

### 산업적 유용 방선균의 분리 및 분류

김 창 진

KIST 생명공학연구소

방선균은 생육시 형태적으로 곰팡이와 유사한 균사를 형성하므로 과거에는 곰팡이로 분류된 적도 있다. 1970년대에 이르러서는 생리생화학적인 분석방법의 발전으로, 세포내의 GC 함량이 높고 분화하는 성질을 지닌 원핵미생물로 인식되고 있다.

1960년대 이전의 연구는 *Streptomyces*가 주 대상이었으며 종명을 결정하는데 있어서 형태적 특징이 중요시 되었다. 그리고 신물질 생산하는 방선균은 신종 균주로 보고되는 혼란한 시기이었다. 그래서 Gottlieb와 Shirling가 주도하여 ISP (International Streptomyces Project)를 시행하게 되었고 이를 계기로 국제적인 조정 작업이 이루어 졌으며, 1980년에는 세균 학명 승인 목록이 발표되었다. 그 후 *Micromonospora*속 방선균으로부터 gentamycin이 발견되면서 부터는 *Streptomyces* 이외의 소위 회소방선균이 주 연구 대상으로 부각되기 시작하였다. 그래서 1989년판 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(1)에는 40종의 회소방선균 속이 기재되었으며, *Streptomyces*속으로서는 70종 정도의 species가 보고되었다. 이것은 1970년대부터 도입된 화학분류법이 더욱 일반화되고, 유전자 해석 연구가 진전된 때 따른 결과로서, 형태적 특징에 따른 분류를 중요시하던 과거의 방법이 많이 바뀌게 되었다.

한편, 방선균은 2차 대사산물의 다양성으로 인하여 지금까지 미생물로부터 탐색된 10,000여종의 생리활성물질 가운데 약 2/3가 방선균으로부터 발견된 것임- 의약, 농업, 식품소재 등 각종 생물소재 산업에 있어서 산업적으로 가장 중요한 미생물로 인식되고 있다. 앞으로도 새로운 bioassay계의 구축, 유전자 기능의 최대 발현 연구를 통하여 발견되는 신 속, 신 종의 방선균과 이로부터 유래되는 신물질은 더욱 증가할 것으로 전망된다.

1993년에 발효된 국제적인 생물다양성 협약에 의해 미생물의 다양성과 보존의 중요성에 대한 관심이 높아지고 있다. 방선균에 관한 국제 심포지움(International Symposium on Biology of Actinomycetes)도 매 3년 마다 열리는데, 제 10회 대회가 1997년 5월, 중국 북경에서 개최된 바 있다. 이웃 일본에서는 일본 방선균학회(SAJ; The Society for Actinomycetes Japan)가 조직되어 1987년부터 Actinomycetologica라는 학술지를 발간해오고 있고, 최근에는 주요 방선균의 전자현미경 사진을 중심으로 한 "Atlas of Actinomycetes"를 편찬하였다(2). 국내에서는 한국산업미생물학회와 한국미생물학회등 방선균 관련 학

술단체의 활동이외에도, 1992년부터 한국 방선균 생물학연구회(KRGA; Korea Research Group for Actinomycetes)가 조직되어 국내외 심포지움 개최, 학술지 발간등 활발한 연구활동을 전개하고 있다.

본 고에서는 산업적으로 유용한 생물소재를 스크리닝하고자 하였을 때 필요한, 방선균의 효율적인 분리 방법과 방선균 분류학의 최근 동향에 관하여 간략히 서술하고자 한다.

#### 방선균 분리

방선균은 주로 토양 중에 서식하며 비옥한 토양에는  $10^8$  cells/g soil 정도의 밀도로 존재한다. 일반적으로는 포자 상태에서 휴면하다가 영양, 습도가 적당하거나 다른 미생물의 영향을 받으면 포자가 발아를 시작하게 되고 균사가 성장한다.

방선균을 효율적으로 분리하기 위해서는 방선균 이외의 다른 미생물의 생육을 억제시킬 필요가 있다. 이를 위해 방선균 포자가 지닌 열과 건조에 대한 내성, 약제내성, 유기물 자화성 등의 특성을 이용한다. 방선균은 한천 고체 배지상에서 단단한 코로니를 형성하여 배지중으로는 기질균사가 성장하고, 기균사 부분은 건조한 분말과 같은 양상을 나타내므로 일반 세균과의 식별이 비교적 용이하다.

일반적으로 새로운 방선균을 분리하거나 중복되지 않는 방선균을 많이 분리하게 되면 신물질이 탐색될 가능성이 높아진다고 하겠다. 신 종 방선균을 이용하면 신물질의 탐색 효율성은 높아지겠지만 신 종 방선균을 분리하는 것 자체가 쉽지 않으며, 신 종 방선균을 분리하였다 하더라도 신물질이 반드시 탐색되는 것은 아닐 것이다.

따라서 먼저 다종, 다양한 방선균을 분리하고자 노력하면서 신 종 방선균을 분리하려는 작업을 병행하는 것이 좋을 것으로 생각된다. 본 장에서는 새로운 방선균을 분리하는 방법보다는 한 시료로부터 서로 다른 방선균을 최대한 많이 분리하는 방법을 중심으로 논하고자 한다. 즉, 자연계에 최소하게 존재하거나 분리가 어려웠던 방선균을 보다 더 체계적으로 분리하고자 하는 관점에서 서술하고자 한다.

#### 특정 속 회소방선균의 분리

방선균 유래의 항생물질은 항세균성 뿐만 아니라 항진균, 항암, 항바이러스성 물질을 포함하며, 항생물질 이외의 효소저해제, 면역조절제 등 여러 생리활성물질도 포함하고 있다.

새로운 항생물질 또는 생리활성물질을 스크리닝하기 위해서는 새롭고도 선택적인 스크리닝 방법을 개발하여야 하지만 대개의 경우 독창적인 새로운 스크리닝 방법의 개발은 쉽지 않다. 따라서 이미 개발된 스크리닝 방법을 조금씩 변형하여 적용하는 경우가 많다. 목표 지향적 스크리닝(target directed specific screening) 또는 특이한 스크리닝 방법을 적용할 수 없는 경우에는 방선균 분리시, 희소방선균을 중심으로 균분리하되 중복되지 않는 다양한 균주를 분리하여 이용하는 것이 바람직하다. 그리고 모든 균종을 대상으로 하여 탐색하기는 어려우므로 몇 가지 특정 속 방선균을 대상으로, 선택적으로 분리하여 이용하는 것도 좋은 방법이라 하겠다.

그 예로써 일본 Meiji Seika라는 회사에서는 지난 20년간 방선균 분리를 위한 특징적인 지표로서 기균사를 형성치 않으며, 오렌지 또는 갈색을 띠며, colony의 형태가 가죽 표면처럼 단단한 것을 찾는 방법으로써 토양으로부터 *Dactylosporangium*속 방선균을 선택적으로 분리·탐색할 수 있었다. 그 결과 200여 점의 시료로부터 *Dactylosporangium*속 방선균 40주를 분리할 수 있었으며 이들로부터 dactimicin, SF2185, SF2107, SF2139 등의 신물질을 탐색하였다(3). 그리고 일본 Yamanouchi라는 회사에서는 Okinawa 섬에서 채집한 토양 시료 145점으로부터 *Saccharopolyspora*속 방선균 206주를 분리하였고 이로부터 hatomamicin을 비롯한 몇 종의 신물질을 탐색하였다(4). 그 외에도 많은 연구자들이 *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Microbispora*, *Dactylosporangium*, *Streptosporangium*, *Streptovercillium* 등 특정 속 방선균을 집중적으로 분리하였고 이로부터 여러 가지 생리활성물질을 탐색하였다는 연구 보고가 있다(5-8).

