
**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE *ACTINOPLANES* ISOLADOS DO SOLO DE
CERRADO GOIANO E O EFEITO CITOTÓXICO DO
EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DOS ISOLADOS¹**

Regina Célia Lacerda de Santana Azevedo,² Fabiana Cristina Pimenta³ e José Daniel G. Vieira³

RESUMO

Os actinomicetos são bactérias gram-positivas que possuem a capacidade de formar hifas em algum estágio do seu desenvolvimento. São encontrados em solos, águas e ambientes modificados pelo homem, sendo os principais produtores de antimicrobianos. Visando isolar *Actinoplanetes* (actinomicetos raros) capazes de produzir substâncias com atividade antimicrobiana e com baixa citotoxicidade, amostras de solo de cerrado foram tratadas segundo a metodologia descrita por Palleroni (1980). Foram isoladas seis morfoespécies com características de *Actinoplanes* (ACR 3, 4, 7, 13, 14, 23). Os isolados foram avaliados em relação a oito bactérias gram-positivas, oito gram-negativas e sete fungos. Não foi observada atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-negativas nem contra os fungos. Essa atividade foi observada somente contra bactérias gram-positivas. Os *Actinoplanes* ACR 4, 7 e 23 foram os únicos que mostraram produção de moléculas bioativas com atividade contra bactérias gram-positivas, e essa atividade foi melhor no meio ágar AC. Os extratos secos produzidos pelos isolados *Actinoplanes* ACR 4, 7 e 23 não apresentaram atividade citotóxica nas concentrações analisadas (de 20.000 ppm a 0,125 ppm de extrato seco). Os resultados sugerem um potencial dos isolados na produção de substâncias com atividade antimicrobiana, as quais poderão ser utilizadas na terapêutica das infecções causadas por bactérias gram-positivas.

DESCRITORES: Atividade antimicrobiana. *Actinoplanes*. Teste de citotoxicidade.

1 Parte da dissertação de mestrado da primeira autora.

2 Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Área de concentração: Microbiologia. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG).

3 Setor de Microbiologia. Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia (DMIPP), IPTSP, UFG.

Endereço para correspondência: José Daniel G. Vieira, Rua 262, nº45, Ap. 501, Bl. 2D, Condomínio Barão de Duas Barras, Setor Universitário, Goiânia, Goiás-CEP 74615-300. E-mail: jvieira@iptsp.ufg.br

Recebido para publicação em 30/5/2004. Revisto em 4/11/2004. Aceito em 15/11/2004.

INTRODUÇÃO

Os actinomicetos são um grupo heterogêneo de bactérias caracterizadas por sua habilidade em formar hifas. Tais bactérias são aeróbias, gram-positivas, com alto conteúdo de G+C em seu DNA, sendo encontradas em diversos ambientes, particularmente no solo (Holt et al. 1994). Sua morfologia varia de simples à complexa, compreendendo desde bactérias que se multiplicam por divisão binária (*Corynebacterium* spp) e outras que se apresentam como células envelopadas e algumas ramificações, a exemplo da *Mycobacterium* e *Nocardia* spp, respectivamente, até espécies extensivamente filamentosas e ramificadas, como *Streptomyces* (Connell 2001).

Os actinomicetos possuem a característica marcante de produzirem inúmeros compostos bioativos, estruturalmente diversos, de elevada importância farmacêutica e agrícola (Goodfellow et al. 1983). Tais compostos são metabólitos secundários, sintetizados por um grupo muito reduzido de microrganismos durante a fase tardia do seu crescimento. Os compostos sintetizados não são necessários para o desenvolvimento do microrganismo produtor e, geralmente, são produzidos como uma mistura de produtos quimicamente relacionados entre si. Entre os metabólitos secundários mais conhecidos, encontram-se os antibióticos. Existem cerca de cinco mil compostos com atividade antibiótica, e esse número aumenta numa média de aproximadamente trezentos a cada ano. Os actinomicetos, em particular, as bactérias do gênero *Streptomyces*, são responsáveis por 75,0% da produção desses antibióticos (Sanglier et al. 1993a e b).

A produção de moléculas bioativas, dentre elas os antibióticos, é uma das áreas de aplicação farmacológica mais exploradas em biotecnologia, envolvendo, principalmente, empresas de países industrializados. A pesquisa de microrganismos produtores de novos compostos tem sido realizada através do isolamento e *screening* de diferentes ambientes e também de actinomicetos ditos raros, os *Actinoplanetes* (Nolam & Cross 1988).

