



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BEATRIZ CORTELLINI FERRANTI

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS INIBIDORES DO
DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS EM GRÃOS DE MILHO**

BEATRIZ CORTELLINI FERRANTI

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS INIBIDORES DO
DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS EM GRÃOS DE MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Daniele Sartori

Londrina

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B369s Ferranti, Beatriz Cortellini.
Seleção de microrganismos inibidores do desenvolvimento de fungos em grãos de milho / Beatriz Cortellini Ferranti. - Londrina, 2024.
65 f. : il.

Orientador: Daniele Sartori.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Seleção de linhagens - Tese. 2. Potencial antagônico - Tese. I. Sartori, Daniele . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 66

BEATRIZ CORTELLINI FERRANTI

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS INIBIDORES DO
DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS EM GRÃOS DE MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Maria Inês Rezende
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 25 de março de 2024.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar minha profunda gratidão a Deus, por me proporcionar sabedoria, paciência e coragem durante meu mestrado em Biotecnologia.

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de pós-graduação em Biotecnologia, assim como todos os professores envolvidos, pela oportunidade. A Capes pelo auxílio financeiro concedido durante toda minha jornada. À banca examinadora, pela disposição.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Daniele e ao grupo de pesquisa, expresso minha sincera gratidão aos ensinamentos e o tempo dedicado, foram essenciais para o meu crescimento acadêmico e profissional. Sou grata por ter feito parte desse grupo!

Ao meu noivo Pablo, quero dedicar palavras de apreço pelo apoio incondicional, compreensão e amor. À minha querida família, especialmente aos meus pais, Valdir e Lisângela, por sempre apoiarem minha jornada acadêmica. Agradeço também meu irmão Iago e aos demais membros da minha família.

Aos amigos que encontrei nessa jornada, agradeço de coração. Os momentos compartilhados fizeram toda a diferença, os trabalhos em grupo, os estudos.

Muito obrigada por fazerem parte desta significativa fase da minha vida!

RESUMO

FERRANTI, Beatriz Cortellini. **Seleção de microrganismos inibidores do desenvolvimento de fungos em grãos de milho.** 2024. 65 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2024.

O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais grãos produzidos no Brasil, utilizado como fonte alimentícia animal e humana. Por outro lado, o milho está susceptível à infecção fúngica principalmente durante o período de armazenamento. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são predominantes em grãos armazenados e muitas espécies de ambos os gêneros são potenciais produtoras de micotoxinas. Grãos de milho contaminados com micotoxinas, são impróprios para consumo humano e animal, resultando em grandes perdas econômicas. Uma das formas para minimizar a presença de fungos em grãos de milho é utilizar microrganismos que inibem o desenvolvimento de fungos, como algumas espécies do gênero *Bacillus*. Com este propósito o objetivo desse estudo foi selecionar a ação antagônica de 9 linhagens de *Bacillus*, com ação antagônica contra *A. flavus/oryzae* UELZm4.106. A seleção do potencial antagônico foi feita inicialmente por Cultura Pareada e Difusão em Ágar. Em ambas as triagens foi utilizado 10^6 células/ mL de *Bacillus* e 10^3 conídios/ mL de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106. Tanto em Cultura Pareada quanto em Difusão em Ágar, somente 4 linhagens de *Bacillus*, UELAsF5.1, UELAsF4.66, UELAsF1.483 e UELAsA1.447, apresentaram potencial antagônico significativo, com potencial de inibição de 9,6 % até 35,96 %, respectivamente. As 4 linhagens de *Bacillus* selecionadas foram avaliadas por associação par a par, onde dos 6 tratamentos, apenas 3 pares (UELAsF5.1 + UELAsF4.66, UELAsF5.1 + UELAsA1.447 e UELAsF4.66 + UELAsA1.447) apresentaram inibição de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106. Os extratos livres de células, das mesmas 4 linhagens de *Bacillus*, também foram avaliados, porém, não inibiram *A. flavus/oryzae* UELZm4.106. As 4 linhagens de *Bacillus* previamente selecionadas foram avaliadas em grãos de milho. Para tanto, foi utilizado 20 g de grãos de milho que foram submetidos a tratamentos de infecção artificial *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 e tratamento com grãos naturalmente infectados com fungos. Ambos os tratamentos foram expostos às quatro linhagens de *Bacillus* separadamente e em seguida avaliado o número de conídios. Os resultados obtidos demonstraram ação antagônica das linhagens de *Bacillus* spp. contra *A. flavus/oryzae* e contra fungos diversos nos grãos artificialmente infectados (8,25 %) e naturalmente infectados (81,1 % a 88,89 %). Estes dados sugerem que as 4 linhagens de *Bacillus* apresentam potencial antagônico e são potenciais candidatas ao desenvolvimento de bioinsumos.

Palavras-chave: grãos de milho, potencial antagônico, *Bacillus* spp., *Aspergillus flavus*

ABSTRACT

FERRANTI, Beatriz Cortellini. **Selection of microorganisms that inhibit the development of fungi in corn grains.** 2024. 65 f. Dissertation (Master's degree Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2024.

Corn (*Zea mays* L.) is one of the main grains produced in Brazil, has high nutritional value, and is used as an animal and human food source. On the other hand, corn is susceptible to fungal infection mainly during its storage period. The genera *Aspergillus* and *Penicillium* are predominant in stored grains and many species of both genera are potential mycotoxin producers. Corn grains contaminated with mycotoxins are unfit for human and animal consumption, resulting in large economic losses. One of the ways to minimize the presence of fungi in corn grains is to use microorganisms that inhibit the development of fungi, such as some species of the *Bacillus* genus. For this purpose, the objective of this study was to select the antagonistic action of 9 strains of *Bacillus*, against *A. flavus/oryzae* UELZm4.106. The selection of antagonistic potential was initially done by Paired Culture and Agar Diffusion. In both screenings, 10^6 cells/mL of *Bacillus* spp. and 10^3 conidia/mL of *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 were used. Both in Paired Culture and Agar Diffusion, only 4 *Bacillus* strains, UELAsF5.1, UELAsF4.66, UELAsF1.483 and UELAsA1.447, showed significant antagonistic potential, with inhibition potential from 9.6% to 35.96 %, respectively. The 4 selected *Bacillus* strains were evaluated by pairwise association, where of the 6 treatments, only 3 pairs (UELAsF5.1 + UELAsF4.66, UELAsF5.1 + UELAsA1.447 and UELAsF4.66 + UELAsA1.447) showed inhibition against *A. flavus/oryzae* UELZm4.106. Cell-free extracts from the same 4 *Bacillus* strains were also evaluated, however, they did not show inhibition against *A. flavus/oryzae* UELZm4.106. Regarding the antagonistic potential on fungi present in corn grains, 125 mL Erlenmeyer flasks containing 20 g of corn grains were used. The experiments were conducted with 4 controls: autoclaved corn grains, autoclaved corn grains infected by *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 (10^6 conidia/mL), corn grains naturally contaminated with fungi and superficially disinfected; autoclaved corn kernels, artificially infected by *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 (10^6 conidia/mL) and superficially disinfected. The treatments contained naturally and artificially contaminated corn kernels immersed in a solution containing 10^8 cells/mL of each *Bacillus* spp. The flasks were incubated at 28 °C for 5 days. Furthermore, two additional systems were evaluated where an aliquot of 5 corn grains was removed from each flask before incubation and deposited in Petri dishes containing filter paper; in the other, an aliquot of 3 corn grains was deposited in Petri dishes containing DG18 medium (without antibiotics). The plates were incubated under the same conditions as the flasks. The results obtained in the vials showed that the antagonistic potential of *Bacillus* spp. against *A. flavus/oryzae* was similar to that observed by Paired Culture and Agar Diffusion, UELAsF5.1, UELAsF4.66, UELAsF1.483 and UELAsA1.447 was obtained in descending order, respectively. These data suggest that the 4 *Bacillus* strains have antagonistic potential and are potential candidates for the development of bioinputs.

Keywords: corn grains, antagonistic potential, *Bacillus* spp., *Aspergillus flavus*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVO	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1 A PRODUÇÃO DO MILHO (<i>Zea mays</i> L.)	12
3.2 ARMAZENAMENTO E QUALIDADE DOS GRÃOS DE MILHO	13
3.3 PRINCIPAIS FUNGOS EM GRÃOS DE MILHO	16
3.4 ESTRATÉGIAS PARA MINIMIZAÇÃO DE FUNGOS POTENCIALMENTE PRODUTORES DE AFLATOXINAS EM GRÃOS DE MILHO	21
4. METODOLOGIA	26
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO	26
4.2 PREPARO DOS GRÃOS DE MILHO PELO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO ACELERADO DOS GRÃOS	26
4.3 ATIVIDADE DE ÁGUA (<i>Aw</i>).....	26
4.4 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTAGÔNICA ENTRE ESPÉCIES DE <i>Bacillus</i> E <i>Aspergillus</i>	26
4.4.1 Avaliação da ação antagônica por Cultura Pareada.....	26
4.4.2 Avaliação da ação antagônica por Difusão em Ágar	27
4.4.3 Avaliação da ação antagônica entre <i>Bacillus</i> spp. por associação par a par.....	28
4.4.4 Avaliação da ação antagônica a partir do extrato livre de células	29
4.4.5 Avaliação da ação antagônica de <i>Bacillus</i> spp. contra fungos em grãos de milho.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 AÇÃO ANTAGÔNICA ENTRE ESPÉCIES DE <i>Bacillus</i> E <i>A. flavus/oryzae</i> 32	
5.2 AÇÃO ANTAGÔNICA Entre <i>Bacillus</i> spp. associados contra. <i>A. flavus/oryzae</i> UELZm4.106	34
5.3 AÇÃO ANTAGÔNICA DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS.....	36
5.4 AÇÃO ANTAGÔNICA DE <i>Bacillus</i> sp. EM GRÃOS DE MILHO	37
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
7. REFERÊNCIAS.....	42

INTRODUÇÃO

A produção de milho (*Zea mays* L.) é uma das atividades agrícolas mais relevantes no Brasil, com uma produção de 131.892,6 mil toneladas na safra 2022/2023 (CONAB, 2024) e de 112.752,7 mil toneladas de grãos esperado para a safra 2023/2024, sendo o estado de Mato Grosso o principal produtor nacional (CONAB, 2024). Globalmente, o milho alcançou um marco significativo, ultrapassando 1 bilhão de toneladas e se tornando a maior cultura agrícola do mundo, segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA).

Além de sua importância econômica, o milho desempenha um papel crucial na segurança alimentar, sendo utilizado tanto para consumo humano quanto animal, e é uma fonte essencial para a produção de biocombustíveis e como fonte de renda para agricultores.

Contudo, o armazenamento de grãos de milho enfrenta desafios em relação a infecção fúngica, um dos principais problemas no armazenamento. Como substrato rico em amido, o milho é um dos cereais com grande probabilidade de ser infectado por fungos, principalmente aqueles dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Abbas *et al.*, 2005; Mohale *et al.*, 2013),.

Estes gêneros estão entre os que mais abrigam espécies/linhagens produtoras de micotoxinas, que podem ser produzidas sob condições ambientais favoráveis como alta umidade, e temperatura elevada.

Milho, soja, arroz e trigo estão frequentemente contaminados por *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp., potenciais produtores de aflatoxinas (AFs) e fumonisinas (FBs), (Abouzied, 1994; Hirooka *et al.*, 1996; Ono *et al.*, 1999; Ono *et al.*, 2002; Ono & Hirooka, 2002).

A inserção das micotoxinas na cadeia alimentar pode ocorrer por contaminação direta, quando há consumo de um produto que foi infectado por alguma linhagem de fungo potencial produtor de toxina ou por contaminação indireta, quando a micotoxina está presente no produto final resultante de infecção fúngica prévia, porém o fungo foi eliminado durante o processamento (Freire *et al.*, 2007).

O controle dos fungos potenciais produtores de micotoxinas pode ser feito por antifúngicos sintéticos, no entanto, ainda há dificuldades quanto a toxicidade dos antifúngicos utilizados. Como alternativa, há um crescente interesse na utilização de microrganismos que sejam antagonistas e ou à utilização de seus metabólitos, com

intuito de inibir o crescimento desses fungos potencialmente produtores de micotoxinas, buscando contribuir com sustentabilidade e segurança alimentar.

Neste contexto, alguns grupos de bactérias, como aquelas do o gênero *Bacillus*, têm mostrado representando uma promissora estratégia como agentes de biocontrole.

OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antifúngico de linhagens de *Bacillus* em cultivo com *Aspergillus* spp. e em grãos de milho.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar linhagens de *Bacillus* com ação antagônica contra *Aspergillus flavus/oryzae* UELZm4.106 em cultura ;
- Avaliar a ação antagônica por associação par a par de linhagens de *Bacillus* contra *Aspergillus flavus/oryzae* UELZm4.106 em cultura
- Avaliar o extrato livre de células de linhagens de *Bacillus* contra *Aspergillus flavus/oryzae* UELZm4.106 em cultura
- Avaliar a ação antagônica de linhagens de *Bacillus* contra *Aspergillus flavus/oryzae* UELZm4.106 em grãos de milho;

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A PRODUÇÃO DO MILHO (*Zea mays* L.)

Durante décadas, o milho atingiu o nível de maior cultura agrícola do mundo e é a única cultura a ultrapassar a marca de 1 bilhão de toneladas, deixando para trás, quando se trata de produção, culturas como arroz e trigo (Miranda, 2018).

Da safra 2000/01 para a de 2017/18, a produção mundial de milho passou de 591 milhões de toneladas para 1,076 bilhão de toneladas, com aumento principalmente devido ao uso como ração animal para a produção de frangos e suínos (USDA, 2018 *apud* Contini *et al.*, 2019). A safra 2023/24 deve ultrapassar os 1,22 bilhão de toneladas, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA).

Como segundo cereal mais produzido no Brasil, sendo superado apenas pela soja, a cultura do milho é economicamente importante no cenário agrícola (Amaral *et al.*, 2017). Os estados com maiores produções são Mato Grosso, seguido do Paraná e Goiás. Dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab, 2024) apontam a produção brasileira de milho, safra 2023/24, que foi em torno de 110,96 milhões de toneladas, representando uma queda quando comparada a safra 2022/23, consequência da diminuição de área plantada (8,3%), além de fatores climáticos.

O milho (*Zea mays* L.), segundo Barros e Calado (2014), é uma espécie originária a partir de populações de *Zea mays* L. subsp. *parviglumis*, da região sul do México, sendo cultivado em várias partes do mundo há mais de 8.000 anos. Apresenta fácil adaptabilidade, representado por diferentes genótipos, cultivados desde o limite do Equador até regiões temperadas e desde o nível do mar até altitudes superiores a 3.600 metros, em climas tropicais, subtropicais e temperados. Tem sido utilizado como alimento para humanos e animais, devido a qualidade nutricional, contendo de 70-87 % de carboidratos (amido), 6-13 % de proteína e 4 % de lipídeos, (Győri, 2017; Jaques *et al.*, 2018).

O milho pode ser utilizado de diversas maneiras, tanto o grão quanto a planta podem passar por processos de beneficiamento. A maior parte do consumo deste cereal ocorre na forma de grãos empregados na alimentação animal.

Neste contexto, conforme ressaltado por Labegalini *et al.* (2016), devido às suas múltiplas aplicações, o milho assume um importante papel socioeconômico, no

entanto, ainda há questões limitantes no que tange à produção do grão, dentre os quais a infecção por microrganismos (Trojan, 2016).

Dentre os microrganismos que mais causam danos à cultura do milho estão: *Puccinia polysora* e *Puccinia sorghi* (causadores de ferrugens), *Phaeosphaeria maydis* (causador da mancha-branca), *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis* (causadores da podridão-de-diplodia); *Colletotrichum graminicola* (causador da antracnose foliar), *Fusarium verticillioides* (causador da podridão de *Fusarium*) e *Gibberella zae* (causador da giberela) (Villani, 2016). A presença de tais microrganismos acarretam perda da qualidade dos grãos, consequentemente da produtividade, gerando assim prejuízos econômicos.

3.2 ARMAZENAMENTO E QUALIDADE DOS GRÃOS DE MILHO

A qualidade dos grãos de milho pode ser afetada por fatores abióticos como estresse hídrico e térmico, práticas de cultivo e condições de armazenamento inadequadas (Neme *et al.*, 2017; Leite *et al.*, 2021).

