

항암성 항생물질을 생산하는 토양 방선균 YBE-316의 분리 및 동정

신진이 · 박재홍 · 배동훈¹ · 유주현*

연세대학교 식품·생물공학과 생물산업소재연구센터, ¹단국대학교 식품공학과

Isolation and Identification of a Soil Actinomycetes YBE-316 Producing an Antitumor Antibiotic

Jin-E Shin, Jae-Hong Park, Dong-Hoon Bai¹ and Ju-Hyun Yu*

Department of Food and Biotechnology, Bioproducts Research Center,
Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

¹Department of Food Engineering, Dankook University, Chunan 330-180, Korea

Abstract — Antitumor antibiotic material was produced by *Streptomyces* sp. YBE-316 which was isolated from soil, and the optimal culture conditions for the antitumor antibiotic material production were as follows; 2.0% (w/v) sucrose, 0.8% (w/v) polypeptone, 0.4% (w/v) yeast extract, 0.2% (w/v) K₂HPO₄, pH 7.0, at 30°C, 150 rpm and for 100 hours culture. The antitumor antibiotic material had strong antitumor antibiotic activities against most testing tumor cell lines, gram positive and negative bacteria, yeasts, and, especially, *Penicillium chrysogenum* in fungi.

제2차 세계대전 후 본격적인 항암제 개발 연구가 시작된 이래 항암제 screening 기술은 많은 발전을 해 왔다. Screening 방법에는 종양 system과 미생물 및 생화학적인 방법을 이용한 *in vitro* system이 있다. 암의 치료를 위해서 여러 가지 동물을 이용한 연구가 *in vivo* 상에서 행해지고 있으나, 이 방법 외에도 암 세포화된 각종 cell line들을 이용하여 *in vitro* 상에서도 많은 연구가 행해지고 있다(1). Harrison, Carrel 등에 의하여 19세기 초부터 조직배양이 시작된 이후 (2, 3), 1943년 Earle 등에 의해 병아리 배(embryo)의 조직세포배양 연구로부터 세포배양에 대한 연구가 고무되었다(4). 1952년 Gey 등에 의해 최초로 HeLa cell line이 확립되어(5) 많은 cell line들이 연구되어 졌고, 이로부터 생체 호르몬(hormone), 항체(antibody) 및 인터페론(interferon) 등과 같은 유용물질이 많이 생산되었으며, cell line 자체의 연구로부터 암세포에 대한 여러 정보가 알려지게 되었다. 특히 cell line은 생체내 암세포가 나타내는 지속적인 성장·분열의 특성을 가진다는 점에서 암세포화된 것이기 때문에 항암물질의 개발에 많이 사용되고 있다. 항암제 screening에서 *in vitro* 방법은 종양 system에 비해 적은

양으로 실험이 가능하고 짧은 시간과 싼 가격으로 초기 선별 작업이 가능하다. *In vitro*에서 활성이 있던 물질이 *in vivo*에서 활성을 갖지 못하는 경우도 있지만, Foley와 Epstein은 *in vitro*에서 사용되고 있는 screening 방법 중 human carcinoma cell을 이용하는 방법에서 250개 항암물질의 82%가 *in vivo*에서도 활성이 있다고 밝혀, 미생물 배양액이나 천연물로부터 항암물질을 screening 하는 예비 방법으로 *in vitro* system을 사용할 수 있음을 시사하고 있다.

미생물은 다양한 생리대사기작을 가지며 많은 종류의 생체활성물질을 만들어 내고 있으며, 현재 사용되고 있는 생물공업제품의 대부분이 미생물의 대사물질로부터 개발된 생체활성물질이다. 이러한 관점에서 볼 때 탐색되지 않은 미생물을 대상으로 새로운 생체활성물질을 발견할 수 있는 가능성이 높기 때문에 미생물에 의한 생체활성물질 탐색은 매우 중요한 의의를 갖는다. 본 연구에서는 새로운 항암제 개발을 위해 토양으로부터 *Streptomyces* sp. YBE-316을 분리, 동정하고 항암성 항생물질 생산을 위한 최적배양조건을 검토하였다.

재료 및 방법

Key words: Isolation, identification, actinomycetes, antitumor antibiotic

*Corresponding author

토양으로부터 항암물질 생산 방선균의 탐색

1g의 토양을 시험관에 넣고 살균 생리식염수(0.85% NaCl) 5 ml를 가하여 vortex mixer로 진탕하고 2시간 동안 정지한 후 상등액을 항곰팡이제인 sodium propionate가 0.1% 첨가된 petri dish 상의 Czapek 배지(1.0% glycerine, 0.2% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.001% FeSO₄·7H₂O, 1.5% agar) 및 전분암모니아 배지(1.0% soluble starch, 0.05% NH₄Cl, 0.05% KH₂PO₄, 1.5% agar)에 streaking 하여 7일간 배양하였다. 이때 생성된 colony를 새로운 전분암모니아 배지에 이식하여 1차 균주분리를 행하였다.

1차로 분리한 균주를 screening 용 액체배지(2.0% sucrose, 0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.5% KH₂PO₄, 0.5% Na₂HPO₄·12H₂O, 2.0% GVS)에 접종하여 30°C, 150 rpm에서 5일간 진탕배양하였다. 배양액에 동량의 acetone을 가하여 vortex mixer로 교반한 후 배양액을 4°C에서 12시간 방치하였다. 5000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 분리한 후 이를 감압농축하여 acetone을 제거하고 균주탐색시료로 사용하였다.

종양증식 억제율의 측정

항암물질의 탐색에 사용한 세포는 HEp2(Epidermoid carcinoma, larynx, human)(6), PC14(Prostate adenocarcinoma, human)(7), K562(Chronic myelogenous leukemia, human)(8) 등이며, 항암물질의 bioassay 용 기질로는 PC14 세포를 사용하였다. 실험에 사용한 세포의 배양에는 RPMI-1640(9)에 10% fetal bovine serum을 혼합한 배지에 100 units의 penicillin/streptomycin을 첨가한 것을 사용하여 37°C의 CO₂ 배양기(5% CO₂)에서 행하였으며, 세포를 배양용기에서 분리하기 위한 trypsin 용액(10)은 Hank's balanced salts solution(HBSS)(11)에 0.05%(w/v) trypsin과 0.53 mM EDTA가 첨가된 것을 사용하였고 배양 세포의 세척등에는 HBSS를 사용하였다.