Actinoplanetes é um nome trivial para designar espécies microbianas da família *Actinoplanaceae*, que são caracterizadas pela produção de esporos freqüentemente móveis após serem desvinculados dos esporângios ou das vesículas. A classificação genérica dessas espécies é baseada na morfologia do esporângio, que é esférico ou irregular nos *Actinoplanes*, *Spirillospora* e *Streptosporangium*, lobado nos *Amorphosporangium*, com forma de sino ou garrafa nas *Ampullariella* e cilíndrico nos *Dactylosporangium*, *Planobispora* e *Planomonospora* (Makkar & Cross 1982). Os gêneros são diferenciados com base nos arranjos e no número dos esporos no esporângio, na motilidade dos esporos e na composição da parede celular (Holt et al. 1994).

O presente trabalho visou o isolamento de *Actinoplanes* oriundos de amostras de solo do cerrado goiano, com atividade antimicrobiana e baixa atividade citotóxica.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem e isolamento dos *Actinoplanes*

Amostras de solo foram coletadas a uma profundidade de 0 a 10 cm, na região de cerrado goiano (Acreúna-GO), e processadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. As amostras foram submetidas a um pré-tratamento de dessecação à temperatura ambiente por dezesseis horas. Após esse período utilizou-se a metodologia descrita por Palleroni (1976, 1980) para o isolamento dos *Actinoplanes*: colocou-se uma porção (0,5 g) da amostra em cada compartimento da câmara de isolamento e adicionou-se água destilada esterilizada até o nível de 2 mm acima do canal de conexão. A câmara foi incubada por uma hora a 30°C para induzir a liberação e a mobilidade dos esporos do esporângio maduro. Após esse período, um tubo capilar esterilizado, preenchido com tampão fosfato 0,01 mol/L, foi colocado no canal de conexão com uma pinça fina. O capilar ficou imerso pelo menos em 1 mm da superfície do líquido. Esse aparato foi deixado por mais uma hora a 30°C. O tubo capilar foi então retirado e lavado externamente com água esterilizada, e o conteúdo, vertido dentro de um tubo Eppendorf contendo 1 ml de água esterilizada. Porções dessa suspensão foram espalhadas sobre a superfície de placas de Petri contendo o ágar amido-caseína (AC) adicionado de 0,5% de sulfato de magnésio anidro (Palleroni 1980). As placas foram incubadas a 30°C por até 21 dias. Colônias com características típicas de *Actinoplanes* foram retiradas e semeadas em meio ágar ISP-2 e incubadas a 30°C até a esporulação (de sete a quatorze dias). Esse processo foi repetido por cinco vezes a fim de garantir a pureza dos isolados. As colônias foram caracterizadas quanto à afinidade tintorial das células (gram-positivas), presença de esporos móveis, morfologia e composição da parede celular. Aquelas que apresentaram características de *Actinoplanes* foram mantidas em ágar ISP-2 e em solução de glicerol a 20,0% a -20°C (Holt et al. 1994).

Determinação da atividade antimicrobiana dos isolados

Para a determinação da atividade antimicrobiana, os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo o ágar AC (Palleroni 1980) e o ágar meio para produção de estreptomicina (MPE) (Melo & Sanhueza 1995). Foram também incubados a 30°C por quatorze dias para a formação de um tapete homogêneo de crescimento dos microrganismos isolados. Após esse período, cilindros de ágar de 7 mm de diâmetro foram cortados e colocados sobre placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton previamente inoculado com culturas bacterianas indicadoras: *Bacillus cereus* ATCC 14.579, *B. subtilis* DAUFPE 16, *Enterococcus*

