

자연 석회동굴에서 분리한 방선균의 속 다양성

박동진 · 이상화 · 박해룡 · 권오성 · 박상호 · 여수환 · 마사카즈 우라모토¹ · 김창진*
생명공학연구소, ¹Tamagawa University, Japan

Genus Diversity of Soil Actinomycetes Isolated from Natural Lime Caves. Park, Dong-Jin, Sang Hwa Lee, Hae Ryong Park, Oh Sung Kwon, Sang Ho Park, Soo-Hwan Yeo, Masakazu Uramoto¹ and Chang-Jin Kim. Korea Research Institute of Bioscience Biotechnology, P. O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea and ¹Faculty of Agriculture, Tamagawa University, Machida-shi, Tokyo 194-8610, Japan - Different actinomycete strains were isolated from natural lime caves of Ondal, Cheongok, Hwanseon and Yongyeon, which are located at Kangwon or Chungcheongbook province in Korea, and were identified to the genus level. Soil samples were collected at 6 sites inside and 2 sites outside of each natural lime cave. As the result, the strains belonging to genus *Streptomyces* and rare actinomycetes were isolated at the average of 2.1 and 3.4 strains per g soil on inside cave, whereas, which were isolated at the 6.0 and 1.8 strains per g soil on outside cave. However, the generic distribution of *Streptomyces* and rare actinomycetes isolated from outside cave was quite different from that of inside cave. It was shown that rare actinomycetes at natural lime caves is generally highly abundant than *Streptomyces*.

Key words: actinomycetes, natural lime caves, genus, diversity

방선균은 자연계에 폭 넓게 분포하고 있으며 그 밀도 또한 상당히 높다[6,19,20]. 이들 방선균의 특징으로서 첫 번째는 원핵생물에 소속하는 그람양성 세균임에도 불구하고 다른 세균과 뚜렷이 구별되는데 이는 복잡한 형태분화를 가진다. 특히, 그들의 생활사를 살펴보면 우선 포자가 발아하여 기질균사로 신장 및 분지를 하고 이어서 기균사가 형성되어 균사의 융벽 형성과 포자의 숙성으로 형태분화를 한다. 두 번째로서는 대사산물의 다양성과 유용성 등에 기인한다. 지금까지 발견된 미생물 유래의 저분자 생리활성물질로서는 약 10,000여 종의 화합물이 발견되었으며 이들 중 65% 정도는 방선균에서 유래하고 있어 방선균은 각종 생리활성물질의 중요한 탐색원으로(의약, 농약, 동물약)활용되고 있다고 하겠다[2,10,13,16,24].

이들의 생태학적 분포에 관한 이해는 다양한 균주의 효과적 분리를 위한 선택적 분리 방법의 개발[2,18]과 더불어 중요한 연구 목표의 하나가 되고 있다. 한 예로, Lechevalier 등은 16종의 토양으로부터 5,000주의 방선균을 분리·동정하여 그 분포 특성을 보고한 바 있다[10]. 그 연구 결과에 따르면 *Streptomyces* 속 방선균은 95%로 대부분을 차지하

고 *Nocardia*와 *Micromonospora* 속은 1-2% 수준이며 기타 다른 속 방선균은 극히 적은 것으로 나타났다. 그러나 저자들은 Lechevalier와 달리 중복성을 피하기 위해 동일 균주를 배제한 후 서로 다른 방선균만을 대상으로 토양 방선균의 분포 다양성을 조사한 바 있는데[7,8,9], 산림, 밭, 초지, 논 등의 일반 토양에서는 *Streptomyces* 속이 60-70%를 차지하였고, *Streptomyces* 속을 제외한 희소방선균[10,11]은 30-40%이었다. 이러한 분포 특성은 여러 다른 연구자들의 결과와 대체로 일치하였다[5,14,15,20].

