

生理活性 物質 生産 微生物의 選擇的 分離法

— 好氣性 菌을 중심으로 —

柳韓洋行 中央研究所 姜 熙 日



지금까지 유용가치가 있는 미생물의 검색 (screening)은 주로 경험적이었으며 자연에서 발견되는 microbial community의 일부분에서 채취된 시료를 대상으로 검색이 이루어졌다고 할 수 있다. 그러므로 탐색 대상물질의 생물학적 품질 (biological quality)을 높이기 위해서는 아직까지 많이 분리되지 못했거나 새로운 미생물을 선택적으로 분리할 수 있는 새롭고도 목적적인 선택분리 과정이 필요하게 된다.

세균 중에는 토양에서 쉽게 분리할 수 있는 放線菌 (actinomycetes)과 내생포자 (endospore)를 형성하는 세균—주로 *Bacillus* 속—이 항생물질, 효소, 효소저해제, 비타민 등의 생리활성물질 생산균주로 잘 알려져 있다.

본 고에서는 주로 방선균의 선택분리 과정을 시료 (substrate) 선정, 시료 전처리 (pretreatment), 배지, 배양조건, 콜로니 선정 등으로 나누어 살펴보고자 한다. 자세한 설명과 자료는 Cross (1982), Williams and Wellington (1982), Wellington and Cross (1983), Goodfellow and Williams (1986), Nolan and Cross (1988) 등의 총설을 참고하기 바란다.

1. 시료 선정 (Choice of substrate)

대부분의 방선균은 토양에서 쉽게 분리할 수 있다 (Williams *et al.*, 1984). 방선균 중에서도 *Streptomyces*가 우점종을 차지하지만 *actinomadurae*, *arthrobacter*, *micromonosporae*, *nocardiae*, *rhodococci* 등도 토양에서 분리할 수 있다. 방선균은 또한 freshwater (Cross, 1981), 해양 환경 (Goodfellow and Haynes,

1984) 뿐만 아니라 *Comptonia* (Callaham *et al.*, 1978)의 뿌리혹이나 *Bibio marci*의 larvae 창자 (Szabo *et al.*, 1967) 등과 같은 한정된 habitat에서도 분리된다.

방선균을 분리하기 위한 시료는 일반적인 생태계 뿐만 아니라 특수한 동식물 생태계가 형성된 지역이나 환경요인이 특이한 국한환경 (extreme environment)에서 채취할 수도 있는데 특히 새로운 대사물질 (novel metabolites)을 생산할 가능성이 높은 균주를 얻기 위해서는 다양한 환경에서 얻은 시료를 여러 배지와 배양조건에서 시험하는 것이 바람직하다. 즉, 일본과 미국의 제약회사들이 호주 (Austarlia)의 토양시료를 검색한다든지 (Keast *et al.*, 1984; Okazaki and Naito, 1986), 호산성 방선균 (Jensen, 1928; Hagedorn, 1976; Flowers and Williams, 1977; Lonsdale, 1985), 호염기성 방선균 (Taber, 1960; Mikami *et al.*, 1982; Miyashita *et al.*, 1984; Sato *et al.*, 1985), 저온성 방선균 (Yoshida *et al.*, 1973), 호열성 방선균 (Maher *et al.*, 1979), 호염성 방선균 (Okami *et al.*, 1976) 등을 검색 대상으로 하여 유용한 물질을 분리하였다는 보고에 유의할 필요가 있다고 본다.

선택된 시료에 인위적 조작을 가하여 natural habitat 내의 population을 변화시킬 수 있다. 예를 들면 atrazine을 토양시료에 첨가하여 actinomycetes의 수를 증가시킬 수 있었으며 (Percich and Lock wood, 1978), 항진균물질인 carboxanilide를 첨가했을 때 nocardialike microbe가 잘 자랐다고 한다 (Bachofer *et al.*, 1973).