faecalis LMM-IPTSP, *Micrococcus luteus* CCT 3.225, *Rhodococcus equi* CCT 0541, *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, *S. epidermidis* ATCC 12.228, *S. saprophyticus* LMM-IPTSP, *Citrobacter freundii* LMM-IPTSP, *Escherichia coli* ATCC 25.922, *Enterobacter cloacae* LMM-IPTSP, *Proteus mirabilis* LMM-IPTSP, *Pseudomonas aeruginosa* CCT 0090, *P. fluorescens* CCT 0595, *Salmonella* sp LMM-IPTSP, *Serratia* sp LMM-IPTSP. As placas foram incubadas a 37°C por um período de 16 a 24 horas. As culturas das bactérias indicadoras foram padronizadas a uma concentração equivalente à metade da concentração do tubo nº 1 da escala de McFarland e semeadas com o auxílio de *swab* (Woods & Washington 1995). Os fungos indicadores (*Aspergillus flavus* LMM-IPTSP, *A. fumigatus* LMM-IPTSP, *Candida albicans* CCT 0776, *Microsporium canis* LMM-IPTSP, *M. gypseum* LMM-IPTSP, *Rhodotorula* sp LMM-IPTSP e *Trichosporum* sp LMM-IPTSP) também foram padronizados à mesma concentração, inoculados em ágar Sabouraud e incubados a 30°C por um espaço de 72 a 96 horas (Espinel-Ingroff & Pfaller 1995). Para realizar a leitura, mediu-se a zona de inibição do crescimento dos microrganismos testados.

Para a preservação dos microrganismos indicadores, as bactérias foram mantidas em glicerol a 50% em congelador a - 20°C, e os fungos em ágar Sabouraud sob refrigeração a - 4°C.

Determinação da atividade citotóxica

Produção e extração da substância bioativa

Os isolados que apresentaram melhor atividade antimicrobiana foram inoculados em 15 mL de caldo amido-caseína de Waksman (17) e incubados a 30°C sob agitação constante (180 rpm) por três dias. Em seguida, adicionaram-se a eles 50 mL do mesmo caldo, deixando-os incubar por mais quinze dias nas mesmas condições. Após esse período, o caldo foi filtrado para a separação da massa celular, que foi macerada em gral e tratada com etanol absoluto numa proporção de 2,0 mL do solvente para cada grama de micélio bruto (Delle Monache et al. 1970). Esse procedimento foi repetido três vezes, e o extrato etanólico (extrato 1) obtido foi separado para posterior utilização como diluente do resíduo da evaporação do filtrado. Tratando-se por três vezes o filtrado com acetato de etila, obteve-se uma bicamada na qual a fase orgânica foi separada e evaporada sob pressão (rotavapor) a 42°C. O resíduo obtido foi ressuspensão com o extrato etanólico produzido anteriormente, sendo novamente evaporado para se obter extrato seco. Esse também foi ressuspensão em 1 mL de etanol absoluto, obtendo-se assim o extrato 2, chamado de extrato etanólico bruto. Finalmente o extrato 2 foi armazenado em congelador para posterior utilização no teste de citotoxicidade em *Artemia salina*.

Teste de citotoxicidade em *Artemia salina*

No teste de citotoxicidade em *Artemia salina* descrito por Blizzard et al. (1989) e Takahashi et al. (1989) com modificações, 200 mL do extrato etanólico bruto foi solubilizado em 200 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), e o volume foi completado para 10 mL com solução salina a 3,5% preparada com sal marinho e água filtrada (solução estoque – 20.000 ppm do extrato seco) (Blizzard et al. 1989). A partir dessa solução foram preparadas outras soluções nas concentrações de 20.000 ppm até 0,125 ppm do extrato seco. Colocou-se 1,0 mL dessas soluções em tubos aos quais foram adicionados dez náuplios de *Artemia salina* obtidos por eclosão de ovos em solução salina a 3,5%. Os náuplios foram deixados nessa solução a 30°C sob aeração e iluminação por 48 horas e posteriormente concentrados para o uso no teste. Os tubos contendo o extrato diluído e os náuplios foram mantidos a 30°C sob iluminação. Os náuplios sobreviventes foram contados após 24 horas de incubação. Fez-se um controle negativo utilizando etanol absoluto e DMSO nas mesmas concentrações do experimento, realizado em triplicata. A porcentagem de mortalidade foi calculada por meio da fórmula descrita abaixo, e a determinação da DL₅₀ foi feita pela análise de regressão da porcentagem de mortalidade.

$$\% \text{ de mortalidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de náuplios mortos ou com inibição de movimentos}}{\text{n}^\circ \text{ total de } Artemia \text{ salina}} \times 100$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os *Actinoplanes* caracterizam-se por possuírem colônias lisas, brilhantes ou enrugadas, com coloração variando entre amarelo, alaranjado, vermelho, azul, verde, ocre, púrpura, marrom ou preto (Holt et al. 1994). Possuem esporos móveis devido à presença de flagelos. Com base nessas descrições e na coloração de gram (bactérias gram-positivas), foram isoladas seis morfoespécies com características de *Actinoplanes* (Tabela 1).