No Brasil, a colheita do milho tem início, com raras exceções, quando os grãos apresentam teor de umidade em torno de 18 % a 20 % (Galindo *et al.*, 2017), os quais devem ser submetidos sequencialmente a colheita, à secagem artificial com objetivo de garantir condições ideais para o armazenamento. Outra opção é esperar e colher o milho após a secagem natural na lavoura, onde seu conteúdo de água é reduzido, chegando a aproximadamente 13 a 14 % (Oliveira, 2017). Pimentel & Fonseca (2011), observaram que a secagem natural do milho no campo é uma prática comum no Brasil, e ocorre, principalmente, pela facilidade, economia e falta de equipamentos de secagem artificial nas propriedades. Os grãos naturalmente secos, por outro lado, apresentam qualidade inferior quando comparados com os grãos colhidos com umidade em torno de 18 % a 20 %, pois passaram mais tempo em campo, onde ficaram susceptíveis às infecções fúngicas e de pragas.

Os grãos de milho após a secagem devem ser levados diretamente à limpeza, seguida do armazenamento. Os grãos também podem ser encaminhados diretamente a indústria, aos consumidores ou para a distribuição aos animais. Na Figura 1 são apresentadas as etapas de produção e pré-processamento dos grãos de milho (EMBRAPA, 2015).

Figura 1 – Fluxograma das etapas de produção e pré-processamento do milho.

Fonte: EMBRAPA, 2015.

Para garantir maior qualidade dos grãos de milho é importante realizar um processo de secagem até 48 horas após colheita dos grãos com umidade em torno de 18 % a 20 %, onde as condições de armazenamento, temperatura (10 °C -15 °C) e umidade relativa do ar (abaixo de 70 – 75 %), devem ser controladas (Dorn *et al.*, 2013; Valmorbida, 2016).

Os grãos de milho secos podem ser armazenados por um longo período de tempo, (Silva *et al.*, 2015), uma vez que, segundo o Manual de Boas Práticas de Armazenamento do Milho, o tempo possível de conservação dos grãos pode dobrar a cada redução de 1 % na umidade e 5 °C na temperatura.

O armazenamento de grãos de milho visa manter as características que os grãos apresentam tais como a viabilidade de sementes, a manutenção da qualidade dos grãos pré e pós moagem e as propriedades nutricionais dos grãos (Santos, 2015; de Queiroz *et al.*, 2020).

O tipo de armazenamento estabelecido pode ser a granel, em silos (metálicos, de alvenaria ou concreto), em armazéns convencionais (sacarias), em armazéns graneleiros ou em sistemas de armazenagem temporária, como silos bolsa (Oliveira *et al.*, 2014; EMBRAPA, 2015; Oliveira, 2017).

Atualmente, o armazenamento a granel é predominantemente utilizado, em silos verticais de armazenamento ou em armazéns graneleiros (Ziegler *et al.*, 2021).

Fatores como a presença de fungos de armazenamento (como espécies de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.), condições inadequadas de temperatura e

umidade nos silos, podem impactar negativamente a rentabilidade e a segurança alimentar (Oliveira, 2017).

A qualidade dos grãos armazenados é dependente do ambiente de armazenamento, a massa de grãos constitui um ecossistema dinâmico, formado por elementos bióticos (e abióticos (que são afetados, tanto química como biologicamente por diversos fatores, (Raudiene *et al.*, 2017).

A quantidade total de água contida nos grãos, ou seja, a umidade, juntamente com a atividade de água (A_w), são os fatores de maior influência no processo de deterioração dos grãos e consequente diminuição (perda) da qualidade do grão armazenado (Raudiene *et al.*, 2017).

A A_w é empregada para controle da estabilidade do produto no período de armazenamento, pois avalia a disponibilidade de água no alimento no qual pode estar susceptível a diversas reações (químicas, enzimáticas) ou também a quantidade de água que pode ser usada por microrganismos, acarretando assim na degradação do produto (Food Safety Brazil, 2016; Zeymer, 2021). Para a armazenagem, o ideal é que a atividade de água (A_w) do grão esteja abaixo de 0,6 na maioria dos cereais (Fernandes, 2020).

A análise de atividade de água também permite uma avaliação do crescimento de microrganismos, cujos parâmetros permitem controlar a atividade microbiana na matéria-prima e nos produtos industrializados. Cada microrganismo possui uma A_w favorável ao seu desenvolvimento, o qual é possível monitorar o crescimento microbiano. A A_w ideal para o desenvolvimento da maioria de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (frequentemente encontrados no armazenamento de grãos de milho) está entre 0,85 - 0,95 e 0,80 - 0,85 respectivamente.

Assim, associação entre temperaturas elevadas (acima de 35 °C), e A_w favorável ao desenvolvimento microbiano intensificam o processo de deterioração dos grãos armazenados.

A manutenção da umidade em torno de 9 – 10 %, em grãos armazenados é um dos fatores abióticos passíveis de contribuir com o controle dos demais fatores favoráveis à deterioração dos grãos, como A_w e temperatura. O equilíbrio higroscópico dos grãos de milho (relação termodinâmica entre a pressão d'água contida em cada grão e a pressão do vapor d'água do ar em contato com ele), para controlar o desenvolvimento de microrganismos é de 14 % (Elias, 2018).

A Tabela 1 apresenta as temperaturas ótimas para o crescimento de algumas espécies de fungos encontrados no armazenamento de grãos de milho bem como a porcentagem mínima de umidade necessária para que o microrganismo se desenvolva no substrato (Limites mínimos de umidade).

Tabela 1 - Temperaturas mínima, ótima e máxima para o crescimento de fungos encontrados no armazenamento de grãos de milhos e seus Limites mínimos de umidade (% b.u.) para desenvolvimento.

FUNGOS	Temperaturas para Crescimento (°C)			Limites mínimos de umidade (% b.u.)*
	Mínima	Ótima	Máxima	
<i>Aspergillus restrictus</i>	5 – 10	30 – 35	40 – 45	13,5 – 14,5
<i>Aspergillus candidus</i>	10 – 15	45 – 50	50 – 55	15,0 – 15,5
<i>Aspergillus flavus</i>	10 – 15	40 – 45	45 – 50	18,0 – 18,5
<i>Penicillium spp.</i>	-5 – 0	20 – 25	35 – 40	16,5 – 19,0

Adaptado de: Manual de Boas Práticas de Armazenagem – Milho

*b.u. = base úmida

Em geral, os grãos se mantêm em boas condições de qualidade quando se encontram armazenados a temperaturas inferiores a 18 °C e umidade inferior a 14 %, sendo o ideal entre 12 e 13 %. A associação dessas variáveis é determinante para a boa conservação dos grãos sob armazenamento.

3.3 PRINCIPAIS FUNGOS EM GRÃOS DE MILHO

Embora atualmente haja padrões adequados de produção e armazenamento dos grãos de milho, a infecção dos grãos por fungos ainda é uma das principais causas de deterioração do produto, prejudicando a qualidade e reduzindo as propriedades nutricionais resultando em perdas econômicas (Munkvold *et al.*, 2019).

O estudo de Brito *et al.* (2022) relatou a incidência de fungos em grãos de milho armazenados em silo-bolsas, dos quais a maior incidência foi dada por *Penicillium* (37,5 %), seguido de *Aspergillus* (22,2 %) e *Fusarium* (16,6 %), dos quais dentre as espécies de *Aspergillus* destacou-se *A. flavus* (61,7 %).

Lima (2023), identificou fungos potenciais produtores de micotoxinas em grãos de milho destinados à produção de ração animal. O gênero *Aspergillus* foi o mais

incidente com 92,8 % (incluindo *Aspergillus* section *Aspergillus*, *Aspergillus* section *Flavi* e *Aspergillus* section *Cremeri*), seguido pelo gênero *Fusarium* com 2,9 %.

Os fungos presentes nos grãos de milho armazenados são frequentemente divididos em dois grupos, de acordo com sua origem: (I) fungos de campo e (II) fungos de armazenamento (Aminu *et al.*, 2021). Os primeiros, ou seja, fungos de campo, infectam os grãos ainda no campo, necessitando que os grãos de milho estejam com umidade mais alta ($> 20\%$) (Embrapa, 2021) e temperaturas mais moderadas para o desenvolvimento do fungo, provocando as podridões de espigas. Já os fungos de armazenamento são capazes de se desenvolverem em umidades relativas mais baixas que os fungos de campo e temperaturas mais elevadas ($20\text{ }^{\circ}\text{C} - 30\text{ }^{\circ}\text{C}$), esses progridem e substituem os fungos de campo, que são impedidos de se desenvolver em condições de armazenamento menos favoráveis.

Os gêneros comumente encontrados em grãos armazenados são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Suanthie *et al.*, 2009; Vegi *et al.*, 2013; Xing *et al.*, 2018; Rocha *et al.*, 2020; Araújo *et al.*, 2021; Gasperini *et al.*, 2021).

O gênero *Fusarium*, causa perda de produtividade, em razão de podridão no colmo (Costa *et al.*, 2019) e na espiga (Munhoz *et al.*, 2015; Gabriel *et al.*, 2018), acarretando na formação de grãos ardidos durante o armazenamento.

Os fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* infectam os grãos geralmente depois da colheita e têm a capacidade de viver associados a grãos com baixo teor de água (Bertuzzi, 2019; Tadei, 2020), pois produzem estruturas, como esporos e hifas, que lhes permitem colonizar e se desenvolver em grãos com teores de água relativamente baixos além da capacidade de produzir enzimas que permite degradar componentes dos grãos, como amido, proteínas e lipídios, para obter nutrientes necessários ao seu crescimento.

O gênero *Aspergillus* abriga um grande número de espécies presentes em diversos nichos ecológicos e está entre as principais espécies de fungos encontrados em grãos de milho armazenados (Travaglia, 2011; Visagie *et al.*, 2017).

Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* podem conter espécies capazes de produzir micotoxinas (Arruda *et al.*, 2019), como aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona, ocratoxina, entre outras, sob condições ambientais favoráveis, como temperaturas e umidade elevada (Iamanaka, 2010; Castellari *et al.*, 2015; Pitt, 2000; Gasperini *et al.*, 2021; Leite *et al.*, 2021; Brito *et al.*, 2022). No entanto, é importante

ressaltar que nem todas as espécies e nem todas as linhagens de uma espécie são potencialmente produtoras de micotoxinas (Leite *et al.*, 2021).

Micotoxinas é um termo originado da palavra grega “mykes” que significa fungo e do latim “toxicum”, veneno ou toxina (Goldblatt, 1972; Bullerman, 1979), traduzido por Lazzari (1997). São metabólitos secundários de alguns fungos causando danos à saúde humana e animal quando alimentos contaminados com as mesmas são ingeridos (Andrade *et al.*, 2015; FAO, 2022).

As principais micotoxinas encontradas em grão de milho armazenados são as aflatoxinas (AFs), seguido por fumonisinas (FBs), tricoteceno (Toxina T-2), ocratoxina (OTs), zearalenona (ZEN) e deoxivalenol (DON) (Oliveira *et al.*, 2017; Misihairabgwi *et al.*, 2019; Leite *et al.*, 2021; Medeiros, 2021; Brito *et al.*, 2022).

Como exemplo de espécies produtoras de micotoxinas tem-se: *Aspergillus flavus* (aflatoxinas), *Aspergillus niger* (ocratoxinas), *Fusarium verticillioides* e *F. subglutinans* (fumonisinas), *Fusarium graminearum* (zearalenona e tricotecenos), *Fusarium sporotrichioides* (toxina T-2), *Penicillium verrucosum* (ocratoxinas) (Aprodu *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015).

As micotoxinas encontradas com maior incidência em grãos de milho armazenados são as aflatoxinas.

As aflatoxinas, podem causar hepatotoxicidade, e desenvolvimento de carcinogênese, enquanto as fumonisinas, tem como principal efeito a neurotoxicidade e carcinogênese (Lee *et al.*, 2012; Awuchi *et al.* 2022; Fernandes *et al.*, 2022).

Segundo Wan, Chen e Rao (2020), os principais produtores de aflatoxinas (AFs) são *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, (Arruda *et al.*, 2019; Munkvold, 2019; Vedovatto *et al.*, 2020).

Todas as formas de aflatoxinas são derivadas da difurocumarina. As duas principais formas de aflatoxinas, B e G (*blue e green*), são subclassificadas como B₁, B₂, G₁ e G₂. A pequena diferença estrutural entre elas é responsável pela diferença, na toxicidade, sendo a aflatoxina B₁ a mais tóxica, classificada como carcinogênica em humanos pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) (Savi *et al.*, 2020) e a mais comum de todas. As aflatoxinas B₁ e G₁ são consideravelmente mais tóxicas que B₂ e G₂ (Travaglia, 2011; Wan *et al.*, 2020). Além de dois produtos metabólicos, M₁ e M₂, principais metabólicos das aflatoxinas B₁ e B₂ respectivamente, com potencial tóxico menor (Coulombe, 1991; Sartori *et al.*, 2015; Souto *et al.*, 2017).

As aflatoxinas causam efeitos patológicos, tanto em humanos quanto em animais, como hepatotoxicidade (lesões no fígado), hiperplasia dos ductos biliares, hemorragia, carcinogênese (tumores hepáticos), redução da imunidade, entre outros (Travaglia, 2011). Em animais, alimentos contaminados com aflatoxinas têm sido associados com aflatoxicose, imunossupressão, tumores hepáticos e renais devido à presença da aflatoxina M₁, um derivado da aflatoxina B₁ (Amoras *et al.*, 2021).

A ingestão de grãos de milho contendo micotoxinas podem causar síndrome da toxicidade resultante da absorção de micotoxinas, que podem ser classificadas como aguda, subaguda, ou crônica, dependendo da quantidade e frequência de ingestão (Bahniuk *et al.*, 2021).

Devido à sua ampla gama de propriedades físicas e químicas, as micotoxinas são compostos químicos estáveis que não podem ser destruídos durante a maioria das operações de processamento de alimentos (Sadhasivam *et al.*, 2017).

As micotoxinas possuem caráter acumulativo, ou seja, elas podem também alcançar a cadeia alimentar indiretamente. Tratamentos térmicos e processamentos industriais podem eliminar os fungos presentes, mas não são capazes de eliminar as toxinas já presentes nos alimentos (Bragotto, 2016).

A toxicidade causada pelas micotoxinas tem levado diversos países a estabelecerem regulamentações para garantir um controle da contaminação por micotoxinas em alimentos e rações animais.

Organizações internacionais avaliaram a toxicidade das micotoxinas e com base nos resultados destas avaliações foram determinados limites toleráveis de contaminação por micotoxinas em alimentos para tentar controlar a exposição humana. Os países da Comunidade Europeia (European Commission) têm uma legislação específica e detalhada dos Limites Máximos Toleráveis (LMT) para micotoxinas em alimentos. Nos Estados Unidos a Food and Drug Administration (FDA) regulamenta os níveis de ação de algumas micotoxinas. Na América do Sul estes limites são considerados no acordo do Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), que agrupa 12 países da região. O Brasil é o país do MERCOSUL com legislação própria que inclui maior quantidade de micotoxinas e categorias alimentares, estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Adaniya, 2017).

Em julho de 2022 a ANVISA lançou uma nova Instrução Normativa (IN N° 160) estabelecendo novos Limites Máximos Toleráveis (LMT) de micotoxinas em alimentos de milho ou a base de milho (Tabela 2).

Tabela 2 - Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em milho.

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg)
Aflatoxinas B1, B2, G1, G2	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	20
	Milho de pipoca	2.000
Fumonisinhas (B1 + B2)	Alimentos à base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200
	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	1.500
	Amido de milho e outros produtos à base de milho	1.000
	Milho em grão para posterior processamento	5.000
Zearalenona	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos à base de milho	150
	Milho em grão e trigo para posterior processamento	400
Desoxinivalenol (DON)	Trigo e milho em grãos para posterior processamento	2.000

Adaptado de: ANVISA, 2022.

Devido aos efeitos deletérios para a saúde associados ao consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas, o Ministério da Saúde através da Instrução Normativa – IN Nº88 de 26/03/2021, delimitou a quantidade máxima para a presença de aflatoxinas em milho não processado usado para consumo direto na alimentação humana ou como ingrediente em outros produtos alimentícios, sendo 5,0 µg.kg⁻¹ para aflatoxina B₁ e 20,0 µg.kg⁻¹ para aflatoxinas totais (B₁, B₂, G₁ e G₂). Contudo, apesar da existência de tais regulamentações, a contaminação de alimentos por aflatoxinas ainda é um desafio.

Se tratando de grãos de milho destinados a ração animal, os limites máximos de micotoxinas (Tabela 3) podem variar de acordo com o tipo de animal, o produto final, as regulamentações de cada país e as recomendações de organizações de segurança alimentar e saúde animal.

Tabela 3 - Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em grãos de milho destinados a ração animal.

PAÍS	MICOTOXINA	LMT (µg/kg)
Brasil (ANVISA e MAPA)	Aflatoxinas totais	20
	Deoxinivalenol (DON)	5.000
	Zearalenona	500
	Fumonisinias (B1 e B2)	60.000
Estados Unidos (FDA)	Aflatoxinas totais	20 – 300
	Deoxinivalenol (DON)	5.000 – 10.000
	Zearalenona	1.000 – 5.000
União Europeia (Comissão Europeia, com base nas avaliações da EFSA)	Aflatoxinas totais	20
	Deoxinivalenol (DON)	8000
	Zearalenona	500
	Fumonisinias (B1 e B2)	60.000

Um desafio importante na produção de milho é reduzir a infecção por fungos produtores de aflatoxinas nos grãos de milho, já que a presença da mesma é um agravante gerando perdas econômicas e à saúde (Okoth *et al.*, 2012).