Table 1. Examples of heat pretreatment of material for isolation of actinomycetes

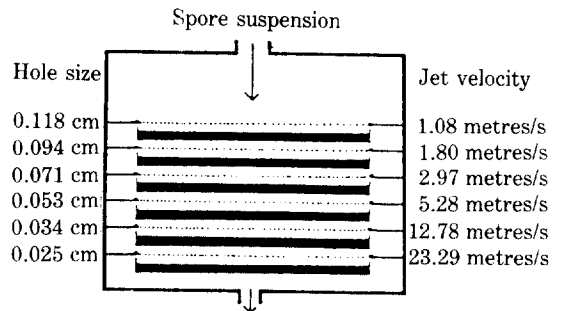
Treatment	Material	Media	Target organism (s)	Reference
120°C for 1 h	Air-dried soil	AV agar	<i>Microbiospora</i> and <i>Streptosporagium</i> spp.	Nonomura and Ohara (1969).
100°C for 1 h	Air-dried soil	C2 and MGA-SE agars	<i>Microbiospora</i> and <i>Microtetraspora</i>	Nonomura and Ohara (1971)
40°C for 2-16 h	Soil and roots	Starch-casein agar	<i>Streptomyces</i> spp.	Williams <i>et al.</i> (1972)
55°C for 6 min	Water, soil and dung	M3 agar	<i>Rhodococcus coprophilus</i>	Rowbotham and Cross (1977)
55°C for 6 min	Soil	Diagnostic Sensitivity Test Agar (Oxiod) + methacycline	<i>Nocardia asteroides</i>	Orchard (1978)
100°C for 15 min	Air-dried soil	Glucose Yest extract agar + rifampicin	<i>Actinomadura</i> spp.	Athalye, Lacey and Goodfellow (1981)
60°C for 40 min	Soil	Cellulose asparagine seawater agar + novobiocin	<i>Micromonospora</i>	Goodfellow and Haynes (1984)

2. 시료 전처리(Pretreatment of substrate)

방선균을 효과적으로 분리하기 위해 target organism에 영향을 주지 않는 범위에서 fungi나 bacterial growth를 억제하거나 제거하는 것이 필요하다. 이러한 효과를 얻기 위해서는 dilution plating 과정 중 여러 단계에서 적당한 selective pressure를 가함으로써 가능한데 열처리, 물리·화학적 처리, baiting 등 여러 방법이 있다.

열처리는 방선균의 포자(e.g. *Streptomyces*)나 균사(e.g. *Rhodococcus*)가 그람-음성 세균보다 열에 강하다는 성질을 이용한 것(Table 1)이지만 방선균의 숫자도 감소한다는 것을 고려해야 한다(Williams *et al.*, 1972).

선택 분리배지에 균현탁액을 접종하기 전에 시료나 방선균의 propagule(spore, hyphal fragment)을 물리화학적으로 처리하여 선택분리능을 높이기도 한다(Table 2). Water sample 등을 0.45 μm membrane으로 여과하여 농축시킨 후 membrane을 plate에 수시간 접촉시키거나 방치하여 방선균을 자라게 하며, 해수와 같이 균농도가 낮은 시료는 여과하기 전에 원심분리 과정을 거치기도 한다(Burman *et al.*, 1969; Okami

**Fig. 1. Andersen sampler.**

and Okazaki, 1972; Al-Diwany *et al.*, 1978; Goodfellow and Haynes, 1984).

퇴비나 건초더미, 식물의 잎이나 가지 등에 있는 호열성 방선균은 시료를 wind tunnel(Lacey and Dutkiewicz, 1976a) 혹은 sedimentation chamber(Lacey and Dutkiewicz, 1976b)에서 흔들어 준 후 발생한 포자구름(spore cloud)을 Andersen(1958) 채집기내에 있는 배지표면에 충돌시켜 세균오염을 방지하면서 쉽게 분리할 수 있다. Andersen 채집기(Fig. 1)는 크기가 일정한 구멍이 400개씩 뚫려 있는 6개의 알루미늄단(stage)과 O-ring gasket, clamp 등으로 구성되어 있으며 각 단 사이에 spore를 포집하기 위한 적합한 배지가 들어있는 plate를 두게 되어 있다.

