



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TATIANE MARTINS DE OLIVEIRA

**DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNO COMO ADUBO NO CULTIVO DE
MILHO:
MICROBIOTA BACTERIANA E FÚNGICA DO SOLO ARGILOSO
E REPERCUSSÃO NA MICOLOGIA ASSOCIADA À PRODUÇÃO
DE FUMONISINA NO GRÃO**

Londrina
2011

TATIANE MARTINS DE OLIVEIRA

**DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNO COMO ADUBO NO CULTIVO DE
MILHO:
MICROBIOTA BACTERIANA E FÚNGICA DO SOLO ARGILOSO
E REPERCUSSÃO NA MICOLOGIA ASSOCIADA À PRODUÇÃO
DE FUMONISINA NO GRÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como um requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Elisa Yoko Hirooka

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

O48d	<p>Oliveira, Tatiane Martins de. Dejeto líquido de suíno como adubo no cultivo de milho: microbiota bacteriana e fúngica do solo argiloso e repercussão na micologia associada à produção de fumonisina no grão / Tatiane Martins de Oliveira. – Londrina, 2011. 83 f. : il.</p> <p>Orientador: Elisa Yoko Hirooka. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2011. Bibliografia: f. 55-69</p> <p>1. Microorganismos do solo – Teses. 2. Resíduos como fertilizante – Teses. 3. Suíno – Esterco – Teses. 4. Milho como alimento – Teses. 5. Solos – Microbiologia – Teses. I. Hirooka, Elisa Yoko. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 631.4611</p>
------	---

TATIANE MARTINS DE OLIVEIRA

**DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNO COMO ADUBO NO CULTIVO DE MILHO:
MICROBIOTA BACTERIANA E FÚNGICA DO SOLO ARGILOSO E
REPERCUSSÃO NA MICOLOGIA ASSOCIADA À PRODUÇÃO DE
FUMONISINA NO GRÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como um requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Diva de Souza Andrade
IAPAR – Londrina – PR

Prof^a Dr^a Tereza Cristina Rocha Moreira de
Oliveira
UEL – Londrina – PR

Prof^a Dr^a Elisa Yoko Hirooka
UEL – Londrina – PR

Londrina, 21 de fevereiro de 2011.

*Aos meus amados pais José de Oliveira e Neusa de Oliveira, por todo amor, apoio, incentivo, dedicação e pelo excelente exemplo de vida.
Ao meu amado irmão Fábio de Oliveira, por todo apoio, incentivo, carinho e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter concedido a vida e proporcionado a saúde durante todos os dias suficientes para o desenvolvimento das atividades diárias e permitir a realização de mais um trabalho.

À Prof^ª. Dra. Elisa Yoko Hirooka, pela oportunidade, paciência e orientação, desde a iniciação científica na graduação até o desenvolvimento desta dissertação.

À Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade de realização desta pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

À Dra. Diva de Souza Andrade, pelo treinamento técnico-científico, pelos conselhos, incentivo e a oportunidade de realização de parte das análises no Laboratório de Microbiologia de Solos (ASO), muito obrigada.

À Dra. Graziela Moraes de Césare Barbosa, por permitir o acompanhamento do Experimento de Dejeito Líquido de Suíno - IAPAR e a coleta de amostras para a realização das análises para esta dissertação e pelas informações técnicas.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR e ao Laboratório de Microbiologia de Solos, pela oportunidade de realização de atividades práticas que compõe os resultados desta dissertação.

À Prof^ª. Emília Kiyomi Kuroda, pela apresentação da Pesquisadora Dra. Diva de S. Andrade e pela colaboração ao elaborar o projeto de Mestrado.

À Prof^ª. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono e Prof^ª. Margarida M. Yamaguchi pelas sugestões na qualificação, auxílio no projeto de Mestrado e correção de artigo.

Ao Departamento de Bioquímica (Centro de Ciências Exatas) da Universidade Estadual de Londrina - UEL, pela permissão do uso do laboratório de Bioquímica.

Aos professores do Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelos ensinamentos e contribuições na minha formação

Aos técnicos e funcionários do IAPAR, Maria A. de Matos, Jorge Félix, Antonio Carlos Costa, Paulo Sergio, Antônio C. Rosa, Ailton Maia, Delmira Borges, Gisele Milani e Alexandra Sherer, pelos ensinamentos, auxílio na condução do experimento de campo, análises laboratoriais, documentação fotográfica e a amizade.

Aos Pesquisadores, Dr. Dimas S. Júnior, Dra. Alaíde A. Krzyzanowski e Dr. Nilceu R. X. de Nazareno pelas valiosas sugestões, e aos Professores, Dr. Alexandre Oba, Dra. Ana M. Bridi e Dra. Nilva N. Fonseca, pelos ensinamentos, confiança, colaboração e pela amizade.

Aos estagiários do IAPAR, Ana, Aderson, Caroline, Daniela, Diogo, Gabriela, Gisela, Giulina, Hiury, Juliana, Karina, Leidiane, Maira, Paula, Priscila, Priscila M., Stéfano, Tayrine e Zethe, por toda colaboração e amizade.

Aos funcionários da UEL, Sandra Rezende, Patrícia Sambatti, Maria A., Aldair, Nelson J. Rodriguez, Nelson, Marília, Rubens, Célia, Maria Alice, Alessandra B., Marli, Elza Y., Berenice e Aurélio pela disposição e colaboração.

Aos colegas e amigos, Joice S. dos Santos, Dani Luce D. da Silva, Luciana P. Bernd, Wagner E. Risso, Tatiana de A. Miguel, Cássia R. Tabakayashi, Ânie I. Francabandiera, Leandro B. Ferrari, Lydiane Damasceno, Juliane Alves, Juscélio D. Cardoso, Cleiton I. Ramos, Agnes I. Nagashima, Rafael M. Brito, Angélica T. Ishikawa, Diogo G. Pedrollo, Thiago M. de Souza, Renata P. Sobottka, Carolina N. Rossi, Aline F. de Souza, Luciana V. H. Ferreira, Lígia M. Martins, Lívia M. Médici, Maísa A. Leite, Jaime T. Piza, Francine Kuriama, Gervásio H. Saito e Jaqueline G. Bordini, pela colaboração e momentos de descontração.

Aos amigos, Eduardo e Matheus, pelos bons momentos de descontração e conversas, pela prestatividade, todo apoio e a amizade.