3.4 ESTRATÉGIAS PARA MINIMIZAÇÃO DE FUNGOS POTENCIALMENTE PRODUTORES DE AFLATOXINAS EM GRÃOS DE MILHO

Os métodos propostos para o controle de micotoxinas são normalmente preventivos, incluindo boas práticas de manejo na agricultura e pós-colheita, podendo ser utilizado métodos químicos, físicos e biológicos. Entretanto, após a toxina estar presente no alimento, a sua descontaminação é muito difícil. A utilização de raios gama, raios X e ultravioleta são exemplos de métodos físicos (Carão *et al.*, 2014). Os adsorventes, como as argilas e bentonitas, são as substâncias mais comuns utilizadas para a descontaminação adicionadas à alimentação animal. Estes compostos são capazes de se ligar às toxinas no trato gastrointestinal e impedir a sua absorção sistêmica (Savi, 2020; Maia *et al.*, 2021). Apesar disso, até o momento, não há um método disponível que elimine as micotoxinas sem causar alterações no produto, e o uso desses adsorventes não é uma solução definitiva para o problema, pois possuem uma baixa eficiência dependendo do nível de contaminação e do tipo de micotoxina.

Dentre os métodos utilizados nas etapas pós-colheita, tem-se ainda a utilização de ozonização, tratamento térmico e irradiação UV, essas abordagens são consideradas pouco práticas e eficazes em termos de implementação e resultados. (Bhat *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019; Afsah-Hejri *et al.*, 2020; Bocate, 2020).

O uso de microrganismos é uma alternativa à prevenção do desenvolvimento de fungos potencialmente produtores de micotoxinas. A utilização de microrganismos antagonistas, como *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp., é uma alternativa adequada e sustentável que vem se destacando nesse contexto (Shoda, 2000; Chan *et al.*, 2003).

O biocontrole utiliza microrganismos como antagonistas, os quais podem agir, competindo por nutrientes e espaço, ou ainda produzindo moléculas antimicrobianas.

Microrganismos podem interagir entre si, podendo criar condições desfavoráveis ao desenvolvimento de outros microrganismos, ou seja, determinado microrganismo pode agir inibindo o crescimento/ desenvolvimento de outro, sendo esta forma de interação denominada de antagonismo (Allwood *et al.*, 2008).

Há quatro principais mecanismos de ações inibitórias: (1) competição física por recursos vitais (nutrientes) e espaço, (2) indução de instabilidade na estrutura da parede celular, (3) interferência nas atividades intracelulares das mitocôndrias, núcleo e membrana citoplasmática, e (4) regulação negativa da expressão gênica associada à síntese de aflatoxinas (Ren *et al.*, 2020). Importante ressaltar que essas ações inibitórias frequentemente resultam de uma interação combinada de diversos mecanismos, não são atribuídas unicamente a um mecanismo isolado.

Existem vários tipos de interações entre microrganismos antagonistas, incluindo a produção de substâncias antimicrobianas. Segundo Li, e Zhang, (2021). Nesta interação, microrganismos produzem e liberam substâncias que inibem o crescimento ou atividade de outros microrganismos presentes no ambiente. A inibição do crescimento microbiano por substâncias liberadas no meio pode se dar por competição por recursos nutricionais, como fontes de carbono, nitrogênio e outros nutrientes essenciais, reduzindo a disponibilidade para outros microrganismos (Gómez-Gómez *et al.*, 2021).

O antagonismo pode ainda se dar por competição por espaço, onde os microrganismos competem por espaço físico em um ambiente, colonizando superfícies sólidas ou ocupando nichos específicos, o que pode limitar o crescimento ou a sobrevivência de outros microrganismos (Ren *et al.*, 2020). Algumas espécies microbianas utilizam sistemas de comunicação intercelular, como *quorum sensing*, para regular comportamentos coletivos, como a produção de substâncias antimicrobianas, afetando indiretamente a sobrevivência de outros microrganismos (Zhang *et al.*, 2020).

Das interações que podem ocorrer no antagonismo, metabólitos voláteis e não voláteis produzidos por microrganismos com potencial de inibição e seus modos de ação têm sido estudados de forma crescente, devido à sua aplicabilidade no controle de microrganismos (Morath *et al.*, 2012; Muhamadali *et al.*, 2015). Quando um microrganismo produz e libera substâncias químicas, que inibem o crescimento, desenvolvimento ou sobrevivência de outro organismo denomina-se antibiose. Essas substâncias podem incluir antibióticos, enzimas ou outros compostos que interferem nos processos vitais do organismo alvo.

O antagonismo está correlacionado com a antibiose, pois é um dos mecanismos pelos quais um organismo exerce efeitos inibitórios sobre outro.

Quevedo *et al.* (2023), utilizando a técnica de pareamento de culturas *in vitro*, avaliaram quatro isolados de *Trichoderma* spp. como microrganismo inibidor do crescimento de *Fusarium oxysporum*. A utilização do agente antagonista inibiu de 13,06 % a 14,24 % o crescimento micelial de *F. oxysporum*.

Ferreira (2021) avaliou o potencial antagônico *in vitro* (cultura pareada) de isolados de *Bacillus* spp. (10 linhagens) e *Trichoderma asperellum* no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. A média de inibição micelial pelas linhagens de *Bacillus* variou de 59 % a 68,5 % e a média de inibição micelial de *T. asperellum* foi de 72 %.

Entre relatos sobre o uso de microrganismos antagonistas, o uso de bactérias do gênero *Bacillus* é tido como uma das mais promissoras entre os agentes de biocontrole (Viterbo *et al.*, 2002; de La Cruz-Quiroz *et al.*, 2018; Dorighello *et al.*, 2020).

Essas bactérias tornaram-se um dos principais agentes microbianos associados ao mecanismo de controle biológico, devido a alta atividade inibitória para uma variedade de microrganismos (Wilming, 2013; Kim *et al.*, 2016).

As bactérias do gênero *Bacillus* podem agir sobre outro organismo por competição, porém, na maioria das vezes, ocorre a produção de ampla gama de compostos antagônicos de amplo espectro contra outras bactérias, fungos e até mesmo vírus (Earl *et al.*, 2008, Dorighello, 2017; Durairaj *et al.*, 2018; Fira *et al.*, 2018; Dorighello *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020; Montino, 2021),

O gênero *Bacillus* é um dos gêneros componentes da microbiota do solo, podendo interagir com diferentes plantas, e se distinguem por sua capacidade de tolerar baixas temperaturas. Eles podem sobreviver em condições adversas de pH, podem sobreviver no solo por longos períodos até que ocorram condições ambientais

favoráveis para seu crescimento e podem permanecer no solo mesmo quando não surgem condições favoráveis (Balbinot, 2018).

Estudos mostram resultados promissores utilizando linhagens de *Bacillus* como forma de controle para substituição dos fungicidas químicos no controle de fungos patogênicos (Einloft *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2022). As espécies *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* e *B. subtilis* são espécies que possuem grande potencial antifúngico (Ryu *et al.*, 2004; Ongena *et al.*, 2007; Leelasuphakul *et al.*, 2008; Pérez-Garcia *et al.*, 2011).

Isolados de *Bacillus* podem ser utilizados, segundo relatos da literatura, como agentes de biocontrole de microrganismos fitopatogênicos ao milho (Lizárraga-Sánchez *et al.*, 2015; Kulimushi *et al.*, 2017).

Diversos autores relataram a efetividade de isolados de *Bacillus* no controle de patógenos, onde as espécies mais utilizadas são *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. firmus*, *B. insolitus*; *B. methylotrophicus* e *B. megaterium* (Earl *et al.*, 2008; Dorighello *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015; Radhakrishnan *et al.*, 2017). A efetividade do controle se dá, principalmente, sobre os gêneros *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Fusarium*, *Thielaviopsis*, *Cercospora*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Uncinula*, *Pyricularia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Erwinia*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Meloidogyne* e *Pratylenchus* (Martins *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2018).

Navya *et al.* (2015) avaliaram, *in vitro*, a redução do crescimento micelial de *A. flavus* por *B. subtilis* (15 %), *Bacillus* sp. (20 %) e *B. cereus* (11 %). Além de *Bacillus* spp., também foram avaliados *Pseudomonas fluorescens* (26 % e 34 %), *Pseudomonas aeruginosa* (38 %) e nove linhagens de *Trichoderma*, se destacando o *Trichoderma viridae* (56 %).

Buscando avaliar a inibição do crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, Wang *et al.* (2021), avaliaram *in vitro*, que os compostos orgânicos voláteis (COVs) da fermentação da cepa CF-3 de *B. subtilis* foi capaz de inibir o crescimento (30 mm) de *C. gloeosporioides*.

Teixeira *et al.* (2021), avaliaram *in vitro* o potencial da cepa de *Bacillus velezensis* CMRP 4490 quanto à sua capacidade de inibir patógenos de plantas, apresentando atividade antagônica contra *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani* com inibição do crescimento micelial de aproximadamente 60 %,.. Higashi (2020) realizou estudos preliminares utilizando a

mesma cepa (CMRP 4490) e obteve antagonismo contra *Fusarium solani* 145, *F. solani* 234 e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* 06, onde a taxa de inibição se deu entre 75% (*F. solani*) - 72% (*F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*) de inibição.

Diante do potencial de inibição do crescimento de fungos por algumas espécies de *Bacillus* ou outros microrganismos, algumas linhagens já foram selecionadas e empregadas no desenvolvimento de formulações como demonstrado na Tabela 04.

Tabela 4: Biofungicidas comercialmente disponibilizados no Brasil.

NOME COMERCIAL	PRINCÍPIO ATIVO	PATÓGENO	CULTURA	FABRICANTE
Serenade	<i>B. subtilis</i>	<i>Alternaria, Botrytis, Colletotrichum, Xanthomonas</i>	Diversas culturas	Bayer, México
Sonata	<i>B. pumilus</i>	<u><i>Sphaerotheca, Botrytis</i></u>	Diversas culturas	Bayer
Rizoderma TSI	<i>T. afroharzianum</i>	<i>Sclerotinia Sclerotiorum, Macrophomina, Fusarium, Rhizoctonia</i>	Milho, soja, trigo, arroz	Rizobacter, Argentina
Shocker	<i>B. amyloliquefaciens</i> (2 cepas) e <i>T. harzianum</i>	<i>Rhizoctonia, Fusarium e Sclerotinia</i>	Soja, café, algodão e HF's	Agrivalle, Brasil
TRITTER	<i>T. harzianum</i>	<i>Rhizoctonia, Sclerotinia</i>	Feijão, alface e soja	Ballagro, Brasil
agTecmmon	<i>B. amyloliquefaciens</i> (2 cepas)	<i>Colletotrichum; Corynespora; Phaeosphaeria; Ramularia</i>	Todas as culturas	Agrivalle, Brasil
Ecotrich WP	<i>T. harzianum</i>	<i>Sclerotinia, Rhizoctonia e Macrophomina</i>	Todas as culturas	Ballagro, Brasil
Atoxigen	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Aspergillus flavus</i> e outras espécies de fungos produtores de aflatoxinas	Milho e amendoim	Bioceres Crop Solutions

Fonte: Próprio autor, adaptado ADAPAR.

A maioria dos biofungicidas descritos na Tabela 4, apresentam recomendações de uso via aplicação em sementes, diferentes etapas de preparo do solo ou em cultura. Nenhum dos produtos apresentam recomendações eficazes de uso em grãos armazenados.

METODOLOGIA

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Este estudo utilizou a linhagem de *Aspergillus flavus/oryzae* UELZm4.106, isolada de grãos de milho e identificada por Lima (2023), e nove linhagens de *Bacillus* (UELAsF1.483, UELAsF2.2, UELAsF4.7, UELAsF5.1, UELAsA3.44, UELAsF2.47, UELAsF2.79, UELAsF4.66 e UELAsA1.447) isoladas de alho (Batistela, 2022). Todas as linhagens fazem parte da Coleção de Microrganismos da Universidade Estadual de Londrina.

Os grãos de milho avaliados no estudo foram obtidos de silos dos estados de São Paulo e Paraná destinados a produção de ração animal.

4.2 PREPARO DOS GRÃOS DE MILHO PELO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO ACELERADO DOS GRÃOS

Todos os grãos de milho utilizados neste trabalho passaram pelo processo de envelhecimento acelerado, também conhecido como termoinibição. Neste processo, os grãos foram dispostos no fundo de um refratário de vidro e incubados em BOD a 45° C por 72 h.

4.3 ATIVIDADE DE ÁGUA (Aw)

A atividade de água dos grãos foi aferida com auxílio do equipamento analisador de atividade de água para amostras contendo voláteis – AquaLab Series 4TEV (Meter Group).

4.4 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTAGÔNICA ENTRE ESPÉCIES DE *Bacillus* E *Aspergillus*

4.4.1 Avaliação da ação antagônica por Cultura Pareada

Um total de nove linhagens de *Bacillus* spp. foram utilizadas, com o preparo do pré-inóculo realizado em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura líquido

DYGS (2 g/L glicose, 1,5 g/L peptona, 2 g/L extrato de levedura, 0,5 g/L $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) incubados a 37 °C, 180 rpm por 24 horas. Uma alíquota de 200 µL do pré inóculo foi adicionada em 5 mL de meio de cultura líquido DYGS incubados a 37 °C, 180 rpm por 3 horas, para obtenção do inóculo.

O preparo de *Aspergillus flavus/ oryzae* UELZm4.106 foi conduzido em placa de Petri contendo meio de cultura Ágar Batata Dextrose (Kasvi, Espanha) e incubado a 28 °C por 5 dias.

A avaliação do antagonismo foi conduzida com o inóculo de 50 µL de cada linhagem de *Bacillus*, contendo 10^6 UFCs/mL, em discos de papel filtro de 15 mm de diâmetro, na região central da placa de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA) (Kasvi, Espanha). *Aspergillus flavus/ oryzae* UELZm4.106 foi inoculado pontualmente em quadrantes da placa de Petri à 15 mm da borda. As placas produzidas em quintuplicata experimental, foram incubadas a 28 °C por 5 dias. Como controle foi utilizado água destilada nos discos de papel filtro depositados no centro das placas de Petri.

A ocorrência de inibição foi avaliada a partir do diâmetro médio de crescimento da colônia *Aspergillus flavus/ oryzae* UELZm4.106, aferida com o auxílio do paquímetro e dada em milímetros comparando o diâmetro médio de crescimento das colônias controle.

A inibição do crescimento de *Aspergillus flavus/ oryzae* UELZm4.106 foi obtida conforme a fórmula de Edington:

$$I = \left[\frac{(CFC - CFT)}{CFT} \right] \times 100, \text{ onde:}$$

I = porcentagem de inibição do crescimento de *Aspergillus flavus/ oryzae* UELZm4.106.

CFC= diâmetro de crescimento de *Aspergillus flavus/ oryzae* UELZm4.106 em placas controle;

CFT= diâmetro de crescimento de *Aspergillus flavus/ oryzae* UELZm4.106 em placas de Petri contendo linhagens de *Bacillus*.

Os resultados foram analisados por teste de Tukey e análise de variância (ANOVA) pelo software RStudio (versão R i386 4.1.3, RStudio Team, 2022).

4.4.2 Avaliação da ação antagônica por Difusão em Ágar

O pré-inóculo das nove linhagens de *Bacillus* e a linhagem de *Aspergillus flavus/oryzae* UELZm4.106, foram preparadas conforme descrito no item 4.3.1.

Em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) foi plaqueado 100 µL de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106, correspondente a 10³UFCs/mL. Nestas placas foi construído um poço central de 9 mm de diâmetro e inoculado 50 µL da linhagem de *Bacillus* contendo 10⁶UFCs/mL. Como controle foi inserido água destilada no poço central das placas de Petri. As placas, em quintuplicata experimental, foram incubadas a 28 °C por 5 dias.

A avaliação da inibição do crescimento de *Aspergillus flavus/oryzae* UELZm4.106 foi feito por aferição de halo de inibição ao redor do poço central entre placas contendo as linhagens de *Bacillus* e placas controle.

A ação antagônica foi avaliada por comparação do diâmetro de crescimento da colônia de *Bacillus* ou produção de halo de inibição ao redor do poço central, comparado ao controle. A porcentagem de inibição foi obtida pela fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = \left(\frac{\text{Tratada}}{\text{Diâmetro total da placa}} \right) \times 100\%, \text{ onde:}$$

Tratada = diâmetro de crescimento de *Aspergillus flavus/oryzae* UELZm4.106 em placas de Petri contendo linhagens de *Bacillus*.