Table 2. Example of Physical and chemical pretreatments for isolation of streptomycetes

Treatment	Material	Predominant isolates
Physical:		
Agitation in sedimentation chamber	Mouldy hay	Thermophilic
Centrifugation	Seawater and mud	<i>Streptomyces</i> spp.
Membrane filtration	Soil	<i>Streptomyces</i> spp.
	Water	<i>Micromonospora</i> and <i>Streptomyces</i> spp.
Chemical:		
Ammonia and sodium hypochlorite	Water	<i>Streptomyces</i> spp.
Chloramine	Water	<i>Micromonospora</i> and <i>Streptomyces</i> spp.
Calcium carbonate to increase pH with incubation	Soil	<i>Streptomyces</i> spp.
Nutrient enrichment with chitin and incubation	Soil	<i>Streptomyces</i> spp.
Phenol	Soil and water	<i>Streptomyces</i> spp.
Baiting:		
Paraffin-coated rod in carbon-free broth	Soil	<i>Nocardia</i> spp.
Pollen	Soil and Water	<i>Actinoplanaceae</i>
Snakeskin	Soil	<i>Ampullariella</i> spp.
Human hair	Soil	<i>Pilimelia</i> spp.

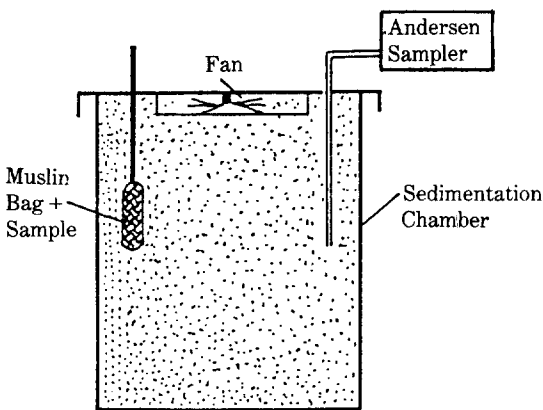


Fig. 2. Sedimentation chamber of Andersen sampler containing a spore suspension.

Muslin bag에 싼 건조된 시료를 전기 fan을 가동시키면서 sedimentation chamber에서 아래위로 세게 흔들어 주어 포자구름을 만들고 수시간 방치시킨 후 진공펌프로 흡입 (1 ft³/min)하면 1μm 이상의 입자는 모두 sampler에 포집되면서 적합한 단 아래의 plate에 impinge하게 된다(Fig. 2). Andersen 채집기는 건조시료로부터 spore를

분리하는 좋은 방법으로서 새로운 균주를 분리하는데 자주 이용되고 있다.

3. 배 지

방선균을 분리하기 위해 많은 종류의 배지가 권장되어 왔으나 경험에 의해 결정된 배지조성의 선택능력에 대한 이론적 설명은 거의 불가능하다 (Williams, *et al.*, 1984). 예를 들면 starch casein medium (Kuster and Williams, 1964; Williams and Davies, 1965)은 방선균 colony가 chitin agar에서보다 더 잘자라고 pigment 색이 진하지만 방선균 뿐만 아니라 다른 세균도 쉽게 자랄 수 있다. 또한 McKay (1977)는 NaCl (4, 6%, w/v)을 첨가함으로써 그람음성세균의 발육을 억제하면서 *Streptomyces*를 선택적으로 분리할 수 있다고 하였으나, Williams 등 (1983a)의 수리형질 분석에 의하면 400주 이상의 *Streptomyces* 중 4% (w/v) NaCl에서 자랄 수 없는 *Streptomyces*도 적지 않았다. 이러한 사실은 분리하고자 하는 방선균에 따라 적합한 선택배지가

Table 3. Selective isolation media based on information taken from numerical taxonomic data bases

<i>Actinomadura</i> spp.	Rifampicin	Athalye, Lacey and Goodfellow (1981) Athalye <i>et al.</i> (1985)
<i>Faenia rectivirgula</i>	Hippurate	D. Rose, J Lacey and M. Goodfellow (unpublished data)
<i>Nochrda asterodites</i>	Chlortetracycline; demethylchlortetracycline; methacycline	Goodfellow and Orchard (1974); Orchard and Goodfellow (1974)
<i>Streptomyces diastaticus</i>	Rifampicin	Williams, Goodfellow and Vickers (1984)
<i>Streptomyces chromofuscus</i> , <i>S. cyaneus</i> , <i>S. rochei</i>	Raffinose, histidine	Vickers, Williams and Ross (1984)
<i>Thermomonospora chromogena</i>	Kanamycin	McCarthy and Cross (1981)