Aos meus pais, José de Oliveira e Neusa de Oliveira, pelos esforços incansáveis na minha formação, por toda a ajuda, o apoio e incentivo na superação de desafios e na realização das conquistas

Ao meu irmão Fábio de Oliveira, por todo carinho, a ajuda, compreensão e apoio nos momentos difíceis.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

"Ninguém nasce feito,
É experimentando-nos no Mundo,
que nós nos fazemos. "

Paulo Freire

OLIVEIRA, Tatiane M. **Dejeto líquido de suíno como adubo no cultivo de milho: microbiota bacteriana e fúngica do solo argiloso e repercussão na micologia associada à produção de fumonisina no grão.** 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

O dejetto líquido de suíno (DLS) é formado de fezes, urina, água de consumo e de lavagem das instalações da suinocultura, constitui-se de macronutrientes, apresentando bactérias e fungos. A geração de grande quantidade de resíduos necessita de um adequado manejo para a minimização de problemas ambientais, dessa forma o DLS vem sendo aplicado como fertilizante no solo. No entanto, a sua utilização pode alterar a qualidade microbiológica do solo e dos grãos. O milho (*Zea mays* L.) é um alimento consumido mundialmente por humanos e animais, e a qualidade dos grãos pode ser prejudicada pela contaminação por *Fusarium verticillioides* e produção de fumonisinas. Os objetivos deste trabalho foram analisar o efeito do uso de dejetto líquido de suíno (DLS) como adubo no solo na microbiota bacteriana e fúngica do solo, e na micologia e na produção de fumonisinas nos grãos. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições, sendo os tratamentos equivalentes a kg de N (ha ano)⁻¹: controle (sem adubação), adubação mineral (150), DLS (50), DLS (100), DLS (150), DLS (200) e DLS (300). A caracterização do DLS utilizado como fertilizante na safra 2009/10 apresentou 4,3 x 10³ e 5,8 x 10⁷ UFC mL⁻¹ de fungos e bactérias, respectivamente. Na análise química foram encontradas concentrações de 29,8g de nitrogênio e 29,0g de potássio por kg de matéria seca. O solo apresentou médias de 1,7 x 10⁸ UFC g⁻¹ bactérias e 5,8 x 10⁵ UFC g⁻¹ de fungos na pós semeadura e 1,5 x 10⁸ UFC g⁻¹ bactérias e 2,0 x 10⁷ UFC g⁻¹ de fungos na colheita. A similaridade genotípica de bactérias região 16S foi de 57% de similaridade genotípica entre todos os solos. O perfil do DLS não foi detectado em solo coletado na colheita do milho, indicando que as bactérias do DLS não estavam presentes no solo. Nas amostras de solo adubado com DLS, a contagem total de fungos variou entre 1,0 x 10⁵ a 8,0 x 10⁵ UFC g⁻¹ e a contagem total de bactérias de 4,0 x 10⁷ a 3,0 x 10⁸ UFC g⁻¹. Na safra 2009/2010 a concentração de fumonisina total nos grãos de milho com tratamento controle apresentou média de 0,5 µg g⁻¹ de milho. A concentração de fumonisina FB₁ no milho sob adubação com 150 DLS apresentou variação entre 0,4 a 0,5 µg g⁻¹ e o milho com adubação mineral 0,7 a 0,8 µg g⁻¹ de fumonisina FB₁. Portanto, o DLS apresentou grande quantidade de nutrientes e não apresentou efeito significativo na contaminação fúngica e na produção de fumonisinas em grãos de milho. Conforme a avaliação de diversidade genotípica, a ausência do perfil de dejetto líquido de suíno no solo na época da colheita significa que não há possibilidade de contaminação dos grãos e alteração da qualidade microbiológica.

Palavras-chave: DGGE. *Fusarium verticillioides*. Fumonisinina. Milho. Nitossolo

Oliveira, Tatiane M. **Liquid swine slurry as fertilizer in maize crop: fungal and bacterial microbiota in clay soil and impact of on mycoflora associated fumonisin production in grain.** 2011. 83 p. Dissertation (Master Degree in Food Science) – State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

ABSTRACT

Swine slurry (SS) is composed of feces, urine, drinking water, washing facilities water in swine farming, of macronutrients, so as bacteria and fungi. The generation of large quantities of waste requires an appropriate management to minimize environmental problems, so the SS has been used as fertilizer in the soil. However, their use may alter the microbiological quality of soil and grains. Maize (*Zea mays* L.) is a worldwide food consumed by humans and animals, grain quality can be compromised by contamination by *Fusarium verticillioides* and fumonisins production. The objectives this work were to analyze the effect of the use of Swine Slurry (SS) as a fertilizer in the soil bacterial and fungi microbiota of soil and in mycology and fumonisins production in grain. The experiment design was a randomized block design with four replications, with treatments equivalent to kg N (ha year)⁻¹: control (without fertilization), mineral fertilizer (150), SS (50), SS (100), SS (150), SS (200) and SS (300). The microbiological characterization of SS used as fertilizer in 2009/2010 had 4.3 x 10³ and 5.8 x 10⁷ CFU mL⁻¹ of fungi and bacteria, respectively. Chemical analysis were found concentration of 29.8g of nitrogen and 29.0g of potassium per kg dry matter. The soil showed an average of 1.7 x 10⁸ CFU g⁻¹ bacteria and 5.8 x 10⁵ CFU g⁻¹ of fungi after sowing and 1.5 x 10⁸ CFU g⁻¹ bacteria and 2.0 x 10⁷ CFU g⁻¹ of fungus at harvest. The genotypic similarity of bacterial was 57% between all soils. The profile of the SS was not detected in soil collected at harvest of maize, indicating that bacteria were not presented in soil. In the Soil fertilized with SS, the total count of fungi ranged from 1.0 x 10⁵ to 8.0 x 10⁵ CFU g⁻¹ and bacteria count of 4.0 x 10⁷ to 3.0 x 10⁸ CFU g⁻¹. In the season 2009/2010 the total concentration of fumonisin in maize with control treatment showed an average of 0.5 µg g⁻¹ of maize. The concentration of fumonisin FB₁ in maize under fertilization with 150 SS varied between 0.4 to 0.5 µg g⁻¹, and mineral fertilizer of 0.7 to 0.8 µg g⁻¹ of fumonisin FB₁. Therefore, the swine slurry presented a greater quantity of nutrients, can be used as organic fertilizer, and no significant effect was noted on fungal growth and production of fumonisins in maize grains. The assessment of genotypic diversity bacterial, the absence of profile of swine slurry in soil at harvest time means there not possibility of contamination of the grains and alteration of the microbiological quality.

Key words: DGGE. *Fusarium verticillioides*. Fumonisin. Maize. Oxisol

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** –Estrutura química de fumonisinas B1 e B2.....26
- Figura 2** –Dados climáticos referentes aos anos de 2008, 2009 e 2010, no período que ocorreu a pesquisa. Fonte: Estação agrometereológica do Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR, Londrina.29
- Figura 3** –Croqui ilustrativo do delineamento experimental – Campo Experimental - Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR - Londrina.30
- Figura 4** –Dendrograma de dissimilaridade fenotípica pelo método COMPLETE e Coeficiente Euclidiana de isolados de bactérias de dejetos líquidos de suíno (DLS).45
- Figura 5** –Foto ilustrativa do de amplificação de Nested PCR 16S de DNA total de do dejetos líquidos de suíno (DLS) aplicado no solo.....46
- Figura 6** –Dendrograma de dissimilaridade de isolados bacterianos de dejetos líquidos de suíno e do solo na colheita do milho, com base nas características fenotípicas pelo método COMPLETE e Coeficiente Euclidiana.50
- Figura 7** –Dendrograma de dissimilaridade de isolados de bactérias de dejetos líquidos de suíno e de solo, da pós semeadura e da colheita do milho, baseado em características fenotípicas pelo método COMPLETE e Coeficiente Euclidiana.52
- Figura 8** –Foto ilustrativa de amplificação de 1ª reação de PCR 16S de DNA total de solo adubado com dejetos líquidos de suíno (DLS) aos 45 dias após a semeadura.53
- Figura 9** –Foto ilustrativa de amplificação de Nested PCR 16S de DNA total de solo adubado com dejetos líquidos de suíno (DLS) aos 120 dias após a semeadura.....54

