

광범위한 항균활성을 보이는 토양 유래 *Streptomyces* 속 방선균의 분리 및 특성 연구

박세욱¹ · 배태욱² · 김승범^{1*}

¹충남대학교 미생물·분자생명과학과

²School of Medicine, Indiana University

Isolation and Characterization of *Streptomyces* spp. from Soil Showing Broad Spectrum Antibiotic Activity

Sewook Park¹, Taeok Bae², and Seung Bum Kim^{1*}

¹Department of Microbiology and Molecular Biology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

²School of Medicine, Indiana University, Gary, IN46408, USA

(Received November 16, 2012 / Accepted December 12, 2012)

Three actinobacterial strains exhibiting broad spectrum antibiotic activities were isolated from soil, and characterized. Through the comparative analysis of 16S rRNA genes, the three isolates could be assigned to the genus *Streptomyces*, as *S. tanashiensis*, *S. nashivillensis*, and *S. rubiginosohelvolus* were found to be the mostly related species, but the strains formed independent phylogenetic lineage. Each strain exhibited different antimicrobial profile against Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, Gram-negative bacteria *Salmonella typhi*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, and *Pseudomonas aeruginosa*, and also fungi *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. In addition to the antimicrobial profile, the strains also differed in API ZYM test results, which implies that the three strains might produce difference antimicrobial substances.

Keywords: *Streptomyces*, antimicrobial activity

방선균은 항생물질을 포함한 다양하고 유용한 이차대사산물의 주요 생산자로 알려져 있다(Osada, 1998; Saadoun and Gharaibeh, 2003). 특히 *Streptomyces* 속의 세균은 방선균이 생산하는 10,000 종류가 넘는 생리활성물질 중 7,600여 종류 이상을 생산하고 있으며(Berdy, 2005), 의약분야에서 상업적으로 사용되고 있는 항생물질의 75%, 농업분야에서 이용되고 있는 항생물질의 60%가량을 생산하고 있어 다양한 산업분야에서 매우 중요한 역할을 하고 있다(Miyadoh, 1993).

현재 미생물을 기원으로 한 많은 항생물질이 개발되어 임상에서 사용되고 있으나, 항생물질의 사용이 빈번해짐에 따라 그에 따른 내성균의 출현도 급증하고 있으며 내성기전도 다양해지고 있는 실정이다(DeLeo and Chambers, 2009). 이러한 다양한 내성기전은 돌연변이 또는 내성유전자의 전파로 획득되며, 내성균에서 플라스미드 또는 파아지를 매개로 하여 전위유전단위(transposons)에 기억되어 있는 내성 인자가 전파될 수 있으며, 플라스미드 자체에 내성 인자가 기억되어 있는 경우도 있다

(Davies, 1994). 이에 따라 새로운 항생물질의 개발에 대한 필요성이 증대되고 있는 실정이다.

방선균 유래 생리활성물질의 발견이 1940년대부터 폭발적으로 증가하여 tetracycline, cephalosporin, aminoglycoside, macrolide 등 현재 사용되고 있는 대부분의 주요 항생물질군이 이미 발견된 이후 현재에 이르러서도 신규 생리활성물질의 발견은 이어지고 있다(Berdy, 2005). 방선균의 분리원도 해양, 목재 등의 환경에서 진핵생물과 공생하는 *Streptomyces* 유래 생리활성물질의 발굴도 시도되는 등 다양화 추세를 보이고 있다(Pullen *et al.*, 2002; Lam, 2006). Watve 등(2001)은 당시까지 진행된 항생물질 발견의 추세에 근거하여 *Streptomyces* 속에서 발견할 수 있는 항생물질의 종류를 100,000여 종류로 추산하였다. 이는 현재까지 발견된 *Streptomyces* 유래 항생물질의 종류가 아직 전체의 10% 정도에 불과할 것임을 말해주고 있다.

본 연구에서는 신규 천연항생물질을 개발하고자 토양으로부터 항균활성을 보이는 세균을 탐색하고, 순수분리하여 각 분리균주들에 대해 분자계통분류학적, 생리화학적, 표현형적 특성을 분석하였고, 세균과 진균을 포함한 병원성 미생물들을 대상으로 분리균주들의 항균활성에 대한 연구를 수행하였다.

