

*Algerian Journal of
Nutrition and Food Sciences
(AJNFS)*

ISSN: 2773-4366

Journal homepage: fac.umc.edu.dz/inataa/revue/

Recherche d'activités antifongiques dans les rhizosphères de palmiers dattiers affectés par le *Bayoud*

Boughachiche F., Khider H., Messaadia F., Zerizer H., Rachedi K., Bahri F.

Published online: November 9, 2021.

To cite this article: Boughachiche, F., Khider, H., Messaadia, F., Zerizer, H., Rachedi, K., Bahri, F. 2021. Preparation of summer squash powder (*Cucurbita pepo*) and winter squash powder (*Cucurbita maxima*) dehydrated and its use in soup preparation. *Algerian Journal of Nutrition and Food Sciences*, 1(3), 17–21

To link to this article: <https://fac.umc.edu.dz/inataa/revue/files/ajnfs0103003.pdf>

Recherche d'activités antifongiques dans les rhizosphères de palmiers dattiers affectés par le Bayoud

Boughachiche F.^{1*}, Khider H.¹, Messaadia F.¹, Zerizer H.¹, Rachedi K.¹, Bahri F.¹

¹ Laboratoire Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), INATAA, UFMCI (Algérie)

Received September 24, 2021 Accepted October 10, 2021 Available online November 9, 2021

Abstract The aim of this work is the search of antifungal substances from Actinobacteria strains isolated from date palm (*Phoenix dactylifera*) rhizosphere affected by Bayoud disease in the region of Ghardaïa desert (South-East of Algeria). Bayoud, the date palm vascular wilt, is caused by *Fusarium oxysporum* pathogen occurring in the date palm growing areas of Algeria and Morocco. In the last century it caused the loss of a considerable number of trees of the best cultivars and has aggravated the phenomenon of desertification. In this context, eight Actinobacteria strains and seven filamentous fungi were isolated from three soil samples and were purified and identified according to macromorphological and micromorphological characteristics. The antifungal activities of Actinobacteria isolates were tested against the seven filamentous fungi strains using Agar cylinder technique. All Actinobacteria showed an antibiotic activity against at least one fungi strain, especially against *Aspergillus sp.*, *Chrysosporium sp.* and *Fusarium sp.* These results are very promising in the discovery of new antifungal substances particularly against *Fusarium sp.*: the causal agent of the Bayoud.

Keywords Actinobacteria, antifungal, rhizosphere, Bayoud, fungi

Résumé Ce travail a pour but la mise en évidence de la production de molécules antifongiques par des souches d'actinobactéries isolées à partir de rhizosphères de palmiers dattiers (*Phoenix dactylifera*) affectés par le Bayoud, dans la région saharienne de Ghardaïa (Sud-Est algérien). Cette fusariose vasculaire du palmier dattier causée par un champignon tellurique *Fusarium oxysporum* a affecté, depuis plus de cent ans, les meilleures variétés productrices de dattes en Algérie et au Maroc et a aggravé le phénomène de désertification. A partir de trois échantillons de sols, huit souches d'actinobactéries et sept souches de moisissures ont été isolées, purifiées et identifiées en se basant sur les caractères macromorphologiques et micromorphologiques. La recherche de l'activité antifongique des actinobactéries est réalisée par la technique des cylindres d'Agar contre les sept souches de moisissures isolées. Les résultats montrent que toutes les souches sont actives contre au moins un champignon-test, en particulier : *Aspergillus sp.*, *Chrysosporium sp.* et *Fusarium sp.* Ces résultats prometteurs permettront, en perspectives, la sélection de nouveaux antifongiques actifs spécialement contre le *Fusarium spp.* dont l'espèce *F. oxysporum* est responsable de la fusariose ce qui contribuera à la lutte contre cette maladie.

Mots clés Actinobactérie, antifongique, rhizosphère, Bayoud, champignons

Introduction

Le sol héberge une grande diversité de communautés microbiennes qui, dans la rhizosphère, interagissent avec les racines des plantes (Alabouvette et Cordier, 2018). Nous y trouvons fréquemment les actinobactéries qui peuvent atteindre 10^7 unités par gramme de sol. Nombre d'entre eux ont un rôle très important dans le secteur pharmaceutique par la production de substances intéressantes telles que les antibiotiques, les enzymes, les vitamines et les substances antihistaminiques (Rangseekaew et Pathom-aree, 2019).

