

Artículo original

Enzimas hidrolíticas (DNAses, lipases e proteases) secretadas por *Cladosporium cladosporioides* aislado de solo e seu potencial de aplicación en biotecnología

María Beatriz Riverón Acosta^{a,*}, Daniel Casartelli de Santa Inez^a, Lucas Fujiwara Balieiro^a, Emy Tiyo Mano^b, Luiziana Ferreira da Silva^b

^aCentro de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Microbiologia, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, Brasil.

^bDepartamento de Microbiologia, Laboratório de Bioprodutos, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Recibido 11 de septiembre de 2017; aceptado 15 de noviembre de 2017

Resumo: Os microrganismos habitam todos os tipos de solos e apresentam uma enorme diversidade metabólica o que os faz uma importante fonte de bioprodutos, dentre eles, as enzimas. O objetivo deste trabalho foi isolar pelo menos um microrganismo capaz de secretar as enzimas hidrolíticas lipases, proteases e com ênfase DNAses, a partir de uma amostra de terra de jardim e usá-las como fonte produtora destas enzimas, para a formulação de um detergente. Foi encontrado o fungo filamentososo, denominado inicialmente F6, produtor de tais enzimas. Estudos com os extratos de cada enzima sobre seus substratos (azeite de oliva, caseína e DNA extraído de diferentes organismos) mostraram forte atividade a 30 °C e pH 7,5, e estabilidade quando estocados sob refrigeração a 8 °C por dois meses. O fungo F6 foi identificado como *Cladosporium cladosporioides* por morfologia observada à microscopia óptica e por sequenciamento da região ITS pelo método de Sanger. A importância deste achado inédito é o fato de obter as enzimas de interesse a partir de um mesmo microrganismo, o que facilita e economiza condições de cultivo, temperatura de incubação e teor de aeração, dentre outros, para desenvolver no futuro um detergente enzimático.

Palavras chave: solo, DNase, lipases, proteases, *Cladosporium cladosporioides*.

Secreción de enzimas hidrolíticas (DNAsas, lipasas y proteasas) por *Cladosporium cladosporioides* aislado de suelo y su potencial aplicación en biotecnología

Resumen: Los microorganismos habitan todos los tipos de suelos y presentan una enorme diversidad metabólica, lo que los hace una fuente importante de bioproductos, entre ellos, las enzimas. El objetivo de este trabajo fue aislar al menos un microorganismo secretor de enzimas hidrolíticas (lipasas, proteasas, con énfasis en ADNAsas), a partir de una muestra de tierra de jardín, y usarlo como fuente productora de enzimas para la formulación de un detergente. Se encontró un hongo filamentososo, denominado inicialmente F6, productor de tales enzimas. Los estudios con los extractos de cada enzima sobre sus sustratos (aceite de oliva, caseína y ADN extraído de diferentes organismos) mostraron fuerte actividad a 30 °C y pH 7,5, así como estabilidad cuando se almacenaron bajo refrigeración a 8 °C durante dos meses. El hongo F6 fue identificado como *Cladosporium cladosporioides* por su morfología en microscopía óptica y por secuenciación de la región ITS por el método de Sanger. La importancia de este hallazgo inédito es el hecho de obtener las enzimas de interés a partir de un mismo microorganismo, lo que facilita y ahorra condiciones de cultivo, temperatura de incubación y contenido de aireación, entre otros, para desarrollar en el futuro un detergente enzimático.

Palabras clave: suelo, ADNasa, lipasas, proteasas, *Cladosporium cladosporioides*.

Hydrolytic enzymes (DNAses, lipases and proteases) secreted by *Cladosporium cladosporioides* isolated from soil and its potential application in biotechnology

Abstract: Microorganisms inhabit all types of soils and present an enormous metabolic diversity, which makes them an important source of bioproducts, among them, the enzymes. The objective of this work was to isolate from a sample of garden soil, at least one microorganism able to produce hydrolytic enzymes (lipases, proteases and with emphasis DNAses) and use it as a source of enzymes for the formulation of a detergent. A filamentous fungus was found, initially named F6, which produced such enzymes. Studies with extracts of each enzyme on their

substrates (olive oil, casein and DNA extracted from different organisms) showed strong activity at 30 °C and pH 7.5, and stability when stored under refrigeration at 8 °C during two months. The F6 fungus by optical microscopic morphology was identified as *Cladosporium cladosporioides* and by sequencing the ITS region by the Sanger method. The importance of this unprecedented finding is the fact of obtaining the enzymes of interest from the same microorganism, which facilitates and saves culture conditions, incubation temperature and aeration content, among others, to develop an enzymatic detergent in the future.