세포수의 측정에는 hemacytometer와 trypan blue 염색법(12)을 이용하였다. 분리한 세포배양액 10 μl와 trypan blue solution(0.4% trypan blue, 0.8% NaCl, 0.06% KH₂PO₄, 0.05% methyl-*p*-hydroxybenzoate, pH 7.2) 10 μl를 잘 혼합한 후 혼합액의 10 μl를 hemacytometer에 취해 inverted microscope를 이용해 세포수를 측정하였다.

종양증식 억제율은 1차적으로 세포의 형태변화를 관찰한 후 이중 활성을 가지는 시료를 MTT assay 법(13)으로 측정하였다. MTT solution은 phosphate buffer solution(PBS)에 5 mg/ml의 MTT를 용해한 것을 사용하였다. 상기의 방법에 의해 조제된 균주탐색

시료 10 μl를 96-microwell plate에 5×10⁵ cells/ml의 농도로 분주되어 미리 24시간 배양된 세포배양액 90 μl에 가하고 24시간 배양 후 조제한 MTT solution을 10 μl/well 씩 첨가하여 4시간을 더 배양하고 배지를 흡인, 제거한 다음 0.04 N HCl을 함유한 isopropyl alcohol을 100 μl/well 씩 가하고 plate-mixer에서 잘 교반하여 침전물을 완전히 용해하였다. 각 well의 흡광도는 660 nm를 reference wavelength로 하여 550 nm에서 2-wavelength microplate photometer를 사용하여 측정하였다. 종양증식 억제율은 다음의 식에 대입하여 계산하였다.

$$\text{종양증식 억제율(\%)} = [(A - B)/A] \times 100$$

A : 시료 무첨가 well의 A₅₅₀

B : 시료 첨가 well의 A₅₅₀

항암물질 생산균주의 동정

선별균주의 동정을 위하여 균의 이화학적 및 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성을 조사하였다. 이화학적 특성은 diaminopimelic acid(DAP) isomer의 분석과 세포내 당분석(14)을 통하여 관찰하였다. 형태학적 특성은 scanning electron microscopy(SEM)로 포자의 사슬형태, 표면형태, 크기, sclerotia의 형성 유무 등(15)으로, 배양학적 성질은 International Streptomyces Project(ISP)에 명시된 배지를 사용하여 30°C에서 7, 14, 21일 간격으로 생육정도, 기균사의 색, 뒷면의 색, 가용성 색소 및 멜라닌 생성 여부로 관찰하여 행하였다. 생리학적 특성 중 당의 이용성과 멜라닌 생성은 Shirling과 Gottlieb의 방법(16)으로, 젤라틴 액화력, 전분 분해력, 질산염 환원력은 Gordon과 Mihm의 방법(17)으로, 황화수소 생성은 Kuster와 Williams의 방법에 따라 조사하였다. 분리균주의 동정은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(18) 및 Berd(19)와 Williams(20) 등의 방법에 준하여 행하였다.

선별균주의 항생물질 내성 및 항암, 항균 Spectrum의 측정

선별균주의 각종 항생물질에 대한 내성은 paper disc agar diffusion method(21, 22)를 이용하여 조사하였다. 항암 spectrum은 상기의 방법으로 만든 각종 세포기질 90 μl에 시료 10 μl를 가한 후 세포의 생육 상태를 inverted microscope로 관찰하여 결정하였다. 항균 spectrum은, 세균의 경우에는 LB agar 배지(1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% NaCl, 1.5% agar), 곰팡이와 효모의 경우에는 YM agar 배지(0.3%

yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1.0% glucose, 1.5% agar) 15 ml을 petri dish에 취해 균화 후, soft agar 배지(0.6% agar) 4 ml에 세균의 경우 12시간, 곰팡이와 효모의 경우 36시간동안 배양한 배양액을 1%가 되게 현탁하여 평판배지에 overlay 하여 사용하였다. 활성은 paper disc 법에 의해 생성된 저지환으로 측정하였다.

최적 배지조성 및 배양조건의 결정

최적 탄소원은, screening 배지에, 각종 탄소원을 2.0%로 첨가하여, 최적 질소원은 각종 질소원을 1.0%로 첨가하여, 최적 무기염은 각종 무기염을 0.1%로 첨가하여 그 활성을 관찰하여 결정하였다. 또한 결정된 각각의 탄소원, 질소원, 무기염의 농도를 변화시키면서 활성을 관찰하여 최적 배지조성을 결정하였다. 최적 배지 초기 pH는 위에서 결정된 최적 배지의 pH를 4.0~12.0으로 변화시키면서, 최적 배양온도는 온도를 10~50°C로 변화시키면서 그 활성을 측정하여 결정하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

토양으로부터 분리한 약 3000주의 균주중 1차적으로 항암활성을 지니는 9주를 선별하였다. 이 중 피검 cell line으로 사용한 HEp2, PC14, K562에 모두 강한 활성을 나타내는 균주를 선별하여 균주 YBE-316이라 명명하였으며, 본 균주의 배양추출액을 PC14에 처리