이와 같이 특정 속 방선균을 탐색 연구의 대상으로 하는 경우에는 지금까지 미이용 되었던 방선균을 분리·이용할 수 있게 될 뿐 아니라 신 속과 신 종에 속하는 방선균을 분리할 확률이 자연히 높아지게 된다. 이렇게 하므로써 한 균주당 신물질이 탐색되는 비율은 증가될 것이나, 한편으로는 많은 수의 방선균을 분리하기 어렵다는 단점도 있다. 따라서 사용하는 스크리닝 방법의 특이성, 스크리닝의 속도와 경제성 등 여러 가지 측면을 고려하여 적절한 방법을 강구하여야 할 것이다.

한편 특정 속 희소방선균을 분리하는 방법에 대해서는 앞서 소개한 바와 같이 이미 많이 연구가 진행되었다. 그리고 여러 가지 형태적이며 생리 화학적인 특징이 각 방선균 속별로 상이하다. 따라서 일률적으로 적용하기는 어려우므로 특정 속 희소방선균을 분리하는 방법에 대해서는 소개한 문헌을 참고하기 바람직하며 여기에서 자세한 설명은 생략하기로 한다.

## 다종 방선균의 분리

일반적으로 토양에 존재하는 미생물 중 1% 미만만이 분리, 이용되고 있다고 한다(9). 따라서 자연계에는 아직까지 이용되지 않은 미지의 방선균이 많이 존재하고 있으며, 이로부터 신물질이 계속적으로 탐색될 것이다.

성공적인 탐색을 위해서는 효과적인 스크리닝 방법과 연계한 방선균의 분리가 필요하다. 생리활성물질을 스크리닝 할 경우, 스크리닝 방법이 아주 독창적이거나 선택적일 때에는 분리 이용하는 방선균의 신규성이 어느 정도 낮거나 다소 중복적이어도 큰 문제가 되지 않을 수 있다.

그러나 그렇지 않을 때에는 가능한 한 다양한 균 분리원을 활용하고 각 균 분리 원으로부터는 그 속에 존재하는 방선균을 중복적이지 않으면서도 다수, 즉 다종류의 방선균이 분리되도록 하여야 한다. 그리고 일반적으로, 생리활성물질 스크리닝에 있어서는 스크리닝 하는 속도도 중요하므로 스크리닝의 대상으로서 신 종 또는 희소방선균만을 고집하여서도 곤란할 것이다.

이러한 관점에서 저자의 연구실에서는 다양한 방선균을 분리하고 있으며, 이를 배양하여 필요로 하는 연구자들에게 공급하고 있다. 이 연구지원사업은 과학기술처 주관의 선도기술 개발사업의 하나로서, 1994년 8월부터 생명공학연구소를 중심으로하는 공통기반 연구지원 사업으로 수행되고 있으며 이미 많은 연구자들이 활용하고 있다.

다음은 스크리닝 목적에 적합한, 중복성은 낮으면서도 다양한 방선균을 분리하는 방법에 대하여 소개해 보고자 한다. 방선균으로부터 신물질을 탐색하고자 할 때 중요한 요소로서는 1) 균 분리원의 적절한 선정 및 시료 채취 2) 물리적 또는 화학적인 시료 전처리 3) 영양적, 생리적인 면을 고려하거나 적당한 저해제를 첨가한 선택적인 균 분리 배지의 사용 4) 적절한 배양 조건 및 배양 기간의 선택 5) 육안 또는 현미경 하에서의 효율적인 균 선별 등을 들 수 있는데, 이들 각 항목에 대하여 하나씩 살펴 본다.

### 1) 균 분리원의 선정

방선균은 그 대사 산물과 형태가 다양한 만큼이나 분포하는 장소도 아주 다양하다. 즉 토양을 비롯 하천, 바다, 조류 또는 식물의 근권이나 부엽토 같은 식물 재료, 동물의 내장, 배설물, 표피, 혈관 등의 동물 재료, 공기중, 생활 하수 등의 폐수 등 거의 모든 자연계에 존재하고 있다(10).

*Actinoplanes*, *Rhodococcus*, *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Nocardia*속의 방선균은 하천, 해양 등 주로 수분이 많은 시료에 많이 분포하고 있으며 *Actinomadura*, *Faenia*, *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora*속의 방선균은 주로 퇴비 등에 *Actinosynnema*, *Frankia*, *Nocardia* 속의 방선균은 나뭇잎 등 식물 재료에 *Actinomyces*, *Dermatophilus*, *Nocardiopsis*속의 방선균은 동물 재료에 많이 분포하고 있다(9).

이러한 수평적인 분포뿐만 아니라 수직적 분포도 중요하다.

즉 Takahashi 등이 연구한 결과(11)에 따르면 지하 40 m까지 조사하였을 때, 수직적인 분포에 있어서 대부분의 방선균은 지하 1 m 이내에 존재하며 특히 지표면에서 10 cm 이내에, 분포 밀도로서 80% 이상이 존재한다고 하였으며 깊이에 반비례하여 그 수는 점차적으로 줄어들고 있다. 지하 1 m까지 10 cm씩 각 층별로 상이한 방선균의 수를 비교하였을 때, 깊이에 반비례하여 줄어들지만 각 층별로 상이한 방선균의 종류가 많이 존재함을 알 수 있다. 또한 Woodruff의 연구 결과(12)에 의하면 토양 중에 존재하는 방선균의 종류에 있어서 수평적인 변화보다는 토양 깊이에 따른 수직적 변화가 훨씬 크다고 하였다.

식물의 근권 토양인 경우에는 비 근권 토양에 비하여 그 차이는 더욱 현저하다고 하였다. 그리고 박 등이 연구한 결과(13-15)에 따르면 같은 지역 또는 같은 지점의 토양이라 하더라도 계절적인 요인을 비롯한 환경의 변화에 따라서도 큰 차이를 나타내며, 시료 채취 후의 시료 보관 상태에 따라서도 달라질 수 있다. 따라서 생리활성물질 탐색을 위한 균 분리원으로서 토양 시료가 가장 적당하다고 할 수 있으나 가능한 한 다양한 자연계 시료를 이용하는 것이 바람직하다.

특히 동일 지역 내에서도 식물의 식생이 다른 지점의 토양, 즉 근권 토양의 시료는 유용할 것이다. 균 분리원의 선정시 식생이 유사한 지역의 경우, 수평적으로는 일반적으로 5~10 km 이상 떨어진 지점이 좋다고 할 수 있다. 수직적으로는 깊이 10 cm의 차이에 의해서도 상이한 종의 방선균이 많이 존재하므로 같은 지점에서 여러 깊이별로 시료를 채취하는 것이 유용하다. 그리고 채집된 시료는 즉시 사용하여 균분리하여야 다양한 방선균을 분리할 수 있을 것이다.

### 2) 시료의 전처리

일반적인 방법으로 방선균을 분리한다면 존재 밀도가 낮거나, 생육속도가 느린 방선균은 토양 시료 내에 있다 하더라도 분리해 내기가 어렵다. 이를 해결하기 위한 방법의 하나로서 시료를 전처리하는 방법을 많이 사용하고 있다.