Dans la rhizosphère, les actinobactéries présentent souvent un antagonisme vis-à-vis des bactéries et des champignons voisins ; cet antagonisme se manifeste par la sécrétion de substances antibiotiques (Dommergues et Mangenot, 1970). C'est sur ce phénomène naturel que se base notre étude qui porte sur des échantillons prélevés à partir de la rhizosphère de palmiers dattiers de la wilaya de Ghardaïa (Sud-Est algérien) affecté par la maladie du Bayoud (fusariose) afin d'isoler des actinobactéries à activité antifongique et particulièrement anti-fusariose.

Il s'agit, donc, dans un premier temps d'isoler des souches d'actinobactéries et de champignons du même écosystème ; de les purifier, de les identifier et de les conserver. Dans un second temps, de mettre en évidence les activités antagonistes (antifongiques) vis-à-vis des souches de champignons isolées.

* Corresponding author:
Boughachiche Faiza
Email address: faizasasi@yahoo.fr
INATAA, UFMCI
7° Km Route de Sétif, RN 5, 25000 Constantine (Algeria)

Matériel et méthodes

Site d'échantillonnage

Trois échantillons de rhizosphères de palmiers dattiers situés dans la commune de Daia (32° 32' 13" Nord, 3° 36' 20" Est) ont été prélevés :

- E1 : palmier totalement détruit par la fusariose ;
- E2 : palmier sain affecté durant trois ans par la fusariose et rétabli sans aucun traitement ;
- E3 : palmier dont les premiers symptômes de la maladie commencent à apparaître.

Prélèvement

Les trois à cinq centimètres de sol sont écartés et 100 à 200 g de sol sont prélevés à partir de la couche située entre 5 à 20 cm de profondeur des rhizosphères des trois palmiers. Les échantillons sont transportés au laboratoire, où ils subissent un prétraitement d'une heure à 50 °C (Takizawa *et al.*, 1993) après mesure du pH (Pochon, 1964).

Isolement des actinobactéries

Des séries de dilutions décimales (de 10⁻¹ à 10⁻⁶) sont effectuées, dans de l'eau physiologique, à partir des suspensions préparées selon la technique de Finance *et al.* (1985). Chaque dilution sert à ensemercer, à raison de 1 mL par dilution par boîte de Pétri, deux milieux de culture différents :

Milieu AC : Agar (18 g/L, amidon (10 g/L), KNO₃ (2 g/L), K₂HPO₄ (2 g/L), NaCl (2 g/L), caséine (0,3 g/L), MgSO₄. 7H₂O (0,05 g/L), CaCO₃ (0,02 g/L), FeSO₄. 7H₂O (0,01 g/L).

Milieu M3 : Agar (18 g/L), propionate de sodium (0,2 g/L), Na₂HPO₄ (0,732 g/L), KNO₃ (0,1 g/L), KH₂PO₄ (0,466 g/L), NaCl (0,29 g/L), MnSO₄. 4H₂O (20 mg/L), MgSO₄. 7H₂O (0,1 g/L), CaCO₃ (0,02 g/L), FeSO₄. 7H₂O (200 mg/L), ZnSO₄. 7H₂O (180 mg/L).

Chaque milieu est additionné d'amphotéricine B à une concentration de 50 µg/mL et d'acide nalidixique à une concentration de 10 µg/ml pour limiter la prolifération des contaminants (Boughachiche *et al.*, 2005).

Les boîtes sont observées quotidiennement après une semaine, jusqu'à un mois d'incubation à 28 °C. Toutes les colonies se rapprochant par leur aspect macroscopique aux actinobactéries, sont observées au microscope à l'état frais et après coloration de Gram. Leurs caractères culturels sont notés après 14 jours d'incubation.

Celles appartenant au groupe des actinobactéries sont ensemercées par stries sur les mêmes milieux que ceux d'isolement et cette opération est répétée jusqu'à obtention de souches pures. Les isolats sont ensuite conservés à 4 °C sur gélose inclinée ou congelées à -20 °C dans des bouillons additionnés de 15 % (V/V) de glycérol stérile.