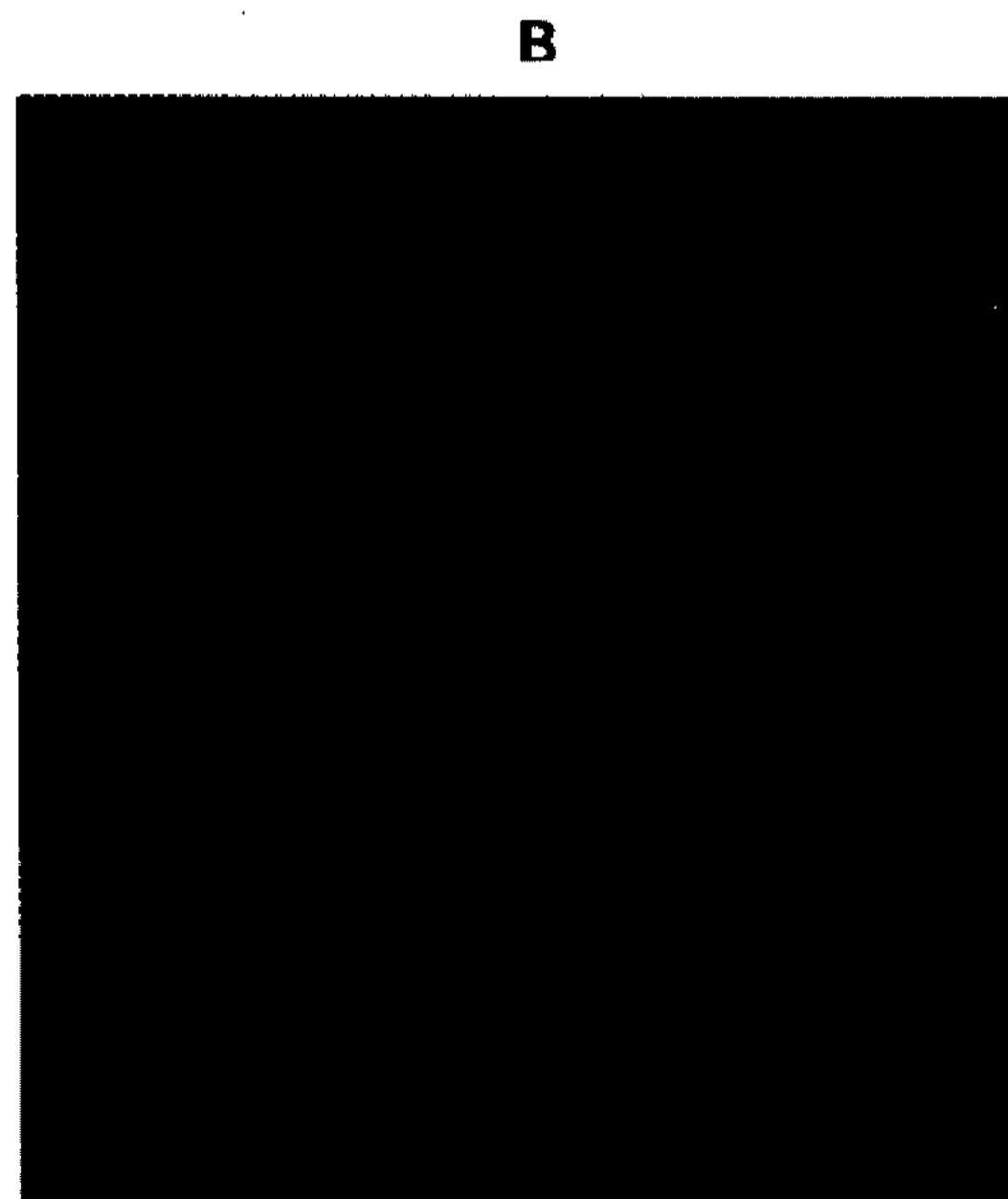
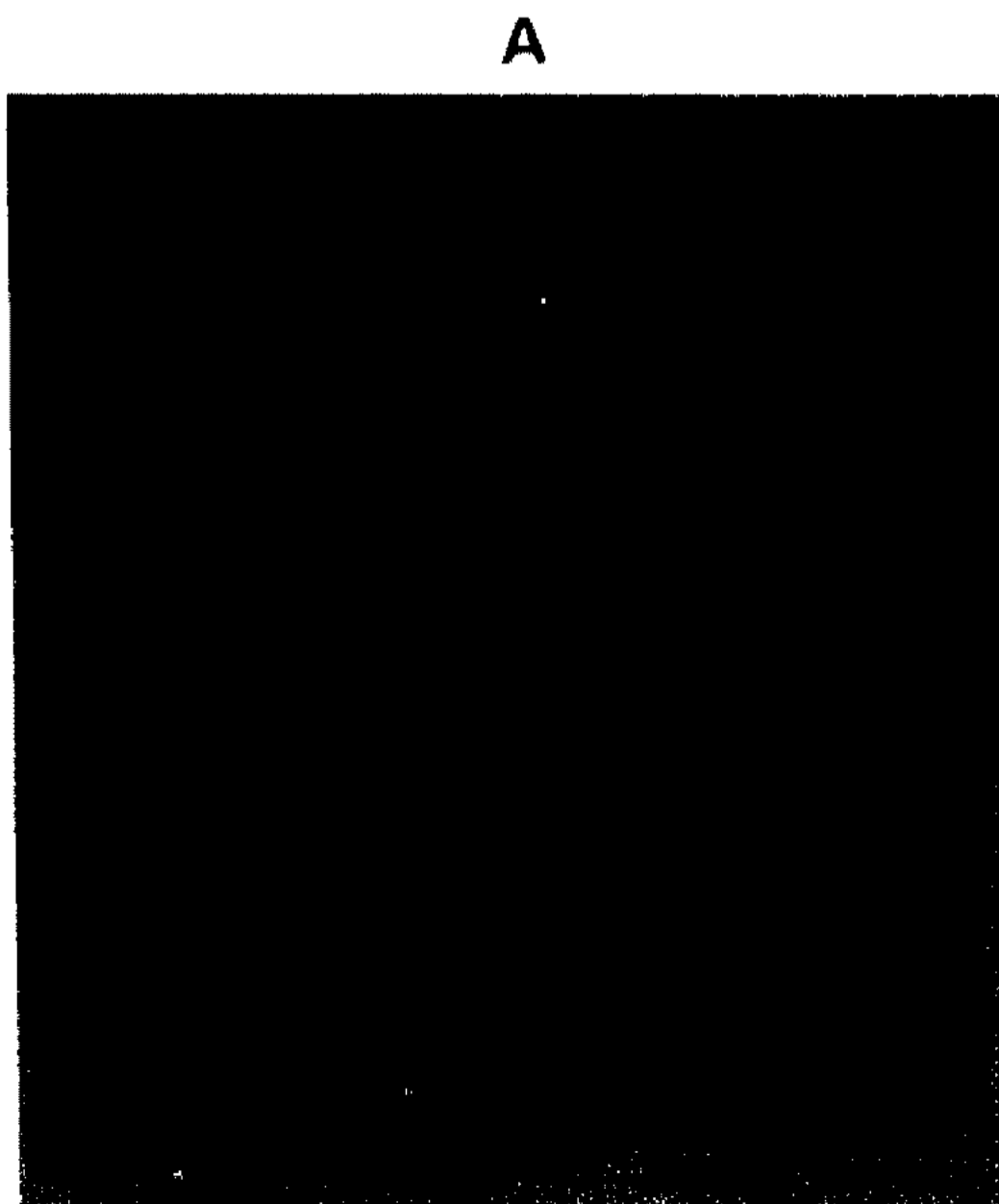