Keywords: soil, DNase, lipases, proteases, *Cladosporium cladosporioides*.

* Correspondencia:

E-mail: briveron@uol.com.br

Introdução

O solo é um sistema biológico complexo e dinâmico, sendo encontrado nele todos os tipos de microrganismos, a maioria deles, auxiliando na fertilidade e protegendo-o da degradação, sendo também responsável por propriedades físico-químicas como pH, conteúdo de carbono, oligoelementos entre outros [1].

Os fungos constituem uma importante fonte natural de produtos com potencial enorme para a obtenção de novos compostos de uso em farmacologia e aplicações agrícolas e industriais. Junto com as bactérias, apresentam uma grande diversidade metabólica embora, sobre tudo nos fungos, ainda não muito explorada nem compreendida [1]. No entanto, pesquisas realizadas com *Cladosporium cladosporioides* revelaram a síntese de compostos bioativos como ácido p-metilbenzoico, peróxido de ergosterol e calfofina C, assim como enzimas incluindo pectinametilesterase, poligalacturonase e clorpirifohidrolase [2].

O gênero *Cladosporium* caracteriza-se pela ausência de fase reprodutiva sexual, sendo classificado como fungo imperfeito (Deuteromycota). Este gênero pertence ao filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, família *Mycosphaerellaceae* e contém aproximadamente 500 espécies [3-4].

As espécies de *Cladosporium* são encontradas em ambientes externos ou internos aeróbios se desenvolvendo em substratos orgânicos, sendo às vezes considerados importantes contaminantes de alimentos [5-6]. Este fungo pode utilizar diferentes substratos para seu desenvolvimento tais como madeira, matéria orgânica em decomposição, frutas maduras e tecidos têxteis [7]. Algumas espécies de *Cladosporium* têm sido associadas a certas doenças de peixes [8]. As espécies isoladas mais comumente são *C. sphaerospermum*, *C. cladosporioides*, *C. herbarum* e *C. elatum* [3].

Em contraste, algumas espécies de *Cladosporium* são capazes de produzir metabólitos secundários tais como antibióticos que inibem *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* [8], e outras espécies são excelentes inseticidas biológicos (entomopatogênicos) particularmente contra insetos que já desenvolveram resistência a inseticidas químicos [9].

A atividade bioquímica total do solo compreende uma série de reações químicas catalizadas por enzimas. Estas podem ser intracelulares (do interior de organismos vivos ou mortos) ou extracelulares, que por sua vez podem estar

em estado livre ou ligadas as colóides do solo. Os processos de decomposição por microrganismos do solo, como a degradação de polímeros (Exemplo: lignina e celulose), envolvem exoenzimas mesmo que nos estágios finais participem enzimas intracelulares. Por exemplo, o complexo celulase é ainda parcialmente compreendido, embora avanços rápidos estejam sendo obtidos. Atualmente é reconhecido pela tecnologia o potencial dos microrganismos na decomposição, de modo que cada vez mais se investiga sobre o assunto, além da ação dos microrganismos sobre os ciclos de nitrogênio e fósforo, sua participação na regulação de micronutrientes tais como íons ferro, cobre, zinco, potássio, cálcio, magnésio e seus papéis na biorremediação [10-12]. Toda a exuberância metabólica que apresentam os microrganismos é devida em grande parte às enzimas.

Este trabalho teve como objetivo isolar pelo menos um microrganismo de solo capaz de secretar conjuntamente as enzimas hidrolíticas lipase, protease e com ênfase DNases, visando em um futuro muito próximo, o desenvolvimento de um detergente enzimático.