Isolement et identification des champignons

Les mêmes dilutions sont utilisées pour ensemercer le milieu Sabouraud additionné de gentamicine à raison de 1 mL par dilution par boîte de Pétri. Après incubation à 28 °C, la purification est réalisée selon la méthode de Patrache (Botton *et al.*, 1985) qui consiste à prélever un fragment de gélose de chaque souche et de le mettre au centre d'une nouvelle boîte du milieu Sabouraud. Après purification, les souches fongiques sont conservées aux deux températures 4 °C et -20 °C.

Les souches isolées sont identifiées, au niveau du genre, en se basant sur les caractères macromorphologiques et sur les observations microscopiques après fixation au lactophénol.

Mise en évidence des activités antifongiques

La production de métabolites antifongiques est mise en évidence par la technique des cylindres d'Agar qui se réalise en deux étapes :

La première consiste à ensemercer en stries serrées les souches d'actinobactéries sur quatre milieux de production différents et sont incubées à 28 °C pendant 14 jours, la composition des milieux est la suivante :

Milieu AF : Agar (15 g/L, extrait de malt (10 g/L), extrait de levure (10 g/L), glucose (2 g/L), CaCO₃ (1 g/L) ;

Milieu Synthétique : Agar (18 g/L), amidon (40g/L), asparagine (1,5 g/L), K₂HPO₄ (0,75 g/L), CaCO₃ (3g/L), MgSO₄. 7H₂O (0,5g/L), FeSO₄ (10⁻⁴ M), MnSO₄. 7H₂O (10⁻⁶ M), ZnSO₄. 5H₂O (10⁻³ M), CuSO₄. 5H₂O (10⁻⁵ M) ;

Milieu Bennett : Agar (15 g/L), glucose (10 g/L), peptone (2 g/L), extrait de levure (2 g/L), extrait de viande (1 g/L) ;

Milieu GBA : Agar (15 g/L), glycérol (20 g/L), peptone (10 g/L), amidon (20 g/L), extrait de viande (5 g/L), CaCO₃ (3 g/L).

Dans la deuxième étape, des cylindres d'Agar de 6mm de diamètre des cultures d'actinobactéries sont prélevés et sont déposés sur milieu Sabouraud gélosé préalablement ensemercé avec un champignon-test. Les boîtes sont placées à 4 °C pendant deux heures, pour permettre une prédiffusion des molécules bioactives puis sont incubées 3 jours à 28 °C.

Résultats et discussion

Isolement des actinobactéries

Le pH des trois échantillons est proche de la neutralité (E1 : 7,22 - E2 : 7,52 - E3 : 7,57) ce qui a favorisé la prolifération des actinobactéries. Les colonies apparues sur les deux milieux d'isolement, sont regroupées en huit types (numérotées de A1 à A8) d'après leur aspect macroscopique et microscopique (tableau 1).

Ces résultats montrent la diversité des rhizosphères du sol saharien en actinobactéries ce qui corrobore

Tableau 1. Aspect macroscopique des actinobactéries après 14 jours d'incubation

Code de la souche	Echantillon	Aspect de la colonie	Revers de la boîte
A1	E1	-Taille : 7mm -Couleur : grise -Contour : irrégulier -Pas de fissures -Sèche, bombée -Incrustée dans la gélose	Marron foncé avec périphérie claire
A2	E1	-Taille : 5mm -Couleur : blanche -Contour : régulier -Présence de fissures -Bombée -Incrustée dans la gélose	Jaune
A3	E2	-Taille : 6mm -Couleur : grise -Contour : irrégulier -Ridée -Sèche, bombée -Incrustée dans la gélose -granuleuse	Gris
A4	E2	-Taille : 6mm -Couleur : rose qui devient grise après sporulation -Contour : irrégulier -Pas de fissures -Bombée -Incrustée dans la gélose	Grenat
A5	E2	-Taille : 5mm -Couleur : grise claire -Contour : régulier -Pas de fissures -Ronde, bombée -Incrustée dans la gélose -perforée	Marron clair
A6	E2	-Taille : 6mm -Couleur : grise blanche -Contour : régulier -Pas de fissures -perforée -Incrustée dans la gélose	Marron foncé
A7	E3	-Taille : 7mm -Couleur : brune -Contour : irrégulier -Peu de fissures -Sèche, bombée -Incrustée dans la gélose	Grenat
A8	E3	-Taille : 11mm -Couleur : orangée claire -Contour : régulier -Fissures abondantes -Sèche, bombée -Incrustée dans la gélose	Orange