Figura 10 –Foto ilustrativa do de amplificação de Nested PCR 16S de DNA total de solo adubado com dejetos líquidos de suíno (DLS) aos 120 dias após a semeadura.	54
Figura 11 –Foto ilustrativa de amplificação de Nested PCR 18S de DNA total de solo adubado com dejetos líquidos de suíno (DLS) aos 45 dias após a semeadura.	56
Figura 12 –Dendrograma de similaridade genotípica de perfil de DGGE de solo sob cultivo de milho safra 2009/2010 adubado com dejetos líquidos de suíno (DLS) pelo método UPGMA e coeficiente de Jaccard.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção média diária de esterco (kg), esterco + urina (kg) e dejetos líquidos (L) por animal por fase de produção.....	31
Tabela 2 – Análise química de solo antes de adubação na safra 2009/2010 a profundidade de 0 a 10 cm - Londrina – Pr.	33
Tabela 3 – Região conservada 16S para bactéria e 18S para fungos, nome dos oligonucleotídeos iniciadores, seqüência e tamanho em pares de bases (pb) do fragmento de rDNA amplificado.....	38
Tabela 4 – Caracterização química do dejetos líquido de suíno (DLS).	44
Tabela 5 – Número de bactérias total do solo sob adubação com dejetos líquido de suíno (DLS) safra de milho 2009/2010 – Londrina PR.....	49
Tabela 6 – Distribuição de índices de diversidade nos diferentes tratamentos a partir do dendrograma fenotípico pelo método COMPLETE e coeficiente Euclidiana de isolados de bactérias do dejetos líquido de suíno e de solo aos 45 dias após a semeadura.	49
Tabela 7 – Distribuição de índices de diversidade nos diferentes tratamentos a partir do dendrograma fenotípico pelo método COMPLETE e coeficiente Euclidiana de isolados de bactérias do dejetos líquido de suíno e de solo na colheita do milho	51
Tabela 8 – Distribuição de índices de diversidade na pós-semeadura e na colheita a partir do dendrograma fenotípico pelo coeficiente Euclidiana de isolados bacterianos de solo.....	51
Tabela 9 – Número de fungos total do solo sob adubação com dejetos líquido de suíno (DLS) safra de milho 2009/2010 – Londrina PR.	55
Tabela 10 – Perfil micológico em milho produzido sob adubação com dejetos líquido de suíno (DLS) safra 2008/2009 e 2009/2010 - Londrina - PR.....	60
Tabela 11 – Perfil da contaminação de fumonisina em milho produzido sob adubação com dejetos líquido de suíno (DLS) safra 2008/2009 e 2009/2010 Londrina – PR	62

LISTA DE ABREVIATURAS

%	percentagem
°C	grau Celsius
AM	adubação mineral
C	carbono
Ca(NO₃)₂	nitrato de cálcio
cel g⁻¹	células por grama
cm	centímetro
cm³	centímetro cúbico
DLS	dejeito líquido de suíno
dNTP	Desoxirribonucleotídeo tri-fosfatado
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
Fe	Ferro
g	gramas
g	força G
h	hora
ha	hectare
K	Potássio
kg	quilograma
L	litro
µg	micrograma
µg mL⁻¹	micrograma por mL
µL	microlitros
µM	micromolar
mg	miligramas
min	minutos
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
m²	metro quadrado

m³	metro cúbico
M	molar
MG	Magnésio
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
Mn	Manganês
Mol	quantidade de matéria
MS	matéria seca
N	Nitrogênio
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NH₃	amônia
P	Fósforo
pb	pares de bases
pMol	picomoles
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	potencial hidrogeniônico
r.p.m	rotações por minuto
s	segundos
SDS	dodecil sulfato de sódio
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
U	unidade
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFC g⁻¹	Unidade Formadora de Colônia por grama
UFC mL⁻¹	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
UV	ultravioleta
V	volt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2.2.1 Dejeito Líquido de Suíno (DLS) Utilizado para Adubação da Cultura de Milho	19
2.2.2 Solo da Área Experimental de Plantio da Cultura do Milho	19
2.2.3 Grãos de Milho	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNO	20
3.2 CULTURA DE MILHO	22
3.3 FITOPATOLOGIA EM MILHO	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 INSTALAÇÃO EXPERIMENTAL.....	28
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
4.3 DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNO	30
4.4 SOLO DA ÁREA EXPERIMENTAL.....	32
4.5 GRÃOS DE MILHO	33
4.6 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	34
4.6.1 Contagem Total de Bactérias e Fungos do Dejeito de Suíno	34
4.6.2 Contagem Total de Bactérias e Fungos de Solo	34
4.6.3 Isolamento e Caracterização Fenotípica de Colônias Bacterianas	35
4.6.4 Extração de DNA dos Isolados de Bactérias	35
4.6.5 Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante – DGGE	36
4.6.5.1 Extração do DNA total do solo.....	36
4.6.5.2 Reação da polimerase em cadeia – PCR.....	37

4.6.5.3	Análise dos produtos de amplificação	39
4.6.5.4	Preparo do gel de eletroforese em gel de gradiente desnaturante – DGGE	40
4.6.6	Contagem Total de Bolores e Leveduras dos Grãos de Milho.....	41
4.6.7	Determinação de Fumonisin (FB1 e FB2) em Grãos de Milho por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE	41
4.6.7.1	Extração da amostra.....	41
4.6.7.2	Pré-limpeza da amostra.....	42
4.6.7.3	Preparo da fase móvel.....	42
4.6.7.4	Quantificação da amostra por CLAE	42
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1	CAPÍTULO 1- CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR DO DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNO E SEU EFEITO NA MICOLOGIA E PRODUÇÃO DE FUMONISINAS EM GRÃOS DE MILHO SOB PLANTIO DIRETO.....	44
5.2	CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE SOLO FERTILIZADO COM DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNO EM CULTIVADO COM MILHO (ZEA MAYS L.)	48
5.3	CAPÍTULO 3 - EFEITO DE ADUBAÇÃO COM DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNO NA MICOLOGIA E PRODUÇÃO DE FUMONISINAS EM GRÃOS DE MILHO (ZEA MAYS L.).....	59
6	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66
	ANEXOS	81
	Composição de Meios de Cultura	82
	Meio de Martin.....	82
	Meio Glicose- peptona	82
	Meio de Ágar Batata Dextrose (BDA).....	82

1 INTRODUÇÃO

A fertilidade do solo constitui fator importante na manutenção da produtividade. Os níveis de nutrientes exigidos pela cultura são fornecidos através da prática de adubação do solo, com a aplicação de macro e micronutrientes (COELHO, 1995). Tem-se dado ênfase à agricultura sustentável ou orgânica, baseada no desenvolvimento de sistemas de produção que contemplem o adequado manejo do solo, com o objetivo de conservação da fertilidade e melhorar a produtividade, evitando a erosão e a perda de nutrientes. Para isto, utiliza-se da adubação com nutrientes provenientes de recursos naturais e de baixo custo, como resíduos orgânicos gerados pela própria cultura ou resíduos de animais (CASTRO *et al.*, 2005).