Fig. 1. Microscopic measurement of cell viability in PC14 cell line (×200). A; before addition of sample, B; after addition of sample

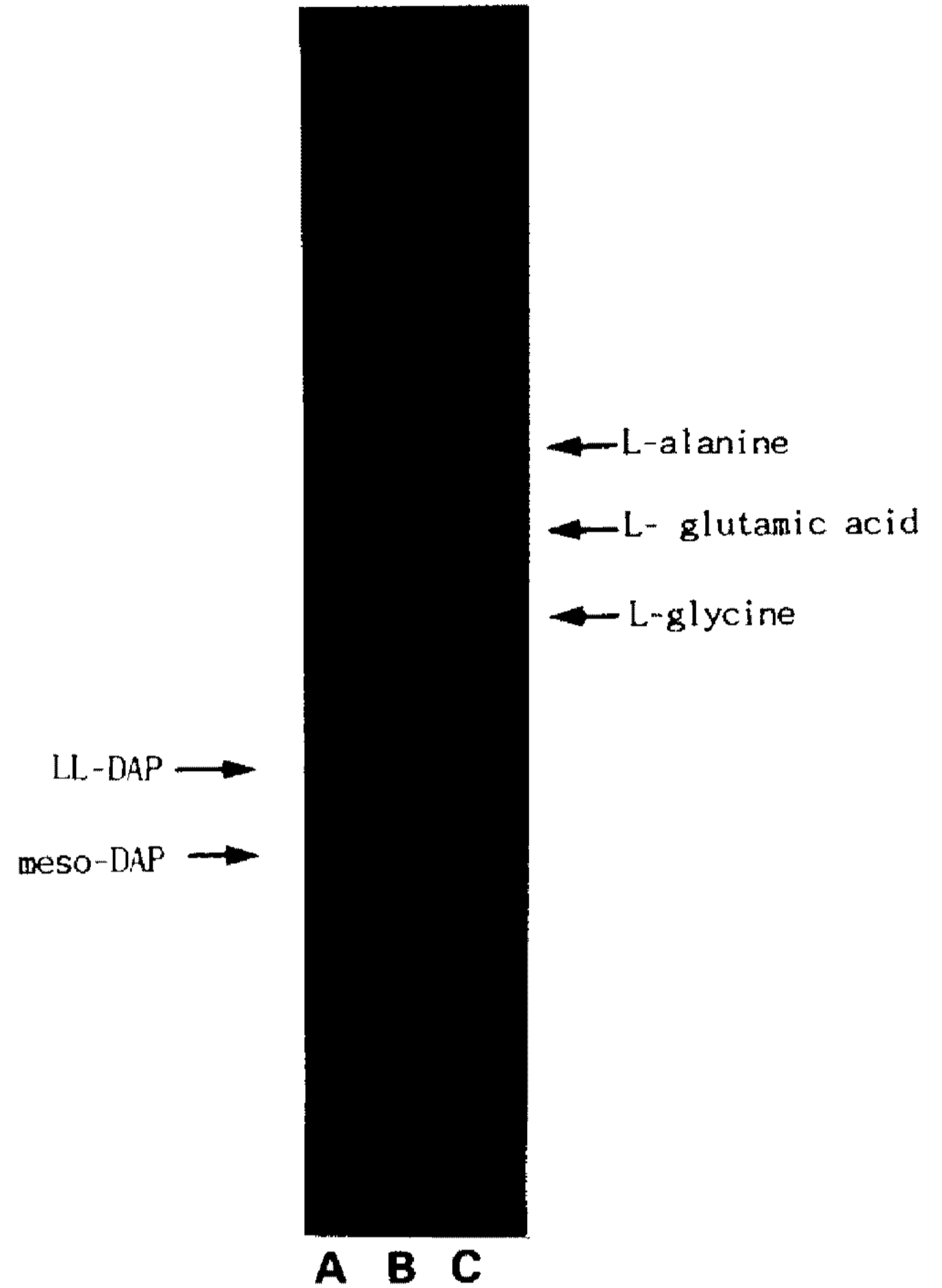


Fig. 2. Cellulose thin layer chromatogram of cell wall diaminopimelic isomer and amino acid of strain YBE-316. Solvent system; MeOH:water:10N HCl:pyridine=80:17.5:2.5:10, Lane A; standard DAP isomers, Lane B; strain YBE-316, Lane C; standard amino acids