Table 4. Examples of scores included in the percentage positive probability matrix for streptomycete clusters

Clusters*	Characters*				
	Utilization			Resistance to:	
	Raffinose	Xylose	Histidine	Neomycin (50 µg/ml)	Rifampicin (50 µg/ml)
<i>S. albidoflavus</i>	0.17	0.93	0.65	0.01	0.54
<i>S. chromofuscus</i>	0.22	0.99	0.78	0.01	0.33
<i>S. cyaneus</i>	0.99	0.90	0.85	0.01	0.46
<i>S. diastaticus</i>	0.84	0.90	0.68	0.01	0.68
<i>S. fulvissimus</i>	0.89	0.99	0.99	0.89	0.99
<i>S. griseoruber</i>	0.99	0.89	0.99	0.01	0.78
<i>S. griseoviridis</i>	0.51	0.83	0.83	0.01	0.83
<i>S. lavendulae</i>	0.08	0.33	0.08	0.50	0.33
<i>S. platensis</i>	0.82	0.27	0.36	0.18	0.09
<i>S. rochei</i>	0.69	0.96	0.77	0.08	0.89

*Only ten of the 223 species groups and five of the 41 characters included in the full matrix are listed in this Table.

새로이 논리적 근거 위에서 개발되어야 한다는 사실과 그 필요성을 잘 보여준다고 하겠다.

방선균을 선택적으로 분리하려는 여러 연구결과 영양요구성(nutritional requirement), 생리적 특성, 항생체에 대한 감수성, 물리적 특성(건조, 열, salt에 대한 내성) 등의 profile이 자연으로부터 특정 taxa를 쉽게 분리할 수 있는 하나의 자료가 될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 특히 수리분류 데이터 베이스(numerical taxonomic data base)는 이러한 정보를 많이 갖고 있기 때문에 새로운 선택배지를 개발할 때 이상적인 자료를 제공

한다(Table 3). 또한 동정행렬(probabilistic identification matrix) 내의 각 군집(cluster)이 갖고 있는 여러 형질 중 가장 특징적인(diagnostic) character를 선별할 수 있는 DIACHAR 프로그램(Sneath, 1980)을 이용하면 선택 분리배지를 효과적으로 개발할 수 있다. Streptomycete 동정행렬의 정보를 분석하여 colloidal chitin agar나 starch casein agar에서 쉽게 분리되는 *Streptomyces albidoflavus* 이외의 Streptomycete community를 분리한 예를 들면 다음과 같다. Table 4에 나타난 바와 같이 主 탄소원과 질소원

Table 5. Computer-assisted identification of streptomycetes isolated from a sample sand-dune using three different selective media

Species-groups	Percentage of total isolates on:		
	Starch casein medium	Starch-casein medium + rifampicin (50 ug/ml)	Raffinose-histidin medium
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	6.5	13.3	0
<i>S. chromofuscus</i>	2.2	0	0
<i>S. cyaneus</i>	28.3	0	63.6
<i>S. diastaticus</i>	0	80.0	2.3
<i>S. platensis</i>	37.0	0	4.5
<i>S. rochei</i>	8.7	6.6	13.6
Unidentified isolates	17.4	0	15.9

으로 raffinose와 histidine, 혹은 rifampicin 이 첨가된 배지를 사용하면 *Streptomyces albidoflavus*의 수를 줄일 수 있으리라 생각할 수 있다. 실제 토양시료로부터 starch casein medium(대조)과 raffinose histidine medium에서 분리된 균주들을 컴퓨터로 동정하였을 때(computer와 probability identification matrix 사용), *Streptomyces albidoflavus*를 비롯한 *Streptomyces*의 분포가 변화한 것을 알 수 있다(Table 5). 이러한 결과는 분명히 배지조성에 의한 선택 분리 능력과 경쟁(competition) 효과 때문이라는 것을 잘 나타내고 있다. 따라서 방선균의 선택 분리배지 개발은 좀더 과학적으로 접근될 수 있으며 다양한 선택배지를 사용한다면 새로운 방선균이나 특정 방선균을 쉽게 분리할 수 있다는 것을 시사하고 있다.