Diâmetro total da placa = 90mm – como se houvesse inibição 100%

Os resultados foram analisados por teste de Tukey e análise de variância (ANOVA) pelo software RStudio.

4.4.3 Avaliação da ação antagônica entre *Bacillus* spp. por associação par a par.

As linhagens de *Bacillus* que apresentaram inibição do crescimento de *Aspergillus flavus/oryzae* UELZm4.106 por Cultura Pareada e Difusão em Ágar foram avaliadas por duas linhagens de *Bacillus* simultaneamente (par a par).

A avaliação foi conduzida com preparo dos inóculos de cada linhagens o qual posteriormente foi feito uma mistura de 150 µL de cada linhagem de *Bacillus*, contendo 10³ UFCs/mL de cada linhagem.

Um total de 50 µL do preparo par a par de *Bacillus*, na concentração final de 10⁶ UFCs/mL, foi inoculado em discos de papel filtro de 15 mm de diâmetro, na região central da placa de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA). *Aspergillus flavus/oryzae* UELZm4.106 foi inoculado pontualmente em quadrantes da placa de Petri à 15 mm da borda, e as análises seguiram como descrito no item 4.3.1.

4.4.4 Avaliação da ação antagônica a partir do extrato livre de células

As linhagens de *Bacillus* que apresentaram atividade inibitória contra o crescimento de *Aspergillus flavus/oryzae* UELZm4.106 foram preparadas conforme o item 4.1. (pré-inóculo) e foi realizado uma fermentação em meio de cultura líquido DYGS e meio Luria-Bertani (LB) (inserir a composição do meio), incubados a 37 °C, 180 rpm por 3 dias. No final do cultivo, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante filtrado com auxílio de filtros 0.22µm para obtenção do extrato livre de células (ELC).

Em seguida, o ECL foi utilizado para avaliação contra *Aspergillus flavus/oryzae* UELZm4.106 Um total de 50, 100 e 150 µL do extrato livre de células de cada linhagem de *Bacillus* foi depositado em discos de papel filtro de 15 mm de diâmetro, na região central da placa de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA). *Aspergillus flavus/oryzae* UELZm4.106 foi inoculado pontualmente em quadrantes da placa de Petri à 15 mm da borda. As placas foram incubadas em triplicata experimental a 28 °C por 5 dias. A avaliação das placas foi conduzida conforme descrito no item 4.3.1.

4.4.5 Avaliação da ação antagônica de *Bacillus* spp. contra fungos em grãos de milho

As linhagens de *Bacillus* previamente selecionadas e que apresentaram inibição contra *Aspergillus flavus/oryzae* UELZm4.106 foram avaliadas quanto ao potencial de inibição de crescimento de fungos em grãos de milho provenientes do armazenamento em silos.

Os grãos foram submetidos a três sistemas de avaliação: 1) grãos de milho (20 g) inseridos em frascos Erlenmeyers de 125 mL, 2) placas de Petri contendo papel filtro com 5 grãos de milho por placa e 3) placas de Petri contendo meio DG18 Dichloran Glicerol (glicerol 220 g/L, glicose 10 g/L, peptona 5 g/L, fosfato de potássio monobásico 1 g/L, sulfato de magnésio heptahidratado 0,5 g/L, dicloran 2 mg/L e ágar 15 g/L (Pitt & Hocking, 1997), sem antibiótico e contendo 3 grãos de milho por placa. Todos os sistemas foram analisados em triplicata experimental.

Em seguida, foi preparado quatro controles e dois tratamentos que foram avaliados utilizando os sistemas descritos.

Os controles consistiram em: 1) grãos de milho tratados com calor úmido; 2) grãos de milho tratados com calor úmido e artificialmente infectado com *A. flavus/oryzae* UELZm4.106; 3) grãos de milho desinfetados superficialmente; e 4) grãos de milho tratados com calor úmido, infectado artificialmente com *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 e desinfetados superficialmente.

O preparo dos grãos de milho do controle 1, consistiu na submissão de 20 g de grãos de milho tratados com calor úmido, a 121 °C, 1 atm por 15 minutos, seguido de incubação a 28 °C por 5 dias. O controle 2 foi preparado com 20 g de grãos de milho submetidos a calor úmido e em seguida artificialmente infectados com 500 µL de 10⁶ conídios/mL de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106, e incubado sob as mesmas condições descritas no controle 1. O preparo do controle 3, consistiu na utilização de 20 g de grãos de milho desinfetados superficialmente por imersão em hipoclorito de sódio 0,4 % por 1 minuto, seguido lavagem com água destilada por 1 minuto e incubação. O controle 4, consistiu em utilizar 20 g de grãos de milho submetidos ao calor úmido, seguido de infecção com 10⁶ conídios/ mL de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106. Este controle foi incubado em estufa tipo B.O.D a 28 °C por 3 dias, desinfetados em seguida, por imersão em hipoclorito de sódio 0,4 % por 1 minuto e novamente, incubados. Todos os controles foram preparados em frascos Erlenmeyers (125mL), o qual foi retirado 3 grãos de milho e inseridos em placas de Petri contendo meio DG18 Dichloran Glicerol e 5 grãos de milho depositados em placas de Petri contendo papel filtro. Os sistemas controle foram incubados a 28 °C por 5 dias.

O preparo do tratamento 1, consistiu em utilizar 20 g de grãos de milho tratados com calor úmido e infectados artificialmente com *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 (500 µL de 10⁶ conídios/mL) e incubados a 28 °C por 3 dias. Em seguida, os grãos de milho foram desinfetados superficialmente, com hipoclorito de sódio 0,4 % e lavagem com água destilada. Os grãos deste tratamento foram imersos suspensão de 10⁸ UFC/ mL da linhagem de *Bacillus* sp. (UELAsF5.1, UELAsF4.66, UELAsF1.483 ou UELAsA1.447) preparada em 50 mL de meio de cultura DYGS durante 15 minutos. Os grãos foram secos superficialmente e depositados novamente em frascos Erlenmeyers (125 mL) e placas de Petri contendo meio DG18 ou papel filtro, e incubados a 28 °C por 5 dias.

O tratamento 2 foi preparado utilizando os sistemas de avaliação no qual os grãos de milho foram inicialmente desinfectados superficialmente e imersos em suspensão em 50 mL de meio DYGS contendo 108 UFC/mL de *Bacillus* sp., durante 15 minutos, seguido de secagem superficial e incubação a 28 °C por 5 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AÇÃO ANTAGÔNICA ENTRE ESPÉCIES DE *Bacillus* E *A. flavus/oryzae*

A partir dos procedimentos propostos foi possível verificar ação de inibição do crescimento de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 por linhagens de *Bacillus*, tanto pelo método de cultura pareada (Anexo A), quanto por difusão em ágar (Anexo B). Os dados expressos em porcentagem de inibição e diâmetro de colônia estão apresentados nas Tabelas 5 e 6. Dentre as 9 linhagens de *Bacillus* avaliadas, foi observado inibição significativa do crescimento de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 por quatro linhagens de *Bacillus* (UELAsF5.1, UELAsF4.66, UELAsF1.483 e UELAsA1.447).

A menor taxa de inibição foi dada por *Bacillus* sp. UELAsA1.447, enquanto as maiores porcentagem de inibição de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 foi dado por *Bacillus* sp. UELAsF5.1 e *Bacillus* sp. UELAsF4.66 (Tabela 5).

Tabela 5 – Porcentagem de inibição do crescimento de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 por linhagens de *Bacillus* e diâmetro de crescimento da colônia de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 por cultura pareada.

<i>Bacillus</i> sp.	Diâmetro de crescimento da colônia (mm) de <i>A. flavus/oryzae</i> UELZm4.106	% de inibição do crescimento de <i>A. flavus/oryzae</i> UELZm4.106
CONTROLE	44,83 ± 0,47 ^a	0
UELAsF5.1	30,33 ± 0,24 ^{d*}	32,34
UELAsF4.66	31,33 ± 0,62 ^{d*}	30,11
UELAsF1.483	33,17 ± 0,24 ^{c*}	26
UELAsA1.447	39,00 ± 0,41 ^{b*}	13
UELAsF2.2	44,70 ± 0,50 ^a	0
UELAsF2.47	44,88 ± 0,36 ^a	0
UELAsF2.79	44,80 ± 0,40 ^a	0
UELAsF4.7	44,74 ± 0,52 ^a	0
UELAsA3.44	44,78 ± 0,50 ^a	0

Os dados foram expressos por médias ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p -valor < 0,05) de acordo com teste de Tukey. (*) indica diferença significativa em relação ao controle.

O crescimento de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 apresentou redução média do diâmetro em relação ao controle, principalmente devido a ação antagônica do *Bacillus* sp. UELAsF5.1, cuja taxa de inibição média foi de 32,34 % (30,33 mm de

diâmetro. Estes dados são similares aos obtidos por Lima *et al.* (2014), que avaliaram, pelo método de cultura pareada, a ação antagonista de isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. no crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Os autores observaram que todos os isolados de *Bacillus* apresentaram ação antagonista..

Ansary *et al.* (2018) em seu estudo sobre os efeitos de três espécies de *Bacillus* contra *Sclerotinia sclerotiorum*, observaram, por cultura pareada, que a cepa BCL-1 inibiu o crescimento radial de *Sclerotinia sclerotiorum* em 69,1 %, *B. amyloliquefaciens* BDR-2 inibiu 66,7 % e *B. subtilis* BRtL-2 inibiu 54,7 %.

Nayak *et al.* (2020) descobriram que *Bacillus amyloliquefaciens* (BC1, BC2), *B. vallismortis* (BC5) e *B. subtilis* (BC6) são capazes de inibir o crescimento de *Aspergillus flavus* (A2 e A28) *in vitro*. A maior taxa de inibição (92,3 %) foi dada pelo BC5 inibindo o crescimento micelial de A2, seguido pelo BC6 (90 %) e a menor taxa foi de BC1 (88,6 %). Em relação a A28, a maior taxa foi dada por BC5 (87,3 %) e a menor BC6 (85 %).

Samaras *et al.* (2021) avaliaram a atividade antagonista *in vitro* de *Bacillus subtilis* MBI 600 contra patógenos do pepino, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* e *Pythium aphanidermatum*, pelo método de cultura pareada (também chamado de cultura dupla) e observou inibição do crescimento micelial de 26 % e 33 %, respectivamente, na presença de MBI 600 além da presença de formação de zona de inibição.

B. subtilis, *B. mycoides* e *B. thuringiensis* foram avaliados contra *A. westerdijkiae*, *A. ochraceus*, *A. flavus* e *A. parasiticus* pelo método de cultura dupla (Hlebová *et al.*; 2021). *B. mycoides* apresentou melhor capacidade inibitória contra *A. ochraceus* (82,96 %) e *A. westerdijkiae* (67,36 %), e a menor inibição de *A. flavus* (3,96 %). Em geral, a maior taxa de inibição foi dada pelo *B. thuringiensis*, com inibição de 92,43 % (*A. flavus*) seguida por *B. subtilis* (inibição de 91,54 % *A. flavus*). Em relação ao *B. thuringiensis*, não houve inibição quanto ao *A. westerdijkiae* e *A. parasiticus*.

Wu *et al.* (2022) avaliaram, por cultura pareada, 10 cepas bacterianas isoladas do solo da rizosfera de *Camellia sinensis* em relação a inibição de *A. flavus*. Das 10 cepas, apenas duas, identificadas como *Bacillus tequilensis* (B1) e *Bacillus velezensis* (B2) apresentaram efeitos inibitórios significativos com taxa de inibição de 34,22 % e 35,72 %, respectivamente.

Dentre as nove linhagens de *Bacillus* avaliadas em difusão em ágar (Anexo B) também houve ação de inibição do crescimento de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 pelas mesmas quatro linhagens *Bacillus* (UELAsF5.1, UELAsF4.66, UELAsF1.483 e UELAsA1.447) selecionadas em cultura pareada. As maiores taxas de inibição foram dadas por *Bacillus* sp. UELAsF5.1 (25,87 %) e *Bacillus* sp. UELAsF4.66 (25,11 %) (Tabela 6). No entanto, a menor taxa de inibição foi dado por *Bacillus* sp. UELAsF1.483, diferindo quanto aos dados obtidos por Cultura Pareada.

Tabela 6 – Porcentagem de inibição do crescimento de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 e diâmetro da colônia de linhagens de *Bacillus* pelo método de difusão em ágar.

<i>Bacillus</i> sp.	Diâmetro de crescimento (mm) de <i>Bacillus</i> sp.	% de inibição do crescimento de <i>A. flavus/oryzae</i> UELZm4.106
CONTROLE	0	0
UELAsF5.1	23,28 ± 0,27 ^a	25,87
UELAsF4.66	22,60 ± 0,11 ^a	25,11
UELAsF1.483	19,93 ± 0,62 ^b	22,14
UELAsA1.447	22,51 ± 0,43 ^a	25
UELAsF1.483	19,93 ± 0,62 ^b	22,14
UELAsF2.2	0	0
UELAsF2.47	0	0
UELAsF2.79	0	0
UELAsF4.7	0	0
UELAsA3.44	0	0

Os dados foram expressos por médias ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p -valor < 0,05) de acordo com teste de Tukey. (*) indica diferença significativa em relação ao controle.

. Os tratamentos com *Bacillus* sp. UELAsF5.1, *Bacillus* sp. UELAsF4.66 e *Bacillus* sp. UELAsA1.447 não apresentaram diferença significativa, apenas o tratamento com *Bacillus* sp. UELAsF1.483 apresentou diferença significativa.

5.2 AÇÃO ANTAGÔNICA Entre *Bacillus* spp. associados contra *A. flavus/oryzae* UELZm4.106

Foram avaliadas, pelo método de cultura pareada, seis combinações de *Bacillus* sp., resultantes das quatro linhagens selecionadas (UELAsF5.1, UELAsF4.66, UELAsF1.483 e UELAsA1.447) contra *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 (Anexo C). A

Tabela 7 apresenta a porcentagem de inibição do crescimento obtida por cada par de *Bacillus* spp..

Tabela 7 – Porcentagem de inibição do crescimento de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 e diâmetro de crescimento da colônia de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 diante da associação par a par de *Bacillus* spp. por cultura pareada.

Pares de <i>Bacillus</i> spp.	% de inibição do crescimento de <i>A. flavus/oryzae</i> UELZm4.106	Diâmetro de crescimento da colônia (mm) de <i>A. flavus/oryzae</i> UELZm4.106
CONTROLE	0	20,55 ± 0,32 ^{ab}
UELAsF5.1 + UELAsF4.66	19,27	16,59 ± 0,16 ^{d*}
UELAsF5.1 + UELAsF1.483	0	21,30 ± 0,18 ^a
UELAsF5.1 + UELAsA1.447	18,34	17,32 ± 0,77 ^{d*}
UELAsF4.66 + UELAsF1.483	0	20,31 ± 0,58 ^{bc}
UELAsF4.66 + UELAsA1.447	6,37	19,24 ± 0,12 ^{c*}
UELAsF1.483 + UELAsA1.447	0	20,26 ± 0,27 ^{ab}

Os dados foram expressos por médias ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p -valor < 0,05) de acordo com teste de Tukey. (*) indica diferença significativa em relação ao controle.

As quatro linhagens previamente selecionadas, quando avaliadas em pares, apresentaram menor porcentagem de inibição do crescimento de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 quando comparadas com os resultados obtidos ao utilizar linhagens individuais (Item 5.1, Tabela 5). Das seis combinações, apenas três combinações apresentaram diferença significativa, onde a porcentagem de inibição variou de 6,37 % a 19,27 %. Os pares *Bacillus* spp. UELAsF5.1 + UELAsF4.66 (19,27 %), *Bacillus* spp. UELAsF5.1 + UELAsA1.447 (18,34 %) e *Bacillus* spp. UELAsF4.66 + UELAsA1.447 (6,37 %) apresentaram taxa significativa de inibição do crescimento de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106.

Em relação aos resultados obtidos das linhagens de *Bacillus* quando avaliadas individualmente, a porcentagem de inibição máxima foi de 32,34 % (*Bacillus* sp. UELAsF5.1) enquanto a maior taxa de inibição de crescimento na associação de linhagens em pares foi de 19,27 % (*Bacillus* spp. UELAsF5.1 + UELAsF4.66). Essas duas linhagens de *Bacillus* (*Bacillus* sp. UELAsF5.1 e *Bacillus* sp. UELAsF4.66) também apresentaram as maiores porcentagens de inibição quando avaliadas individualmente.

Os microrganismos que habitam comunidades estão continuamente envolvidos em interações e competições dinâmicas por recursos limitados, tais como nutrientes

e espaço, fatores cruciais que, em última instância, desempenham papéis determinantes na evolução e no sucesso de uma comunidade (Granato *et al.*, 2019). Consequentemente, o entendimento dos mecanismos pelos quais as espécies bacterianas interagem, comunicam-se e evoluem, visando à coexistência ou à superação de competidores, (Niehaus *et al.*, 2019).