Tabela 1. Características macroscópicas do cultivo de *Actinoplanes* isolados em ágar AC segundo Waskman após quatorze dias de cultivo

Isolados	Micélio Aéreo	Micélio de Superfície
<i>Actinoplanes</i> ACR 3	laranja	laranja
<i>Actinoplanes</i> ACR 4	preto	marron
<i>Actinoplanes</i> ACR 7	preto	preto
<i>Actinoplanes</i> ACR 13	laranja-escuro	laranja-escuro
<i>Actinoplanes</i> ACR 14	amarelo	amarelo
<i>Actinoplanes</i> ACR 23	marrom	marrom

A capacidade de produção de moléculas bioativas com atividade antimicrobiana pelos isolados pode ser observada na Tabela 2. Não se observaram, em nenhum dos meios utilizados, moléculas produzidas com atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas nem contra fungos, mas somente contra bactérias gram-positivas. As cepas *Actinoplanes* ACR 4, ACR 7 e ACR 23 demonstraram melhor atividade contra bactérias gram-positivas quando cultivadas no ágar AC. Já as cepas ACR 3, ACR 13 e ACR 14 não apresentaram atividade em nenhuma das condições testadas. Somente a cepa *Actinoplanes* ACR 7 apresentou atividade antimicrobiana quando previamente cultivada no meio ágar MPE.

Quando comparado com o ágar MPE, o ágar AC possibilitou aos isolados de *Actinoplanes* testados, nas condições da análise, melhor capacidade para produção de moléculas antimicrobianas.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana dos *Actinoplanes* isolados contra as bactérias gram-positivas

Bactérias Indicadoras	Meio de Cultura	<i>Actinoplanes</i> ACR 4	<i>Actinoplanes</i> ACR 7	<i>Actinoplanes</i> ACR 23
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14.579	AC	++	-	-
	MPE	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> 16	AC	+	-	+
	MPE	-	++	-
<i>Enterococcus faecalis</i> LMM-IPTSP	AC	++	-	+
	MPE	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> CCT 3.225	AC	-	-	++
	MPE	-	+++	-
<i>Rhodococcus equi</i> CCT 0541	AC	-	-	-
	MPE	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25.923	AC	++	++	+
	MPE	-	+++	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12.228	AC	+++	-	-
	MPE	-	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> LMM-IPTSP	AC	+	++	+
	MPE	-	+++	-

Nota: +++ 14-16 mm de Ø; ++ 11-13 mm de Ø; + 9-10 mm de Ø; - ausência de halo de inibição de crescimento.

Diferentes constituintes presentes nos meios de cultura podem influenciar a produção de moléculas bioativas. Além desses constituintes, o pH, a temperatura e o estado físico (sólido ou líquido) também podem interferir (Omoto et al. 1979, Shomura et al. 1979, Furlan 1997). Geralmente a produção de

metabólitos secundários é observada em meios ricos, capazes de manter um rápido crescimento, e onde os nutrientes, provavelmente, reprimem a formação das enzimas inibidoras da síntese desses metabólitos (Piret & Demain 1988).

Analisando a produção de armentomicina por *Streptomyces armentosus*, He et al. (1995) observaram que ela é influenciada pela concentração de amido presente no meio de cultura (diferentes relações carbono-nitrogênio). Furlan (1997), avaliando a produção do complexo rentamicina por *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5.622, observou também diferenças nas atividades antimicrobianas do complexo, de acordo com os diferentes meios de cultivo (MP, STL-5 e R5 Mod.). Também foi observado que o meio R5 Mod. apresentou melhor capacidade para a produção de moléculas bioativas com atividade antimicrobiana. Segundo a descrição de Furlan, os outros meios apresentam componentes não refinados e indefinidos, podendo conter impurezas que afetariam a produção. O ágar MPE, por exemplo, contém farinha de soja, um constituinte indefinido e não refinado que pode ter influenciado a não-produção de moléculas bioativas pelos isolados.

A atividade citotóxica foi determinada para os isolados *Actinoplanes* ACR 4, ACR 7 e ACR 23, que apresentaram as melhores atividades antimicrobianas (Tabela 2). Observou-se que os extratos secos produzidos não apresentaram atividade citotóxica nas concentrações analisadas: de 20.000 ppm a 0,125 ppm de extrato seco (Tabela 3).

