglas & Garrard^[10,11] it was found possible to differentiate the strains belonging to various well-defined species such as *S. flavus* 2, *S. aureofaciens* 10762, *S. rimosus* 8229 and *S. venezuelae* 10595 (Tab. 2).

The serological methods were also applicable to the differentiation of non-identified strains isolated from soil, which corresponded to *S. griseus* according to their morphological and cultural characteristics. This group of strains was further tested by means of utilization of different carbon sources from synthetic agar medium, cross antagonism test, susceptibility to streptomycin, susceptibility to 5 different monovalent actinophages of *S. griseus*, characteristics of fermentation broth (paper chromatography and electrophoresis), antibiotic spectrum and serological response to the antiserum of *S. griseus* reference strain (SM producing strain) (Tab. 8).

It was shown by the results obtained that by means of serological reactions it was possible to identify strains belonging to the closely related species, according to the criteria used actually for the differentiation and classification purposes in genus *Streptomyces*.

The polysaccharide antigens of different species (*S. griseus* 6111 and *S. rimosus* 8229) were of different serological specificity, but contained the same carbohydrates, namely *D*-glucosamine, *D*-glucose and *L*-arabinose. Our results confirmed the data of other authors (Dzulynska & Mikulaszek^[12], Romano & Nickerson^[13]). The polysaccharide antigens were, from the immunological point of view, weak haptens. The specificity of immunological reactions in this genus of microorganism seemed to be connected rather with the glycoprotein antigen (Tab. 4).