지금까지 연구된 대부분의 방선균은 好中性(neutrophile)이어서 배지의 pH는 통상 6.7~7.5이었으나, 호산성 방선균(acidophilic actinomycetes)을 분리하기 위해서는 pH를 4.5~5.0으로 조절해 주어야 한다(Williams *et al.*, 1971; Lonsdale, 1985; Kang, 1989). 산성 토양에서 호산성 방선균이 존재한다는 사실은 1928년(Jensen) 처음 보고되었으나 대부분의 분리·탐색 과정에서 거의 무시되어 왔다. 이와는 반대로 pH 6, 1~6.8 이하에서 살 수 없는 호염기성

(alkalophilic 혹은 basophilic) 방선균도 Taber (1960) 등에 의해 발견되었으나 이 또한 연구의 관심이 많이 기울여 지지 않았다.

항생물질이나 저해제를 첨가하여 배지의 선택분리능을 높일 수 있다. 시료가 토양인 경우 fungi의 발육을 억제하기 위해서 배지에 cycloheximide(actidione)나 nystatin을 첨가하는 것이 좋으며, 특정 그룹의 방선균을 분리하기 위해서는 목적 미생물의 생장에 영향을 미치지 않는 항생물질을 첨가해 주는 것이 좋다. 수리분류 데이터 베이스에 있는 항생물질이나 저해제 등의 내성(tolerance)에 관한 자료를 DIACHAR로 분석하고 배지에 첨가하여 특정군집(cluster)을 쉽게 분리할 수도 있다.

4. 배양(Incubation)

방선균은 주로 25~30°C에서 호기적 조건으로 배양한다. 그러나 호열성 방선균 분리를 위해서는 45~55°C, 호한성(psychrophilic) 방선균은 4~10°C에서 배양해야 하나 아직까지 psychrophile이나 혐기성 방선균에 대해서는 많은 연구가 이루어 지지 못하였다.

배양온도 뿐만 아니라 배양기간도 중요한 요인으로 작용한다. 쉽게 분리되는 중온성(mesophile) 방선균인 *Micromonospora*나 *Nocardiae*, *Streptomyces*는 1~2주간 배양하지만, 호열성 방선균인 *Faenia rectivirgula*는 1~2일 정도면 콜로니를 이루는 것을 볼 수 있다. 배양기간을 길게 하여 새로운 균을 분리할 수도 있다. 예를 들면 Nonomura와 Ohara(1971)는 30~40°C에서 1개월간 배양하여 새로운 taxa를 몇 개 발견했으며, Goodfellow와 Haynes(1984)는 18°C에서 10주간 배양하여 marine habitat에서 새로운 균을 분리하기도 하였다.

5. 콜로니 선정(Colony selection)

분리의 마지막 과정으로서 균을 인지하고 무균적인 조작을 통해 순수분리 하는 콜로니 선정은 시간이 오래 걸리며 가끔 실망을 주지만, 가장 중요

한 과정의 하나이다.

방선균 중 특정한 taxa(예, genera)가 목적 미생물이라면 작업거리가 길면서 고배율을 가진 현미경으로 형태 등을 관찰하여 대사 미생물을 1차 선정할 수 있으나, 동일한 genus라 하더라도 서로 다른 species를 구별하는 것은 거의 불가능하다.

항생물질의 생산균 분리가 검색의 목적이라면 감수성이 높은 시험균을 분리배지 위에 overlay하거나 replica-plating 방법을 쓸 수 있으나 이들 방법들은 나름대로의 단점을 갖고 있다. 그러므로 흥미있는 대사산물을 생산하는 균주를 선별하기 위해서는 편리하거나 효과적인 방법을 독자적으로 개발하여 사용하여야 한다. 예를 들면 β -lactamase 저해제 생산균주를 선별하기 위해서 chromogenic test(O'Callaghan *et al.*, 1972)를 이용하기도 하였으며, β -lactam에 매우 민감한 변이주를 β -lactam 생산균 탐색에 이용(Kitano *et al.*, 1977)하여 새로운 물질을 발견하기도 하였다.