균 분리용 시료의 전처리 방법으로는 물리적 방법과 화학적 방법이 있는데 물리적인 처리 방법으로는 40~52°C에서 2~16시간 건조하는 방법(16), 100~120°C에서 15분~1시간 건열 처리하는 방법(17), 55~110°C에서 6~10분간 습열 처리하는 방법(18,19) 등이 있다. 화학적인 처리 방법으로는 phenol을 처리하는 방법(20,21) yeast extract 및 sodium dodesyl sulfate를 처리하는 방법(21,22) 등이 알려져 있다. 방선균은 토양 시료 내에 포자 상태로 존재하므로 이러한 전처리 방법들은 방선균 포자의 내열성을 이용하거나 포자 발아를 촉진시키는 원리를 이용한 것이라 하겠다.

### 3) 선택적 분리 배지의 사용

자연계로부터 방선균을 선택적으로 분리하기 위한 배지로서 chitin agar, starch-casein-KNO<sub>3</sub> agar, paraffin agar, glycerol-arginine agar, actinomyces isolation agar 등이 알려져 있으며(23),

생물산업

Hayakawa가 고안한 humin acid-vitamin agar(24) 배지가 방선균을 선택적으로 분리하는데 가장 적당한 배지로 판단된다. 이는 토양 생태계의 유기물 분해 과정에 있어서 처음 단계에는 전분, 포도당 등을 분해 이용하는 세균과 곰팡이에 의해, 다음 단계에는 cellulose 분해 세균 등에 의해 무기화와 부식화가 진행되지만 방선균은 이러한 천이의 후기 단계에 참여하여 난 분해성 물질을 서서히 이용하는 것으로 알려져(25) 있고 또한 방선균은 다른 미생물 군에 비해 토양 부식 산을 분해하는 활성이 가장 높기 때문일 것이다(26). Humic acid-vitamin agar 배지는 부식 산을 유일한 탄소 및 질소 공급원으로 하여 인산 염의 농도를 낮추고 각종 비타민 류를 첨가하였는데, 방선균에 대한 선택성이 높고 방선균의 포자 형성을 양호하게 하는 배지로 알려져 있다. 그러나 배지의 색이 검은 색이기 때문에 방선균의 형태적 특성 중 하나인 색깔의 관찰이 어렵다는 단점도 있다.

또한 생육 저해제로서 항생물질을 첨가하기도 하는데 일반적으로 곰팡이의 생육을 억제하기 위해서는 cycloheximide 또는 nystatin을 첨가하고 *Bacillus*의 생육을 억제하기 위해서는 nalidixic acid를 첨가하는 것이 효과적이다. 그리고 특정 방선균을 선택적으로 분리하기 위해서는 한가지 또는 두 가지 이상의 항생물질을 첨가하게 되는데 novobiocin은 *Micromonospora* 및 *Actinoplanes*를, tunicamycin은 *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Dactylosporangium*를, leucomycin 또는 josamycin은 *Streptosporangium*과 *Microtetraspora viridis*를(21), kanamycin은 *Actinomadura*와 *Thermomonospora chromogena*를(27,28), lincomycin은 *Micromonospora*를(29), nalidixic acid와 penicillin 그리고 tellurite를 함께 사용하면 *Rhodococcus equi*를(30), tetracycline은 *Nocardia*(31)를 선택적으로 분리하는데 사용된다.

한편 방선균을 분리하기 위해서 한 번에 여러 종류의 배지를 사용하면 더 많은 종의 방선균을 분리할 수 있을 것이다. 그러나 같은 균주가 여러 배지상에서 어느 정도 중복하여 분리될 것이므로 적절하게 균 분리 배지를 선정하여야 할 것이다. 한가지 토양 시료로부터 복수의 균 분리 배지를 사용하여 방선균을 분리하였을 때 어느 정도의 방선균이 상호 중복되어 분리되는지를 조사한 김 등(32)의 연구 결과를 보면 Table 1과 같다. 방선균 분리 배지로서 Bennet's agar, humic acid-vitamin agar, glycerol-asparagine agar 등 세 종류의 배지를 사용하여 소백산에서 채집한 토양 시료 10점으로부터 분리된 각 방선균을 동정 비교하여 중복 분리 빈도를 조사한 결과이다.

그 결과를 보면 Bennet's agar 배지는 glycerol-asparagine agar 배지 및 humic acid-vitamin agar 배지와 각각 8.3% 및 16.7%의 중복도를 나타내었고 glycerol-asparagine agar 배지는 Bennet's agar 배지 및 humic acid-vitamin agar 배지와 각각 10.6% 및 14.9%의 중복도를 나타내었고 humic acid-vitamin agar 배지는 Bennet's agar 배지 및 glycerol-asparagine 배지와 각각 10.4% 및 9.1%의 중복도를 나타내었다. 따라서 실험에

**Table 1.** Duplicity of actinomycete strains on each isolation media.

Samples	Media		Bennet's agar (B)				Glycerol-asparagine agar (GA)				Humic acid-vitamin agar (HV)			
			Duplicated number			Total	Duplicated number			Total	Duplicated number			Total
	GA	HV	GA+HV	B	HV		B+HV	B	GA		B+GA			
1	0	1	0	4	0	0	0	3	1	0	0	4		
2	1	0	0	7	0	1	1	4	0	1	1	12		
3	0	1	0	7	0	0	0	5	2	0	0	10		
4	0	1	0	6	0	2	0	8	1	2	0	15		
5	0	2	0	6	0	0	0	4	1	0	0	5		
6	0	1	0	4	0	2	0	3	1	2	0	6		
7	1	2	0	7	1	1	0	5	1	1	0	8		
8	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	1		
9	2	1	0	8	2	2	0	4	1	1	0	7		
10	1	1	0	10	2	0	0	9	0	0	1	9		
Total (%)	5(8.3)	10(16.7)	0	60	5(1.6)	7(14.9)	1(2.1)	47	8(10.4)	7(9.1)	2(2.6)	77		
		15(25.0)				13(27.7)				17(22.1)				

사용한 세 가지 배지 중 2종류의 배지를 사용하여 방선균을 분리하면 배지 상호간 중복 균수의 비율은 평균 11.7% 정도이고 3종류를 모두 다 사용하였을 때는 25% 정도의 균주가 중복하여 분리되었다.

이와 같이 여러 종류의 균 분리용 배지를 사용한다면 사용하는 배지의 종류에 따라서 분리되는 방선균의 총 수 및 상이한 균주의 수도 증가하지만, 상대적으로 중복되어 분리되는 균수도 증가하게 되므로 연구 목적에 맞는 배지와 배지 수를 함께 검토하여야 할 것이다. 여러 종류의 균 분리용 배지를 사용하면 분리된 균주 중 중복 균주를 제거하는 단계가 필요하겠지만, 일반적으로 한 종류의 균 분리용 배지를 사용하는 것보다는 2-3종류의 균 분리용 배지를 사용하는 것이 효과적일 것으로 판단된다.

4) 적절한 배양 조건 및 배양 기간의 선택

앞에 열거한 여러 가지 방법을 한가지 또는 잘 조합하여 방선균의 분리를 행하게 되겠지만, 이외에도 배지의 pH 또는 염농도의 조절, 배양 온도, 배양 기간에 따라서도 서로 다른 방선균을 분리해 낼 수 있다. 즉 pH의 조절에 의해 호산성이나 내산성 또는 호알칼리성이나 내알칼리성균을, NaCl 등이 고농도로 함유된 배지를 사용함으로써 호염성 및 내염성균을 선택적으로 분리할 수 있고 배양 온도를 조절함에 따라 저온성균 또는 고온성 및 내열성 균을 선택적으로 분리할 수 있을 것이다.