Entre os resíduos orgânicos de animais, salienta-se que o grande volume de dejetos líquido de suíno (DLS) ocorre devido à intensificada atividade suinícola para atender a demanda do mercado consumidor. No Brasil mantêm-se alojadas mais de 2,4 milhões de matrizes com produção anual de 3 milhões de toneladas de carne suína e consumo nacional médio de 14,5 quilos per capita por ano em 2010. O Paraná exportou 31,3 milhões de toneladas de carne suína (ABIPECS, 2011) e a legislação paranaense estabelece que aos suinocultores realizem o correto manejo dos dejetos desde 1982 (DAGA *et al.*, 2007).

O dejetos líquido de suíno (DLS) é constituído de fezes, urina, água de consumo, de limpeza das baias dos animais, resíduos de ração e, em alguns casos, resíduo de cama dependendo do sistema de produção (RUFETE, 2006). A minimização dos custos de produção suinícola pode ser atingida pela adequada utilização desses dejetos (KONZEN, 2003). Para isto, há alternativas como a produção de gás metano (biogás) e outros tipos de energia e a transformação em adubos orgânicos processados (OLIVEIRA, 1993). O nitrogênio (N) e o fósforo (P) são dois importantes compostos químicos do dejetos de suíno sob o ponto de vista nutricional de plantas possibilitando a aplicação na produção agrícola (BASSO *et al.*, 2005). No entanto, a sua utilização pode afetar a microbiota do solo e de grãos produzidos.

A área destinada para produção brasileira de grãos da safra 2010 foi de 49,6 milhões de hectares (ha), ocupada com cultura de algodão, amendoim, arroz,

feijão, girassol, mamona, milho, soja, sorgo, aveia, centeio, cevada, trigo e triticale (IBGE, 2011).

A cultura do milho (*Zea mays* L.) constitui matéria-prima de relevância mundial para a indústria alimentícia e de ração; ocupando cerca de 21,8% da área brasileira, e correspondente a 12,8 milhões de ha, atingindo produção nacional de 56,1 milhões de toneladas (CONAB, 2011). O Estado do Paraná é um dos principais estados produtores de milho no país, a produção anual é de 13,5 milhões de toneladas e sua produtividade média é de 4,3 toneladas por ha, em uma área de 3,1 milhões de ha (IBGE, 2011). Cifra superior a 70% de milho destina-se a alimentação animal, avicultura, suinocultura e pecuária, 11% consumo industrial, 10% exportações, 1,5% consumo humano e 0,6% perdas ou sementes (FNP, 2008). Devido ao valor nutritivo, boa produtividade e adaptabilidade de cultivo em diferentes áreas e épocas de plantio, o milho é utilizado na elaboração de concentrados na ração animal, forragem “*in natura*” ou forragem conservada, na produção de silagem (REIS *et al.*, 2001; SENGER, 2005).

A qualidade dos grãos de milho pode ser prejudicada pelo ataque de insetos, desencadeando crescimento de diferentes espécimes fúngicas. As Micotoxinas podem ser produzidas durante a armazenagem, mas determinados fungos multiplicam-se no milho ainda no campo e produzem toxinas antes da colheita, dependendo de condições climáticas, como o gênero *Fusarium* spp. (MARQUES *et al.*, 2009). As micotoxinas constituem amplo grupo químico pertencente à categoria de metabólitos secundários fúngicos capazes de causar danos à saúde humana e animal, que se manifestam sob efeito desde agudo a carcinogênico, imonossupressor, teratogênico, redução no consumo de alimentos, perda de peso e redução do desempenho zootécnico dos animais e, conseqüentemente, prejuízos econômicos ao produtor rural (SANTURIO, 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da fertilização com dejetos líquidos de suíno (DLS) na qualidade de grãos de milho analisando a micologia e contaminação por fumonisinas B₁ e B₂, bem como, a diversidade microbiana de solo pela utilização da técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito do uso de dejetos líquidos de suíno como adubo no solo cultivado com milho, na microbiota bacteriana e fúngica do solo, na micologia de grãos de milho e a na produção de fumonisinas nos grãos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Dejetos Líquidos de Suíno (DLS) Utilizados para Adubação da Cultura de Milho

Quantificar bactérias e fungos do DLS aplicado no solo. Avaliar a diversidade da população de bactérias por amplificação da região 16S do DNA total do DLS por PCR, e Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE).

2.2.2 Solo da Área Experimental de Plantio da Cultura do Milho

Quantificar bactérias e fungos nas amostras de solo. Amplificar a região 18S de fungos, e avaliar a diversidade da população de bactérias por amplificação da região 16S e por análise de DGGE.

2.2.3 Grãos de Milho

Proceder à contagem total de bolores e leveduras nas amostras de milho, caracterizando os principais gêneros fúngicos; e determinar níveis de fumonisinas FB₁ e FB₂ em milho por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNO

Segundo dados da Pesquisa Pecuária Municipal (IBGE, 2007), o estado do Paraná é o terceiro maior produtor de carne suína, atrás de Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

A intensificação da atividade suinícola, para atender a demanda do mercado consumidor por carne e co-produtos, gera uma produção considerável de dejetos de suínos ou chorume (BERENGUER, 2008).

Para minimizar os efeitos negativos do excesso de dejetos suínos, vários métodos de transformação e utilização do dejetos de suíno foram desenvolvidos, entre estes a produção de energia e o uso na melhoria da qualidade do solo como adubo (BERTORA, 2008). A aplicação dos dejetos de suínos como fertilizante é uma das alternativas disponíveis para o correto manejo de suinoculturas (SÁNCHEZ, 2005).

Na atividade suinícola, a quantidade de resíduos produzida diariamente depende de características da atividade realizada na suinocultura, por exemplo, o peso, a idade e a categoria dos animais. Também, a composição do resíduo está sujeito a alterações conforme a fase de crescimento dos animais, a fisiologia do animal e a composição bromatológica das rações (SOUZA *et al.*, 2008).

Em áreas de pecuária é comum a utilização de estrumes como fertilizante na reciclagem de nutrientes resultando assim, em potencial aumento da matéria orgânica no solo, aspecto que auxilia na obtenção de uma agricultura sustentável (PEU *et al.*, 2007). Os estrumes de animais aplicados frescos no solo podem causar efeitos sobre as propriedades do solo, como modificação na composição orgânica e química e na atividade da microflora (PLAZA, 2004).

A aplicação de chorume permite reciclar os nutrientes de volta ao solo (PERÄLÄ, 2006), o dejetos líquido de suínos é amplamente utilizado para fornecer nutrientes para plantas e aumentar o nível de matéria orgânica no solo (FANGUEIRO *et al.*, 2009). Além disso, ajuda a amenizar os problemas econômicos e ambientais relacionados à eliminação desses resíduos (PLAZA *et al.*, 2003). A legislação do

Paraná, desde 1982, estabelece as suinoculturas que realizem o correto manejo de seus dejetos durante a produção dos animais (DAGA *et al.*, 2007).

Na maioria das produções em campos agrícolas, o N é o nutriente que se apresenta freqüentemente em maior deficiência nos solos (DENG *et al.*, 2006). Utilização de estrumes animais, incluindo esterco bovino e chorume de suínos tem contribuído para o aumento do nitrogênio orgânico no solo (CARPENTER *et al.*, 1998).