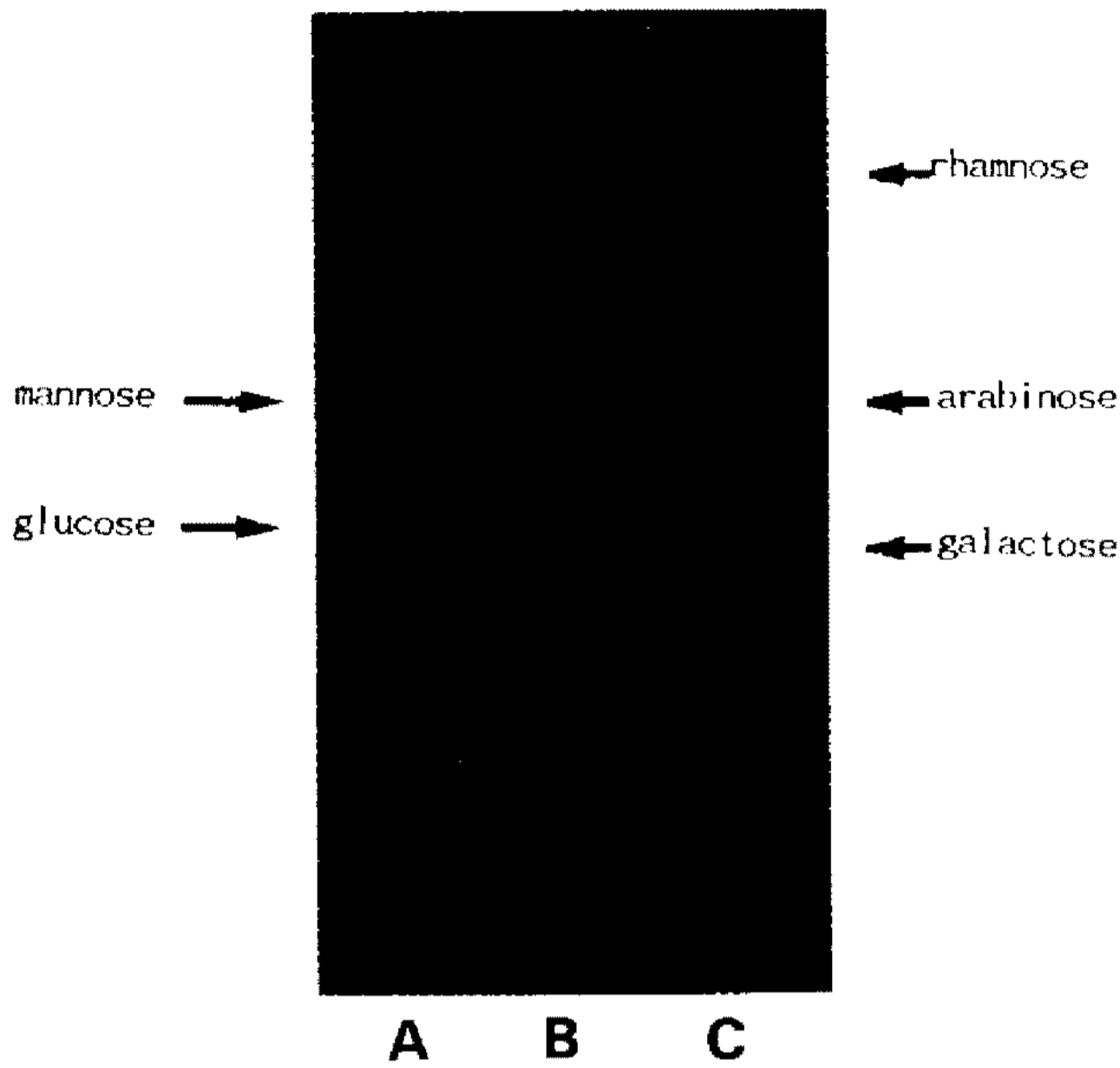


Fig. 3. Cellulose thin layer chromatogram of whole cell sugar of strain YBE-316.
Solvent system; n-butanol:water:pyridine:toluene=10:6:6:1, Lane A and C; standard sugars, Lane B; strain YBE-316

한 결과 세포의 형태변화에 영향을 미치는 것이 관찰되었다(Fig. 1).

균주 YBE-316 세포벽의 DAP isomer는 LL-DAP 이었으며, 아미노산은 alanine, glutamic acid, glycine 등이 검출되어 glycine으로 연결된 peptide를 가지는 peptidoglycan type이 A3이며 wall chemotype I(23)에 해당하였다(Fig. 2). 세포내의 당성분은 없는 것으로 나타나(Fig. 3), Lechevalier의 sugar pattern에 따른 분류에 의하면 pattern C(24)에 해당한다. 따라서 본 균주 YBE-316은 *Streptomyces*에 해당하며, 이에 속하는 방선균 속으로는 *Intrasporangium*, *Kineosporia*, *Sporichthya*, *Streptomyces*, *Streptoverticillium* 등이 있다. Yeast extract-malt extract 배지에서 3주간 배양한 균주 YBE-316의 균사체와 포자를 전자현미경으로 관찰한 결과 포자사슬형태는 나선형이었고, 단포자의 모습은 구형이었으며, 포자표면은 smooth 하였다(Fig. 4). 각각의 고체배지에 균주 YBE-316을 접종하여 28°C에서 2주간 배양하며 균락의 성장, 기균사의 색, 뒷면의 색, 가용성 색소의 생성 여부를 관

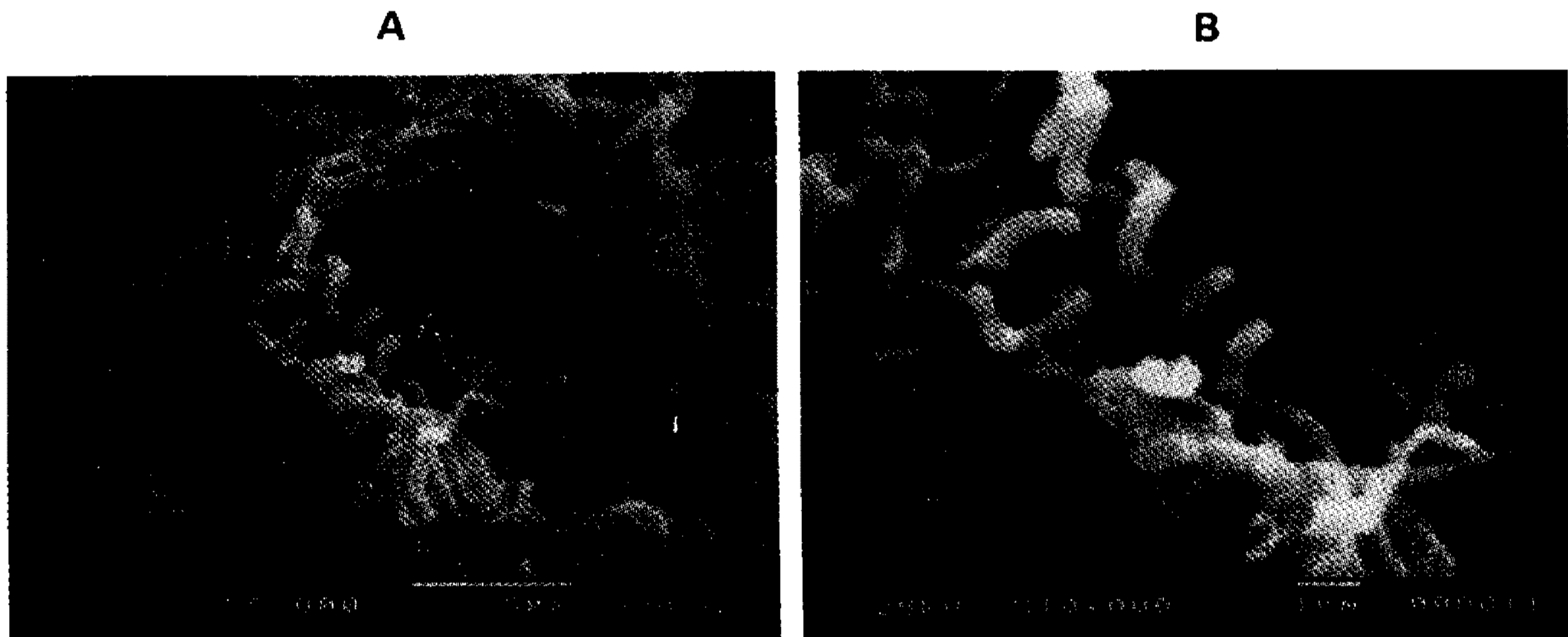


Fig. 4. Scanning electron microphotogram of strain YBE-316.
A; ×5,000, B; ×10,000