한편, 한국은 4계절이 뚜렷한 온대 지역에 속하며 특히 중 동부 지역에는 많은 자연 석회동굴이 분포하고 있다. 이들 동굴의 내부는 연중 온도 변화가 거의 없으며 유기물의 유입이 극히 제한적이고 또한 오랫동안 격리되어 있어 일반 토양과는 상당히 다른 방선균의 분포 특성을 나타낼 것으로 예상된다. 또한 1993년에 발표한 생물 다양성 조약에 의해 미생물 종의 다양성과 그 보존의 중요성이 최근 주목 받고 있다. 따라서 자연계로부터 항생물질·효소·그 외의 저분자 생리활성물질 탐색을 위한 기초연구자료로 활용하기 위한 첫 단계로 국내에 소재 하는 8개 자연 동굴(고수굴, 천동굴, 노동굴, 고씨굴, 성류굴, 협재굴, 쌍용굴, 만장굴)에 존재하는 토양 방선균 분포를 조사한 바 있다[11]. 전보에 이어 본 연구에서는 국내 중 동부지역의 또 다른 석회동굴을 대상으로 하여 토양시료를 채취하고 이로부터 서로 다른 방선균을 분리·동정하여 동굴 내·외부지역의 속 다양성을 상호 비교 분석하였다.

*Corresponding author
Tel. 042-860-4332, Fax. 042-860-4595
E-mail: changjin@mail.kribb.re.kr

재료 및 방법

토양 시료

한국의 강원도 및 충청북도 일원에 소재하고 있는 자연 석회동굴인 환선, 온달, 용연, 천곡동굴을 연구 대상으로 하였다. 이들 동굴의 내부 온도는 평균 13-15°C이고 전장 길이는 760-6,200 m인 것으로 알려져 있다. 토양 시료는 일반인들의 접근이 허용되지 않는 곳을 중심으로 각 동굴별로 각각 6점을 채취하였는데, 동굴입구 10 m 지점으로부터 시작하여 일정한 간격으로 토양시료를 채취하였고, 또한 비교 실험을 위해 각 동굴의 외부지역에서도 각 2점씩을 채취하였다.

방선균의 순수 분리

방선균의 분리는 여러 종류의 vitamin(p-aminobenzoic acid 0.5 mg, biotin 0.25 mg, Ca-pantothenate 0.5 mg, inositol 0.5 mg, thiamine-HCl 0.5 mg)과 항생 물질(cycloheximide 50 mg, nalidixic acid 20 mg)이 첨가된 HV(humic acid-vitamin) agar 배지[3](humic acid 1.0 g, Na₂HPO₄ 0.5 g, KCl 1.7 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, CaCO₃ 0.02 g, agar 20 g, pH 7.2, distilled water 1 l)를 사용하였으며 특히 균주 보존은 Bennett's agar 배지 [1](glucose 10 g, yeast extract 1.0 g, bacto-peptone 2.0 g, beef extract 1.0 g, agar 20 g, pH 7.2, distilled water 1 l)를 사용하였다. 채취한 각 토양 시료 1.0 g를 멸균 생리 식염수 10 ml에 현탁한 다음 10⁻⁴배까지 희석한 후, 희석액 0.1 ml씩을 HV agar 배지에 도말 하였다. 이를 28°C에서 2주간 배양하면서 생육한 방선균 집락을 Bennett's agar 배지에 다시 옮겨 28°C에서 1주일 배양한 후, 형태적 특징을 상호 비교하여 서로 다른 방선균을 순수 분리하였다.

방선균의 속 동정

방선균의 속 동정은 Bergey's manual[4] 과 ISP방법[17]에 따랐으며, 순수 분리된 각 균주들의 형태 및 화학적 특성을 조사하였다. 즉 기균사의 색조, 배면 색조, 가용성 색소 등의 생성 여부와 광학 현미경(Nikon사, Labophot-2, long working distance objectives, 40×, 100×)을 이용한 포자 사슬 등의 형태학적 특징 및 균주 세포벽 성분인

diaminopimelic acid(DAP)의 특성을 조사하였다. DAP 분석은 Lechevalier의 방법[10]에 따라 충분히 생육된 일정량의 균체를 6N HCl로 가수분해한 후, thin layer chromatography(cellulose TLC; Merck 5715, 전개용매; methanol: water:6N HCl:pyridine=80:26:4:10)상에서 전개시켜 LL-DAP 혹은 meso-DAP를 구분하였다. 동정된 균주는 *Streptomyces* 속과 이를 제외한 희소방선균 군으로 구분하였으며 또한 희소방선균 군은 *Micromonospora* 속과 *Nocardia*, *Amycolata*, *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia*를 포함하는 nocardiaforms 군 그리고 분리 빈도가 2% 이하인 *Actinomadura*, *Kineosporia*, *Microbispora*, *Nocardioopsis*, *Saccharopolyspora*, *Streptosporangium* 속과 미동정 균주를 합한 기타 균주 군으로 세분하였다.