O chorume é constituído de urina, fezes, resíduos de ração, água de bebida e de limpeza das baias dos animais e, em alguns casos, restos de cama (RUFETE, 2006). O nitrogênio excretado pelos suínos encontrado nas fezes sofre rápida decomposição pelas bactérias, e, na urina, a maior parte na forma de uréia é convertida à amônia e dióxido de carbono pela enzima urease (CANH, 1998).

A função da aplicação do chorume está associada ao ciclo de nitrogênio no solo de sistemas agrícolas de produção intensiva. Os efeitos positivos observados são de maximização do valor econômico pelo teor de nutrientes, produção sustentável (VLIET *et al.*, 2006) e a minimização da poluição ambiental (CECCHERINI *et al.*, 1998).

O conhecimento das etapas de produção é fundamental para o sucesso e a sustentabilidade de um sistema (BELLI FILHO *et al.*, 2005). A adequação de um programa racional de manejo dos dejetos é essencial para a correta utilização dos dejetos, desde a armazenagem até a aplicação no solo.

Além disso, a qualidade do solo pode influenciar no seu potencial de uso, a produtividade e a sustentabilidade global do agroecossistema, sendo seu estudo necessário para fornecer informações sobre o manejo do solo e assegurar a tomada de decisões para uma melhor utilização desse recurso (SPOSITO; ZABEL, 2003). Visto que o solo pode apresentar limitações ao crescimento das plantas pela capacidade de supri-las com nutrientes, água e oxigênio (IMHOFF, 2000). E ainda, os ciclos de nutrientes são impulsionados pela atividade de diferentes comunidades microbianas, capazes de transformar continuamente a estrutura física, composição de nutrientes, disponibilidade e volume de matéria orgânica do solo (PLAZA, 2004).

3.2 CULTURA DE MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é originário da América, provavelmente da região onde hoje se situa o México (PATERNIANI, 1993), pertence a família *Gramineae*, subfamília *Panicoideae* (SCHOBE, 2008), adaptou-se as regiões tropicais e subtropicais (FANCELLI, 1982) e consiste em um dos mais importantes cereais cultivados no mundo (FRANZOLINA *et al*, 1999).

O milho é cultivado em diferentes regiões brasileiras (GOULART, 1993). Existem variedades que são utilizadas na ração animal e alimentação humana (RAMESSAR, 2008), é empregado também como ingrediente de produtos industriais, óleo vegetal, fabricação de amido e na produção de biocombustível como o etanol (PERSSON *et al*, 2009).

No Brasil, o milho tem sido o cereal mais empregado na elaboração de rações, por apresentar elevado nível energético, rico em amido (aproximadamente 72%), pobre em fibras (< 2%) e de alta palatabilidade (MOREIRA *et al* 2001).

A estrutura do grão de milho pode ser dividida em três partes: pericarpo, endosperma e embrião (SGARBIERI, 1996). Na sua composição os grãos apresentam um baixo teor em proteínas (MOUEIUM *et al*, 1996). Ainda quanto a qualidade da proteína essa é limitada por deficiências de alguns aminoácidos essenciais na nutrição animal (MOTTO *et al*, 1996).

Ainda quanto à composição protéica, a zeína é a principal proteína de reserva do milho, representa cerca de 50% da proteína total, tem reduzido valor biológico devido a deficiência dos aminoácidos lisina e triptofano (BRITO *et al*, 2005). Por outro lado, a composição de aminoácidos essenciais no endosperma apresenta valores significativamente maiores para metionina, cistina, leucina e treonina (GIBBON & LARKINS, 2005).

Na alimentação de aves e suínos, o milho integra a composição em até cerca de 80% da ração balanceada em proteína e energia (RODRIGUES *et al.*, 2002). Também, o milho tem sido utilizado como forrageira na alimentação de ruminantes, na forma *in natura* ou conservada (MIZUBUTI *et al.*, 2002) e se destaca entre as plantas forrageiras por apresentar alto rendimento de massa verde por unidade de área,

excelente qualidade de fermentação, boa qualidade nutricional, possibilitando produções com alto valor nutritivo de silagem e aceitabilidade pelos animais (MELO *et al.*, 1999).

O nitrogênio (N) é o macro nutriente extraído em maior quantidade pela cultura de milho (SANGOI; ALMEIDA, 1994). Pois, o N é um elemento dinâmico em interagir com plantas, solo, microrganismos do solo e o ar. Além disso, apresenta funções no metabolismo das plantas, como constituinte de proteína, coenzimas, ácidos nucléicos, citocromos, clorofila, além de ser um nutriente relevante para o aumento da produção (PEIXOTO *et al.*, 2003).

3.3 FITOPATOLOGIA EM MILHO

As doenças que afetam a cultura do milho podem ser agrupadas em sementes e plântulas, foliares, de colmo, de espiga e em grão armazenados, conforme o local de ação dos patógenos (NAZARENO, 1982). As doenças em milho podem ser provocadas por fungos, bactérias, vírus e helmintos, que prejudicam o crescimento, desenvolvimento e a produtividade da planta (SANGOI *et al.*, 2000).

Os fungos constituem-se um número considerável de patógenos (DENTI; REIS, 2003). Esses microrganismos pertencentes ao Reino Fungi, podem ser encontrados em diferentes ambientes como solo, ar, plantas e matéria orgânica em decomposição e pode desenvolver em vários tipos de substratos (MARCIA, 1998).

Os fungos que invadem sementes e grãos são divididos em dois grupos: fungos do campo, que infectam o produto ainda no campo e fungos de armazenamento, que afeta o milho pouco antes e durante o armazenamento (MILLER, 1995).

Os principais gêneros de fungos de campo são *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Nigrospora*, *Helminthosporium*, *Alternaria* e *Cladosporium* que invadem os grãos durante o amadurecimento e os possíveis danos são causados antes da colheita. Já os fungos de armazenamento são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* que podem ser encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, elevadores, equipamentos e lugares onde produtos agrícolas são armazenados e

processados. Dessa forma, causam danos ao produto somente se as condições de armazenagem forem impróprias à manutenção da qualidade do produto (MILLER, 1995).

Espécies de fungos do gênero *Aspergillus* (*A. halophilicus*, *A. restrictus*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. alutaceus* (*A. ochraceus*) e *A. flavus*) e as do gênero *Penicillium* (*P. viridicatum*, *P. verrucosum*) são as indicadoras de deterioração em sementes e grãos causando danos no germe, descoloração, alterações nutricionais, perda da matéria seca e os primeiros estágios da deterioração microbiológica (SINHA & SINHA, 1991). Os gêneros de fungos toxigênicos que mais frequentemente colonizam os grãos de milho são *Fusarium*, *Apergillus* e *Penicillium* (CHULZE, 1996).

O crescimento de fungos nos alimentos está associado a fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos, ou seja, aqueles relacionado ao grão são composição do substrato, a atividade de água e o pH. Os fatores extrínsecos são referentes a fatores ambientais como a temperatura e a umidade (KAPETANAKOU, 2009).