5.3 AÇÃO ANTAGÔNICA DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS

Considerando que os microrganismos como os *Bacillus* podem produzir alguns compostos antifúngicos, a cultura livre de células (ou extrato livre de células) obtida do cultivo em meio DYGS e LB foram utilizadas para avaliar a ação antagônica contra *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 por cultura pareada.

Os resultados obtidos demonstraram que mesmo em diferentes volumes (50 µL, 100 µL e 150 µL) do extrato livre de células (ELC) sobre as linhagens de *Bacillus* previamente selecionadas (Anexo E), não apresentaram inibição do crescimento de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106.

Gordillo *et al.* (2009) destacaram que a composição do meio de cultura e as condições de cultivo (pH e temperatura) de *Bacillus* sp. são fatores importantes a serem considerados para a produção de metabólitos com ação antifúngica, principalmente a adição de aminoácidos. Nos resultados apresentados pelos pesquisadores, as maiores taxas de inibição de crescimento fúngico ocorreram na presença de glicose (2 %).

Li *et al.* (2016) avaliaram, *in vitro*, a atividade antifúngica da suspensão celular e do sobrenadante livre de células de *Bacillus amyloliquefaciens* isolado SYBC H47 e concluíram que em ambos os ensaios a atividade antifúngica foi significativa contra *Botryosphaeria dothidea*, *Aspergillus niger*, *Mucor racemosus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum* e *Candida albicans*. Os resultados obtidos pela suspensão celular (22 – 30% de inibição) foram superiores 2 a 6 %, aos do sobrenadante livre de células (20 – 24% inibição).

Jiang *et al.* (2020) demonstraram que a iturina A é o principal metabólito secundário produzido por *B. subtilis* com ação de inibição de *Aspergillus carbonarius*. Pelo método de diluição em caldo os autores concluíram que a extensão do micélio de *A. carbonarius* foi significativamente inibida pela iturina A, com destaque para a

concentração de 10µg/ mL de iturina A., onde o peso seco do micélio de *A. carbonarius* foi <5 mg, enquanto no controle era >40 mg.

Li *et al.* (2022) afirmaram que os lipopeptídeos (LPs) produzidos por cepas de *Bacillus* têm efeito antifúngico. A cepa E2 (*Bacillus* spp.), antagonista contra *A. flavus*, foi identificada como *Bacillus velezensis* e a concentração inibitória mínima (CIM) de LPs avaliada. Após fermentação em meio LB, os LPs brutos foram coletados e depois extraídos com metanol e posteriormente filtrados, o metanol foi removido por vácuo. A substância extraída foi dissolvida em água destilada estéril e neutralizada. Após o pré-congelamento, foi liofilizado e se obteve um pó sólido castanho claro, os LPs. O efeito inibitório dos LPs sobre *A. flavus* se mostrou dependente da sua concentração, ou seja, quanto maior a concentração de LPs, maior a inibição de *A. flavus*. No estudo apresentado, foi possível concluir que a melhor concentração de LPs foi de 15 mg/ mL, porém, não houve diferença significativa no efeito inibitório a 10 mg/ mL e 15 mg/ mL ($p < 0,05$). Além disso, foi comparado o diâmetro da zona de inibição, pela concentração de 15 mg/ mL LPs o diâmetro atingindo 2,5 mg/ mL enquanto o diâmetro de inibição produzido pela suspensão da cepa E2 foi inferior, isto mostrou que o efeito antifúngico dos LPs, em alta concentração, foi melhor do que o das bactérias.

Qi *et al.* (2023) também avaliaram a atividade antifúngica de *Bacillus* sp. (*B. amyloliquefaciens* KRS005) e destacam a necessidade de otimização do meio de cultivo a ser utilizado na fermentação para a obtenção do ELC, para melhor atividade antifúngica.

Harčárová, *et al.* (2021) avaliaram 5 linhagens de *Lactobacillus* sp. e 2 linhagens de *Bacillus* sp. contra 2 linhagens de *Fusarium graminearum*. O ELC de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* não apresentaram atividade de inibição de *Fusarium*.

5.4 AÇÃO ANTAGÔNICA DE *Bacillus* sp. EM GRÃOS DE MILHO

Estudos anteriores também destacaram a atividade antifúngica de cepas *Bacillus* spp., como *B. subtilis*, evidenciando sua eficácia contra fungos patogênicos associados às doenças que afetam a cultura e os grãos de milho (Kupper *et al.*, 2003; Angonese *et al.*, 2009).

Nas avaliações da ação antagonica de *Bacillus* spp. previamente selecionados contra *A. flavus/oryzae* utilizando grãos de milho provenientes de armazenamento em silos e artificialmente infectado com *A. flavus/oryzae* UELZm4.106, foi possível

verificar inibição do crescimento de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 apenas por *Bacillus* sp. UELAsF5.1 (Tabela 8). A ausência de diferença significativa nos demais tratamentos, em relação ao controle, foi provavelmente, devido ao excesso de conídios introduzidos.

Tabela 8 – Porcentagem de inibição do crescimento de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 e contagem do número de conídios de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 (inoculado artificialmente) após tratamento com linhagens de *Bacillus*.

<i>Bacillus</i> sp.	Contagem de conídios de <i>A. flavus/oryzae</i> UELZm4.106	% de inibição do crescimento de <i>A. flavus/oryzae</i> UELZm4.106
Controle	$3,15 \times 10^6 \pm 5,00 \times 10^3^a$	0
UELAsF4.66	$3,09 \times 10^6 \pm 1,00 \times 10^4^a$	0,95
UELAsA1.447	$3,12 \times 10^6 \pm 3,00 \times 10^4^a$	1,9
UELAsF1.483	$3,09 \times 10^6 \pm 5,00 \times 10^3^{ab}$	1,9
UELAsF5.1	$2,86 \times 10^6 \pm 6,50 \times 10^4^{b*}$	8,25

Os dados foram expressos por médias $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p -valor $< 0,05$) de acordo com teste de Tukey. (*) indica diferença significativa em relação ao controle.

A maior taxa de inibição foi dada por *Bacillus* sp. UELAsF5.1 (8,25 %). As demais porcentagens de inibição do crescimento variaram de 0,95 % a 1,9 % e não foram significativas em relação ao controle.

Já nas avaliações da ação antagônica de *Bacillus* sp. previamente selecionados contra *A. flavus/oryzae* utilizando grãos de milho provenientes de armazenamento em silos, naturalmente infectados com fungos (Tratamento 2), foi possível verificar ação de inibição do crescimento de fungos por todas as linhagens avaliadas (Tabela 9) em relação ao controle.

Tabela 9 - Porcentagem de inibição do crescimento de fungos e contagem do número de conídios após tratamento com linhagens de *Bacillus*.

<i>Bacillus</i> sp.	Contagem de conídios em grãos de milho	% de inibição do crescimento de fungos em grãos de milho
CONTROLE	$1,80 \times 10^6 \pm 3,50 \times 10^4$ ^a	0
UELAsF1.483	$3,40 \times 10^5 \pm 1,00 \times 10^4$ ^{b*}	81,1
UELAsA1.447	$3,35 \times 10^5 \pm 1,50 \times 10^4$ ^{b*}	81,4
UELAsF5.1	$2,55 \times 10^5 \pm 3,50 \times 10^4$ ^{b*}	85,83
UELAsF4.66	$2,00 \times 10^5 \pm 3,00 \times 10^4$ ^{b*}	88,89

Os dados foram expressos por médias $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p -valor $< 0,05$) de acordo com teste de Tukey. (*) indica diferença significativa em relação ao controle.

A maior porcentagem de inibição do crescimento foi dada por *Bacillus* sp. UELAsF4.66 (88,89 %), enquanto que, a menor porcentagem de inibição do crescimento (81,1%) foi dada na presença de *Bacillus* sp. UELAsF1.483,

O valor da atividade de água (A_w) é um fator crítico para o desenvolvimento de fungos em grãos de milho armazenados. As condições de armazenamento cuja $A_w > 0,7$ e o longo tempo de armazenamento (3 – 9 meses) resultam frequentemente em perdas de qualidade do milho (Taher *et al.*, 2019).

Os grãos de milho utilizados neste estudo apresentaram A_w inicial de 0,67, considerado moderadamente favorável ao desenvolvimento de fungos em grãos de milho armazenados. Isso ocorre porque a maioria dos fungos associados aos grãos de milho, como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, pode produzir micotoxinas em condições de A_w relativamente baixas, embora o crescimento seja mais lento do que em valores mais elevados.

A_w abaixo de 0,6 é considerado seguro para o armazenamento de grãos de milho, após o processo de envelhecimento dos grãos de milho os grãos atingiram $A_w 0,59$.

Outros fatores como temperatura e umidade relativa, também devem ser considerados em conjunto com a atividade de água para garantir condições adequadas de armazenamento e evitar a contaminação por fungos.

Observando as placas de Petri contendo papel filtro (Anexo F) e meio DG18 Dichloran Glicerol, sem antibiótico (Anexo G), podemos afirmar que os grãos estavam

naturalmente infectados e os fungos foram controlados nas condições em que as linhagens de *Bacillus* foram utilizadas.

Em estudo *in vitro* apresentado por Einloft *et al.* (2021), os autores avaliaram três *Bacillus* spp. em relação ao controle do crescimento de *A. flavus*, observaram que todas as linhagens reduziram significativamente o crescimento micelial do fungo. *Bacillus safensis* RF69 foi responsável pela menor taxa de inibição (73,2 %), enquanto que, a maior taxa foi dada *Bacillus* sp. RP242 (78,2 %), seguido por *Bacillus* sp. RP103 (76,8 %). Já nos grãos de milho, a maior redução de *A. flavus* foi obtida com *Bacillus* sp. RP103 (89,7 %), seguido por *Bacillus* sp. RP242 (56,4 %) e *Bacillus safensis* RF69 (44,5 %).

. A variação nas taxas de inibição do crescimento entre as distintas linhagens de *Bacillus* demonstra que cada linhagem apresenta um *background* genético distinto, apresentando respostas específicas,

O gênero *Bacillus* tem desempenhado um papel significativo na agricultura moderna como agente biológico.(Liu *et al.*, 2023).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos, das nove linhagens de *Bacillus*, quatro - *Bacillus* sp. UELAsF5.1, *Bacillus* sp. UELAsF4.66, *Bacillus* sp. UELAsF1.483 e *Bacillus* sp. UELAsA1.447 - demonstraram capacidade de inibição contra *A. flavus/oryzae* UELZm4.106. Torna-se evidente que essas linhagens de *Bacillus* podem desempenhar um papel fundamental no controle de fungos em grãos de milho armazenados.

A inibição observada por essas linhagens sugere uma possível aplicação prática na redução do desenvolvimento de *A. flavus/oryzae* e outros fungos presentes no armazenamento dos grãos de milho.

Essa estratégia não apenas visa preservar a qualidade dos grãos, mas também contribui para a redução de perdas econômicas significativas associadas à contaminação fúngica. Consequentemente, esses resultados abrem caminho para futuras pesquisas e aplicações práticas visando a segurança alimentar e a sustentabilidade na produção de milho.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H. K.; CARTWRIGHT, R. D.; XIE, W.; SHIER, W. T. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. **Journal of Crop Protection**, v. 25, n. 1, p. 1-9, 2005.
- ADANIYA, Z. N. C. **Micotoxinas no Milho Roxo Peruano**. Dissertação Mestrado (Pós-Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Santa Maria, RS, 2017.
- AFSAH-HEJRI, L.; HAJEB, P.; EHSANI, R. J. Application of ozone for degradation of mycotoxins in food: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p.1777-1808, 2020.
- ALLWOOD, J. W.; ELLIS, D. I.; GOODACRE, R. Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant–host interactions. **Physiologia plantarum**, v. 132, n. 2, p. 117-135, 2008.
- AMARAL, L.A.; ASCARI, J.; DUARTE, W.M.; MENDES, I.R.N. Efeito de doses de gesso agrícola na cultura do milho e alterações químicas no solo. **Revista Agrarian**; Dourados, v.10, n.35, p. 31-41, 2017.
- AMINU, M., KETA, J. N. Study of fungi on stored maize (*Zea mays* L.) in Kebbi State, Nigeria. **Journal of Current Opinion in Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 55-59, 2021.
- AMORAS, E.S.; COSTA, A.L.P. Aflatoxicoses: uma revisão das manifestações clínicas em seres humanos e animais. **Revista Arquivos Científicos**, v. 4, n. 1, p. 47-53, 2021.
- ANDRADE, M.A.; LANÇAS, F.M. Estado-da-arte na análise cromatográfica de Ocratoxina A em amostras de alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 1, p. 31-52, jan./2015.
- ANGONESE, M. T.; DELLA-GIUSTINA, J.; PAIM, L. H.; PANSERA, M. R.; PAGNO, R. S.; MEZZOMO, F.; ZORZI, E.; PEREIRA, C. O. F.; RIBEIRO, R. T. S. Fungistatic effect of *Bacillus* spp. on plant pathogenic fungi. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 97-100, 2009.

ANSARY, W. R.; PRINCE, F. R. K.; HAQUE, E.; SULTANA, F.; WEST, H. M.; RAHMAN, M.; MONDOL, A. M.; AKANDA, A. M.; RAHMAN, M.; CLARKE, M. I.; ISLAM, T. Endophytic *Bacillus* spp. from medicinal plants inhibit mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* and promote plant growth. Zeitschrift für Naturforschung: **A Journal of Biosciences**, v. 25, n. 73(5-6), p. 247-256, 2018.

ANVISA. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Instrução Normativa nº 160, de julho de 2022. Dispõe sobre novos Limites Máximos Toleráveis (LMT) de contaminantes em alimentos. Brasília-DF, 2022

APRODU, I.; BANU, I. Co-occurrence of fumonisins and T-2 toxins in milling maize fractions under industrial conditions, CyTA - **Journal of Food**, v. 13, n. 1, p. 102-106, 2015.

ARAÚJO, R. I.; FREIRE, C.; CRUZ, S.; PETERS, L. P.; FERREIRA, J. Identificação De Isolados De Fusarium Encontrados Em Grãos De Milho Durante O Armazenamento Em Silos No Estado Do Acre. **Enciclopedia Biosfera**, [S. l.], v. 18, n. 38, 2021.

ARRUDA, A. D.; BERETTA, A. L. R. Z. Micotoxinas e seus efeitos à saúde humana: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 51, n. 4, p. 286-289, 2019.

AWUCHI, C.G.; ONDARI, E.N.; NWOZO, S.; ODONGO, G.A.; ESEOGHENE, I.J.; TWINOMUHWEZI, H.; OGBONNA, C.U.; UPADHYAY, A.K; ADELEYE, A.O.; OKPALA, C.O.R. Mycotoxins' toxicological mechanisms involving humans, livestock and their associated health concerns: A Review. **Toxins**, v.14, p.167, 2022.

BAHNIUK, G.; CORSINI, L.M.; MÜLLER, M.; PEREIRA, G.M.P.; BATISTA, K.Z.S. Micotoxinas e micotoxicoses em cães. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 19, n. 1, e38135, 2021.

BALBINOT, W.G. **Inoculação de *Bacillus* sp. na cultura do milho (*Zea Mays* L.) como promotor de crescimento**. 2018. 48f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Agronomia) - campus Curitibaanos da Universidade Federal de Santa Catarina. Curitibaanos, 2018.

BARROS, J.F.C.; CALADO, J.G. **A cultura do milho**. 2014. 53f. Évora: Universidade Évora, Escola de Ciências e Tecnologia - Departamento de Fitotecnia, 2014.

BATISTELLA, T. **Incidência e identificação de fungos e bactérias de *Allium sativum* fresco e armazenado**. Orientador: Prof. Dra. Daniele Sartori. 2022. 55 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

BERTUZZI, T.; ROMANI, M.; RASTELLI, S.; GIORNI, P. Mycotoxins and Related Fungi in Italian Paddy Rice During the Growing Season and Storage. **Toxins**, v. 11, n. 3, p. 151, 2019.

BHAT, N.A.; WANI I.A.; HAMDANI A.M; GANI A.; MASOODI, F.A. Physicochemical properties of whole wheat flour as affected by gamma irradiation, **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 175-183, 2016.

BOCATE, K.C.P. **Compostos naturais como agentes antifúngicos e descontaminantes de micotoxinas em milho estocado**. 2020. 171f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Curitiba, 2020.

BRAGOTTO, A.P.A. **Compostos Tóxicos de Origem Natural: Fungos**. Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP. Campinas – SP. 2016.

BRITO, V.D.; ACHIMON, F.; ZUNINO, M.; ZYGADLO, J.; PIZZOLITTO, R.P. Fungal diversity and mycotoxins detected in maize stored in silo-bags: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 7, p. 2640-2650, 2022.