les résultats de Dommergues et Mangenot (1970), Iwai et Takashi (1992), Madigan (1997), Lamari *et al.* (2015). La fréquence d'isolement des actinobactéries sur le milieu AC additionné d'antibiotiques est plus élevée que celle obtenue sur le milieu M3 additionné des mêmes antibiotiques. Cette performance s'expliquerait par la présence, dans ce milieu, de deux substrats (amidon et caséine), qui stimulent la croissance des actinobactéries préférentiellement aux autres bactéries, favorisant ainsi leur récupération à partir des milieux naturels. L'efficacité de ce milieu d'isolement a été signalée par d'autres auteurs comme Hagedorn (1976), Mackey (1977), Suzuki *et al.* (1999) et Boughachiche *et al.* (2005).

Isolement des moisissures

A partir des trois échantillons utilisés dans cette étude, sept types de colonies de moisissures présentant des caractères culturels différents (tableau 2) sont prélevées du milieu Sabouraud, elles sont numérotées de C1 à C7 puis repiquées sur le même milieu d'isolement. Il est important de signaler l'efficacité de l'antibiotique (gentamicine) additionné au milieu d'isolement dans l'élimination des contaminants bactériens, en effet, l'absence totale des colonies bactériennes a été constatée dans la majorité des boîtes, ce qui nous a facilité la récupération des colonies fongiques.

Identification des souches fongiques

Les souches fongiques isolées et purifiées ont été identifiées en se basant sur les caractères macroscopiques et microscopiques. Chaque souche a été rapprochée à un genre selon les recommandations de Botton *et al.* (1985). La souche C7, dont les caractères macroscopiques ne correspondent à aucun genre, n'a pas pu être identifiée et nécessite investigations complémentaires.

Souche C1 :

- Phialides groupées sur une ramification ;
 - Chlamydozoïdes présentes dans le mycélium et dans les conidies ;
 - Conidies fusiformes, courbées, pointues aux deux extrémités, 3 à 5, septés ;
- Genre : *Fusarium*

Souche C2 :

- Thalle cloisonné ;
- Conidiophores noirs, souvent en masse, cloisonnés longitudinalement et transversalement ;

Tableau 2. Aspect macroscopique des champignons après une semaine d'incubation

Code de la souche	Echantillon	Mycélium aérien	Mycélium de substrat	Caractéristique de la colonie	Surface	Pigments diffusibles
C1	E1	Blanchâtre	Jaune	Floconneuse	Plane et uniforme	Absence
C2	E1	Vert foncé	Vert foncé	Floconneuse	Plane et uniforme avec stries	Absence
C3	E1	Noir	Marron foncé	Poudreuse	Plane striée	Absence
C4	E2	Blanchâtre puis vire au violet	Marron	Floconneuse	Largement concave	Marron
C5	E3	Blanchâtre	Jaune clair	Floconneuse	Plane avec stries	Absence
C6	E3	Blanc plâtre	Jaune clair	Floconneuse	Plane et uniforme	Absence
C7	E3	Vert	Grenat avec centre noir	Duveteuse	Plane	Grenat

Tableau 3. Test d'activité antifongique *in vitro*

Souches d'actinobactéries	Diamètres d'inhibition (en mm) contre :						
	C1 <i>Fusarium</i>	C2 <i>Alternaria</i>	C3 <i>Aspergillus</i>	C4 <i>Fusarium</i>	C5 <i>Chrysosporium</i>	C6 <i>Trichothecium</i>	C7 -
A1	16 (Ben)	-	4 (GBA)	-	4 (Syn)	-	-
A2	8 (Ben)	-	6 (GBA)	-	6 (Syn)	-	-
A3	12 (Syn)	6 (Syn)	-	-	-	-	6 (Syn)
A4	4 (Syn)	6 (Ben)	-	-	-	-	-
A5	-	4 (AF) 4 (Ben)	-	-	-	-	-
A6	-	6 (AF) 4 (Ben)	-	-	-	-	-
A7	-	12 (Syn)	-	-	-	-	6 (Ben)
A8	-	12 (Syn)	-	-	-	-	-