O impacto econômico resultante da contaminação de grãos por micotoxinas ocorre em toda a produção vegetal e animal, de sua comercialização e da utilização dos produtos (KUBENA *et al.*, 1990).

As indústrias que utilizam os grãos de milho como matéria prima têm-se preocupado com a qualidade do produto, referente a podridão de espiga que originam os chamados “grãos ardidos”. Os grãos ardidos são causados principalmente por fungos dos gêneros *Diplodia* e *Fusarium* (MARIO, 2001). *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. são os contaminantes mais comumente isolados de milho (SAMAPUNDO, 2007).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidas por fungos (SEWRAM, 2005). Sendo as fumonisinas e as aflatoxinas as micotoxinas mais comumente detectadas em milho (SAMAPUNDO, 2007). Alguns fatores são importantes na produção de micotoxinas, como a regulação genética do fungo e condições ambientais, principalmente, temperatura e atividade de água (RAMIREZ, 2006).

As principais espécies do gênero *Fusarium* relacionadas a perda da produção agrícola consiste em *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium poae* and *Fusarium triticum* (CHAMPEIL, 2004).

Fusarium spp., ao infectar o grão, causa redução de peso, com conseqüente perdas de rendimento de grãos. Além disso, a contaminação do grão provoca destruição dos grânulos de amido e das paredes celulares, afetando também o endosperma e o armazenamento de proteínas, resultando em um produto de baixa qualidade para o consumo (SNIJDERS, 2004).

O fungo *Fusarium graminearum* (teleomorfo *Gibberella zeae*) é um fungo filamentosos (KWON, 2009), e um importante patógeno das culturas cereais (CAVALIERE *et al.*, 2007) que provoca consideráveis perdas na produtividade e qualidade de grãos (KRSTANOVIC *et al.*, 2005).

A espécie *F. graminearum* produz micotoxinas estrogênica e tricotecenos, como a zearalenona e deoxivalenol (DON). A zearalenona é considerada uma toxina de cereal de estocagem (Velluti *et al.*, 2000); a exposição a DON e outros tricotecenos (MILLER, 1994) provoca prejuízos econômicos por ser responsável pelo baixo desempenho zootécnico, devido as alterações no sistema imune dos animais (GOYARTS *et al.*, 2006). Ainda, as fumonisinas são micotoxinas que têm sido isoladas a partir de certas espécies de *Fusarium*, como o *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* (SORIANO, 2004; MCKEAN *et al.*, 2006).

Fusarium verticillioides (fase sexual *Gibberella*) é considerado um grande parasita de plantas do gênero *Gramineae*, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (WEBSTER; GUNNEL, 1992). E de acordo com Presello *et al.*, (2008) é um importante patógeno de milho.

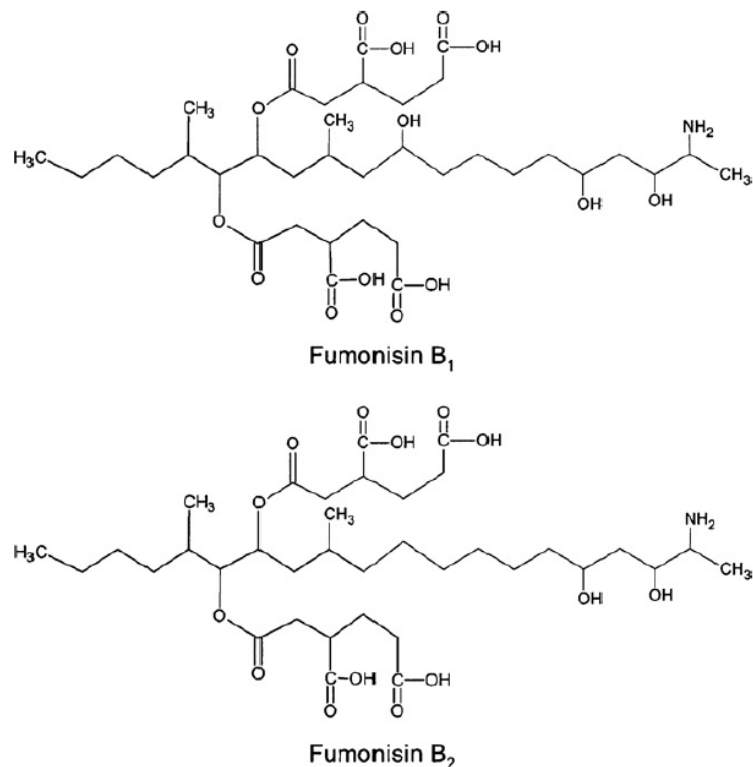
A contaminação dos grãos de milho por *F. verticillioides* pode ocorrer em várias partes da planta, como através das sementes, raízes, caule e das folhas durante o seu crescimento. O vento e a chuva podem transportar os conídios que estão nos resíduos culturais, assim como os insetos são vetores de conídios (MAIORANO *et al.*, 2009).

As fumonisinas podem ser divididas em seis grupos (A₁, A₂, B₁, B₂, B₃ e B₄) (GAMANYA, 2001), são conhecidos mais de 20 análogos de fumonisinas, sendo

que a forma molecular predominante, produzida pelo *Fusarium verticillioides*, é a fumonisina B₁. A fumonisina B₁ (FB₁) é a mais comum associada a micotoxicoses em animais e humanos (REQUENA, 2005).

As fumonisinas FB₁ e FB₂ apresentam estrutura química semelhante a esfingosina e esfinganina (Figura 1), responsável pela toxicidade da toxina, classificada pelo IARC (2002) como carcinógeno do grupo 2B, possível carcinogênico para humanos.

Figura 1 –Estrutura química de fumonisinas B₁ e B₂.



Fonte: Zain (2011).

O consumo de alimentos a base de milho, que apresentam contaminação com fumoninas (MARASAS *et al.*, 2004), tem sido associada a casos de leucoencefalomalácia em equinos (KELLERMAN *et al.*, 1990), síndrome de edema pulmonar em suínos (ROSS *et al.*, 1990), câncer de fígado em ratos (GELDERBLOM *et al.*, 1991) e câncer de esôfago em humanos (THIEL *et al.*, 1992). Também, apresenta efeito neuro, hepato e nefrotóxico e imunossupressor.

A produção de micotoxinas ocorre quando as condições são favoráveis para o crescimento dos fungos toxigênicos (ROSSETTO *et al.*, 2005). Entre os fatores, podem ser citados como principais, a atividade de água (Aa), a umidade relativa do ar e a temperatura dos grãos armazenados (BAPTISTA *et al.*, 2004).

Segundo a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (2009), os limites de fumonisinas (FB₁ + FB₂) estabelecido para os alimentos é de 5 µg g⁻¹ para milho não processado, de 3 µg g⁻¹ para milho pipoca e amido de milho de, farinha de milho, fubá, flocos, canjica e canjiquinha de 2 µg g⁻¹, de 1 µg g⁻¹ para outros produtos a base de milho e de 0,2 µg g⁻¹ para os alimentos a base de milho para a alimentação infantil.