BULLERMAN, L. B. Significance of mycotoxins to food safety and human health. **J. Food Prot.**, v. 42, n. 1, p. 65-86, 1979.

CARÃO, A.C.P.; BURBARELLI, M.F.C.; POLYCARPO, G.V.; SANTOS, A.R.; ALBUQUERQUE, R.; OLIVEIRA, C.A.F. Métodos físicos e químicos de detoxificação de aflatoxinas e redução da contaminação fúngica na cadeia produtiva avícola. **Cienc. Rural**, v. 44, n. 4, 2014.

CASTELLARI, C.C.; CENDOYAA, M.G.; VALLE, F.J.M.; BARRERA, V.; PACIN, A.M. Factores extrínsecos e intrínsecos asociados a poblaciones fúngicas micotoxigénicas de granos de maíz (*Zea mays* L.) almacenados en silos bolsa en Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v.47, p.350-359, 2015.

CHAN, Y.K.; MCCORMICK, W.A.; SEIFERT, K.A. Characterization of an antifungal soil bacterium and its antagonistic activities against *Fusarium* species. **Canadian journal of microbiology**, v. 49, n. 4, p. 253-262, 2003.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2022/23**. 12º Levantamento. Setembro, 2023.

CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2023/24. 5º Levantamento, v. 11, n. 5. Fevereiro, 2024.

CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2022/23. 6º Levantamento. Março, 2024.

CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento**. Apresentação da Safra 2022/23. 12º Levantamento. Setembro, 2023.

CONTINI, E.; MOTA, M.M.; MARRA, R.; BORGHI, E.; MIRANDA, R.A.; SILVA, A.F.; SILVA, D.D.; MACHADO, J.R.A.; COTA, L.V.; COSTA, R.V.; MENDES, S.M. **Milho - Caracterização e Desafios Tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa; Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2019.

COSTA, N. de J. F.; SILVA, M. S. B. dos S.; SILVA, E. K. C.; OLIVEIRA, A. C. S. de; RODRIGUES, A. A. C. Tratamento térmico e biológico de sementes de alface no controle de fungos fitopatogênicos. **Diversitas Journal**, v. 7, n. 2, 2022.

COSTA, R. V.; SIMON, J.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; ALMEIDA, R. E. M.; LANZA, F. E.; LAGO, B. C.; PEREIRA, A. A.; CAMPOS, L. J. M.; FIGUEIREDO, J. E. F. Yield losses in off-season corn crop due to stalk rot disease. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 54, 2019

COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: Sharma RP, Salunkhe DK. **Mycotoxins and phytoalexins**, p.103-43, 1991.

DE LA CRUZ-QUIROZ, R.; ROUSSOS, S.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.;
HERNANDEZ-CASTILLO, D.; AGUILAR, C. N. Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strains. **Karbala International Journal of Modern Science**, v. 4, n. 2, p. 237-243, 2018.

DE QUEIROZ, A. M.; GOMES, F. A.; QUEIROZ, S. L. de O.; DE FREITAS, H. J.;
ROSA, B. L.; DE SOUZA, E. M. Avaliação bromatológica de milho armazenado em
embalagens com ausência de oxigênio e umidade / Bromatological evaluation of
corn stored in packages with absence of oxygen and moisture. **Brazilian Journal of
Development**, v. 6, n. 6, p. 38942–38959, 2020.

DIAS, A. S. Micotoxinas em produção de origem animal. **Revista Científica de
Medicina Veterinária**. Periódico Semestral, n. 30, 2018

DORIGHELLO, D. V. **Versatilidade de *Bacillus* spp. no controle biológico de
doença de plantas e na promoção de crescimento de soja**. 2017. 136f. Tese
(Doutorado em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas da
Unesp, Botucatu, 2017.

DORIGHELLO, D. V.; FORNER, C.; DE CAMPOS, R. M. V. B.; BETTIOL, W.
Management of Asian soybean rust with *Bacillus subtilisin* sequential and alternating
fungicide applications. **Australasian Plant Pathology**, v. 49, n. 1, p. 79-86, 2020.

DORIGHELLO, D.; BETTIOL, W.; MAIA, N.; LEITE, R. Controlling Asian soybean
rust (*Phakopsora pachyrhizi*) with *Bacillus* spp. and coffee oil. **Crop Protection**, v.67,
p. 59-65, 2015.

DORN, T.W.; JACKSON-ZIEMS, T.A. Grain Storage Management to Minimize Mold
and Mycotoxins. **Papers in Plant Pathology**, v. 538, p. 14–15, 2013

DURAIRAJ, K.; VELMURUGAN, P.; PARK, J.H.; CHANG, W. S.; PARK, Y. J.;
SENTHILKUMAR, P.; CHOI, K. M.; LEE, J. H.; OH, B.T. An investigation of
biocontrol activity *Pseudomonas* and *Bacillus* strains against *Panax ginseng* root rot
fungal phytopathogens. **Biological Control**, v. 125, p. 138-146, 2018.

DUTRA, A.; VIEIRA, R. Envelhecimento acelerado como teste de vigor para sementes de milho e soja. **Ciência Rural**, v. 34, 2004.

EDINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, n. 1, p. 42-44, 1971. ABBAS, H. K.; CARTWRIGHT, R. D.; XIE, W.; SHIER, W. T. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. **Journal of Crop Protection**, v. 25, n. 1, p. 1-9, 2005.

EINLOFT, T.; OLIVEIRA, P.; VERAS, F.; WELKE, J.; MALLMANN, C.; DILKIN, P.; DIONELLO, R. Effect of *Bacillus* spp. on *Aspergillus westerdijkiae* growth, sporulation and ochratoxin A production in green-coffee medium. **Ciência E Tecnologia De Alimentos**, v. 37, p. 24-27, 2017.

EINLOFT, T.C; DE OLIVEIRA, P.B; RADÜNZ, L. L.; DIONELLO, R.G. Biocontrol capabilities of three *Bacillus* isolates towards aflatoxin B1 producer *A. flavus* *in vitro* and on maize grains. **Food Control**, v. 125, 2021.

ELIAS, M.C. Manejo tecnológico da secagem e do armazenamento de grãos. **Editora Universitária / UFPel**, Pelotas, 2018.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de Produção Embrapa. Sistema de Produção, 1. Versão Eletrônica. Ed. 9. Nov. 2015.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Pragas de Grãos Armazenados. Portal Embrapa. 2021.

FAO. The State of Food Security and Nutrition in the World 2022. **Repurposing food and agricultural policies to make healthy diets more affordable**. Rome, FAO.

FERNANDES, B. P. O papel da atividade de água na indústria alimentícia. **Artigo BTA Aditivos**, 2020.

FERNANDES, J.I.M.; BALDO, A.S.; FERREIRA, A.C.P.; SCHUOFF, J.S.; REUTER, A.H.; SALINAS, B.C.D. Effect of adsorbents on diets with corn

contaminated by mycotoxins on the productive performance and health of broilers. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v.44, 2022.

FERREIRA, M. J. ***Bacillus* spp. e *Trichoderma asperellum* no biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae***. Cruz das Almas, Bahia, 2021. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

FIRA, D.; DIMKIĆ, I.; BERIĆ, T.; LOZO, J.; STANKOVIĆ, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, v. 285, p. 44-55, 2018.

FOOD SAFETY BRAZIL. **A diferença entre Atividade de Água (Aw) e o Teor de Umidade nos alimentos**. 2016.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. **Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal**. Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, p. 48, 2007.

GABRIEL, L. C.; PEREIRA, C. B.; BAVIA, G. P.; COAN, M.; DONEL, A. A.; TESSMANN, D. J.; SCAPIM, C. A. Avaliação da resistência de genótipos de milho pipoca ao acúmulo de fumonisinas e à podridão de *Fusarium* da espiga. *Summa Phytopathol*, v. 44, n. 3, p. 286-288, 2018.

GALINDO, F. S.; ZOCOLER, J. L.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; SANTINI, J. M. K.; LUDKIEWICZ, M. G. Z.; BUZETTI, S. Teor de água nos grãos, em ocasião de colheita nas perdas ocorridas no milho. *Revista Cultura Agronômica*, v. 26, n. 4, p. 671-682, 2017.

GASPERINI, A.M.; GARCIA-CELA, E.; SULTYOK, M.; MEDINA, A.; MAGAN, N. Fungal diversity and metabolomic profiles in GM and isogenic non-GM maize cultivars from Brazil. *Mycotoxin Research*, v. 37, p. 39-48, 2021.

GOLDBLATT, L. A. Implications of mycotoxins. *Clin. Toxicol.*, v. 5, p. 453-458, 1972.

GORDILLO, M.A.; NAVARRO, A.R.; BENITEZ, L.M.; DE PLAZA, M.I.T.; MALDONADO, M.C. Preliminary Study and Improve the Production of Metabolites with Antifungal Activity by a *Bacillus* sp. Strain IBA 33. **Microbiology Insights**, v. 2, p. MBI.S995. 2009.

GRANATO, E.T.; MEILLER-LEGRAND, T.A.; FOSTER, K.R. The evolution and ecology of bacterial warfare. **Curr. Biol.**, v. 29, p. R521–R537, 2019.

GUPTA, G.; PARIHAR, S.; AHIRWAR, N.; SNEHI, S. K.; SINGH, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **Journal of Microbiol and Biochemical Technology**, v. 7, p. 96-102, 2015.

GYÖRI, Z. **Corn: Grain - Quality characteristics and management of quality requirements**. 2017.

HARČÁROVÁ, M.; ČONKOVÁ, E.; NAŘ, P.; VÁCZI, P.; PROŠKOVCOVÁ, M. In vitro inhibitory activity of cell-free supernatants of *Bactobacillus* spp. and *Bacillus* spp. against *Fusarium graminearum*l. **Folia Veterinaria**, v. 65 (3), p. 9-14, 2021.

Higashi A. **Antagonismo da Cepa LABIM22 de *Bacillus* sp. Frente a Fungos Fitopatógenos e Biocontrole do Mofo Branco em Sementes de Soja**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina. 2020

HLEBOVÁ, M.; UZSÁKOVÁ, V.; CHAROUSOVÁ, I.; HLEBA, L. The *in vitro* antagonistic effects of some *Bacillus* spp. On the growth and mycotoxin production of toxigenic *Aspergilli*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 11, n. 3, p. e5412–e5412, 2021.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. **Anais...** Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, v. 7, p. 138-161, 2010.

JAKUES, L. B. A.; ELY, A.; HAREBERLIN, L.; MEDEIROS, E. P.; PARAGINSKI, R. T. Efeitos da temperatura e da umidade dos grãos de milho nos parâmetros de qualidade tecnológica. **Revista Eletrônica Científica Da UERGS**, v.4, n.3, p. 409-420, 2018.

JIANG, C.; LI, Z.; SHI, Y.; GUO, D.; PANG, B.; CHEN, X.; SHAO, D.; LIU, Y.; SHI, J. *Bacillus subtilis* inhibits *Aspergillus carbonarius* by producing iturin A, which disturbs the transport, energy metabolism, and osmotic pressure of fungal cells as revealed by transcriptomics analysis. **International journal of food microbiology**, v. 330, p. 108783, 2020.

KIM Y.S.; BALARAJU K.; JEON Y. Effects of rhizobacteria *Paenibacillus polymyxa* APEC136 and *Bacillus subtilis* APEC170 on biocontrol of postharvest pathogens of apple fruits. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 17, p. 931–940, 2016

KULIMUSHI, P.Z.; ARIAS, A. A.; FRANZIL, L.; STEELS, S.; ONGENA, M. Stimulation of Fengycin-Type Antifungal Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the Presence of the Maize Fungal Pathogen *Rhizomucor variabilis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, n. 8, 2017.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.

LABEGALINI, N.S.; BUCHELT, A.C.; ANDRADE, L.; OLIVEIRA, S.C.; CAMPOS, L.M. Desenvolvimento da cultura do milho sob efeitos de diferentes profundidades de compactação do solo. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 3, n. 4, p. 7-11, 2016.

LAZZARI, F. A. Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações. **Revista dos Tribunais**, ed.2, p. 148, 1997.

LEE, J.T.; JESSEN, K.A.; BELTRAN, R.; STARKL, V.; SCHATZMAYR, G.; BORUTOVA, R. CALDWELL, D.J. Effects of mycotoxin-contaminated diets and deactivating compound in laying hens: 2. Effects on white shell egg quality and characteristics. **Poultry Science**, v. 91, p. 2096–2104, 2012.

LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEE, P.; CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold

pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest. Biology and Technology**, v.48, p.113-121, 2008.

LEITE, M.; FREITAS, A.; SILVA, A.S.; BARBOSA, J.; RAMOS, F. Maize food chain and mycotoxins: A review on occurrence studies, **Trends in Food Science & Technology**, v.115, p.307-331, 2021.

LI, S.; XU, X.; ZHAO, T.; MA, J.; ZHAO, L.; SONG, Q.; SUN, W. Screening of *Bacillus velezensis* E2 and the Inhibitory Effect of Its Antifungal Substances on *Aspergillus flavus*. **Foods**, 2022.

LI, X.; ZHANG, Y.; WEI, Z.; GUAN, Z.; CAI, Y.; LIAO, X. Antifungal Activity of Isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the Biocontrol of Peach Gummosis. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. e0162125, 2016.

LIMA, M.C.P. de. **Identificação de fungos produtores de micotoxinas em grãos de milho destinados à produção de ração animal**. 2023. 55 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

LIMA, O. D. R.; OLIVEIRA, L. J. M.; SILVA, M. S. B. S.; RODRIGUES, A. A. C. Ação antifúngica *in vitro* de isolados de *Bacillus* ssp. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 4, p. 57-64, 2014.

LIU Y.; YAN B.; WANG Y.; ZHOU Y. Will land transfer always increase technical efficiency in China? — A land cost perspective. **Land.**, v. 82, p. 414-421, 2019.

LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ, G.J.; LEYVA-MADRIGAL, K.Y.; SÁNCHEZ-PEÑA, P.; QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; MALDONADO-MENDOZA, I.E. *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 controls maize stalk and ear rot in Sinaloa, Mexico. **Field Crops Research**, v. 176, p.11–21, 2015.

MAIA, K.M.; ALCALDE, C.R.; BARBOSA, M.A.; MARCATO, S.M. Micotoxinas e adsorventes na alimentação animal. **Ciênc. Anim.**, v. 31, n.4, p. 82–91, 2021.

MARTINS, S.J.; MEDEIROS, F.H.V. de; DE SOUZA, R.M.; FARIA, A.F. de; CANCELLIER, E.L.; SILVEIRA, H.R. de O.; REZENDE, M.L.V. de; GUILHERME, L.R.G. Common bean growth and health promoted by rhizobacteria and the

contribution of magnesium to the observed responses. **Applied Soil Ecology**, v. 87, p. 49–55, 2015.

MEDEIROS, W. S. de O. **Materiais E Tecnologia Associados Para Detecção De Micotoxinas**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Materiais) - Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2021.

MENDES, J. L.; ALMEIDA, F. B.; AMORIM, L. Eficácia do biofungicida no controle de *Aspergillus flavus* em sementes de milho. **Revista Agro@mbiente**, v. 13, n. 2, p. 200-206, 2019.

MENEZES, H.C.; DE LIMA, M.A.C.; OLIVEIRA, F.D.L.; SOUZA, C.A.; SANTOS, P.J.C.; SILVA, J.B.D. Atividade de extratos vegetais no controle de fitopatógenos *in vitro* e *in vivo*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 17, n. 33, p. 322-332, 2020.

MIRANDA, R.A. de. Uma história de sucesso da civilização. **A Granja**, v. 74, n. 829, p. 24-27, 2018.

MISIHAIABGWI, J.M.; EZEKIEL, C.N.; SULYOK, M.; SHEPHARD, G.S.; KRSKA, R. Mycotoxin contamination of foods in Southern Africa: A 10-year review (2007–2016), Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**, v.59, p. 43-58, 2019.

MOHALE, S.; MEDINA, A.; RODRIGUEZ, A.; SULYOK, M.; MAGAN, N. Mycotoxigenic fungi and mycotoxins associated with stored maize from different regions of Lesotho. **Mycotoxin Research**, v. 29, n. 4, p. 209-219, 2013.

MONTINO, S.P. Uso do *Bacillus subtilis* como agente de biocontrole de fitopatógenos da cultura de soja. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, 2021.

MORATH, S. U.; HUNG, R.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biol Rev**, v. 26, p. 73–83, 2012.

MUHAMADALI, H; XU, Y.; ELLIS, D. I.; TRIVEDI, D. K.; RATTRAY, N. J.; BERNAERTS, K.; GOODACRE, R. Metabolomics investigation of recombinant

mTNF α production in ***Streptomyces lividans***. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 157, 2015.