Materiais e métodos

Isolamento de microrganismos de solo e condições de cultivo: Um grama de terra comercializada para plantas ornamentais foi suspenso em 99 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%) e submetido a agitação (120 rpm) durante uma hora. A suspensão obtida foi diluída em solução salina até 10⁻⁵. Uma alíquota de 100 µL foi inoculada em várias placas de Petri contendo meio Luria Bertani (LB, de composição: extrato de levedura 0,5%; triptona 1,0%; cloreto de sódio 1% e ágar 1,5%), espalhando-a com alça de Drigalski. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por uma semana [1]. Após este período, 10 colônias escolhidas ao acaso foram transferidas com agulha estéril para placas de Petri contendo: Agar DNase (Neogen®) para teste de secreção de DNases; meio sintético (fosfato biácido de potássio 0,3%; fosfato monoácido de potássio 0,7%; sulfato de magnésio heptahidratado 0,01%; citrato de sódio 0,05%; sulfato de amônia 0,1% e ágar 1,5%) [13] adicionado de glicose 0,4%, azeite de oliva (1%) e Tween 20 (0,25%) para teste de secreção de lipases [14] e meio sintético adicionado de glicose 0,4% e caseína 1% para verificar secreção de proteases [15]. Também todas as colônias foram inoculadas em placas de Petri contendo Agar LB (placa "Matriz"). As placas ficaram a temperatura ambiente durante uma semana. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Verificação da atividade enzimática das colônias de microrganismos escolhidas aleatoriamente: Para verificar secreção de DNases, adicionou-se HCl 1 M às placas contendo microrganismos desenvolvidos em Agar DNase e aguardou-se 10 minutos, de acordo com recomendações do fabricante de agar. Para detectar produção de lipases, foi acrescentado Rhodamina B 0,001% (m/v) sobre as colônias desenvolvidas em meio sintético contendo azeite de oliva (1%) e Tween 20 (0,25%); após um período de 20 minutos, observou-se sob radiação ultravioleta em comprimento de onda 320 nm [14]. A secreção de proteases foi observada cobrindo-se a superfície da cultura com ácido acético (5%) [15].

Reações enzimáticas a partir do microrganismo selecionado: O microrganismo, inicialmente denominado como F6, apresentou-se como produtor de DNases, lipases e proteases. A partir da placa “matriz”, fragmentos de colônias de aproximadamente 3 mm do microrganismo F6, retirados com alça microbiológica estéril, foram semeados em 25 mL dos seguintes meios de cultivo: caldo DNase; meio sintético adicionado de glicose (0,4%), azeite de oliva (1%) e Tween 20 (0,25%); e meio sintético contendo glicose (0,4%) e caseína (1%), para posteriormente testes de secreção de DNases, lipases e proteases respectivamente. As culturas foram incubadas sob agitação (130 rpm) a 28 °C durante uma semana. Depois, foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm para retirada das células e os sobrenadantes submetidos a liofilização. As massas secas foram suspensas em 3 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,5 e as suspensões filtradas a vácuo (tamanho de poro 0,22 µm). Nestes filtrados dosou-se proteínas totais usando o kit Pierce BCA Protein Assay® (ThermoFisher Scientific) de acordo com instruções do fabricante.

As reações enzimáticas (misturas de reação) realizaram-se em placas de diluição de ELISA. Para o teste de atividade de DNases, colocou-se em 4 orifícios 1 mL de caldo DNase (contendo DNA), e 1 mL de solução aquosa de DNA, previamente extraído usando-se DNazol® (Invitrogen) de acordo com as indicações do fabricante, dos microrganismos *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e de folhas da planta *Saintpaulia* sp. (Violeta africana, de concentração entre 1,7 e 2 mg/mL, de acordo com absorbância a $\lambda = 280$ nm determinada em espectrofotômetro), 100 µL de filtrado (3,5 mg/mL de proteína total) e tampão fosfato 0,1 M pH 7,5 qsp até completar 2 mL. Os controles negativos, sem filtrado, continham 1 mL de solução aquosa de DNA e tampão, para volume total 2 mL. Após incubação por 2 horas a 30 °C, foi adicionado a cada mistura de reação 5 a 6 gotas de HCl 1 M.

Para verificar atividade de lipases, colocou-se em orifícios 1 mL de aceite de oliva, 2 gotas de Tween 20, 100 µL de filtrado (2,1 mg/mL de proteína total) e 2 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,5. O controle negativo não continha filtrado. Após incubação por 2 horas a 30 °C procedeu-se à titulação com NaOH 50 mM usando-se como indicador fenoltaleína [15].