*For correspondence. E-mail: sbk01@cnu.ac.kr; Tel.: +82-42-821-6412; Fax: +82-42-822-7367

재료 및 방법

토양 채취 및 전처리

토양 시료의 채취는 정원 토양에서 이루어졌다. 시료는 지면에서 4-5 cm 깊이에서 채취하여 비닐 팩에 담은 후 냉장 보관하여 실험실로 운반하였고 4℃에서 분리할 때까지 보관하였다.

채취한 토양 시료로부터 포자비형성 세균을 사멸시키기 위하여 채취한 토양 시료를 37℃에서 1일간 건조시킨 뒤, 토양 1 g을 Ringer 용액(NaCl 2.25 g, KCl 0.105 g, CaCl₂ 0.12 g, NaHCO₃ 0.05 g/L)을 이용하여 희석하였다.

선택 분리 및 배양

선택 분리에는 항진균제인 cycloheximide와 nystatin을 50 µg/ml 농도로 첨가한 malt extract agar (ISP-2 agar; yeast extract 4.0 g, malt extract 10.0 g, glucose 4.0 g, agar 20 g/L)와 inorganic salts-starch agar [ISP-4 agar; soluble starch 10.0 g, K₂HPO₄ 1.0 g, MgSO₄ 1.0 g, NaCl 1.0 g, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g, CaCO₃ 2.0 g, FeSO₄ 0.001 g, MnCl₂ 0.001 g, ZnSO₄ 0.001 g, agar 20.0 g/L]를 사용하였다. 희석된 시료를 충분히 혼합한 뒤 200 µl씩 각 평판배지에 도달하여 25℃ 배양기에서 2주간 배양하였다.

생리·생화학적 특성 분석

분리한 방선균주들의 콜로니 형태, 포자형성 여부, 포자체와 기질균사체의 색상 등 배양학적 특성과 그람 염색, pH 및 NaCl 요구성, 생장온도 범위, 포자형성 등 생리·생화학적 특성을 분석하였다. 분석에는 malt extract agar 배지를 사용하였다. 또한

API 20NE Kit (bioMérieux Co., France)와 API ZYM Kit (bioMérieux Co.)를 사용하여 추가적인 생리학적 특성 분석을 실시하였다. 모든 방선균주의 배양은 30℃에서 이루어졌다.

16S rRNA 유전자 염기서열 분석

선별된 균주의 분자계통분류학적 분석을 위하여 각 분리 균주를 10 ml ISP-2 액체 배지에서 진탕배양(200 rpm, 3 days, 30℃)하였다. 배양액을 원심분리(2,000 rpm, 10 min, 4℃)하여 상층액을 제거하고 침강된 균체만을 얻었다. 침강된 균체로부터 세균용 Genomic DNA Prep Kit (SolGent, Korea)를 사용하여 각 균주의 DNA를 획득하였다.

16S rRNA 유전자는 universal primer (27F; 5'-AGAGTTTG-ATCMTGGCTCAG-3', 1492R; 5'-GGTTACCTTGTTACGAC-TT-3')를 이용하여 PCR을 수행하였다(Lane, 1991; Turner *et al.*, 1999). 염기서열 결정은 (주)SolGent에 의뢰하여 수행하였다. 결정된 각 염기서열은 EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>)의 16S rRNA gene 염기서열 정보를 이용하여 동정하였다(Kim *et al.*, 2012).

균주의 항균력 시험

분리된 균주들의 항균력을 분석하기 위하여 먼저 각 균주를 ISP-2 액체배지에서 48시간 배양 후 배양액을 ISP-2 한천배지에 도달하여 24시간 배양하였다. Ringer 용액에 검정대상 미생물이 OD₆₀₀=0.5의 농도로 보관된 현탁액 100 µl이 접종된 BHI soft agar 배지 5 ml을 배양이 끝난 ISP-2 한천배지 위에 각각 쏟아 균한 후 다시 24시간 배양하여 생장억제대 유무를 관찰하였다.