결 과

미생물이 생산하는 신규 생리활성물질을 자연계로부터 효과적으로 탐색하기 위해서는 새로운 스크리닝 방법의 개발과 더불어 유용성이 높은 다양한 미생물 균주의 분리탐색이 중요하다. 본 연구에서는 다양성이 풍부한 방선균을 분리하기 위하여 지리적,환경적으로 특수한 자연 동굴 4지역의 토양 시료로부터 서로 다른 방선균을 분리하고, 이들의 속 다양성을 각 동굴별로 비교 정리하였다. 국내 자연동굴별 방선균의 속 다양성 분포를 조사한 저자들[11]의 연구 결과에 의하면 전체적인 속 수준의 분포는 *Streptomyces*가 52.5%, *Micromonospora*가 16.3%, *Nocardiaforms*가 22.8%, *Kineosporia*, *Actinomadura*, *Nocardioopsis*, *Nocardioides*, *Streptosporangium*의 순서로 0.3%-1.4% 정도 분포하고 있었다. 따라서, 저자들은 더 다양한 방선균을 분리탐색하기 위하여 동굴 내,외부지역의 속 다양성을 상호 비교 분석하였다.

환선동굴 방선균의 속 다양성

강원도 삼척시에 소재하고 있는 환선동굴은 해발 820 m에 위치하며 총 연장 6,200 m의 경사복합형 석회동굴로 형성되어 있다. 동굴 내부에서는 총 26주의 방선균이 분리되었는데, 이중 34.6%는 *Streptomyces* 속이었고 *Micromonospora*, *nocardiaforms*, 기타 다른 속 방선균은 각각 23.1%, 19.2%, 23.1%이었다. 이외는 달리 동굴 외부에서는 분리된

Table 1. Genus diversity of actinomycetes isolated from soil samples of Cave Hwanseon

Site	Number of soil samples	Stm	Rare actinomycetes			Subtotal	Total
			Mim	Noc	Etc		
Inside	6	9*	6	5	6	17	26
		(34.6)	(23.1)	(19.2)	(23.1)	(65.4)	(100)
Outside	2	13	2	1	0	3	16
		(81.3)	(12.5)	(6.3)	(0)	(18.8)	(100)

Stm; *Streptomyces*, Mim; *Micromonospora*, Noc; nocardiaforms, Etc; others including *Actinomadura*, *Kineosporia*, *Microbispora*, *Nocardioopsis*, *Saccharopolyspora*, *Streptosporangium*, and unidentified genera. *Total number of isolates.

16주 중의 81.3%가 *Streptomyces* 속이었으며 *Micromonospora*, *nocardiaforms*, 기타 다른 속의 희소방선균은 총 18.8%이었다(Table 1). 이것은 전보에서[11] 조사 발표한 노동굴 내·외부의 *Streptomyces* 속 및 희소방선균(rare actinomycetes) 속의 분포 다양성과 비교해 볼 때 비슷한 분포 경향을 나타내었다. 또한 토양 시료 당 분리 균주 수를 산정 해 볼 때 동굴 내부에서는 *Streptomyces* 속과 희소방선균이 1.5주와 2.8주였으나 동굴 외부에서는 각각 6.5주와 1.5주이었다. 따라서 환선동굴 내부는 외부에 비해 *Streptomyces* 속 방선균의 분포 다양성은 낮으나 희소방선균의 분포 다양성은 더 높은 것으로 판단된다.