Table 1. Cultural characteristics of strain YBE-316 on various agar media

Media	Growth	Aerial Mycelium Color	Reverse Side Color	Soluble pigment
Yeast extract-malt extract agar (ISP2)	good	white	dark yellow	none
Oatmeal agar (ISP3)	good	white	brown	none
Inorganic salts-starch agar (ISP4)	good	gray	yellow	none
Glycerol-asparagine agar (ISP5)	good	white	yellow	none
Tyrosine agar (ISP7)	good	white	dark brown	none
Glucose-nitrate agar	good	white	yellow	none
Czapek agar	good	white	yellow	none

Table 2. Physiological characteristics of strain YBE-316

Factors	Characteristics
Carbon Source	
Glucose	+
Lactose	-
Sucrose	-
Mannitol	-
Salicin	-
Inositol	-
L-Arabinose	-
Raffinose	-
L-Rhamnose	-
D-Xylose	-
Fructose	-
Hydrolysis of Gelatin	+
Hydrolysis of Starch	+
Reduction of Nitrate	+
Production of H ₂ S	-
Melanin formation	+

Table 3. Antibiotic resistance of strain YBE-316

Antibiotic	Concentration (µg/ml)	Inhibition Zone Diameter (mm)
Penicillin G	50	0
Rifampicin	50	22
Bacitracin	50	20
Streptomycin	50	32
Erythromycin	50	29
Chloramphenicol	100	20
Lincomycin	100	21
Kanamycin	50	34
Tetracycline	200	25
Ampicillin	50	11

찰한 결과, 전반적으로 생육이 양호하였으며, 기균사의 색은 흰색내지 회색이었고 가용성 색소를 형성하지 않았다(Table 1). 당 이용성을 검토한 결과 대부분의 당을 이용하지 못하였으며, 젤라틴 액화능, 전분분해능, 질산염 환원력, 멜라닌 생성은 양성으로, 황화수소 생성은 음성으로 나타났다(Table 2). 상기의 결과를 종합하여 볼 때 본 균주는 *Streptomyces* 중 *Streptomyces* sp.에 속하였으며 따라서 본 균주를 *Streptomyces* sp. YBE-316이라 명명하였다.

선별균주의 항생물질 내성 및 항암, 항균 Spectrum

Table 4. Antitumor and antibiotic spectrum

Cell Lines	Activity
HEp2 (epidermoid carcinoma, larynx, human)	++
PC14 (prostate adenocarcinoma, human)	++
KATO III (gastric carcinoma, human)	+
K562 (chronic myelogenous leukemia, human)	++
HL60 (peripheral blood, promyelocytic, human)	+
A549 (lung carcinoma, human)	+
L929 (fibroblast, mouse)	+
L1210 (lymphocytic leukemia, mouse)	+
CHO (ovary, chinese hamster)	+

Microorganisms	Inhibition Zone Diameter (mm)
<i>Escherichia coli</i> KCCM 11596	19
<i>Proteus vulgaris</i> KCCM 11906	28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCCM 11540	25
<i>Bacillus subtilis</i> KCCM 11316	18
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 11640	20
<i>Candida albicans</i> KCCM 11282	20
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 12028	20
<i>Penicillium chrysogenum</i> KCCM 34767	28
<i>Aspergillus niger</i> KCCM 11885	0
<i>Mucor hiemalis</i> KCCM 12347	0

Table 5. Optimal medium composition

Component	Composition
Sucrose	2.0%
Polypeptone	0.8%
Yeast extract	0.4%
K ₂ HPO ₄	0.2%

Streptomyces sp. YBE-316의 각종 항생물질에 대한 내성을 조사한 결과, 대부분의 항생물질에 sensitive 하였고, penicillin G에 대해서만 내성을 나타내었다