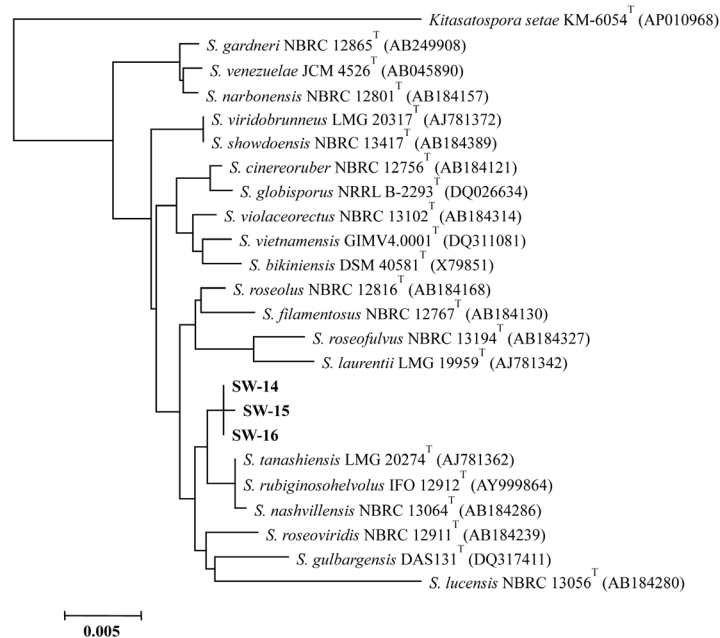


Fig. 1. Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequence of isolates and related species of *Streptomyces*. Scale bar corresponds to 0.005 substitutions per nucleotide position.

Table 1. API 20NE results of three isolates

Characteristic	SW-14	SW-15	SW-16
Nitrate reduction	+	+	+
Indole production	-	-	-
Glucose fermentation	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-
Urease	+	+	+
Esculin hydrolysis	+	+	+
Gelatinase	+	+	+
β -Galactosidase	+	+	+
Assimilation of:			
Glucose	+	+	+
Arabinose	+	+	+
Mannose	+	+	(+)
Mannitol	+	+	(+)
N-Acetyl-glucosamine	+	+	+
Maltose	+	+	+
Potassium gluconate	+	+	+
Capric acid	-	-	-
Adipic acid	-	-	-
Malate	(+)	(+)	-
Trisodium citrate	(+)	(+)	-
Phenylacetic acid	+	+	-

+, positive; (+), weak positive; -, negative.

Table 2. API ZYM results of three isolates

Characteristic	SW-14	SW-15	SW-16
Alkaline phosphatase	(+)	-	-
Esterase (C4)	(+)	(+)	(+)
Esterase Lipase (C8)	+	+	+
Lipase (C14)	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+
Valine arylamidase	+	+	+
Crystine arylamidase	(+)	(+)	(+)
Trypsin	-	-	-
α -Chymotrypsin	(+)	(+)	-
Acid phosphatase	+	+	+
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+
α -Galactosidase	-	-	-
β -Galactosidase	(+)	(+)	(+)
β -Glucuronidase	-	-	-
α -Glucosidase	-	-	+
β -Glucosidase	+	+	+
N-Acetyl- β -glucosaminidase	-	(+)	-
α -Mannosidase	-	-	-
α -Fucosidase	-	-	-

+, positive; (+), weak positive; -, negative.

결 과

항생활성을 가진 방선균의 선택 분리

전처리한 토양 시료를 ISP-2 한천배지에 도말하여 2주간 배양한 결과 단일콜로니들이 형성되었다. 이 중 기균사를 형성하는 방선균의 특징을 나타내는 콜로니 3개를 선택하여 분리, 계대하였으며, 이들을 각각 SW-14, SW-15, SW-16으로 명명하였다.