A *Artemia salina* vem sendo empregada como modelo para a determinação da atividade citotóxica de diferentes materiais, dentre eles os extratos vegetais (Rojas de Arias et al. 1995, Jiménez et al. 2001) e os antineoplásicos (Badawey & Kappe 1997). Nos testes realizados com concentrações maiores que 20.000 ppm do extrato seco, comparado com o controle (etanol e DMSO), foi observado o efeito citotóxico sobre a *Artemia salina*.

Os resultados sugerem um potencial dos isolados de *Actinoplanes* ACR 4, ACR 7 e ACR 23 na produção de substâncias com atividade antimicrobiana, as quais posteriormente poderão ser utilizadas na terapêutica das infecções causadas por bactérias gram-positivas. Porém, testes em sistemas de cultivo de tecido deverão ser realizados para a confirmação ou não da baixa toxicidade dessas biomoléculas.

Tabela 3. Atividade citotóxica dos isolados

Isolados	Concentração Letal 50% (LC50) em ppm de extrato seco*
<i>Actinoplanes</i> sp ACR 4	> 20,000
<i>Actinoplanes</i> sp ACR 7	> 20,000
<i>Actinoplanes</i> sp ACR 23	> 20,000

*Experimento em triplicata

CONCLUSÕES

A metodologia de Palleroni (1980) foi eficiente para o isolamento de *Actinoplanes*. Dos isolados obtidos neste trabalho, três apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, sobretudo quando cultivados em ágar AC, e somente um deles (*Actinoplanes* ACR 7) apresentou essa atividade quando previamente cultivado em ágar MPE.

A baixa – ou nenhuma – citotoxicidade demonstrada nos extratos secos sugere que os isolados de *Actinoplanes* ACR 4, ACR 7 e ACR 23 são potenciais produtores de substâncias bioativas que podem ser empregadas na terapêutica antimicrobiana contra as bactérias gram-positivas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás pela oportunidade de realização deste trabalho.

ABSTRACT

Determination of antimicrobial activity of *Actinoplanes* isolated from the Cerrado soil and the cytotoxic effect of the ethanolic extract from the isolates

Actinomycetes are gram-positive bacteria which have the ability to form branching hyphae at some stage of their development. They are found in ground, waters and modified environments by man, being the main antimicrobial producers. The development of resistance for the microorganisms has demanded man to search for new molecules with antimicrobial activity. Aiming to isolate *Actinoplanes* (rare actinomycetes) with capacity to produce substances with antimicrobial activity and low cytotoxicity, samples of Cerrado soil were treated according to methodology described by Palleroni (1980). Six morphologically different species with characteristics of *Actinoplanes* were isolated (ACR 3, 4, 7, 13, 14, 23). The isolates were evaluated against 8 gram-positive bacteria, 8 gram-negative bacteria and 7 fungi. The best production of bioactive molecules was observed for *Actinoplanes* ACR 4, 7 and 23 with activity against gram-positive bacteria. There was no antimicrobial activity to fungi and gram-negative bacteria. It was observed that dry extract produced by isolated *Actinoplanes* ACR 4, 7 and 23, did not presented cytotoxic activity in the analyzed concentrations (20,000 ppm the 0,125 ppm of dry extract). The results suggest a potential of the isolates in the production of substances with antimicrobial activity, that could be used therapeutically in infections caused by gram-positive bacteria.

KEYWORDS: Antimicrobial activity. *Actinoplanes*. Cytotoxicity assay.