MUNHOZ, A. T.; CARVALHO, R. V.; QUERALES, P. J.; GONÇALVES, F. P.; CAMARGO, L. E. A. Relação entre resistência de linhagens tropicais de milho à podridão de espiga e ao acúmulo de fumonisinas provocados por *Fusarium verticillioides*. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 2, p. 144-148, 2015.

MUNKVOLD, G. P.; ARIAS, S.; TASCHL, I.; GRUBER-DORNINGER, C. Mycotoxins in corn: Occurrence, impacts, and management. **Corn**, p. 235-287, 2019.

NAVYA, H.M.; NAVEEN, J.; HARIPRASAD, P.; NIRANJANA, S.R. Beneficial rhizospheric microorganisms mediated plant growth promotion and suppression of aflatoxigenic fungal and aflatoxin contamination in groundnut seeds. **Annals of Applied Biology**, v. 167, p. 225–235, 2015.

NEME, K.; MOHAMMED, A. Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. **Food Control**, v.78, p.412–425, 2017.

NIEHAUS L.; BOLAND I.; LIU M.; CHEN K.; FU D.; HENCKEL C.; CHAUNG K.; MIRANDA S.E.; DYCKMAN S.; CRUM M. Microbial coexistence through chemical-mediated interactions. **Nat. Commun**, 2019.

OKOTH, S. Toxigenic potential of *Aspergillus* species occurring on maize kernels from two agro-ecological zones in Kenya. **Toxins**, v.4, n.11, p.991-1007, 2012.

OLIVEIRA, C.M.N.O. **Qualidade físico-química de sementes de milho tratadas com Moringa Oleifera Lam. durante o armazenamento**. 2017. 69f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Católica de Pernambuco. Recife, 2017.

OLIVEIRA, D.E.C.; SANTOS, M.N.S.; RUFATTO, S. Forma e tamanho dos grãos de milho da cultivar P3646 submetidos a diferentes condições de ar de secagem. **Nativa**, v. 2, n. 3, p. 162-165, 2014.

OLIVEIRA, J.; SALES, J.; RUBIO-NETO, A.; SILVA, C.; SOARES, M.; SILVA, F. Biological Control in the Germination of Seeds from Two Species Native of the Cerrado Region. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 1, 2021, p. 105-113, 2021.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.-L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v.9, p.1084-1090, 2007.

PARAGINSKI, R.T.; ROCKENBACH, B.A.; SANTOS, R.F. dos; ELIAS, M.C.; OLIVEIRA, M. de. Qualidade dos grãos de milho armazenados em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Eng. Agrícola e Ambiental**, v.19, n.4, p. 358-363, 2015.

PIMENTEL, M. A. G.; FONSECA, M. J. O. **Secagem e Armazenamento. Embrapa Milho e Sorgo**, 2011

PITT, J.I. Toxigenic Fungi and Mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v.56, p.184–192, 2000.

QI, H.Y.; WANG, D.; HAN, D.; SONG, J.; ALI, M.; DAI, X.F.; ZHANG, X.J.; CHEN, J.Y. Unlocking antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* KRS005 to control gray mold. **Frontiers in microbiology**, v. 14, p. 1189354, 2023.

QUEVEDO, A.C.; MUNIZ, M.F.B.; SAVIAN, L.G.; SARZI, J.S.; SALDANHA, M.A. Ação antagonista *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum*. **Ciência Florestal**, v.32, p. 2288-2303, 2023.

RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD_ALLAH, E. F. *Bacillus*: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 2017.

RAUDIENE, E.; RUŠINSKAS, D.; BALČIŪNAS, G.; GRAŽINA, J. Carbon dioxide respiration rates in wheat at various temperatures and moisture contents. **Journal of metrology society of India**; v. 32, n.1, p. 51-58, 2017.

REN, X.; ZHANG, Q.; ZHANG, W.; MAO, J.; LI, P. Control of aflatoxigenic molds by antagonistic microorganisms: Inhibitory behaviors, bioactive compounds, related mechanisms, and influencing factors. **Toxins**, v. 12, 2020.

ROCHA, M.P.; TAVEIRA, J. H.S.; PRADO, S.M.A.; ATAÍDE, M.V. Sistema de armazenamento e incidência dos principais fungos produtores de micotoxinas em grãos. **Brazilian Journal of Development**; [S. l.], v. 6, n. 7, p. 50176–50193, 2020.

RStudio Team (2022). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA

RYU, C.M.; FARAG, M.A.; HU, C.-H.; REDDY, M.S.; KLOEPPER, J.W.; PARÉ, P.W. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.134, p.1017–1026, 2004.

SADHASIVAM, S.; BRITZI, M.; ZAKIN, V.; KOSTYUKOVSKY, M.; TROSTANETSKY, A.; QUINN, E.; SIONOV, E. Rapid detection and identification of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in stored wheat grain. **Toxins**; v. 9, n. 10, p. 302, 2017.

SAMARAS, A.; NIKOLAIDIS, M.; ANTEQUERA-GÓMEZ, M.L.; CÁMARA-ALMIRÓN, J.; ROMERO, D.; MOSCHAKIS, T.; AMOUTZIAS, G. D.; KARAOGLANIDIS, G. S. Whole Genome Sequencing and Root Colonization Studies Reveal Novel Insights in the Biocontrol Potential and Growth Promotion by *Bacillus subtilis* MBI 600 on Cucumber. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2021.

SANTOS, S.C. **Características nutricionais e físicas do milho com diferentes texturas e tempos de armazenamento**. 2015. 106f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Goiânia-GO, 2015.

SARTORI, A. V.; DE MATTOS, J. S.; SOUZA, Y. P.; DOS SANTOS, R. P.; PAULINO DE MORAES, M. H.; DA NÓBREGA, A. W. Determination of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1 and G2 in peanut by modified QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 3, n. 3, p. 115–121, 2015.

SAVI, G. D.; ZENAIDE, F. D. S. Micotoxinas: riscos à saúde humana pela ingestão diária de alimentos contaminados e sua ocorrência em amostras clínicas. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 4, 2020.

SHODA, M. Bacterial control of plant diseases. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 515-521, 2000.

SILVA, D.D.; COSTA, R.V.; COTA, L.V.; LANZA, F.E.; GUIMARAES, E.A. **Micotoxinas em cadeias produtivas do milho: riscos à saúde animal e humana**. Sete Lagoas-MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2015.

SOUTO, P.; AUGUSTO, L.; GREGORIO, M.; OLIVEIRA, C. Principais micotoxicoses em suínos. **Veterinária e Zootecnia**, v.24, 2017.

SUANTHIE, Y.; COUSIN, M.A.; WOLOSHUK, C.P. Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. **Journal of Stored Products Research**, v. 45, n. 2, p. 139-145, 2009.

TADEI, N.S.; SILVA, N.C.C.; IWASE, C.H.T.; ROCHA, L.O. Micotoxinas de *Fusarium* na produção de cerveja: características, toxicidade, incidência, legislação e estratégias de controle. **Scientia Agropecuaria**, v. 11, n. 2, p. 247-256, 2020.

TAHER, H.; URCOLA, H.; BARTOSIK, R.; CENDOYA, M.G. Characterization of the silo bag use in Buenos Aires province. **Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias**, v. 3, p. 1-6, 2019.

TRAVAGLIA, D.P. **Crescimento de *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxina em grãos de milho armazenados sob diferentes temperaturas**. 2011. 64f. Dissertação (Mestrado em Construções rurais e ambiência; Energia na agricultura; Mecanização agrícola; Processamento de produto) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2011.

TROJAN, D.G. **Manejo de doenças da cultura do milho: óleos essenciais, fungicidas e híbridos**. 2016. 234f. Tese (Doutorado em Agronomia - Área de Concentração: Agricultura), Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2016.

VALMORBIDA, R. **Fungos e micotoxinas em grãos de milho (*Zea mays* L.) e seus derivados produzidos no estado de Rondônia, Região Norte do Brasil.**

Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em Ciência dos alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2016.

VEDOVATTO, M. G.; BENTO, A. L.; KIEFER, C.; SOUZA, K. M. R.; FRANCO, G. L. Micotoxinas na dieta de bovinos de corte: revisão. **Archivos de zootecnia**, v. 69, n. 266, p. 234-244, 2020.

VEGI, A.; WOLF-HALL, C.E. Multiplex real-time PCR method for detection and quantification of mycotoxigenic fungi belonging to three different genera. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 1, p. M70-M76, 2013.

VILLANI, M.M. **Manejo fitossanitário na cultura do milho (*Zea mays* L.).** 2016. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Agronomia) - Departamento de Estudos Agrários da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ. Ijuí-RS, 2016.

VISAGIE, C.; YILMAZ, N.; RENAUD, J. A survey of xerophilic *Aspergillus* from indoor environment, including descriptions of two new section *Aspergillus* species producing eurotium-like sexual states. **Myco- Keys**, v. 19, p. 1-30, 2017.

VITERBO, A.; RAMOT, O.; CHERNIN, L.; CHET, I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 549-556, 2002.

WAN, J.; CHEN, B.; RAO, J. Occurrence and preventive strategies to control mycotoxins in cereal-based food. Comprehensive Reviews. **Food Science And Food Safety**, v. 19, n. 3, p. 928-953, 4 mar. 2020.

WANG, K.; QIN, Z.; WU, S.; ZHAO, P.; ZHEN, C.; GAO, H. Antifungal Mechanism of Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus subtilis* CF-3 on *Colletotrichum gloeosporioides* Assessed Using Omics Technology. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 69, n. 17, p. 5267-5278, 2021.

WILMING A.; BEGEMANN J.; KUHNE S.; REGESTEIN L.; BONGAERTS J.; EVERS S.; MAURER K.H.; BÜCHS J. Metabolic studies of γ -polyglutamic acid production in *Bacillus licheniformis* by small-scale continuous cultivations. **Biochem. Eng. J.**, v. 73, p. 29–37, 2013.

WU L.; WU, H.J.; QIAO, J.; GAO, X.; BORRISS, R. Novel Routes for Improving Biocontrol Activity of *Bacillus* Based Bioinoculants. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1395, p. 2-13, 2015.

WU, Q.; LI, H.; WANG, S.; ZHANG, Z.; ZHANG, Z.; JIN, T.; HU, X.; ZENG, G. Differential Expression of Genes Related to Growth and Aflatoxin Synthesis in *Aspergillus flavus* When Inhibited by *Bacillus velezensis* Strain B2. **Foods**, v. 11, n. 22, p. 3620–3620, 2022.

XING, H. Q.; MA, J.C.; XU, B.L.; ZHANG, S.W.; WANG, J.; YANG, X.M. Mycobiota of maize seeds revealed by rDNA-ITS sequence analysis of samples with varying storage times. **Microbiology Open**, v. 7, 2018.

XU, M.; ZHANG, X.; YU, J.; GUO, Z.; WU, J.; LI, X.; CHI, Y.; WAN, S. Biological control of peanut southern blight (*Sclerotium rolfsii*) by the strain *Bacillus pumilus* LX11. **Biological Science and Technology**, v. 30, n. 5, 2020.

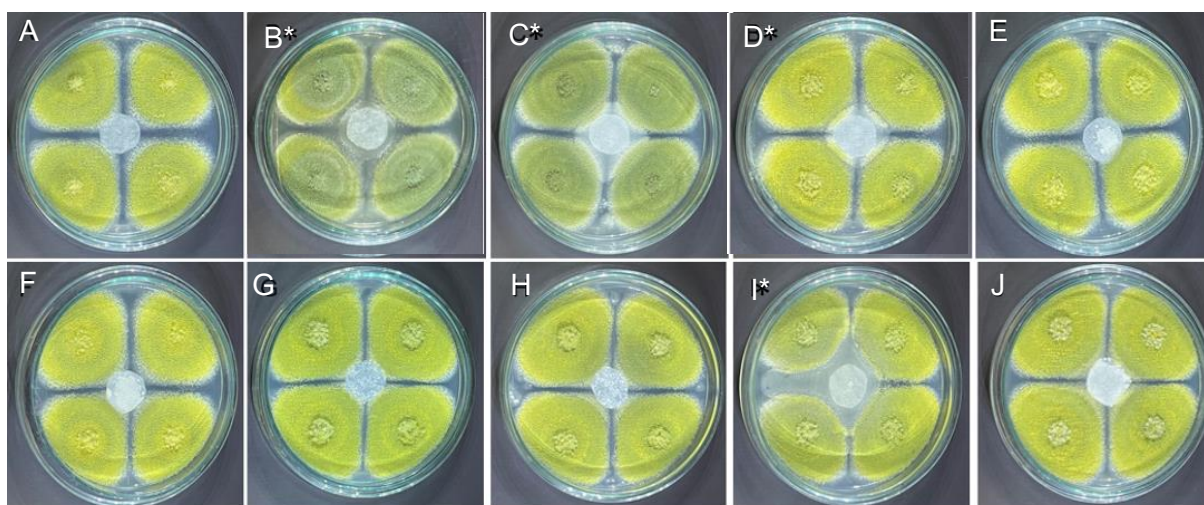
ZEYMER, J. S. Qual a diferença entre Teor de água, Atividade de água e Teor de água de equilíbrio? **Artigo Procer Automação e Sistemas**. 2021.

ZHANG, X.; GUO, X.; WU, C.; LI, C.; ZHANG, D.; ZHU, B. Isolation, heterologous expression, and purification of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain Z-14. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2020.

ZIEGLER, V.; PARAGINSKI, R. T.; FERREIRA, C. D. Grain storage systems and effects of moisture, temperature and time on grain quality - a review. **Journal of Stored Products Research**, v. 91, p. 1-9, 2021.

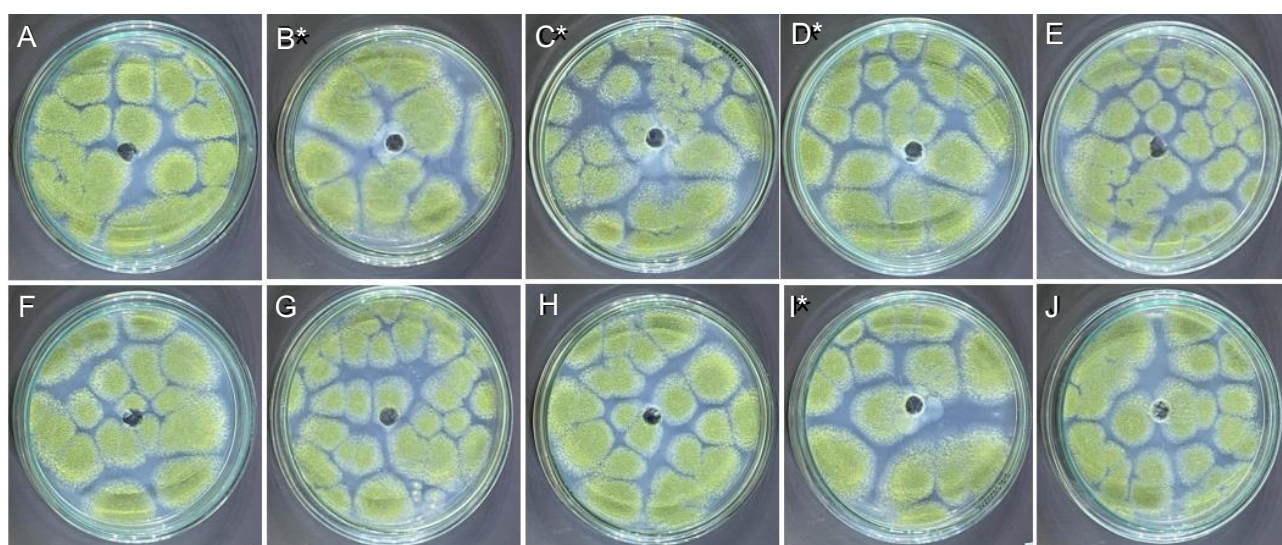
ANEXO A

Seleção das linhagens de *Bacillus* potencialmente inibidoras do desenvolvimento de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 por cultura pareada. (A) Controle; (B) *Bacillus* sp. UELAsF1.483; (C) *Bacillus* sp. UELAsF4.66; (D) *Bacillus* sp. UELAsA1.447; (E) *Bacillus* sp. UELAsF2.2; (F) *Bacillus* sp. UELAsF2.47; (G) *Bacillus* sp. UELAsF2.79; (H) *Bacillus* sp. UELAsF4.7; (I) *Bacillus* sp. UELAsF5.1; (J) *Bacillus* sp. UELAsA3.44. *Inibição significativa de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 por *Bacillus* spp.