16S rRNA 유전자 염기서열 분석

세 균주의 gDNA로부터 PCR을 통해 약 1.5 kb의 16S rRNA gene 단편을 증폭한 뒤에 그 염기서열을 결정하여 각 균주의 분자계통학적 유연관계를 조사하였다. 그 결과 세 균주의 16S rRNA gene 염기서열은 *Streptomyces* 속에 속하는 것으로 나타났다. 세 분리 균주간의 유사도는 99.93–100%로 나타났다. *Streptomyces tanashiensis* LMG 20274^T 균주의 16S rRNA gene 염기서열과 99.3–99.6%의 상동성을 보여 가장 분자계통학적 유사성이 높은 것으로 나타났다. 다음으로 *Streptomyces rubiginosohelvolus* IFO 12912^T (99.2–99.5%), *Streptomyces nashvillensis* NBRC 13064^T (99.2–99.5%)와 높은 상동성을 보였다. 분리 균주와 *Streptomyces* 속의 근연종간 16S rRNA 유전자 염기서열에 따른 계통진화적 유연관계를 Fig. 1에 나타내었다. 세 균주는 단계를 이루었고, 염기서열 유사도 결과에서 나타난 근연종들과 같은 군집을 형성하였다.

생리·생화학적 특성 분석

세 분리 균주를 대상으로 API 20NE Kit 및 API ZYM Kit를 사용하여 분석한 각 균주의 생리·생화학적 특성을 Table 1과 Table 2에 나타내었다. 한편 세 균주는 모두 그람 양성으로 통성 호기성이며 catalase 양성이었다. 세 균주의 최적 생장온도는 25–30°C이었으며, 10°C에서 45°C 사이에서 생장을 관찰할 수 있었고, 45°C 이상에서는 생장을 관찰할 수 없었다. pH 7.0–9.0와 1.0% NaCl에서 가장 높은 생장 정도를 확인할 수 있었으나, pH 4.0 이하와 NaCl 5.0% 이상의 환경에서는 생장이 관찰되지 않았다. 또한 ISP-2 agar 배지에서 적갈색 색소 생산이 관찰되었으며, ISP-4 agar 배지에서 기균사 형성과 포자형성이 관찰되었다. ISP-2 agar 배지 위에서는 배양 10일차까지 세 균주 모두 포자형성이 관찰되지 않았다.

항균활성 분석

BHI soft agar에 포함된 검정대상 미생물이 충분히 자란 것을 확인한 이후에 생장억제대의 최대 지름을 측정하였다. 그 결과 세 균주는 그람 양성 세균인 *Bacillus subtilis* 및 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, 그람 음성 세균인 *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* 등에 대해 항균 스펙트럼을 보였다(Table 3). 그리고 진균인 *Candida tropicalis* 및 *Candida krusei*에 대해서도 세 균주 모두 미약한 항균활성을 보였다. 전체적으로 세균을 대상으로 한 항균활성에 있어 세 균주간에 차이가 관찰되었다.

Table 3. Antimicrobial profiles of three isolates

Test microbes ^a	SW-14	SW-15	SW-16
Gram-positive bacteria			
<i>Bacillus subtilis</i> CCARM 0003	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> CCARM 3089	-	+	(+)
Gram-negative bacteria			
<i>Salmonella typhi</i> CCARM 0242	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> CCARM 0250	(+)	+	+
<i>Serratia marcescens</i> 370 CCARM 0255	+	(+)	(+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 880/2 CCARM 0222	-	(+)	-
Filamentous fungi			
<i>Candida tropicalis</i> CCARM 14019	(+)	(+)	(+)
<i>Candida krusei</i> CCARM 14017	(+)	(+)	(+)

+, positive (> 3 mm); (+), weak positive (< 3 mm); -, negative (none).

^a CCARM: Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes.

고찰

토양으로부터 분리되어 광범위한 항균활성을 나타내는 *Streptomyces* 속 균주들을 선별한 결과 SW-14, SW-15, SW-16의 세 균주가 순수분리되었다. 세 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 통한 계통분류학적 유연관계의 분석 결과, 항생물질 생산 종인 *Streptomyces tanashiensis* LMG 20274^T와 99.3–99.6%의 상동성을 나타내었다. 그러나 이러한 상동성만으로는 분리균주들이 *S. tanashiensis*와 동일한 종인지의 여부를 판별하기 어렵다. 다만 Fig. 1에 나타난 바와 같이 분리균주들이 기존의 종과는 구별되는 독특한 진화적 계통을 구성하는 것으로 보여 이들 분리주들이 *Streptomyces* 속 내에서 신종으로 인지될 수 있는 가능성이 크다고 볼 수 있다. 한편 세 균주간 형태적, 생리·생화학적 특성은 대부분 일치하고 있어 이들 세 균주는 동일한 종에 속하는 것으로 판단된다.