온달동굴 방선균의 속 다양성

충청북도 단양군에 소재하고 있는 온달동굴은 4억5천만 년 전에 생성된 석회암 동굴로서 총 길이가 760 m이고 주선과 지선으로 나뉘어져 있으며, 특히 동굴 내부의 지하수량이 풍부한 것이 특징적이며 다양한 생물이 서식하고 있다. 특히, 방선균의 전체적인 속 다양성 분포는 동굴 내부에서 37.3%가 *Streptomyces* 속이었고 *Micromonospora*, *nocardiaforms*, 기타 다른 속을 포함하는 희소방선균은 총 62.7%이었다. 외부지역에서는 이와 반대로 *Streptomyces* 속과 희소방선균이 각각 78.6%와 21.4%이었다. 또한 동굴 내·외부에서 분리된 균주 수를 상호 비교해볼 때, 동굴 내부에서 *Streptomyces* 속 방선균은 외부에 비해 약 절반 수준이었으나 희소방선균은 외부보다 오히려 2.9배나 더 많았다(Table 2). 따라서 온달동굴 내부는 환선동굴에서 보여진 바와 같이 외부에 비해 *Streptomyces* 속 방선균의 분포 다양성은 낮으나 희소방선균의 분포 다양성은 더 높은 것으로 생각된다.

용연동굴 방선균의 속 다양성

강원도 태백시에 소재 하는 용연동굴은 해발 920 m에 위치하고 있으며, 내부에는 전장 843 m, 폭 50 m, 길이 130 m의 대형광장과 순환형 수평동굴이 있고, 그 생성시기는 약 1억5천 내지 3억만년 전으로 추정되고 있다. 특히, 방선균의 전체적인 속 다양성 분포는 동굴 내부에서 분리한 *Streptomyces* 속과 희소방선균의 분포 비율은 31.4%와 68.6%이었으나, 동굴 외부에서는 이들이 각각 84.6%와 15.4%이었다. 또한 토양 시료 당 서로 다른 균주의 분리수에 있어서도 동굴 내부는 외부지역에 비해 *Streptomyces* 속은 매우 적으나 희소방선균은 오히려 훨씬 더 많았다(Table 3). 특히, 동굴 내부는 환선 및 온달동굴에서 보여준 바와 같이 외부에 비해 *Streptomyces* 속 방선균의 분포 다양성은 2.7배 낮으나 희소방선균의 분포 다양성은 훨씬 더 높은(4.5배) 것으로 생각된다.

천곡동굴 방선균의 속 다양성

강원도 동해시에 소재하는 천곡동굴은 총 길이 1,400 m의 수평동굴로서 생성시기는 4-5억년전으로 추정되며 국내에서는 유일하게 시가지 중심부에 위치하고 있다. 특히, 방선균의 전체적인 속 다양성 분포는 동굴 내부에서는 *Streptomyces* 속과 희소방선균이 각각 55.0%와 45.0%의 비율이었으며, 이외는 달리 외부지역에서는 각각 72.2%와 27.8%이었다(Table 4). 또한 토양 시료 당 분리 균주의 수에 있어서도 동굴 내부는 외부에 비해 *Streptomyces* 속과 희소방선균이 모두 적은 것으로 나타났다. 특히 동굴 내부 지역의 희소방선균 분포율은 다른 3곳의 동굴에 비해 상당히 낮다. 앞에서 설명한 것처럼 동굴 그 자체가 도심지에 위치하고 있어 관광객들의 접근이 용이할 뿐만 아니라 다

Table 2. Genus diversity of actinomycetes isolated from soil samples of Cave Ondal

Site	Number of soil samples	Stm	Rare actinomycetes				Subtotal	Total
			Mim	Noc	Etc			
Inside	6	19* (37.3)	11 (21.6)	15 (29.4)	6 (11.8)	32 (62.8)	51 (100)	
Outside	2	11 (78.6)	1 (7.1)	2 (14.3)	0 (0)	3 (21.4)	14 (100)	

Stm; *Streptomyces*, Mim; *Micromonospora*, Noc; *nocardiaforms*, Etc; others including *Actinomadura*, *Kineosporia*, *Microbispora*, *Nocardio-opsis*, *Saccharopolyspora*, *Streptosporangium*, and unidentified genera. *Total number of isolates.

Table 3. Genus diversity of actinomycetes isolated from soil samples of Cave Yongyeon

Site	Number of soil samples	Stm	Rare actinomycetes				Subtotal	Total
			Mim	Noc	Etc			
Inside	6	11* (31.4)	6 (17.1)	11 (31.4)	7 (20.0)	24 (68.6)	35 (100)	
Outside	2	11 (84.6)	0 (0)	0 (0)	2 (15.4)	2 (15.4)	13 (100)	

Stm; *Streptomyces*, Mim; *Micromonospora*, Noc; *nocardiaforms*, Etc; others including *Actinomadura*, *Kineosporia*, *Microbispora*, *Nocardio-opsis*, *Saccharopolyspora*, *Streptosporangium*, and unidentified genera. *Total number of isolates.