방선균의 분리는 일반적으로 고체 배지 상에서 약 2주간 배양한 후에 실시하지만, 2개월 이상의 장기간 배양하므로써 생육이 느린 방선균을 선택적으로 분리할 수도 있다. 그러나 이러한 경우 균 분리가 성공적이었다 하더라도, 액체 배양 시에도 균 생육이 느리거나 발효가 쉽지 않은 것이 일반적이므로 특별한 배지의 개발 등 선택적인 배양 방법을 개발해야만 하는 난점도 있다.

5) 경험적 요소와 효율적인 균 선별

이상의 방법에 의해 고체 배지 상에 다양한 방선균의 코로

나가 나타나도록 유도한 후에는 일반적으로 육안 및 장거리 초점 작동(long working distance) 대물 렌즈를 장착한 광학 현미경 하에서 적절한 방선균을 선별 분리하게 된다.

Bergey's manual of Systematic Bacteriology(1)에 나타난 *Streptomyces*속 균종의 동정에 필요한 기준을 항목별로 정리해 보면 Table 2와 같다. 총 15개 항목 139 항 중 육안 및 현미경적인 방법으로 판정 가능한 것은 형태적 특성 중 1,3,4,5,6,7 항목 등 총 31항에 이른다. 기타 생리적인 특성 중 각종 생리활성, 생육 특성 등 약 20 여항도 스크리닝의 초기 단계에 판별할 수 있으므로 이러한 가능한 방법을 모두 활용한다면 더욱 효율적으로 균 선별을 할 수 있을 것이다.

이상과 같이 방선균은 자연계에 널리 분포하고 있고 학문적

**Table 2.** Characteristics used by the numerical taxonomy.

Characters	Items
<i>Morphology and pigmentation</i>	
1. Spore chain morphology	4
2. Spore surface ornamentation	5
3. Other morphological features	5
4. Color and spore mass	7
5. Pigmentation of substrate mycelium	5
6. Diffusible pigments	8
7. Melanin pigment production	2
<i>Physiology</i>	
1. Antimicrobial activity	8
2. Enzyme activity	11
3. Degradation activity	18
4. Resistance to antibiotics	11
5. Growth temperature and pH	5
6. Growth in inhibitory compounds	14
7. Use of nitrogen sources	11
8. Use of carbon sources	25
Total	139

으로 흥미롭거나 산업적으로도 유용한 경우도 많으나, 실제 자연계에 있어서의 정확한 분포 및 그 역할은 아직 잘 알려져 있지 않다. 적절한 균 분리원의 선택 및 이로부터의 신 종 또는 유용한 방선균만을 효율적으로 분리하는 방법은 아직까지 다소 논의의 여지가 있지만 자연계에는 아직 미지의 유용한 방선균이 많이 존재함에는 이의가 없다.

따라서 스크리닝 목적과 연계하여 방선균을 효율적으로 분리하고 이용하는 기술이 향상되면 스크리닝 연구는 보다 더 성공적일 것이다. 지금까지 이에 필요한 적절한 균 분리원의 선정, 시료의 전처리, 적절한 배지 등의 선정, 배양 조건의 검토 및 효율적인 균 선별 등에 대하여 간략하게 검토해 보았다. 앞으로 방선균 연구에 있어서, 생태학적인 연구 및 분자 생물학적인 연구의 발전을 통하여 신물질 탐색의 효율성은 더욱 높아질 것으로 보여진다.

## 방선균 분류

### 형태적 특성

방선균이 다른 일반 세균과 구별되는 것은 형태적으로 곰팡이와 유사한 사상체를 형성하기 때문이다. 예를 들어, *Streptomyces*의 경우 생육됨에 따라서 포자의 발아, 기질균사의 신장과 분지, 기균사의 형성, 균사의 분절 및 포자화등 일련의 형태적 변화가 이루어진다. 방선균은 그람양성 세균중에서 가장 형태분화가 발달한 세균이다. 이러한 형태분화는 곰팡이에서도 관찰되기도 하지만, 유성세대가 없으며, 균사가 비교적 가는 특징을 지니고 있다.

이렇게 균사의 분화 정도나 양식이 다양하기 때문에, 1970년 Lechevalier & Lechevalier(33)가 방선균 분류에 있어서 화학적 방법을 도입하기 이전에는 형태학적인 특성이 방선균의 속명을 동정하는 유일한 분류 지표이었으며, 형태적으로 크게 3가지로 나누고 있다.

첫째 그룹으로는 신장된 균사가 분단되어, 간균 또는 구균상의 단위로 분절되는 nocardioform 형으로서 *Actinomyces*, *Oerskovia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* 등이 여기에 속한다. 그렇지만 nocardioform 이라는 용어는 원래 형태적 특징을 나타내는 것이었는데 현재는 화학분류 및 계통분류학적 의미로서 *Actinomyces*와 *Oerskovia*는 일반적으로 포함시키지 않는다. 균사의 분단시기와 기균사의 형성유무는 균주에 따라 상이하하며, 분단시기가 빠르고 기균사가 형성되지 않는 경우는 일반 세균과의 구별이 어렵다.

둘째 그룹으로서는 형태 분화가 발달하고, 다양한 형태의 포자를 형성하는 포자형성 방선균인 sporoactinomycetes로서 *Streptomyces*를 포함하는 일반적인 방선균이 여기에 속한다. Lechevalier & Lechevalier에 의해 세포벽 구성성분에 기초한 방선균 분류체계가 주장되었으나, 기본적으로는 sporoactino-

생물산업

mycetes를 형태적으로 3개의 과(family)로 나눈다. 즉, 긴 포자사슬을 형성하는 *Streptomycetaceae*와 1~2개 포자 또는 짧은 포자사슬을 형성하는 *Micromonosporaceae*, 그리고 포자낭을 형성하는 *Actinoplanaceae*이다.

셋째 그룹으로서는 *Dermatophilus*와 *Geodermatophilus*를 대표로 하는 multilocular sporangia 그룹으로서 균사가 한쪽 방향이 아닌 중횡으로 분할되는 특징을 나타낸다.

과거에는 이러한 형태적 특징에 근거하여, Gottlieb가 정의한 바에 따라서, 방선균은 "생육시 어떤 단계에서 균사를 형성하는 세균"(34)이라고 하였는데 이러한 생각은 실제 방선균을 다루는 곳에서는 지금도 다른 미생물과 구별하는 실용적인 기준으로 사용되고 있다. 그러나 nocardioform중에서 *Mycobacterium*의 경우 배양 초기에만 짧은 균사가 관찰 될 뿐이며, *Actinomyces*, *Rothia* 등의 *Actinomycetaceae*과와 *Rhodococcus*속의 어떤 경우는 균사 형성시기가 극히 짧고, 분단된 형태인 구균 또는 간균의 형태만 관찰 되기도 한다. *Nocardia*속의 경우 균주에 따라서는 코로니의 표면에 기균사를 형성하기도 하지만, 생육 후기에는 기생균사가 분절되어 지그자그형으로 배열된 간균 형태를 이룬다. 앞에서 정의한 것과 비교해보면 일반 세균과의 경계 부분이 명확치 않으나, 일단 형태적 특징에 근거해 보면 방선균은 균사가 존재하는 세균이라 할 수 있다.