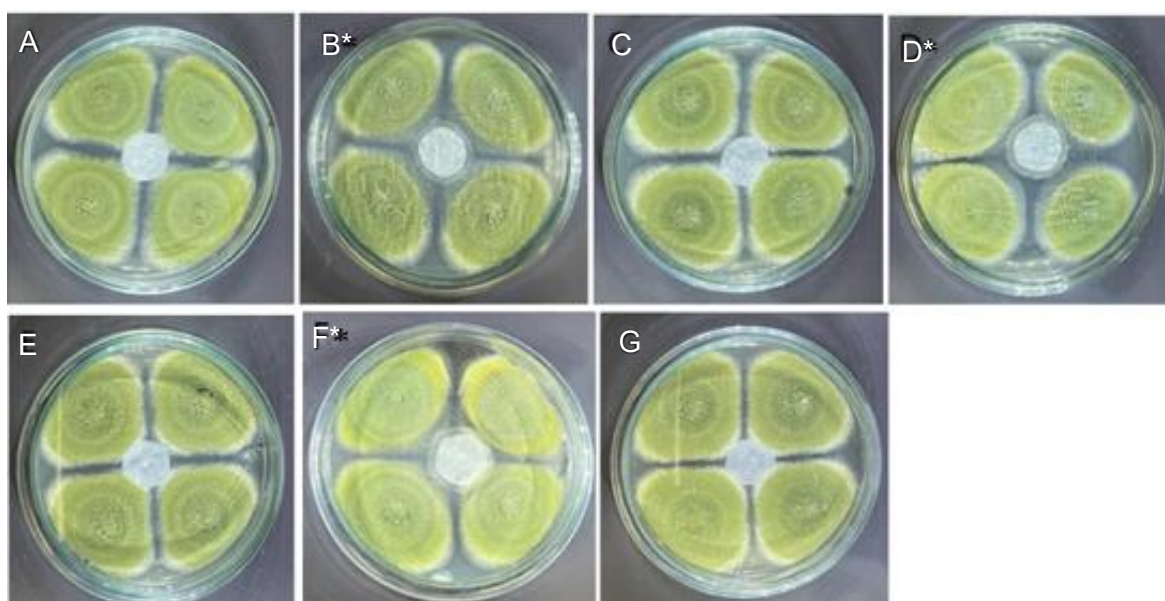
ANEXO B

Seleção das linhagens de *Bacillus* potencialmente inibidoras do desenvolvimento de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 por difusão em ágar. (A) Controle; (B) *Bacillus* sp. UELAsF1.483; (C) *Bacillus* sp. UELAsF4.66; (D) *Bacillus* sp. UELAsA1.447; (E) *Bacillus* sp. UELAsF2.2; (F) *Bacillus* sp. UELAsF2.47; (G) *Bacillus* sp. UELAsF2.79; (H) *Bacillus* sp. UELAsF4.7; (I) *Bacillus* sp. UELAsF5.1; (J) *Bacillus* sp. UELAsA3.44. *Inibição significativa de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 por *Bacillus* spp.



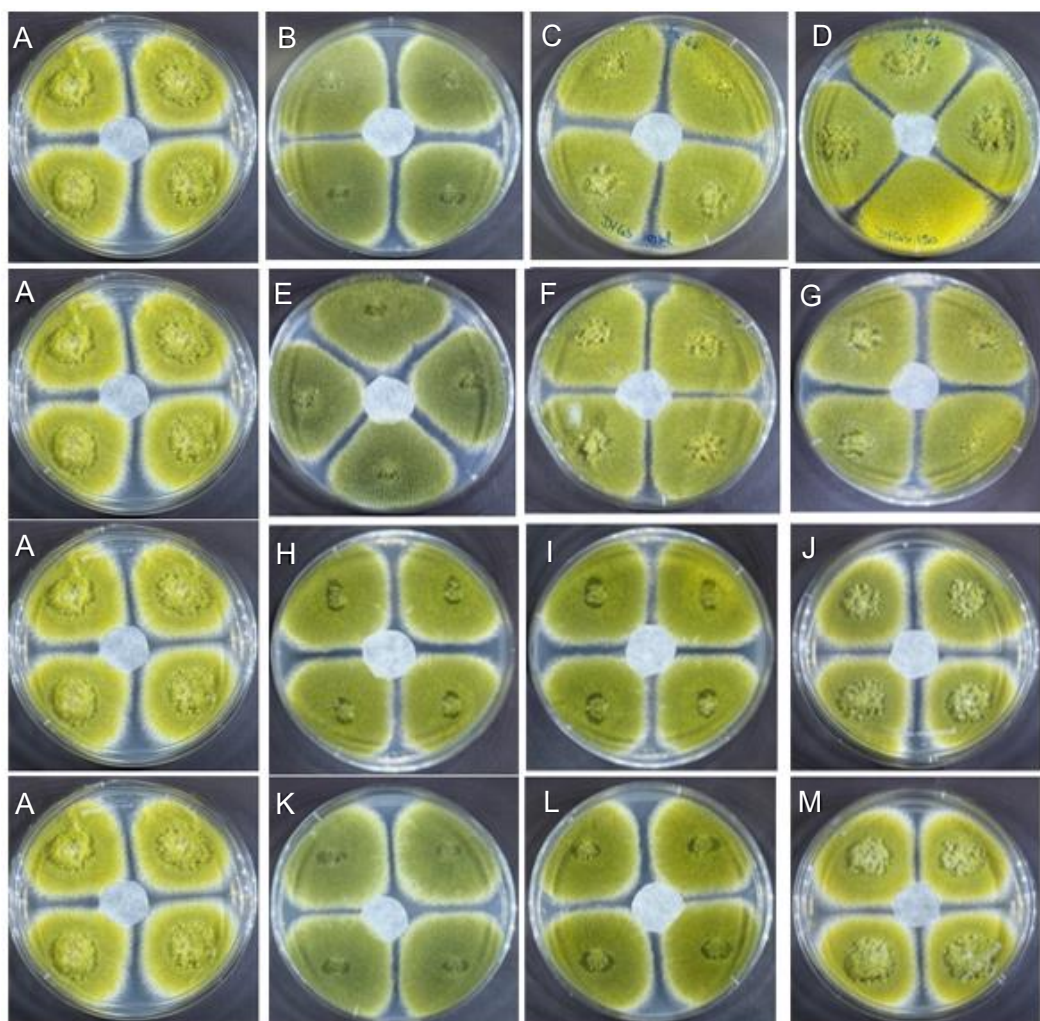
ANEXO C

Seleção das linhagens de *Bacillus* por associação em pares contra *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 por cultura pareada. (A) Controle; (B) *Bacillus* sp. UELAsF5.1 + *Bacillus* sp. UELAsF4.66; (C) *Bacillus* sp. UELAsF5.1 + *Bacillus* sp. UELAsF1.483; (D) *Bacillus* sp. UELAsF5.1 + *Bacillus* sp. UELAsA1.447; (E) *Bacillus* sp. UELAsF4.66 + *Bacillus* sp. UELAsF1.483; (F) *Bacillus* sp. UELAsF4.66 + *Bacillus* sp. UELAsA1.447; (G) *Bacillus* sp. UELAsF1.483 + *Bacillus* sp. UELAsA1.447. *Inibição significativa de *A. flavus/oryzae* UELZm4.106 por *Bacillus* spp.



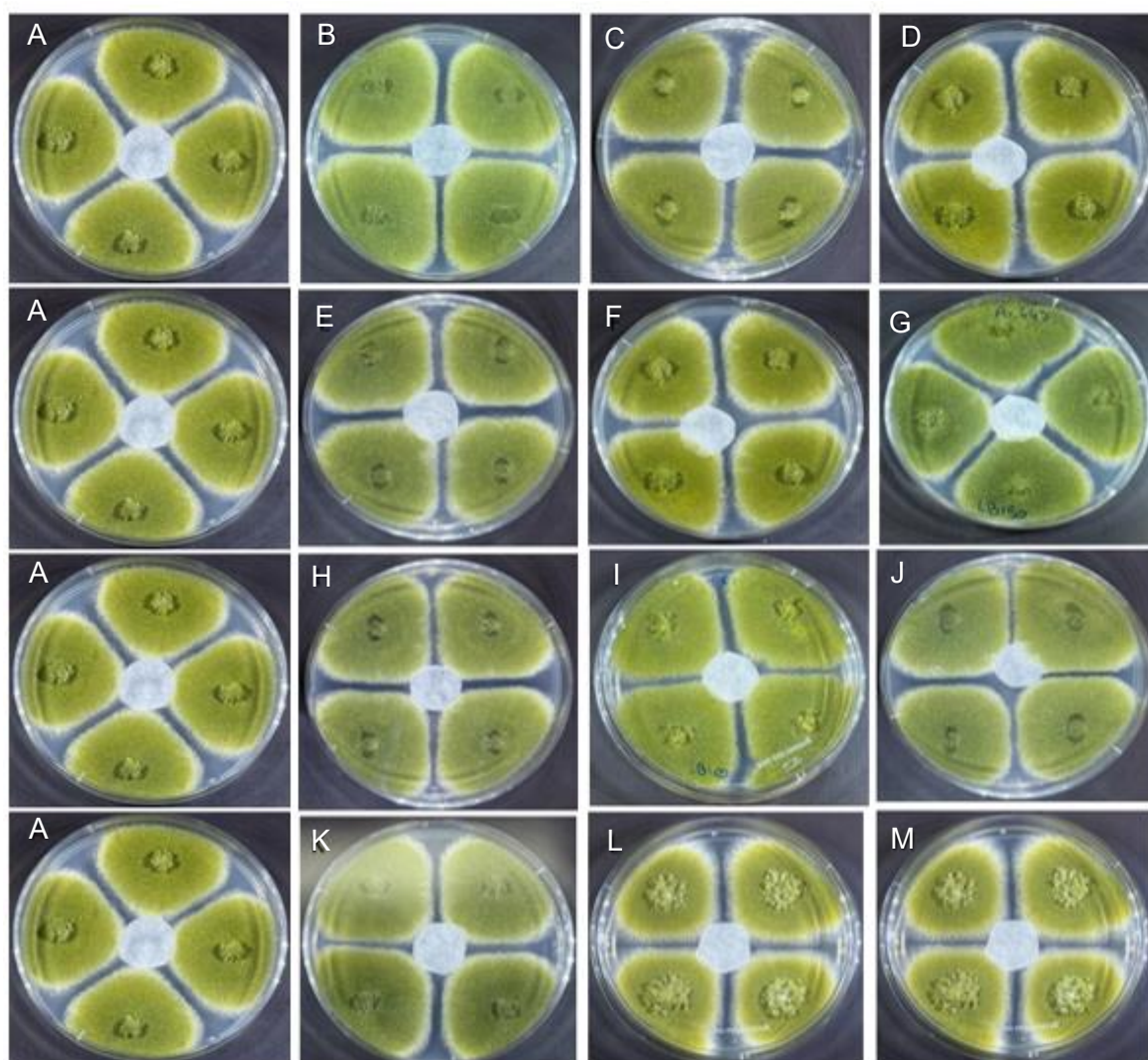
ANEXO D

Seleção dos extratos livres de células preparados em meio DYGS. (A) Controle, (B) 50 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsF4.66, (C) 100 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsF4.66, (D) 150 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsF4.66, (E) 50 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsA1.447, (F) 100 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsA1.447, (G) 150 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsA1.447, (H) 50 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsF5.1, (I) 100 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsF5.1, (J) 150 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsF5.1, (K) 50 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsF1.483, (L) 100 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsF1.483, (M) 150 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsF1.483.



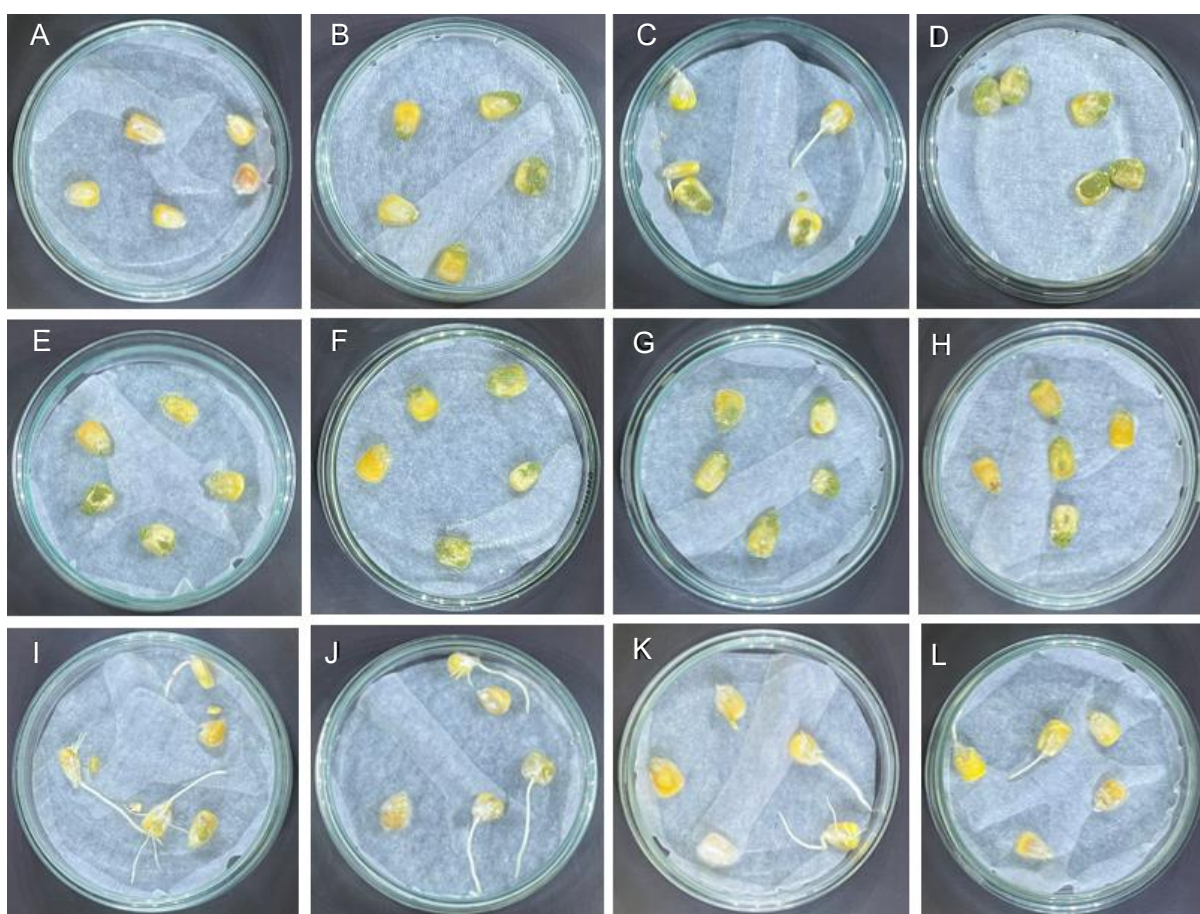
ANEXO E

Seleção dos extratos livres de células preparados em meio LB. (A) Controle, (B) 50 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsF4.66, (C) 100 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsF4.66, (D) 150 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsF4.66, (E) 50 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsA1.447, (F) 100 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsA1.447, (G) 150 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsA1.447, (H) 50 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsF5.1, (I) 100 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsF5.1, (J) 150 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsF5.1, (K) 50 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsF1.483, (L) 100 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsF1.483, (M) 150 μ L de ELC da fermentação por *Bacillus* sp. UELAsF1.483.



ANEXO F

Grãos de milho tratados com linhagens de *Bacillus* em placas de Petri contendo papel filtro. (A) Controle 1; (B) Controle 2; (C) Controle 3; (D) Controle 4; (E) Tratamento 1 com *Bacillus* sp. UELAsF1.483, (F) Tratamento 1 com *Bacillus* sp. UELAsA1.447, (G) Tratamento 1 com *Bacillus* sp. UELAsF4.66, (H) Tratamento 1 com *Bacillus* sp. UELAsF5.1, (I) Tratamento 2 com *Bacillus* sp. UELAsF1.483, (J) Tratamento 2 com *Bacillus* sp. UELAsA1.447 (K) Tratamento 2 com *Bacillus* sp. UELAsF4.66 (L) Tratamento 2 com *Bacillus* sp. UELAsF5.1.



ANEXO G

Grãos de milho tratados com linhagens de *Bacillus* em placas de Petri contendo meio DG18 sem antibiótico. (A) Controle 1; (B) Controle 2; (C) Controle 3; (D) Controle 4; (E) Tratamento 1 com *Bacillus* sp. UELAsF1.483, (F) Tratamento 1 com *Bacillus* sp. UELAsA1.447, (G) Tratamento 1 com *Bacillus* sp. UELAsF4.66, (H) Tratamento 1 com *Bacillus* sp. UELAsF5.1, (I) Tratamento 2 com *Bacillus* sp. UELAsF1.483, (J) Tratamento 2 com *Bacillus* sp. UELAsA1.447 (K) Tratamento 2 com *Bacillus* sp. UELAsF4.66 (L) Tratamento 2 com *Bacillus* sp. UELAsF5.1.