Streptomyces 속 세균들이 생산하는 항생물질 및 항생물질의 전구체들은 매우 광범위하다(Watve *et al.*, 2001; Berdy, 2005). 그 중 본 연구에서 분리한 균주들과 가장 근연관계를 보여준 *S. tanashiensis*는 병원성 곰팡이, 효모, 원생동물, 그람 양성 세균 등에 광범위한 길항작용을 보이는 kalafungin과 그 유사체인 tetrahydrokalafungin를 생산하고, 이와 같은 pyranonaphthoquinone 계열의 항생제인 medermycin을 생산하며, 그람 양성 세균에 대한 항균작용 및 사람과 쥐의 암세포주에 대한 항암활성을 나타내는 lactoquinomycin A와 B를 생산한다는 것이 보고된 바 있다(Johnson and Dietz, 1968; Kakinuma *et al.*, 1995; Brimble *et al.*, 1999). 이 밖에도 *S. tanashiensis*는 항생제로 이용되는 K-73이 생산하고, 항암활성을 보이는 leptofuranins A, B, C, and D를 생산한다고 보고되었다(Ito *et al.*, 1976; Hayakawa *et al.*, 1996).

*Streptomyces*의 경우 분류학적 연관성과 생산되는 항생물질의 종류 간의 상관관계는 존재하지 않는 것으로 보인다. 즉 분류학적으로 근연종이라고 하더라도 서로 전혀 다른 종류의 항생물질을 생산하는 경우가 일반적이다. 그 예로써 본 연구에서 *S.*

*tanashiensis*와 같은 계통을 형성하는 것으로 나타난 *S. nashvillensis*의 경우 bellenammine (Ikeda *et al.*, 1992) 및 tetrodecamycin과 dihydrotetrodecamycin (Tsuchida *et al.*, 1995) 등을 생산하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 분리된 *Streptomyces* 균주들은 앞서 언급된 것처럼 분류학적으로 신종을 형성할 가능성이 높아 이들로부터 신규성을 가진 항생물질을 발굴할 수 있는 가능성도 충분히 크다고 판단된다. 그리고 각 균주들이 서로 다른 항생활성을 보여주고 있다는 점과 API 결과에서도 다소간의 차이를 보인다는 점에 비추어 이들 균주들이 각각 다른 종류의 항생물질을 생산할 수 있는 가능성도 있는 것으로 보인다. 특히 SW-14의 경우 두 종의 그람 양성 세균에 대해 항균활성을 나타내지 않아 SW-15나 SW-16의 항생활성과 뚜렷이 구별되었으므로, SW-14가 분비하는 항생물질은 다른 두 균주의 물질들과는 다를 것으로 예상된다.

항생물질의 발견 이후 병원성 질병은 현저히 감소하였고, *Streptomyces*는 이미 이러한 감소에 지대한 기여를 하였으나 여전히 새로운 항생물질에 대한 수요는 끊이지 않고 있다(Walsh, 2003; Berdy, 2005; Hopwood, 2007). 토양 서식 *Streptomyces*의 다양성은 본 연구에서 나타난 것처럼 아직도 충분히 밝혀지지 않은 상태이며, 매년 다수의 신규 항생물질들이 보고되고 있다. 본 연구 결과 확보한 *Streptomyces* 속 균주들은 분류학적 신규성을 가진다는 점과 광범위한 항균활성을 가진다는 점에서 주목할 만 하다. 향후, 분리된 균주들로부터 항생물질을 분리하고 동정하며, 그 특성을 연구하고자 한다.

적요

토양시료로부터 광범위한 항생작용을 보이는 방선균 3개 균주를 분리하여 그 특성을 조사하였다. 분리주의 16S rRNA 유전자 염기서열 비교 분석을 통해 3개 분리주는 모두 *Streptomyces* 속 에 속하고, *S. tanashiensis*, *S. nashvillensis* 및 *S. rubiginosohelvolus*와 근연 관계에 있는 것으로 나타났으나 독립적인 계통을 형성

하여 신종으로서의 가능성을 보여주었다. 항균활성 검정 결과 세 균주는 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* 등의 그람 양성 세균, *Salmonella typhi*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* 등의 그람 음성 세균, 그리고 *Candida tropicalis* 및 *Candida krusei* 등의 진균류에 대해 각각 서로 다른 길항작용을 보였다. 또한 세 균주 간에는 생리학적 활성에도 차이가 나타나 각 균주가 서로 다른 항생물질을 분비할 가능성이 있음을 보여주었다.