Table 4. Genus diversity of actinomycetes isolated from soil samples of Cave Cheongok

Site	Number of soil samples	Stm	Rare actinomycetes				Total
			Mim	Noc	Etc	Subtotal	
Inside	6	11*	5	3	1	9	20
		(55.0)	(25.0)	(15.0)	(5.0)	(45.0)	(100)
Outside	2	13	1	4	1	6	19
		(72.2)	(5.6)	(22.2)	(5.6)	(27.8)	(100)

Stm; *Streptomyces*, Mim; *Micromonospora*, Noc; nocardiaforms, Etc; others including *Actinomadura*, *Kineosporia*, *Microbispora*, *Nocardiosis*, *Saccharopolyspora*, *Streptosporangium*, and unidentified genera. *Total number of isolates.

큰 동굴에 비해 여러 가지 직접적인 환경오염의 피해가 더 많이 진행되었기 때문이 아닌가 생각된다. 그 결과, 다른 석회동굴(환선, 온달, 용연)에 비해 방선균의 분포 특성에 있어 다소 차이가 있음을 나타내 주고 있다.

고 찰

본 연구에서는 자연 석회 동굴지역을 대상으로 토양 방선균의 분포 특성을 조사하였다. 각 동굴 별 결과를 종합해 보면 동굴 외부지역에서는 토양 시료 당 7.8주의 서로 다른 방선균이 분리되었으며, 이들 중 *Streptomyces*, *Micromonospora*, *nocardiaforms*, 기타 다른 속 균주들이 각각 6주, 0.5주, 0.9주, 0.4주가 분리되었다. 반면 동굴 내부의 경우 토양 시료 당 서로 다른 방선균의 분리수는 외부에 비해 다소 적은 5.5주가 분리되었다. 그리고 이들 균주 중 *Streptomyces* 속은 2.1주에 불과하였으나 나머지 다른 속 방선균 *Micromonospora*, *nocardiaforms*, 및 기타 다른 속 균주는 외부에 비해 상당히 많은 1.2주, 1.4주, 0.8주가 분리되었다. 또한 이들 방선균의 분리 수로부터 *Streptomyces* 속과 이를 제외한 모든 방선균 즉 희소방선균의 구성 비율로 대별해 볼 때, 동굴 외부에서 *Streptomyces* 속과 희소방선균은 각각 79.2%와 20.8%이었으나 오히려 동굴 내부에서는 39.6%인 *Streptomyces* 속에 비해 희소방선균은 60.4%로서 훨씬 더 높은 비율을 나타내었다.

저자들이 이전에 조사·보고한 연구결과[11]와 비교했을 때 동굴 내·외부지역의 방선균 속 다양성 분포는 큰 차이가 없었다. 일반적으로 동굴 외부의 경우는 계절적인 변동에 따라 기온, 습도, 바람 등의 환경적인 변화가 크고 내부의 경우는 온도 등이 일정하여 연중 변화가 적다. 따라서 자연 석회 동굴 내부는 일반 토양에 비해 *Streptomyces* 속 방선균의 분포 다양성은 낮으나 희소방선균의 분포 다양성은 훨씬 더 높은 것으로 생각된다. 이러한 특성을 고려할 때 자연 석회동굴은 항생물질 gentamycin 발견이후, 그 유용성이 매우 높아진 희소방선균의 분리에 상당히 유용할 것으로 기대된다[12,23,24]. 한편 공동 연구자인 Uramoto 등이 연구한 일본 지역 동굴토양 방선균의 속 다양성 연구결과[21,22]에 의하면, 13군데의 자연 석회 동굴로부터 총 45점의 토양 시료를 채취하여 332주의 서로 다른 방선균을

분리·동정한 결과 *Streptomyces* 속과 희소방선균의 분포 비율은 각각 26.9%와 73.1%이었다. 따라서 자연 석회동굴 내부는 *Streptomyces* 속 방선균의 분포에 비해 일반적으로 희소방선균의 분포 다양성이 더 높은 것으로 판단된다. 현재 저자들은 지리적·생태학적으로 격리된 특수환경 조건인 자연 석회동굴의 환경적 특성과 토양 방선균의 분포 특성 간의 상호 관계를 연구하고 있으며, 특히 이러한 결과는 앞으로 토양 방선균의 선택적 집식 배양을 위한 중요한 개념을 낳을 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구를 수행하는데 있어 많은 협조를 해주신 환선동굴, 온달동굴, 용연동굴 및 천곡동굴의 각 관리사무소 관계자 분들께 감사드립니다.