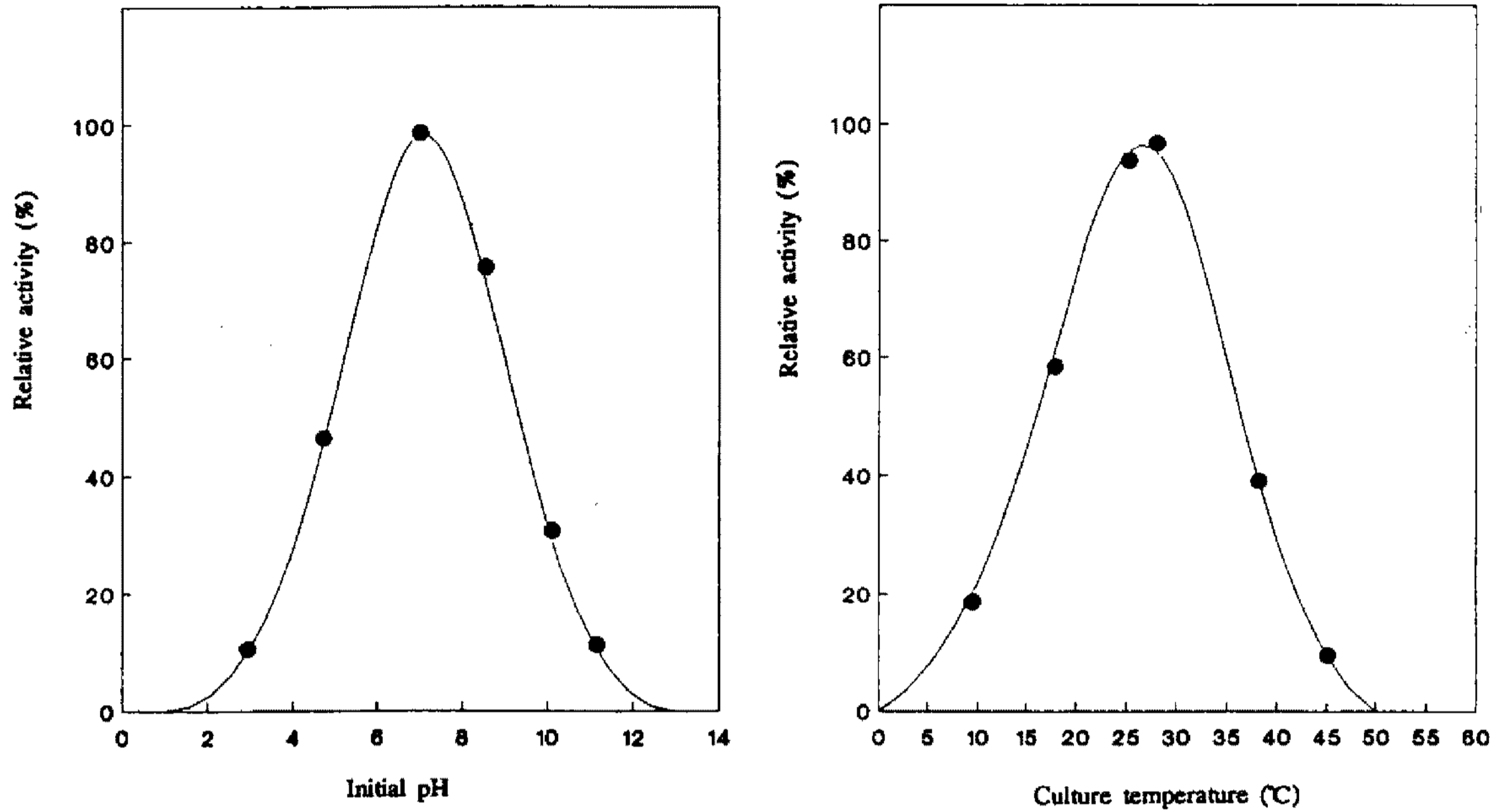


Fig. 5. Effect of initial pH (left) and culture temperature (right) on the antitumor antibiotic production from *Streptomyces* sp. YBE-316.

(Table 3). *Streptomyces* sp. YBE-316의 항암 spectrum을 검토한 결과 anchorage dependent 및 anchorage independent cell 모두에 강한 활성을 나타내었으며, 항균 spectrum은 그람 양성·음성세균과 효모에 모두 강한 활성을 나타내었으며 곰팡이 중에서는 *Penicillium chrysogenum*에 특히 강한 활성을 보였다 (Table 4).

항암성 항생물질의 최적배양조건

항암성 항생물질의 생산을 위한 최적 배양조건은 다음과 같았다.

탄소원의 경우, 항암 및 항균활성은, sucrose를 사용하였을 때가 가장 좋았으며 그 최적농도는 2.0%이었다. 질소원의 경우는 polypeptone이나 yeast extract를 사용하였을 때가 가장 좋았으며 최적농도는 각각 0.8%, 0.4%이었다. 무기염의 경우는 K₂HPO₄를 사용하였을 때가 가장 좋았으며 최적농도는 0.2%이었다(Table 5).

배지의 초기 pH 및 배양온도에 따른 항암성 항생물질의 생산성을 검토한 결과 초기 pH 7.0, 배양온도 30°C에서 최적이었다(Fig. 5). 본 최적조건에서 배양하는 동안 균의 생육, 배지 pH, 항암 및 항균활성을 검토한 결과, 접종 후 40시간이 경과하면서 대수증식기에 들어갔으며 100시간이 지나면서 정지기 및 사멸기에 도달하였고, 항암성 항생물질의 생산은 42시간이 지나면서 증가하기 시작하여 100시간이 경과한 후 최대 활성을 보였다. pH는 초기의 7.0에서 조