지금까지 호기성균의 선택분리를 위해 방선균을 대상으로 시료 선정, 시료 전처리, 배지 배양, 콜로니 선정 등에 관해 알아보았으나, 뚜렷한 목적 물질과 미생물을 선정한 뒤, 생리학적, 분류학적 지식에 바탕을 둔 선택분리를 할 때 가장 효과적으로 또 단시일내에 유용균주 및 유용물질을 얻을 수 있다는 것을 강조하고자 한다.

참고문헌

- Al-Diwany, L.J., B.A. Unsworth and T. Cross. 1978. *J. Appl. Bact.* **45**: 249-258.
- Andresen, A.A. 1958. *J. Bact.* **76**: 471-484.
- Athayle, M., J. Lacey and M. Goodfellow. 1981. *J. Appl. Bact.* **51**: 289-297.
- Atayle, M., M. Goodfellow, J. Lacey and R.P. White. 1985. *Int. J. Syst. Bact.* **35**: 86-98.
- Bachofer, R., O. Ottmans and F. Lingens. 1973. *Arch. Microbiol.* **90**, 141.
- Burman, N.P., C.W. Oliver and J.K. Stevens. 1969. In "Isolation methods for microbiologist" (Eds. D.A. Shapton and G.W. Gould) pp.127-134. Academic Press, London.
- Callaham, D., P.D. Tredici and J.G. Torrey. 1978. *Science*. **199**: 899-902.
- Cross, T. 1981. *J. Appl. Bact.* **50**: 397-424.
- Cross, T. 1982. *Develop. Ind. Microbiol.* **23**: 1-18.
- Flowers, T.H. and S.T. Williams. 1977. *Microbiosis* **18**: 223-228.
- Goodfellow, M. and J.A. Haynes. 1984. In "Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes" (Eds. L. Oritz-Oritz, L.F. Bojalil and Y. Yakoleff), pp.453-477. Academic Press, Orlando.
- Goodfellow, M. and V.A. Orchard. 1974. *J. Gen. Microbiol.* **83**: 375-387.
- Goefellow, M. and E. Williams. 1986. In "Biotechnology and Genetic engineering reviews" Vol. 4. Ed. Russell, E.D. pp.213-262. Intercept Ltd. Newcastle upon Tyne.
- Hagedorn, C. 1976. *Appl. Env. Microbiol.* **32**: 368-375.
- Hanka, L.J., D.W. Rueckert and T. Cross. 1985. *FEMS Microbiol. Letters.* **30**: 365-368.
- Jensen, H.L. 1928. *Soil Science* **25**: 225-233.
- Kang, H.I. 1989. Ph. D. thesis, Seoul National University.
- Keast, D., P. Rowe, B. Bowra, L. Sanfelieu, E.D. Stapley and H.B. Woodruff. 1984. *Microbiol. Ecol.* **10**: 123-136.
- Kitano, K., K. Nara and Y. Nalsao. 1977. *J. Antibio.* **30**: Suppl. S239-S245.
- Kuster, E. and S.T. Williams. 1964. *Nature*. **202**: 928-929.
- Lacey, J. and J. Dutkiewicz. 1976a. *J. Appl. Bact.* **41**: 13-27.
- Lacey, J. and J. Dutkiewicz. 1976b. *J. Appl. Bact.* **41**: 315-319.
- Lonsdale, J.T. 1985. Ph.D. thesis. University of Newcastle upon Tyne.
- Maher, H., H.Y. Cuellar, J. Smallheer, T.H. Williams. G.J. Sasso and J. Berger. 1979. *Monotsh. Chem.* **110**: 531-540.
- McCarthy, A.J. and T. Cross. 1984. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 5-25.
- McKay, S.J. 1977. *Appl. Env. Microbiol.* **33**:

- 227.
27. Mikami, Y., K. Miyashita and T. Arai. 1982. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 1709-1712.
28. Miyashita, K., Y. Mikami and T. Arai. 1984. *Int. J. Syst. Bact.* **34**: 405-409.
29. Noland, R. and T. Cross. 1988. In "Actinomycetes in biotechnology" (Eds. M. Goodfellow, S.T. Williams and M. Mordaski) pp.132. Academic Press. London.
30. Nonomura, H. and Y. Ohara. 1969. *J. Ferm. Technol.* **47**: 463-469.
31. Nonomura, H. and Y. Ohara. 1971. *J. Ferm. Technol.* **49**: 887-894.
32. O'Callahan, C.H., A. Morris, S.M. Kirby and A.H. Shingler. 1972. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1**: 283.
33. Okami, Y. and T. Okazaki. 1972. *J. Antibiot.* **25**: 456-460.
34. Okami, Y. and T. Okazaki, T. Kitahara and H. Umezawa. 1976. *J. Antibiot.* **29**: 1019-1025.
35. Okazaki, T. and A. Naito. 1986. In "Biological, biochemical, and biomedical aspects of actinomyces" (Eds. G. Szabo, S. Biro and M. Goodfellow) pp.739-741. Akademiai Kiado. Budapest.
36. Orchard, V.A. 1978. *Newzealand J. Agric. Res.* **21**: 21-28.
37. Orchard, V.A. and M. Goodfellow. 1974. *J. Gen. Microbiol.* **85**: 160-162.
38. Percich, J.A. and Lockwood, J.L. 1978. *Can. J. Microbiol.* **24**: 1145-1152.
39. Rowbotham, T.J. and t. Cross. 1977. *J. Gen. Microbiol.* **100**: 231-240.
40. Sato, M., K. Araima and T. Beppu. 1985. *Bact. Letters.* **7**, 159-164.
41. Sneath, P.H.A. 1980. *Computers Geosci.* **6**: 21-26.
42. Szabo, I., M. Maraton, L. Ferenczy and I. Buti. 1967. *Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae.* **14**: 239-249.
43. Taber, W.A. 1960. *Can. J. Microbiol.* **6**: 503-514.
44. Vickers, J.C., S.T. Williams and G.W. Ross. 1984. In "Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes" (Eds. L-Ortiz, L.F. Bojali and V. Yakoleff) pp.553-561. Academic Press. Orlando.
45. Wellington, E.M.H. and Cross, T. 1983. *Prog. Ind. Microbiol.* **17**: 7-35.
46. Williams, S.T. and F.L. Davies. 1965. *J. Gen. Microbiol.* **38**: 251-262.
47. Williams, S.T., F.L. Davies, C.I. Mayfield and M.R. Khan. 1971. *Soil Biol. Biochem.* **3**: 187-195.
48. Williams, S.T., M.Shameemulah, E.t. Weston and C.I. Mayfield. 1972. *Soil Biol. Biochem.* **4**: 215-225.
49. Williams, S.T. and E.M.H. Wellington. 1982. In "Bioactive microbial products: Search and discovery" (Eds. J.D. Bu'lock, L.J. Nisbet and D.J. Winstanley) pp.9-26. Academic Press. London.
50. Williams, S.T. M. Goodfellow, G. Alderson, E.M.H. Wellington, P.H.A. Sneath and M.J. Sackin. 1983a. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1743-1813.
51. Williams, S.T., M. Goodfellow, E.M.H. Wellington, J.C. Vickers, G. Alderson, P.H.A. Sneath, M.J. Sackin and A.M. Mortimer. 1983b. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1815-1830.
52. Williams, S.T., S. Lanning and E.M.H. Wellington. 1984. In "The biology of actinomycetes" (Eds. M. Goodfellow, M. Mordaski and S.T. Williams) pp.481-528. Academic Press. London.
53. Williams, S.T., J.C. Vickers, M. Goodfellow, G. Alderson, E.M.H. Wellington, P.H.A. Sneath, M.J. Sackin and A.M. Mortimer. 1984. In "Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes" (Eds. L-Ortiz-Ortiz, L.F. Bojali and V. Yakoleff) pp.537-551. Academic Press. London.
54. Yoshida, N., Y. Hachiya, K. Ueda, Y. Tani and K. Ogata. 1973. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 661-667.