4 MATERIAL E MÉTODOS

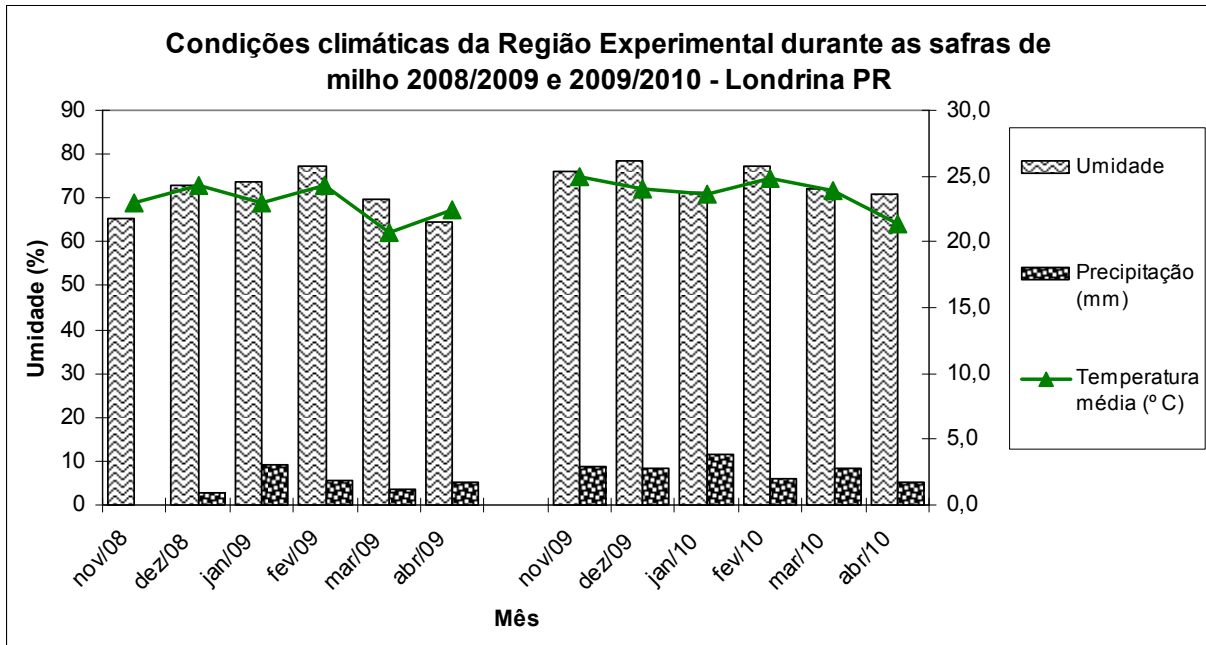
4.1 INSTALAÇÃO EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido na Estação Experimental do Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR, localizado no Município de Londrina, latitude 23 ° 22'S, longitude 51 ° 10'W e altitude 585 m (PEREIRA, *et al.*, 2008), em solo classificado como Latossolo Vermelho distroférico (LVdf) com textura argilosa (EMBRAPA, 2006). Conforme Koppen, a região apresenta classificação climática Cfa, clima subtropical, temperaturas média: inferior a 18°C no inverno (mesotérmico) e no verão superior a 22°C; com verões quentes e tendência de concentração das chuvas (Figura 2).

A sucessão de cultura no período de 2008 a 2010 consistiu em milho/aveia em sistema de plantio direto com adubação com dejetos líquidos de suíno (DLS). No ano de 2008, o solo da área experimental foi calcareado e realizado o plantio de aveia (inverno); o dejetos líquidos de suíno (DLS) foi aplicado pela primeira vez no verão para o plantio de milho safra 2008/2009. Em 2009, no inverno aplicou-se pela segunda vez o DLS e sucedido o plantio de aveia; e a terceira de DLS no verão e realizado o plantio de milho safra 2009/2010.

A contagem total de bactérias e fungos do dejetos líquidos de suíno e do solo, e análise de DGGE foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Solo do Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR. A contagem total de bolores e leveduras e extração de fumonisinas de grãos de milho foram realizadas no Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Centro de Ciências Agrárias; a determinação de fumonisinas em CLAE foi realizada no Depto. de Bioquímica e Biotecnologia - Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Londrina - UEL.

Figura 2 –Dados climáticos referentes aos anos de 2008, 2009 e 2010, no período que ocorreu a pesquisa. Fonte: Estação agrometeorológica do Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR, Londrina.



4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

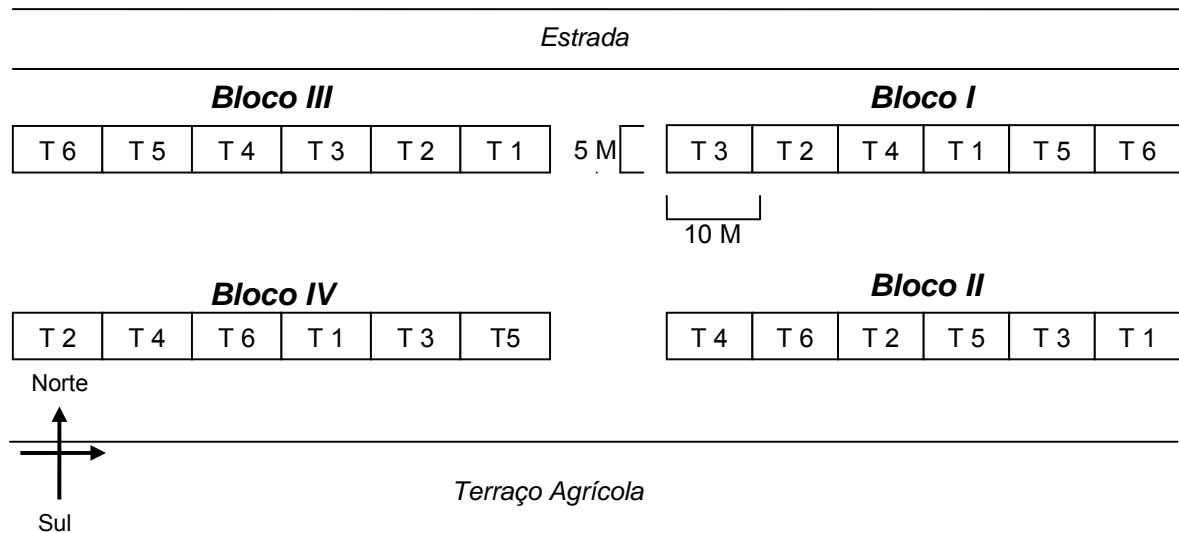
O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições. O experimento foi conduzido em parcelas experimentais de 50 m² (10 x 5 m), em sistema de plantio direto. (Figura 3).

Os tratamentos realizados para o plantio da cultura de milho foi adubação orgânica com dejetos de suíno, com base no teor de Nitrogênio (N) do dejetos líquido de suíno (DLS), com seis tratamentos, na safra 2008/09: T1 (testemunha, sem adubação), T2 adubação mineral, 300 kg ha⁻¹ N:P:K (8:28:16) e adubação em cobertura com uréia (125 kg ha⁻¹) 20 dias após o plantio (150 kg de N ha⁻¹), T3 DLS (50 kg de N (ha ano)⁻¹), T4 DLS (100 kg de N (ha ano)⁻¹), T5 DLS (150 kg de N (ha ano)⁻¹) e T6 DLS (200 kg de N (ha ano)⁻¹).