이와 같이 형태적 특징은 분류에 있어서 가장 중요시 되는 부분이지만, 최근 많이 연구되고 있는 화학분류 또는 계통분류 방법의 진전으로 인하여 그 중요성은 감소하고 있다. 형태적 특징만으로는 비슷하여 구별이 안되지만, 균체 성분 분석 결과가 달라 다른 속으로 이동되거나, 형태적으로는 어느 정도 상이하지만 균체 성분 분석 결과가 일치하여 동일한 속으로 동정되는 경우도 있다.

방선균 분류학자에게 있어서 지금도 방선균 형태의 다양성은 가장 큰 관심사의 하나이다. 앞으로 형태 분화와 관련한 보다 더 상세한 메카니즘이 연구되면, 형태적 특징과 관련한 여러 가지 의미가 밝혀지고, 방선균 분류학에 있어서 형태적 특징의 차지하는 비중이 정립될 것이다. 그러면 Gottlieb가 말한 방선균에 대한 정의가 재 평가될 수 있을 것이다.

### 화학분류

화학분류는 어떤 특징의 균체 성분에 대해서, 그 구성 성분을 비교하므로써 미생물 간의 유연성을 분석하는 것이다. 그러므로 분류의 지표가 될 균체 성분은 대상 미생물에 널리 존재하면서 편차가 풍부하여야 한다. 즉 생명현상의 근간이 되면서 환경 변화 등에 대하여 영향을 받지 않는 안정한 것이 좋을 것이다. 현재 이러한 관점으로, 세포벽 성분, 환원당, 균체 지질(polar lipids, long chain fatty acids, menaquinones), DNA의 염기조성 등이 분류지표로 사용되고 있다. 이렇게 하므로써 지금까지 표현형질의 폭이 넓거나, 주관적인 정보에 의해

잘 못 분류되던 것이 줄어들고 있다.

방선균의 분류에 화학적 방법이 도입된 예로서는, 1958년에 Cummins와 Harris(35)가 *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Micromonospora* 등에 대해서 세포벽을 구성하는 아미노산과 당의 조성을 분석하였는데, 이는 화학 분류지표로서의 가능성을 시사한 한 것이라 하겠다. 그 후 1970년에 Lechevalier & Lechevalier(33)가 많은 방선균과 세균에 대해서 세포벽과 전균체의 환원당 조성을 분석한 연구 결과에 기초하여 분류체계를 구축하였다. 이 체계는 지표가 되는 아미노산과 당을 정성적으로 분석한 것으로서, 이들의 화학적 형태에 대해서는 고려하지 않았다. 1972년에는 Schleifer와 Kandler(36)가 세균의 peptidoglycan 다양성을 정리한 바 있으며, 1980년 경에는 균체 지질에 관한 화학분류학적 연구가 많이 행해져, 데이터가 축적되므로써 좋은 분류 지표의 하나가 되었다. 특히 인지질, 균체 지방산, menaquinone, mycolic acid 등은 과나 속명의 동정에 있어서 당시의 분류체계에 큰 영향을 주었으며, 현재 방선균 동정에 있어서 필수적인 지표가 되고 있다.

방선균과 일반 세균을 구별할 수 있는 특징으로서 어떤 것이 있는지 세포벽 성분인 peptidoglycan의 구조를 예로서 살펴보자. *Agromyces*를 제외한 모든 방선균에는 muramic acid에 결합하는 peptide subunit에 있어서 3번째 peptide subunit의 2염기 아미노산과 4번째 peptide subunit의 D-alanine이 cross-linkage를 형성하는 A형 peptidoglycan이 존재한다. 2염기 아미노산으로서는 LL-diaminopimelic acid(A<sub>2</sub>pm), meso-diaminopimelic acid, lysine 또는 ornithine형으로 나눌 수 있다.

형태 분화가 많이된 일반 방선균에는 LL-A<sub>2</sub>pm가 존재하는데, 방선균에 있어서는 크게 LL-A<sub>2</sub>pm와 meso-A<sub>2</sub>pm 형태로 분류할 수 있다. LL-A<sub>2</sub>pm 형태의 경우에는 glycine으로부터 cross-linkage를 형성하며(세포벽 type I, peptidoglycan type A3γ), meso-A<sub>2</sub>pm 형태의 경우에는 peptide subunit간에 직접 cross-linkage를 형성한다(세포벽 type II-IV, peptidoglycan type A1γ). 이러한 점에서 두 가지 형태는 큰 차이가 있다. 즉 Lechevalier & Lechevalier가 제안한 세포벽 type II는 N-acetylmuramic acid에 인접하는 첫 번째 L-alanine이 glycine으로 치환된 것으로서(37), type III(A1γ)의 하나가 바뀐 것이다. 세포벽 type IV의 경우는 peptidoglycan이 type III와 동일하지만 세포벽 표층의 다당 구조가 다르다.

한편, A<sub>2</sub>pm이 존재하지 않는 방선균으로서는 ornithine을 함유한 *Actinomyces israelii* 그룹(세포벽 type V, peptidoglycan type A4β), lysine을 함유한 *Actinomyces bovis* 그룹, *Oerskovia*속, *Promicromonospora*속 (세포벽 type IV, peptidoglycan type A4α), *Rothia*속 (세포벽 type VI, peptidoglycan type A3α), 2,4-diamino butyric acid를 함유한 *Agromyces*속에는 2번째 D-glutamic acid와 4번째 D-alanine이 diamino acid로서 cross-linkage를 형성하는 B형 peptidoglycan이 존재한다.

이상과 같이 형태 분화의 정도는 세포벽의 peptidoglycan 구조와 어느 정도 상관성이 있는 것으로 보인다. 그러나 대부분의 방선균에 존재하는 A1γ형의 peptidoglycan은 *Brevibacterium*, *Bacillus* 등에도 존재하고 있으며 *Streptomyces*의 peptidoglycan 구조도 *Propionibacterium*과 같다. 따라서 이러한 세포벽의 구조가 방선균에만 국한 한다고 말하기는 어렵다.

기타의 화학분류학적 지표에 있어서도 비슷하다. 그 예로, 방선균의 isoprenoid quinone은 다른 그람양성 세균에 존재하는 menaquinone을 함유한다. 단지, 방선균에 존재하는 menaquinone의 경우 isoprenoid 측쇄가 포화되어 있는 경우가 대부분이고, 복수 종의 quinone이 존재하는 등 일반적인 그람양성 세균에 비하여 복잡한 경향을 나타낸다. 그러나 *Rhodococcus*나 *Nocardia*의 근연종인 *Tsukamurella*는 불포화형의 MK-9을 단독적으로 함유하며, *Pseudonocardia*는 MK-8(H<sub>4</sub>) 또는 MK-9(H<sub>4</sub>)를 단독적으로 함유하는 경우가 많다. 그리고 방선균에 있어서 균체 지방산이나 인지질의 경우도 일정한 경향이 있으며, 이러한 특징이 방선균에 있어서 주요 분류지표의 하나로서 이용되어 지고 있다.

### 계통분류

지금까지 언급한 분류학은 형태와 구성 성분 등 표현 형질을 지표로 하여 미생물간을 차별화하는 것인데, 현존하는 미생물이 어떤 경로를 통하여 과거로부터 현재에 이르게 되었는지에 대한 것은 지금까지 크게 주목되지 못하였다. 고등생물의 경우에는 화석자료 등을 근거로 어느 정도 추론이 가능하지만, 미생물의 경우에는 물적 증거가 희박하여 어렵다.