Para comprovar atividade de protease, colocou-se 1 mL de solução de caseína (1%), 100 µL de filtrado (2,8 mg/mL de proteína total) e 2 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,5. O controle negativo não continha filtrado e as misturas de reação foram incubadas a 30 °C por 2 horas. A continuação adicionou-se entre 10 e 12 gotas de ácido acético (5%) [15]. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Identificação do microrganismo F6:

- Estudo morfológico. O estudo morfológico foi realizado utilizando microscopia óptica e usando-se azul de metileno como corante.

- Reação de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) e sequenciamento. Para extração do DNA para reação de PCR, utilizou-se o Wizard Genomic DNA Purification® Kit (Promega), seguindo as instruções no manual, tendo sido feita em seguida uma PCR para amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 (Internal Transcribed Spacer) do DNAr. Os reagentes utilizados foram: 1 µL (5 pM) de Primer Forward (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'); 1 µL (5 pM) de Primer Reverse (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'); 0,5 µL de dimetilsulfóxido 100% (DMSO, Merck); 0,5 µL de água Milli-Q®; 6 µL de GoTaq® Green Master Mix (2X GoTaq® DNA Polymerase, Reaction Buffer pH 8,5) (Promega), dATP 400 µM, dGTP 400 µM, dCTP 400 µM, dTTP 400 µM; MgCl₂ 3 mM; e 1 µL (25 ng) de amostra. A amplificação foi realizada em termociclador programado para 35 ciclos com os seguintes tempos e temperaturas: 5 min a 95 °C (desnaturação); 30 seg a 95 °C (desnaturação); 30 seg a 61,5 °C (annealing); 1 min a 72 °C (extensão); 10 min a 72 °C (extensão final). A seguir foi realizada uma eletroforese para visualizar os produtos da PCR, usando gel de agarose (0,8%) em tampão TAE (Tris- Acetato-EDTA, LGC Biotecnologia®) adicionado de intercalante fluorescente à luz ultravioleta Sybr®. A corrida eletroforética foi a 80 V por 40 min. Os produtos de amplificação foram encaminhados para o Centro de Pesquisa do Genoma Humano e Células Tronco da USP (Universidade de São Paulo, São Paulo) para sequenciamento pelo método de Sanger. Os eletroferogramas foram editados utilizando o programa Snap Gene para obtenção de sequências de consenso as quais foram utilizadas para busca das mais similares depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLAST para identificação.

Resultados

Produção de enzimas a partir de culturas em meio solidificado: Entre dez colônias desenvolvidas em meio LB, a partir de inóculo de 100 µL de suspensão de uma amostra de solo diluída para 10⁻⁵ e escolhidas ao acaso, foi isolado um fungo filamentosos, em princípio denominado F6, que produz quantidades significativas das enzimas DNases, lipases e proteases. O fungo foi identificado por morfologia observada à microscopia de luz (micélio com hifas septadas e presença de conídios) e por sequenciamento da região ITS como *C. cladosporioides*. As nove colônias restantes, não

apresentaram importância relevante em termos de produção das enzimas de interesse neste trabalho, por tanto não foram consideradas. Todos os testes foram realizados em triplicata, mantendo-se em todos os casos o padrão de resultados.

A verificação de produção de DNAses foi realizada mediante seu cultivo em agar DNase, no qual colônias isoladas, após a adição de HCl 1M, apresentaram no seu entorno halos claros de diâmetros \geq a 3 cm, contrastando com o restante do meio contido na placa de Petri, já que o DNA é precipitável na presença de ácido. A suspensão do extrato liofilizado e filtrado (0,35 mg de proteína total) do sobrenadante da cultura em caldo DNase após centrifugada, mostrou forte atividade hidrolítica para *E. coli*, *S. cerevisiae* e de *Saintpaulia* sp., quando usados como substratos até 2 mg de DNAses contido no próprio caldo. Em todos os casos houve ausência total de precipitado na presença de HCl 1 M, quando comparado ao abundante precipitado formado no controle negativo.

A atividade lipolítica foi demonstrada adicionando-se Rhodamina B (0,001% m/v) às colônias desenvolvidas em placa de Petri contendo meio sintético adicionado azeite de oliva como substrato. A exposição à radiação UV (λ 320 nm) após um período de tempo, permitiu observar colônias de cor rósea fluorescente intensa assim como ao redor das mesmas.