(Ben : milieu Bennett, Syn : milieu Synthétique)

- Conidies bourgeonnées à travers un ou plusieurs pores de la paroi ;

→ Genre : *Alternaria*

Souche C3 :

- Thalle à mycélium cloisonné, non ramifié ;
- Tête conidienne globuleuse de couleur noire brunâtre à noire ;
- Conidies en chaînes divergentes associées en colonies, hyaline ou pigmenté

→ Genre : *Aspergillus*

Souche C4 :

- Conidiophores très ramifiés ;
- Phialides plus ou moins allongées ;
- Conidies fusiformes incurvées, atténuées aux deux extrémités ;

→ Genre : *Fusarium*

Souche C5 :

- Thalle à mycélium étroit ;
- Spores hyalines, lisses, globuleuses, à croissance lente ;

→ Genre : *Chrysosporium*

Souche C6 :

- Conidiophores dressés, non ramifiés, terminés par des conidies plus ou moins courtes ;
- Conidies bicellulaires, tronquées obliquement à la base, hyalines et lisses ;

→ Genre : *Trichothecium*

Souche C7 :

- Mycélium septé et ramifié ;
- Conidies solitaires de forme ovoïde ;

→ Le genre de cette souche reste inconnu (n'existe pas dans la base de données)

La présence de deux souches de *Fusarium sp.* est constatée dans les échantillons E1 (sol de la rhizosphère du palmier totalement détruit par la fusariose) et E2 (sol de la rhizosphère du palmier rétabli de la fusariose sans aucun traitement). Ces deux souches sont, probablement, responsables de la fusariose des deux palmiers dattiers. L'étude d'antagonisme d'actinobactéries contre ces deux souches et les autres champignons présents dans la même rhizosphère serait d'une grande

importance pour la recherche de molécules antifongiques à activité anti-fusariose ou autre.

Mise en évidence des activités antifongiques

Les résultats du test de la production des métabolites antifongiques sont réunis dans le tableau 3. La technique des cylindres d'agar (figure 1) a permis la mise en évidence d'activités contre au moins un champignons-test, cette technique a déjà prouvé son efficacité dans des travaux antérieurs comme ceux de Boughachiche *et al.* (2012). Cependant, l'apparition et les valeurs des zones d'inhibition diffèrent d'un milieu de culture à un autre et varient, sur le même milieu de culture, d'un champignon-test à un autre. En effet, les milieux « Bennett » ou « Synthétique » semblent favoriser la production de métabolites antifongiques chez toutes les souches d'actinobactéries.

La variabilité des zones d'inhibition constatée, est probablement le reflet de l'existence de souches ayant des potentialités différentes de production d'antibiotiques. En effet, les souches d'actinobactéries actives pourraient être dotées d'une part, d'un potentiel génétique d'antibiotiques différent d'une souche à une autre et d'autre part, d'un métabolisme d'assimilation variable des différents composants des quatre milieux de culture utilisés, ce qui peut expliquer l'absence totale d'activité contre certaines souches fongiques comme les souches C4 et C6 (Bushell, 1988; Hobbs *et al.*, 1989; Tanaka, 1992; Marwick *et al.*, 1999; Boughachiche *et al.*, 2012).

Les souches d'actinobactéries les plus actives sont A1, A2 et A3 qui inhibent la croissance de trois champignons-tests : *Fusarium sp.* (C1), *Aspergillus sp.* (C3) et *Chrysosporium sp.* (C5). Elles semblent être dotées d'un large spectre d'action par rapport aux cinq

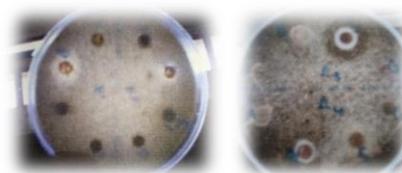


Figure 1. Zones d'inhibition des isolats d'actinobactéries contre *Fusarium sp.* (à gauche) et *Alternaria sp.* (à droite)

autres actinobactéries qui sont actives contre un ou deux champignons-tests. Les souches A7 et A8 présentent également, des zones d'inhibition très importantes vis-à-vis d'*Alternaria* sp. (C2).