한편, 분자유전학과 집단유전학이 발전함에 따라 생물진화를 분자 수준에서 연구하는 분자진화학이 최근 급속히 발전하여, 미생물분류학에 이용되고 있다. 분자 수준의 진화라고 하는 것은 DNA 복제시에 일어난 돌연변이가 그 미생물군 전체에 고정화되는 것을 의미한다. 그래서 비교되는 미생물간의 진화거리는 DNA 등의 정보가 전사되어 생긴 RNA나 단백질로부터 염기의 치환율을 측정하므로써 상동성 관계를 계산할 수 있다. 이러한 목적으로 이용되는 정보고분자는 시간의 흐름에 비례하여 변화가 축적되므로 분자시계라 부르기도 하는데, 세균을 비롯한 방선균에 있어서는 16S rRNA 분자가 가장 많이 사용되고 있다. 그 이유로서는 바이러스를 제외한 모든 생물에 있어서 공통적으로 존재하며, 염기 치환 속도가 비교적 일정하고, 크거나 정보량이 연구자들이 다루기에 적당하기 때문이다. 16S rRNA 분자의 1차 구조결정이 용이하게 된 것은 Lane 등(38)이 reverse transcriptase 효소를 이용하는 방법을 개발한 1985년 이후가 된다. 그 이전에는 rRNA-DNA 교잡법 또는 oligonucleotide catalogue법이라고 하는 편법이 분자간의 유사도를 측정하는데 이용되었다.

이 분류법에 따르면, coryneform bacteria(*Arthrobacter*, *Bre-*

*vibacterium*, *Aureobacterium* 등, *Corynebacterium*속은 제외)와 *Micrococcus* 등은 형태적으로 원시 방선균인 *Actinomyces*와 *Oerskovia* 등과 함께 Actinobacteria로 불린다. Actinoplanes와 *Micromonospora*는 다른 포자형성 방선균 보다는 Actinobacteria나 *Corynebacterium*, *Nocardia*에 가깝다. *Dermatophilus* 속의 경우도 Actinobacteria에 속하지만 형태적으로 유사한 *Geodermatophilus*와는 전혀 다르다.

한편, *Thermoactinomyces*는 기생균사와 기균사가 잘 발달되어 전형적인 방선균으로 분류되고 있으나, GC 함량이 아주 낮고 내열성 포자를 가지며, ribosomal RNA의 염기서열에 따르면 다른 방선균과는 거리가 있으며, 오히려 저 GC 그룹인 *Bacillus*속과 유사성을 나타내어 재분류가 요구되고 있다.

이상과 같은 catalogue법의 연구 결과에 근거하여, Goodfellow와 Cross(39)는 방선균을 형태적 특징에 따른 정의가 아닌, 「DNA의 GC 함량이 55% 이상으로 높고 16S rRNA oligonucleotide의 염기배열과 핵산의 교잡으로부터 계통적인 근연성을 나타내는 그람 양성세균」이라고 하였다. 이렇게 되면 GC 함량이 높은 그람양성 세균인 *Bifidobacterium*과 *Propionibacterium*을 방선균에서 제외시킬 근거가 희박해진다.

그리고 catalogue법은 최근의 간편한 16S rRNA의 염기배열 결정방법의 등장으로 전 1차 구조가 비교적 용이하게 결정됨에 따라 그 역할이 바뀌게 되었다. 현재 미발표된 방선균의 16S rRNA의 염기배열 데이터를 포함하여 많은 데이터가 축적되어 가고 있어, 앞으로 가까운 장래에 진정한 의미의 분자 계통을 논할 수 있게 될 것 같다.

#### 1994년판 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology

1989년판 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology를 보강한 1994년판 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(40)에 의하면 방선균을 8개 그룹으로 나누어 분류하고 있다. 이는 균사, conidia, sporangia 등의 형태적 특징과 세포벽의 화학성분등을 중심으로 구분하여 1) Nocardioform 그룹, 2) Multilocular sporangia 형성 그룹, 3) Actinoplanetes 그룹, 4) Streptomycetes 그룹, 5) Maduromycetes 그룹, 6) Thermomonospora 그룹, 7) Thermoactinomycetes 그룹, 8) 기타 그룹으로 나누고 있다. 자세한 내용은 manual을 참고하기 바람에 개략적으로 소개하면 다음과 같다.

1) Nocardioform 그룹은 mycolic acid의 생성 유무 등에 의해 mycolic acid-containing bacteria, *Pseudonocardia*, *Nocardioides* & *Terrabacter*, *Promicromonospora*의 4개 subgroup으로 나뉜다. Mycolic acid-containing bacteria subgroup에는 *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*속이 포함된다. *Pseudonocardia*와 관련된 subgroup에는 *Actinobispora*, *Actinokineospora*, *Actinopolyspora*, *Amycolata*, *Amycolatopsis*, *Kibdelosporangium*, *Pseudoamycolata*, *Pseudonocardia*, *Saccharomonospora*, *Sac-*

*charopolyspora*속이 포함된다. *Nocardioides* & *Terrabacter* subgroup에는 *Nocardioides*와 *Terrabacter*속이 포함된다. *Promicromonospora* subgroup에는 *Jonesia*, *Oerskovia*, *Promicromonospora*속이 포함된다.

2) Multilocular sporangia 형성 그룹은 중황으로 나누어져 많은 구형의 포자 형태가 되는 sporangia를 가지고 있으며, 운동성이 있는 *Dermatophilus*, *Geodermatophilus*와 비운동성의 *Frankia* 속으로 구분된다.

3) Actinoplanetes 그룹은 운동성 포자가 들어있는 sporangia를 형성하는 *Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Dactylosporangium*, *Pilimelia*속과 비운동성 포자를 1개 가지는 *Micromonospora*와 chain 형태로 가지는 *Catellatospora*속으로 나눌 수 있다. 세포벽에는 meso-DAP와 glycine, arabinose, xylose를 가지고 있다.

4) Streptomycetes 그룹은 세포벽 성분으로 LL-DAP와 glycine을 가지는데, 긴 기균사를 형성하는 *Streptomyces*와 *Streptovorticillium*속과 기균사를 전혀 또는 거의 형성치 않는 *Intrasporangium*, *Kineosporia*, *Sporichthya*속으로 나누어 진다.

5) Maduromycetes 그룹은 세포벽 성분으로 meso-DAP와 madurose를 가지는데 운동성 포자를 각각 2개, 4개, 수개 형성하는 *Microbispora*, *Microtetrastora*, *Actinomadura*속과 sporangia를 형성하는 것으로서 *Planobispora*, *Planomonospora*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*속이 있다.

6) Thermomonospora 그룹은 세포벽 성분으로 meso-DAP 외에 특정한 당이나 아미노산을 함유치 않고 있으며, 단포자를 형성하는 *Thermomonospora*속, chain 형태의 *Actinosynnema*, *Nocardiopsis*속, sporangia와 유사한 형태를 가지는 *Streptoalloteichuse*속이 있다.

7) Thermoactinomycetes 그룹은 고온성균으로서 내생포자를 형성하며, meso-DAP 외에 특정한 당이나 아미노산을 함유치 않고 있으며, 기질균사와 기균사에 단포자를 형성하는 *Thermoactinomyces*속이 유일하게 포함된다.