REFERENCES

1. Atlas, R. M. 1993. *Handbook of microbiological media*, pp. 126-127. 1st ed. CRC, Florida.
2. Goodfellow, M. and A. G. O'Donnell. 1989. Search and discovery of industrially-significant actinomycetes. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **44**: 343-383.
3. 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.
4. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Snea, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, pp. 605-703. 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
5. Iwai, Y. and Y. Takahashi. 1992. Selection of microbial sources of bioactive compounds, pp. 281-302. In S. Omura (ed.), *The search for bioactive compounds from microorganisms*, Springer-Verlag, New York.
6. Kennedy, A. C. and V. L. Gewin. 1997. Soil microbial diversity: present and future considerations. *Soil Sci.* **162**: 607-617.
7. Kim, C. J., K. H. Lee, A. Shimazu, and I. D. Yoo. 1994. Reisolation frequency of soil actinomycetes on multiple isolation media. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 329-331.
8. Kim, C. J., K. H. Lee, A. Shimazu, O. S. Kwon, and D. J. Park. 1995. Isolation of rare actinomycetes on various types of soil. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 36-42.

9. Kim, P. K., O. S. Kwon, C. Y. Lim, D. J. Park, and C. J. Kim. 1997. Genus distribution of soil actinomycetes on different depth. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 534–536.
10. Lechevalier, M. P. and H. Lechevalier. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**: 435–443.
11. Lim, C. Y., O. S. Kwon, P. K. Kim, D. J. Park, D. H. Lee, and C. J. Kim. 1996. Distribution pattern of soil actinomycetes at natural caves. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 534–539.
12. Nisbet, L. J. 1982. Current strategies in the search for bioactive microbial metabolites. *J. Chemmm. Technol. Biotechnol.* **32**: 251–270.
13. Oh, I. H. 1998. Ecological studies on Daechung Reservoir. *Kor. J. Limnol.* **31**: 79–87.
14. Okami, Y. and K. Hotta. 1988. Search and discovery of new antibiotics, pp. 33-67. In M. Goodfellow (ed.), *Actinomycetes in biotechnology*, Academic Press, London.
15. Okazaki, T. 1987. Rare actinomycetes: new breed of actinomycetes. *The bimonthly J. Microorganism* **3**: 453–461.
16. Porter, N. and F. M. Fox. 1993. Diversity of microbial products-discovery and application. *Pestic. Sci.* **39**: 161–168.
17. Shirling, E. B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313–340.
18. Steele, D. B. and M. D. Stowers. 1991. Techniques for selection of industrially important microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 89–106.
19. Takashi, S. 1987. Cosmopolitan actinomycetes. *J. Microorganisms* **3**: 482–492.
20. Tate III, R. L. 1997. Soil microbial diversity research: whither to now? *Soil Sci.* **162**: 605–606.
21. Uramoto, M. and T. Furuta. 1998. Development of isolation procedure of rare actinomycetes and analyses of the useful metabolites. *Pro. Asi. Net. Micro. Res.*: 259–266.
22. Uramoto, M., H. Hori, T. Furuta, and C. J. Kim. 1999. Taxonomic analyses of rare actinomycetes inhabiting natural caves and plant roots for search of new bioactive metabolites. *Pro. Asi. Net. Micro. Res.*: O-I/1, 19–27.
23. Weinstein, M. J., G. M. Luedmann, E. M. Oden, and G. H. Wagnm. 1963. Gentamicin, a new broad-spectrum antibiotic complex. *Antimicrob. Agent Chemother.* 1–7.
24. Zahner, H. 1985. The secondary metabolism of microorganisms: an inexhaustible source for new products. *Pestic. Sci.* **16**: 424–425.

(Received May 16, 2000)