Produção de enzimas a partir de culturas desenvolvidas em meio líquido (caldo): Quando testados sobrenadantes liofilizados suspensos em tampão fosfato 0,1 M pH 7,5 e filtrados de culturas em meio sintético (0,21 mg de proteína total) utilizando-se 1 mL de azeite de oliva como substrato, a titulação com NaOH 50 mM mostrou 66,7% de liberação de ácidos graxos com gasto médio de 60 gotas de NaOH 50 mM, e 20 gotas da mesma solução para o controle negativo.

Para detecção de proteases, utilizou-se ácido acético 5%. Quando este ácido entra em contato com as colônias e suas proximidades, desenvolvidas em meio sintético contendo caseína, observou-se a formação de halos claros em torno, contrastando com o aspecto opaco do restante da superfície da placa. De igual modo, extratos liofilizados suspensos em tampão fosfato 0,1 M pH 7,5 e filtrados (0,28 mg) mostraram forte atividade proteolítica quando usado como substrato caseína 1% (1 mL, 0,01g) e o mesmo ácido como revelador.

Os extratos enzimáticos liofilizados, suspensos em tampão fosfato 0,1 M pH 7,5 e filtrados, ficaram estocados sob refrigeração a 8 °C por 2 meses. Após este período, se repetiram todos os testes e a atividade hidrolítica de cada enzima permaneceu inalterada.

Discussão

As enzimas têm sido utilizadas pelo homem há vários séculos: o uso do malte na preparação de cerveja, do esterco para amolecimento de couros e do coalho na preparação de queijos, são exemplos típicos da utilização destes catalisadores desde tempos antigos. O emprego de enzimas

começou bem antes de se conhecer a sua natureza química e propriedades. Foi a partir das primeiras décadas do século XX que o desenvolvimento da tecnologia enzimática se intensificou. A descoberta de novas enzimas participantes das vias metabólicas, o conhecimento das suas propriedades e a constatação de que quase todas as enzimas de interesse industrial podem ser produzidas por microrganismos, foram alguns dos fatores responsáveis pela evolução da tecnologia enzimática. Os produtores de detergentes são hoje os maiores consumidores de enzimas industriais. Por isto, estão sendo desenvolvidos novos produtos contendo novas enzimas e novas formulações com tal finalidade. A principal inovação neste campo foi a introdução de lipases numa formulação ao final da década de 1980 [16].

No presente trabalho, isolou-se de solo (terra destinada a jardinagem) o fungo *C. cladosporioides* produtor das enzimas DNAses, lipases e proteases, com o propósito de proximamente desenvolver uma formulação de detergente contendo as mesmas. A importância deste achado é o fato de obter as enzimas de interesse a partir de um mesmo microrganismo o que facilita e economizam condições de cultivo como composição dos meios, temperatura de incubação, teor de aeração, dentre outros. Este trabalho pode-se considerar inédito, em termos de produção de DNase a partir de *C. cladosporioides* isolado de solo, assim como de outros fungos filamentosos. Até o momento de culminar este trabalho, não foi encontrado na literatura científica consultada algum trabalho que relate a produção de DNase por este microrganismo.

A maioria dos detergentes atuais, contem enzimas como amilases, celulasas, proteases e lipases, no entanto, a presença de DNase é incomum ou inexistente, posto que esta enzima assim como as enzimas de restrição, possuem baixa estabilidade. A DNase extraída de *C. cladosporioides* neste trabalho, mostrou-se estável por no mínimo 2 meses (já que os testes se refizeram após dois meses quando estocada sob refrigeração a 8 °C).

Em trabalhos de pesquisa em biologia molecular, muitos dos materiais utilizados (como ponteiras de micropipetas, microtubos) são constituídos de polipropileno e descartados, pois pequenas contaminações com DNA podem falsear o resultado de certas reações como produtos de amplificação por PCR entre outros. Estes objetos acumulam-se no meio ambiente por anos já que a degradação de plásticos sintéticos é muito demorada.

Por outro lado, junto com estes materiais, também é desprezado DNA, molécula extremamente resistente, que contamina esgotos, córregos etc. sem se ter a segurança de que não carregue genes que, eventualmente, transformem bactérias do ambiente conferindo-lhes, por exemplo, resistência a antibióticos, por citar um dentre tantos outros.