8) 기타 그룹으로서는 기균사를 형성하며, 긴 spore chain을 형성하며 mycolic acid를 함유치 않는 *Glycomyces*, *Kitasatospora*, *Saccharothrix*속이 포함된다.

#### 최근 제안된 새로운 분류체계

최근 발간된 *Int. J. Syst. Bact.*의 논문(41)에서 제안된 16S rDNA/rRNA sequencing에 기초한 새로운 방선균 분류체계를 소개하면 다음과 같다. Actinobacteria 강(class)을 Acidimicrobiales, Rubrobacterales, Coriobacteriales, Sphaerobacterales, Actinomycetales, Bifidobacteriales의 6개 목(order)으로 나누고, Actinomycetales 목을 다시 Actinomycineae, Micrococccineae, Corynebacterineae, Micromonosporineae, Propionibacterineae, Pseudonocardineae, Streptomycineae, Streptosporangineae,

Order Actinomycetales									
Suborder									
Family/Genus									
Actinomycineae	Micrococineae	Corynebacterineae	Micromonosporineae	Propionibacterineae	Pseudonocardineae	Streptomycineae	Streptosporangineae	Frankineae	Glycomycineae
Actinomycetaceae/ Actinomyces Mobiluncus Arcanobacterium	Micrococaceae/ Arthro bacter Kocuria Nesterenkonia Renibacterium Rothia Stomatococcus	Corynebacteriaceae/ Corynebacterium Turicella	Micromonosporaceae/ Micromonospora Actinoplanes Catenuloplanes Dactylosporangium Pillimelia	Propionibacteriaceae/ Propionibacterium Luteococcus Microbunus Propioniferax	Pseudonocardiaceae/ Pseudonocardia Actinopolyspora Actinosynnema Amycolatopsis Kibdelosporangium Kutzneria Lentzea Saccharomonospora Saccharopolyspora Saccharothrix Streptoaloleiichis Thermocristipum	Streptomycetaceae/ Streptomyces	Streptosporangiaceae/ Streptosporangium Herbidospora Microbispora Microtetraspora Planobispora Planomonospora Nocardiotriaceae/ Nocardiotriopsis	Frankiaceae/ Frankia	Glycomycetaceae/ Glycomyces
	Brevibacteriaceae/ Brevibacterium	Dietziaceae/ Dietzia		Nocardiotriaceae/ Nocardiotriades Aeromicrobium				Acidothermaceae/ Acidothermus	
	Cellulomonadaceae/ Cellulomonas Oerskovia Rarobacter	Gordoniaceae/ Gordonia					Thermomonosporaceae/ Thermomonospora Actinomadura Spirillospora	Geodermatophilaceae/ Geodermatophilus Blastococcus	
	Dermabacteraceae/ Dermabacter Brachybacterium	Mycobacteriaceae/ Mycobacterium						Microsphaeraceae/ Microsphaera	
	Dermatophilaceae/ Dermatophilus Kyococcus Dermacoccus	Nocardiaceae/ Nocardia Rhodococcus							
	Intrasporangiaceae/ Intrasporangium Sanguibacter Terrabacter	Tsakamurellaceae/ Tsakamurella							
	Jonesiaceae/ Jonesia								
	Microbacteriaceae/ Microbacterium Agrococcus Agromyces Aureobacterium Clavibacter Curtobacterium Rathayibacter								
	Promicromonosporaceae/ Promicromonospora								

Fig. 1. Proposed hierarchic classification system of the order Actinomycetales based on the phylogenetic analysis of the 16S rDNA/rRNA sequence data.



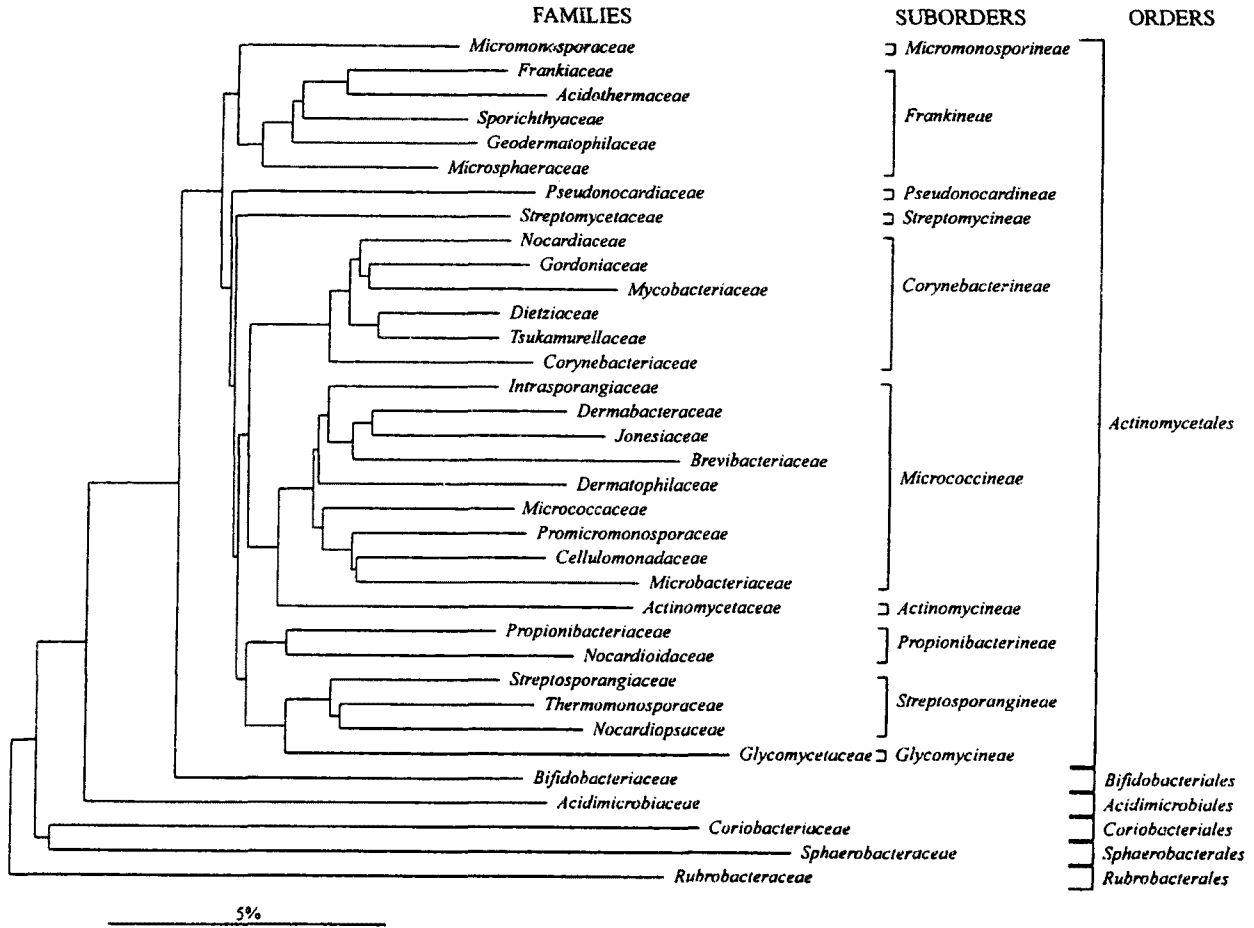


Fig. 2. Intra-class relatedness of Actinobacteria showing the presence of six orders as well as the 10 suborders Actinomycetales based upon 16S rDNA/rRNA sequence comparison. The scale bar represents 5 nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

Frankineae, Glycomycineae 등 10개의 suborder로 나누고 있다. 각 suborder에 속한 family와 genus를 살펴 보면, Fig. 1, 2에서와 같이 Thermoactinomyces속은 제외시키고 있으며, Streptomyces속을 제외한 대부분의 속에 있어서는 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(40)의 분류체계와는 크게 달라져 있음을 알 수 있다. 본 분류체계의 자세한 내용은 Fig. 1, 2와 논문을 참고하기 바란다.