Conclusion

La recherche et la sélection de nouveaux micro-organismes producteurs d'antimicrobiens est actuellement faite à grande échelle par des laboratoires de recherche spécialisés.

Un essai d'isolement d'actinobactéries (micro-organismes à importance capitale dans la production d'antifongiques) à partir des rhizosphères de palmiers dattiers sahariens affectés par la fusariose, a été réalisé. Ainsi, huit souches d'actinobactéries ont été isolées, purifiées et pré-identifiées en utilisant deux milieux sélectifs. Ce criblage primaire est suivi par la recherche d'antifongiques produits par ces souches contre les sept souches de moisissures isolées à partir du même écosystème. Ces tests ont démontré une activité d'actinobactéries contre les genres : *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *Chrysosporium*. Cependant, pour valoriser ces travaux, il est nécessaire de les poursuivre par l'identification moléculaire des souches isolées ainsi que par l'extraction, la purification et la caractérisation des molécules bioactives essentiellement celles à activité anti-fusariose.

Références bibliographiques

- Alabouvette, C., Cordier, C. 2018. Fertilité biologique des sols : des microorganismes utiles à la croissance des plantes. *Innovations Agronomiques*, 69, 61–70.
- Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Guy, P.H., Larpent, J.P., Veu, P. 1985. Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. Masson. Paris. 93–159.
- Boughachiche, F., Reghioua, S., Zerizer, H., Oulmi, L., Boudemagh, A., Kitouni, M., Boulahrouf, A. 2005. Isolement d'Actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la Sebkhia de Ain Mlila. *Sciences et Technologie*, 23, 5–10.
- Boughachiche, F., Reghioua, S., Zerizer, H., Boulahrouf, A. 2012. Activité antibactérienne d'espèces rares de *Streptomyces* contre des isolats cliniques multirésistants. *Annales de Biologie Clinique*, 70 (2), 169–174.
- Bushell, M.E. 1988. Growth, product formation and fermentation technology. In: *Actinomycetes in Biotechnology*. Academic Press. London. 185–217.
- Dommergues, Y., Mangenot, F. 1970. Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie. Paris. 796–297.
- Finance, C., Ouhdouch, Y., Jacks, A., Bonaly R. 1985. Nouvelles substances à action antifongique produites par des souches d'actinomycetales isolées à partir des milieux naturels. *Ann. Biol. Clin.*, 2, 652–653.
- Hagedorn, C. 1976. Influences of soil acidity on *Streptomyces* populations inhabiting forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32, 368–375.
- Hobbs, G., Frazer, C.M., Gardner D.C.J., Cullum, J.A., Oliver, S.G. 1989. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 272–277.
- Iwai, Y., Takashi, Y. 1992. Selection of microbial sources of bioactive compounds. In: *The search for bioactive compounds from microorganisms*. Springer-Verlag. New York. 281–302.
- Lamari, L., Boudjella H., Bouras, N., Sabaou N. 2015. Etude comparative des actinobactéries de la rhizosphère de deux cultivars de palmier dattier sensible et résistant au Bayoud. *Algerian journal of arid environment*, 5(1), 3–17.
- Mackey, S.J. 1977. Improved enumeration of *Streptomyces* spp. on starch casein salt medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 227–230.
- Madigan, M.T. 1997. Biology of micro-organisms. Bsock. 731–740.
- Marwick, J.D., Wright, P.C., Burgess, J.G. 1999. Bioprocess intensification for production of novel marine bacterial antibiotics through bioreactor operation and design. *Mar. Biotechnol.*, 1, 495–507.
- Pochon, J. 1964. Manuel technique d'analyse microbiologique. Masson et Cie. Paris. 5–20.
- Rangseekaew, P., Pathom-aree, W. 2019. Cave Actinobacteria as producers of bioactive metabolites. *Front. Microbiol.*, 10, 1–11.
- Suzuki, S.I., Okuda, T. and Komatsubara S., 1999. Selective isolation and distribution of *Sporichthya* strains in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1930–1935.
- Takizawa, M., Colwell, R.R., Hill, R.T. 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 997–1002.
- Tanaka, Y. 1992. Fermentation processes in screening for new bioactive substances. In: *The search for bioactive compounds from microorganisms*. Springer-Verlag. New York. 303–325.