감사의 말

이 논문은 2010년도 정부재원(교육과학기술부 학술연구조성사업비)으로 한국연구재단의 지원을 받아 연구되었습니다(과제 번호 013-2010-C00025).

참고문헌

- Bérty, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. A personal view (vol 59, pg 1, 2005). *J. Antibiotics* **58**, 1–26.
- Brimble, M.A., Naim, M.R., and Duncalf, L.J. 1999. Pyranonaphthoquinone antibiotics - isolation, structure and biological activity. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 267–281.
- Davies, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**, 375–382.
- DeLeo, F.R. and Chambers, H.F. 2009. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J. Clin. Invest.* **119**, 2464–2474.
- Hayakawa, Y., Sohda, K., Furihata, K., Kuzuyama, T., Shin-Ya, K., and Seto, H. 1996. Studies on new antitumor antibiotics, leptofuranins A, B, C and D. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.* **49**, 974–979.
- Hopwood, D.A. 2007. *Streptomyces* in Nature and Medicine : The Antibiotic Maker. Oxford University Press, Oxford ; New York, N.Y., USA.
- Ikeda, Y., Naganawa, H., Kondo, S., and Takeuchi, T. 1992. Biosynthesis of bellenamycin by *Streptomyces nashvillensis* using stable isotope labeled compounds. *J. Antibiot.* **45**, 1919–1924.
- Ito, A., Ichikawa, Y., Horiguchi, S., Shiota, S., Kayama, Y., Chihara, S., Haneda, I., Hasuda, K., and Takano, S. 1976. Antibiotics No. K-73 and method for producing the same. USA Patent no. 3966913.
- Johnson, L.E. and Dietz, A. 1968. Kalafungin, a new antibiotic produced by *Streptomyces tanashiensis* strain Kala. *Appl. Microbiol.* **16**, 1815–1821.
- Kakinuma, S., Ikeda, H., Takada, Y., Tanaka, H., Hopwood, D.A., and Omura, S. 1995. Production of the new antibiotic tetrahydrokalafungin by transformants of the kalafungin producer *Streptomyces tanashiensis*. *J. Antibiot.* **48**, 484–487.
- Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., and Yi, H. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 716–721.
- Lam, K.S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 245–251.
- Lane, D. 1991 16S/23S rRNA sequencing. pp. 115–175. In Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley and Sons, New York, N.Y., USA.
- Miyadoh, S. 1993. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganism approach. *Actinomycetologica* **7**, 100–106.
- Osada, H. 1998. Actinomycetes, how fascinating microorganisms. *Actinomycetologica* **12**, 85–88.
- Pullen, C., Schmitz, P., Meurer, K., Bamberg, D.D.V., Lohmann, S., Franca, S.D.C., Groth, L., Schlegel, B., Mollmann, U., Gollmick, F., and *et al.* 2002. New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of Celastraceae. *Planta* **216**, 162–167.
- Saadoun, I. and Gharaibeh, R. 2003. The *Streptomyces* flora of Badia region of Jordan and its potential as a source of antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *J. Arid Environ.* **53**, 365–371.
- Tsuchida, T., Iinuma, H., Nishida, C., Kinoshita, N., Sawa, T., Hamada, M., and Takeuchi, T. 1995. Tetrodecamycin and dihydrotetrodecamycin, new antimicrobial antibiotics against *Pasteurella piscicida* produced by *Streptomyces nashvillensis* Mj885-Mf8. I. Taxonomy, fermentation, isolation, characterization and biological activities. *J. Antibiot.* **48**, 1104–1109.
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., and Palmer, J.D. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**, 327–338.
- Walsh, C. 2003. Where will new antibiotics come from? *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 65–70.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., and Bhole, B.D. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.* **176**, 386–390.