REFERÊNCIAS

1. Badawey S & Kappe T. Potential antineoplastics. Synthesis and cytotoxicity of certain 4-chloro-3-(chloroethyl)-2-methylquinolines and related derivatives. *Eur J Med Chem* 32: 815-822, 1997.
2. Blizzard TA, Ruby CL, Mrozik H, Preizer FA & Fisher MH. Brine Shrimp (*Artemia salina*) as a convenient bioassay for avermectin analogs. *J Antibiotics* 62: 1304-1307, 1989.
3. Connell ND. Expression systems for use in actinomycetes and related organisms. *Curr Opin Biotech* 12: 446-449, 2001.
4. Delle Monache F, Marini-Bettolo GB, Albuquerque IL, Lyra FDA & Lima OG. Sulle composizioni della rentamicina, un complesso antibiotico ed attività antitumorale prodotto da *Streptomyces olidensis*, ed. nov, sp. (DAUFPE 5622). *Ann Ist Super Sanità* 6: 357-364, 1970.
5. Espinel-Ingroff A & Pfaller MA. Antifungal agents and susceptibility testing. In: *Manual of Clinical Microbiology* 6th ed. Murray, P.R.; Baron, E.J.; Tenover, F.C. & Tenover, R.H. (eds.) ASM, 1995. p. 1405-1414.
6. Furlan RLA. *Obtenção e estudo de mutantes com a produção alterada do antibiótico Rentamicina sintetizado por "Streptomyces olidensis" DAUFPE 5622*. São Paulo [Tese de Mestrado em Microbiologia ICB/USP], 1997.
7. Goodfellow M, Williams ST & Mordarski M. Introduction to and importance of actinomycetes. In: *The Biology of the Actinomycetes*. Goodfellow, M.; Williams, S.T. & Mordarski, M. (eds.) Academic Press, 1983. p. 1-6.
8. He J-Y, Vining LC, White RL, Horton KL & Doull JL. Nutrients effects on growth and armentomycin production in cultures of *Streptomyces armentosus*. *Can J Microbiol* 41: 186-193, 1995.
9. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT & Williams ST. *Section 28 Actinoplanetes*. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 1st ed. Williams & Wilkins, Co., Baltimore, 1994. p. 2418-2450.
10. Jiménez G, Hasegawa M, Rodrigues M, Estrada O, Mendez J, Castilho A, Gonzalez-Mujica F, Mota N, Vasquez J & Romero-Vecchione E. Biological screening of plants of the Venezuelan Amazons. *J Ethnopharm* 77: 77-83, 2001.
11. Makkar NS & Cross T. Actinoplanetes in soil and on plant litter from freshwater habitats. *J Appl Bacteriol* 52: 209-218, 1982.
12. Melo IS & Sanhueza RMV. *Método de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos: manual técnico*. Embrapa-CNPMA Jaguariúna 1995.
13. Nolan RD & Cross T. Isolation and screening of *Actinomycetes*. In: *Actinomycetes in Biotechnology*. Goodfellow M, Williams ST & Mordarski M (eds) Academic Press, 1988. p. 1-32.
14. Omoto S, Shomura T, Suzuki K & Inouye S. Studies on *Actinomycetales* producing antibiotics only on agar culture. II. Isolation, structure and biological properties of N-carbamoyl-D-glucosamine (substance SF-1993). *J Antibiotics* 32: 436-441, 1979.
15. Palleroni NJ. Chemotaxis in Actinoplanes. *Arch Microbiol* 110: 13-18, 1976.
16. Palleroni NJ. A chemotactic method for the isolation of *Actinoplanaceae*. *Arch Microbiol* 128: 53-55, 1980.
17. Piret JM & Demain AL. Actinomycetes in biotechnology: a review. In: *Actinomycetes in Biotechnology*. Goodfellow M, Williams ST & Mordarski M (eds) Academic Press, 1988. p. 461-481.
18. Rojas de Arias A, Ferro E, Inchausti A, Ascurra M, Acosta N, Rodriguez E & Fournet A. Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan *Asteraceae*. *J Ethnopharm* 45: 35-41, 1995.

19. Sanglier JJ, Haag H, Huck TA & Fehr T. Novel bioactive compounds from *Actinomycetes*: a short review (1988-1992). *Res Microbiol* 144: 633-642, 1993a.
20. Sanglier JJ, Wellington EMH, Behal V, Fiedler HP, Elloouz-Ghordel R, Finance C, Hacene M, Kamoun A, Kelly C, Mercer DK, Princzis S & Trigo C. Novel bioactive compounds from *Actinomycetes*. *Res Microbiol* 144: 661-663, 1993b.
21. Shomura T, Yoshida J, Amano S, Inouye S & Niida T. Studies on *Actinomycetales* producing antibiotics only on agar culture. I. Screening, taxonomy and morphology-productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF-1993. *J Antibiotics* 32: 436-441, 1979.
22. Takahashi A, Kurasawa S, Ikeda D, Okami Y & Takeuchi T. Altemicidin, a new acaricidal and antitumor substance: I. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical and biological properties. *J. Antibiotics* 42: 1556-1561, 1989.
23. Woods & Washington. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: *Manual of Clinical Microbiology* 6th ed. Murray, P.R.; Baron, E.J.; Tenover, F.C. & Tenover, R.H. (eds.) ASM, 1995. p. 1327-1341.