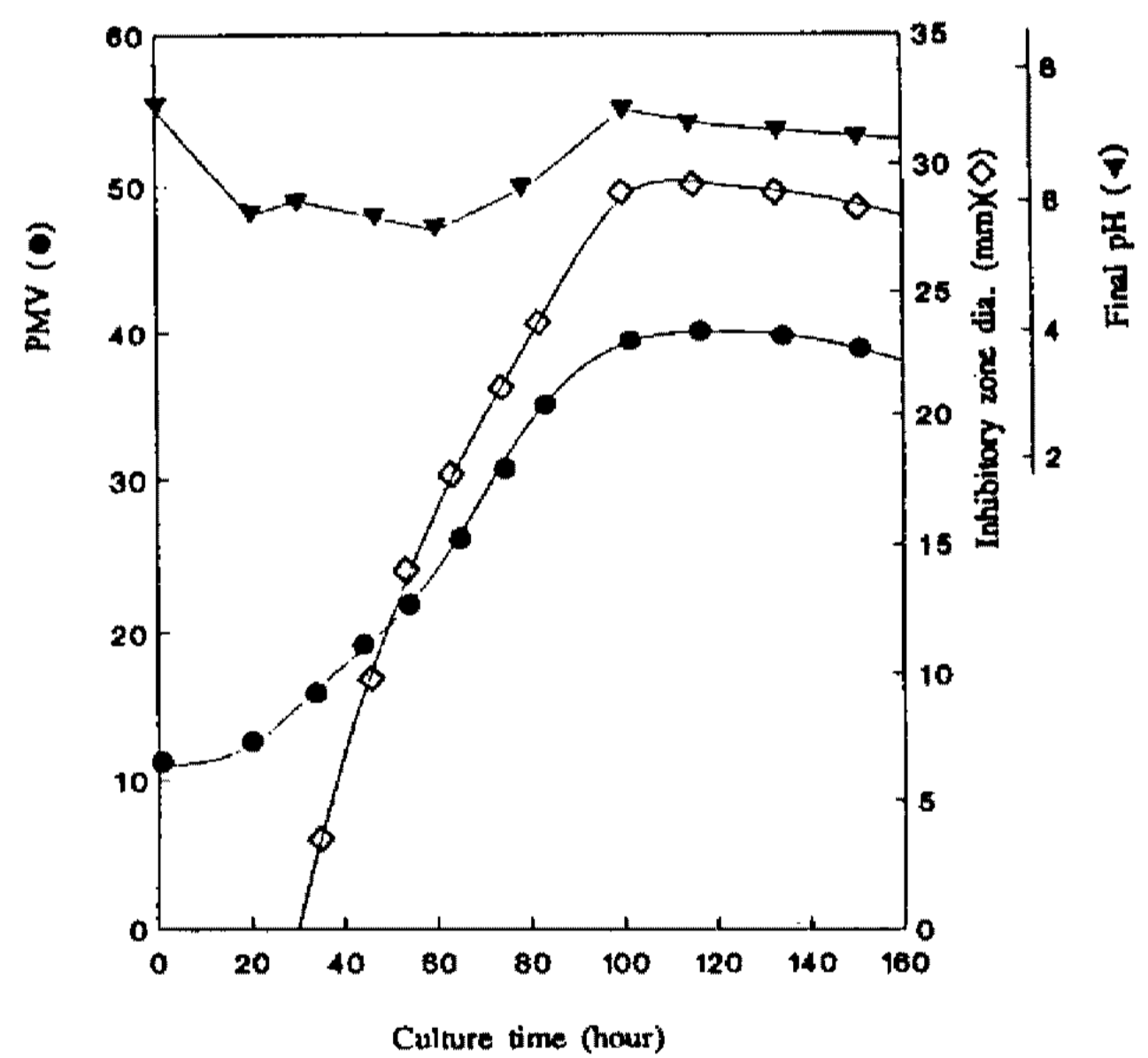


Fig. 6. Time course of the antitumor antibiotic production from *Streptomyces* sp. YBE-316.

금씩 감소하여 100시간 이후에는 pH 6.8로 유지되었다(Fig. 6).

요 약

토양으로부터 항암성 항생물질을 생산하는 균주 YBE-316을 분리하여 이화학적, 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성을 검토한 결과, 본 균주는 *Streptomyces* sp. YBE-316으로 동정되었다. 본 균주로부터의 항암

성 항생물질은 실험에 사용한 대부분의 암세포와, 그람 양성·음성세균, 효모에 강한 활성을 나타내었으며 곰팡이 중에서는 특이적으로 *Penicillium chrysogenum*에만 활성을 보였다. 항암성 항생물질 생산을 위한 최적 배양조건을 검토한 결과, 2.0% sucrose, 0.8% polypeptone, 0.4% yeast extract, 0.2% K₂HPO₄, pH 7.0의 배지에서 30°C, 150 rpm으로 100시간 배양하였을 때 최대활성을 나타내었다.

감사의 말

본 연구는 한국과학기술처 주관 G7 Project 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

참고문헌

1. 동물세포공학기술의 원리와 응용. 1989. II. 세포배양의 기초지식. 한국과학기술원 산학협동 공개강좌. 한국과학기술원 생물공학과.
2. Harrison, R.G. 1907. Observations on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **4**: 140-143.
3. Carrel, A. 1912. On the permanent life of tissues outside the organism. *J. Exp. Med.* **15**: 516-528.
4. Earle, W.R., E.L. Schillind, T.H. Stark, N.P. Straus, M.F. Brown, and E. Shelton. 1943. Production of malignancy *in vitro*, IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **4**: 165-212.
5. Gey, G.O., W.D. Coffman, and M.T. Kubicek. 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**: 364-365.
6. Moore, A.E., L. Sabachewsky, and H.W. Toolan. 1955. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res.* **15**: 598-602.
7. Greene, L.A. and A.S. Tischler. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 2424-2428.
8. Collins, S.J., R.C. Gallo, and R.E. Gallogher. 1977. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature.* **270**: 347-349.
9. Moore, G.E., R.E. Gerner, and H.A. Franklin. 1967. Culture of normal human leukocytes. *J. Am. Med. Assoc.* **199**: 519-524.
10. Waymouth, C. 1974. To disaggregate or not to diaggregate: Injury and cell diaggregation, transient or permanent? *In Vitro.* **10**: 97-111.
11. Hanks, J.H. and R.E. Wallace. 1949. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Exp. Biol. Med.* **71**: 196-201.
12. Patterson, M.K. 1979. *Method in Enzymology: Cell Culture* (Jakoby, W.B. and I.H. Pastan, eds). 58. Academic Press. New York.
13. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**: 55-63.
14. Hoare, D.S. and E. Work. 1957. The stereoisomers of α,β -diaminopimelic acid. *Biochemistry.* **65**: 441-447.
15. Williams, S.T. and F.L. Davies. 1967. Use of a scanning electron microscope for the examination of *Actinomycetes*. *J. Gen. Microbiol.* **48**: 171-177.
16. Lee, Y.S., S.C. Ahn, J.H. Lee, H.S. Lee, B.D. Yoon, J.S. Ahn, and T.I. Mheen. 1991. Purification and chemical characterization of antibiotic MT-497 produced by *Streptomyces nigrofaciens* GMT-497. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 604-609.
17. Gordon, R.E. and J.M. Mihm. 1957. A comparative study of some strains received as *Nocardiae*. *J. Bacteriol.* **73**: 15-27.
18. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th edition. Pp. 605-703. Williams & Wilkins.
19. Berd, D. 1973. Laboratory identification of clinically important aerobic *Actinomycetes*. *Appl. Microbiol.* **25**: 665-681.
20. Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Alderson, E.M. H. Wellington, P.H.A. Sneath, and M.J. Sackin. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1743-1813.
21. Davis, W.W. and T.R. Stout. 1971. Disc plate method of microbiological antibiotic assay. I. Factors influencing variability and error. *Appl. Microbiol.* **22**: 659-665.
22. Davis, W.W. and T.R. Stout. 1971. Disc plate method of microbiological antibiotic assay. II. Novel procedure offering improved accuracy. *Appl. Microbiol.* **22**: 666-670.
23. Lechevalier, H.A. and M.P. Lechevalier. 1970. *The Actinomycetes*, Pp. 393. Gustav Fisher Verlag. Jena.
24. Lechevalier, M.P. 1968. Identification of aerobic *Actinomycetes* of clinical importance. *J. Lab. Clin. Med.* **71**: 934-944.

(Received 20 February 1995)