Pode-se dizer que até o momento da elaboração deste trabalho não existem detergentes contendo DNAses. Não foi achada nenhuma referência bibliográfica na qual se descreva a elaboração de um agente de limpeza a base desta enzima, motivo pelo qual não se citam autores ou pesquisas previamente realizadas. A formulação do detergente está em

andamento, e na formulação da enzima DNase mantém-se estável.

Conclusões

Foi isolado de solo (terra comercializada para jardinaria) o fungo *C. cladosporioides* produtor das enzimas hidrolíticas DNases, lipases e proteases. Este fungo será proximamente utilizado como fonte produtora de tais enzimas para a formulação de um detergente. Têm-se a convicção de que um agente de limpeza a base de enzimas, e fundamentalmente contendo DNases, poderá reduzir significativamente graves problemas de poluição ambiental, oriundos basicamente de descartes utilizados em pesquisa de biologia molecular e afins.

Agradecimentos

Ao Centro de Pesquisa do Genoma Humano e Células Tronco da USP (Universidade de São Paulo, São Paulo). A Nei Carlos Oliveira Sousa, Laboratório de Química, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo. A CNPq e à Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), Universidade Mackenzie.

Referências

- Lynch JM. Biotecnologia do solo. São Paulo: Editora Manole; 1986.
- Gao Y, Chen S, Hu M, Hu Q, Luo J, Li Y. Purification and characterization of a novel chlorpyrifos hydrolase from *Cladosporium cladosporioides* Hu-01. PLoS ONE. 2012; 7:e38137. Doi:10.1371/journal.pone.0038137
- de Hoog GS, Guého E, Masclaux F, Gerrits Van Den Ende AH, Kwon-Chung KJ, McGinnis MR. Nutritional physiology and taxonomy of human-pathogenic *Cladosporium*-*Xylohypha* species. Med Mycol. 1995; 33:339-47.
- Okada K, Takizawa K, Maebayashi Y, Xi L, Campos-Takaki GM, Nishimura K *et al.* Ubiquinone systems of the genus *Cladosporium* and morphologically similar taxa. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996; 16:39-43.
- De Hoog GS, Queiroz-Telles F, Haase G, Fernandez-Zeppenfeldt G, Attili Angelis D, Gerrits Van Den Ende AH *et al.* Black fungi: clinical and pathogenic approaches. Med Mycol. 2000; 38:243-50.
- San-Martín A, Painemal K, Díaz Y, Martínez C, Roviroso J. Metabolites from the marine fungus *Cladosporium cladosporioides*. An Asoc Quím Argent. 2005; 93:247-51.
- Tasié S, Miladinovic-Tasié N. *Cladosporium* spp. cause of opportunistic mycoses. Acta Facultatis Medicae Naissensis. 2007; 24:15-9.
- Gallo ML, Seldes AM, Cabrera GM. Antibiotic long-chain and α,β -unsaturated aldehydes from the culture of the marine fungus *Cladosporium* sp. Biochem Syst Ecol. 2004; 32:545-51.
- Abdel-Baky N, Abdel-Salam A. Natural incidence of *Cladosporium* spp. as a biocontrol agent against whiteflies and aphids in Egypt. J Appl Entomol. 2003; 127:228-35.
- Krogh P. The role of mycotoxins in disease of animals and man. J Appl Microbiol. 1989; 67:99-104.
- Schmidt O, Dyckmans J, Schrader S. Photoautotrophic microorganisms as a carbon source for temperate soil invertebrates. Bio Lett. 2016; 12:20150646. Doi: 10.1098/rsbl.2015.0646.
- De Bellis P, Tristezza M, Haidukowski M, Fanelli F, Sisto A, Mulé G, Grieco F. Biodegradation of ochratoxin A by bacterial isolated from vineyards soils. Toxins (Basel). 2015; 7:5079-93.
- Davis BD, Mingioli ES. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. J Bacteriol. 1950; 60:17-28.
- Oliveira NA, Oliveira LA, Andrade JS, Chagas Junior AF. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos de Amazônia Central, Amazonas, Brasil. Ciênc Tecnol Alim. 2006; 26:853-60.
- Tebaldi VMR, Oliveira TLC, Boari CA, Piccoli RH. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação de ação lipolítica e proteolítica. Ciênc Tecnol Alim. 2008; 28:753-60.
- Coelho MAS, Salgado AM, Ribeiro BD. Tecnologia enzimática. Petrópolis, Rio de Janeiro: FAPERJ Editora EPUB; 2008.