이상과 같이 최근 방선균 분류학에 대한 관심이 고조되는 한편, 이 분야에 대한 연구결과가 많이 나오고 있으므로 머지않은 장래에 산업적으로 유용한 미생물인 방선균의 분류체계는 분자계통 분류학적 방법에 의해 확립될 것으로 전망된다. 이와 함께 방선균으로부터의 신물질 탐색연구도 더욱 활발해질 것으로 전망된다.

참고문헌

1. Williams, S. T. et al., 1989. Bergey's Manual of Syst. Bacteriology, 8th ed., 2463.

2. Miyadoh S. 1997. Atlas of Actinomycetes. The Society for Actinomycetes Japan, Asakura publishing Co.  
 3. Shomura, T. 1993. Screening for new products of new species of Dactylosporangium and other actinomycetes. J. Actinomycetol. 7(2), 88-98.  
 4. Suzuki, K. 1993. Search and discovery of soil microorganisms which produce new bioactive substances: Selective isolation of microorganisms and their fermentation products. J. Actinomycetol. 7(2), 107-109.  
 5. Hayakawa, M., T. Sadakata, T. Kajiura, and H. Nonomura. 1991. New methods for the highly selective isolation of Micromonospora and Microbispora from soil. J. Ferm. Bioeng. 72(5), 320-326.  
 6. Hayakawa, M., T. Kajiura, and H. Nonomura. 1991. New methods for the highly selective isolation of Streptosporangium and Dactylosporangium from soil. J. Ferm. Bioeng. 72(5), 327-333.  
 7. Hanka, L. J. and R. D. Schaadt. 1988. Methods for isolation

- of Streptovercillia from soils. *J. Antibiot.* **41**(4), 576-578.
8. Shomura, T. 1993. Screening for new products of new species of *Dactylosporangium* and other actinomycetes. *J. Actinomycetol.*, **7**(2), 88-98.
  9. Okazaki T. 1987. Rare actinomycetes-new breed of actinomycetes. *J. Microorganism* **3**(5), 453-461.
  10. Takashi, S. 1987. Cosmopolitan actinomycetes. *J. Microorganism* **3**(5), 482-492.
  11. Takahashi, Y., Y. Seki, Y. Tanaka, R. Oiwa, Y. Iwai, and S. Omura. 1990. Vertical distribution of microorganisms in soils. *J. Actinomycetol.* **4**, 1-6.
  12. Woodruff H. B. 1989. Fifty year's experience with actinomycete ecology. *J. Actinomycetol.* **3**, 79-88.
  13. 김창진, 이강현, A. Shimazu, 권오성, 박동진. 1995. 토양특성에 따른 다양한 회소방선균의 분리. 한국산업미생물학회지, **23**(1), 36-42.
  14. 권오성, 박동진, 이찬용, 김창진. 1996. 제주도 토양 방선균의 속 다양성 분포. 한국산업미생물학회지, **24**(4), 399-403.
  15. 임채영, 권오성, 김판경, 박동진, 이동희, 김창진. 자연동굴 토양 방선균의 속 다양성 분포. 한국산업미생물학회지, **24**(5), 534-539.
  16. Williams, S. T., M. Shameemullah, E. T. Watson and C. I. Mayfield. 1972. Studies on the ecology of actinomycetes in soil-VI. The influence of moisture tension on growth and survival. *Soil Biol. Biochem.*, **4**, 215-225.
  17. Athalye, M. et al., 1981. *J. Appl. Microbiol.* **51**, 289-297.
  18. Rowbotham, T. J. and T. Cross. 1977. Ecology of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes in fresh water and agricultural habitats. *J. Gen. Microbiol.* **100**, 231-240.
  19. Sandrak, N. A. 1977. Cellulose decomposition by Micromonosporas. *Microbiology* **46**, 384-386.
  20. Panthier, J. J., H. G. Diem and Y. Dommergues. 1979. Rapid method to enumerate and isolate soil actinomycetes antagonistic towards rhizobia. *Soil Biol. Biochem.* **11**, 443-445.
  21. Hayakawa, M. 1990. Selective isolation methods and distribution of soil actinomycetes. *J. Actinomycetol.* **4**, 103-112.
  22. Grund, A. D. and J. C. Ensign. 1982. Activation of *Streptomyces viridochromogenes* spores by detergents. *Current Microbiol.* **7**, 223-228.
  23. Felictas, K. W. and H. J. Kutzner. 1991. The family Streptomycetaceae. Pp. 961-995. In Balow, A., H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer(ed.), *The Procaryotes*(2nd ed.) Springer-Verlag, New York.
  24. Hayakawa, M. and H. Nonomura. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* **65**, 501-509.
  25. Lechevalier, M. P. 1981. Actinomycetes, 159-166. Gustav Fischer. Springer-Verlag, New York.
  26. Szegi, J. 1967. *Acta Agron, Acad. Sci. Hungar.* Tomus. **16**, 367-373.
  27. Chormonova, N. T., 1978. Isolation of *Actinomadura* from soil samples on selective media with kanamycin and rifampicin. *Antibiotiki* **23**, 22-26.
  28. McCarthy, A.J. and T. Cross. 1981. A note on a selective isolation medium for the thermophilic actinomycete *Thermomonospora chromogena*. *J. Appl. Bacteriol.* **51**, 299-301.
  29. Ivanitskaya, L.P. et al., 1981. *Antibiotiki* **26**, 83-86.
  30. Barton, M. D. and K. L. Hughes. 1981. Comparison of three techniques for isolation of *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* from contaminated sources. *J. Clinical Microbiology* **13**, 219-221.
  31. Orchard, V.A. and M. Goodfellow. 1974. The selective isolation of *Nocardia* from soil using antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* **85**, 160-162.
  32. Kim, C. J., K. H. Lee, A. Shimazu, I. D. Yoo. 1994. Reisolation frequency of soil actinomycetes on multiple isolation media. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**(3), 329-331.
  33. Lechevalier M. P. and H. A. Lechevalier. 1970. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **20**, 435.
  34. Gottlieb D. 1973. Actinomycetales. Pp. 1-10. (ed. Sykes G. & F. A. Skinner), Academic press, London.
  35. Cummins C. S. and H. Harris. 1958. *J. Gen. Microbiol.*, **18**, 173.
  36. Schliefer K. H. and O. Kandler. 1972. *Bacteriol. Rev.*, **36**, 407.
  37. Kawamoto I. 1981. *J. Bacteriol.*, **146**, 527.
  38. Lane D. J. 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 6955.
  39. Goodfellow M. and T. Cross. 1984. The biology of actinomycetes. Pp. 7-164. (ed. Goodfellow M.), Academic press, London.
  40. Williams, S. T. et al., 1994. Bergy's manual of determinative bacteriology. 9th ed., 605-703.
  41. Stackerbrandt E., F. A. Rainey, and N. L. Ward-Rainey. 1997. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis nov.*, **47**(2), 479-491.