Na safra 2009/10, também seis tratamentos: T1 (testemunha, sem adubação), T2 adubação mineral, 300 kg ha⁻¹ N:P:K (8:28:16) e adubação em cobertura com uréia (125 kg ha⁻¹) 20 dias após o plantio (150 kg de N ha⁻¹), T3 DLS (100 kg de N

(ha ano)⁻¹), T4 DLS (150 kg de N (ha ano)⁻¹), T5 DLS (200 kg de N (ha ano)⁻¹) e T6 DLS (300 kg de N (ha ano)⁻¹).

Figura 3 –Croqui ilustrativo do delineamento experimental – Campo Experimental - Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR - Londrina.



4.3 DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNO

O dejetto líquido de suíno foi fornecido pela granja suinícola, que está localizada no Município de Londrina, latitude 23 ° 30'S, longitude 51 ° 22'W, a aproximadamente 8 Km do campo experimental.

A granja realiza ciclo completo de produção em confinamento, com as fases: maternidade, creche, recria e terminação. As instalações da granja possuem orientação leste-oeste, com paredes de alvenaria e piso cimentado. Os galpões possuem cobertura com telha de fibrocimento e há a utilização de cortinas para controle da temperatura ambiental.

O plantel é formado por aproximadamente 1,710 animais da linhagem Agroceres. Destes animais, são 3 cachorros, 3 avós, 170 a 180 matrizes e 30 a 40 leitões.

Para a venda são retirados do plantel de 80 a 85 animais por semana. Os suínos são vendidos aos 140 dias com 190 kg. Esta granja suinícola apresenta uma taxa de conversão alimentar (CA) média de 2,30.

A limpeza é realizada diariamente com raspagem, e a lavagem das baias semanalmente. Com base nos valores numéricos do plantel da granja suinícola e de acordo com a média diária de produção de esterco por categoria animal (Tabela 1) apresentada por Oliveira (1993), calculou-se o fluxo médio da granja de cerca de nove m³ dejetos líquidos de suíno diariamente. Todo o dejetos produzido na granja, sendo este constituído de fezes, urina, resíduo de ração, água de bebida e de lavagem das instalações, é canalizado e direcionado sob fluxo contínuo até duas lagoas de estabilização e armazenagem. O dejetos líquido de suíno (DLS) recebe a adição de microorganismos (Genética Tecnologia Biológica, Chapecó, Santa Catarina) e permanece na lagoa de estabilização até a retirada para utilização em lavoura.

Tabela 1 – Produção média diária de esterco (kg), esterco + urina (kg) e dejetos líquidos (L) por animal por fase de produção

Categoria de Suíno	Esterco	Esterco + Urina	Dejetos líquidos
25 a 100 kg	2,30	4,90	7,00
Porcas em Gestação	3,60	11,00	16,00
Porcas em Lactação	6,40	18,00	27,00
Machos	3,00	6,00	9,00
Leitão desmamado	0,35	0,95	1,40
Média	2,35	5,80	8,60

Fonte: Oliveira (1993).

O dejetos líquido de suíno (DLS) foi coletado de lagoa de estabilização de esterco da granja suinícola através de sucção com auxílio de um trator, e o transporte foi realizado através de tanque engatado ao trator com a capacidade volumétrica de três metros cúbicos até a área de aplicação no solo.

Para o cálculo do volume de DLS utilizado na aplicação do experimento, anteriormente, uma amostra de DLS foi coletada, realizada a determinação de matéria seca (MS) em estufa a 60 °C até volume constante da amostra. Amostra seca do dejetos foi submetida a análise de micro e macronutrientes para determinação da percentagem de Nitrogênio (N) na MS. Com base na

concentração de N g⁻¹ de MS, e considerando o teor de MS = 3,5% do dejetos líquido de suíno calculou-se o volume de DLS a ser aplicado na área experimental, conforme as seguintes doses, equivalentes de N ha⁻¹ utilizando DLS, sendo aplicado no T3 = 1.250 L, T4 = 417 L e no T5 = 834 L de dejetos líquido de suíno, na safra 2009/10.

O dejetos líquido de suíno, ainda no tanque, foi distribuído em recipientes de 50 L e aplicados na parcela experimental de acordo com os tratamentos. Uma amostra de cerca de 900 mL foi coletado em frasco plástico diretamente do tanque, durante a aplicação do mesmo no solo, e posteriormente armazenado a 4 °C até a realização das análises. Sendo realizada a contagem de bactérias e fungos em placas, e extração de DNA total, reações de PCR e DGGE para avaliar a diversidade genética de microrganismos não isolados.

4.4 SOLO DA ÁREA EXPERIMENTAL

As sementeiras do milho das safras 2008/09 e 2009/10 foram realizadas em 21 Nov. 2008 e 13 Nov. 2009, logo após a fertilização orgânica e mineral, conforme os respectivos tratamentos (Figura 3). Na Tabela 2 são apresentados dados de análise química de solo conforme a metodologia de Pavan *et al.* (1992), na safra 2009/2010 a 0-10 cm de profundidade de solo antes da aplicação dos tratamentos. No plantio com espaçamento de 90 cm e 5-6 plantas por metro linear utilizou-se máquina de plantio direto na palhada. Para controle de plantas invasoras foram realizadas duas aplicações de herbicida, uma antes da aplicação do DLS no solo e outra na pós-semeadura.

As amostras de solo foram coletadas em dois períodos da safra 2009/2010, após a sementeira do milho, aos 45 dias (29 Dez. 2009) e aos 120 dias, na colheita dos grãos (16 Mar. 2010). As amostras de solo foram coletadas com o auxílio de um cilindro na região da rizosfera, sendo formada uma amostra composta, através da coleta de 6-9 pontos, na diagonal da área de cada parcela (50 m²).

Para cada ponto de coleta de solo utilizou-se um cilindro de 5 cm de diâmetro e a profundidade de 5 cm (98,2 cm³), precedendo de desinfecção do cilindro com álcool 70%.

Cada amostra composta foi peneirada em malha de 4 mm (5 mesh), em seguida homogeneizada e dividida em subamostras de aproximadamente 100 g, em saco plástico e armazenadas em ambiente refrigerado 4 °C.

As amostras de solo foram analisadas por contagem de fungos e bactérias, e avaliação genética seguida de extração de DNA, reações de PCR e DGGE.

Tabela 2 – Análise química de solo antes de adubação na safra 2009/2010 a profundidade de 0 a 10 cm - Londrina – Pr.

Tratamento (Kg N ha ⁻¹ ano ⁻¹)	mg dm ³	g dm ³cmol _c dm ³⁻¹				
	P	C	Al	Ca	Mg	K	S
Controle	18,60	18,21	0,00	4,59	2,73	0,82	8,14
AM – 150	29,98	18,65	0,06	4,02	2,36	0,78	7,16
DLS – 100	24,28	19,28	0,00	5,17	3,08	0,3	8,98
DLS – 150	17,60	19,20	0,03	4,18	2,54	0,61	7,32
DLS – 200	20,25	18,47	0,04	4,20	2,47	0,67	7,34
DLS – 300	25,65	19,25	0,01	4,10	2,56	0,75	7,40

*AM - Adubação Mineral.

** DLS - Dejeito Líquido de Suíno.

4.5 GRÃOS DE MILHO

O milho Dow AgroSciencesTM 2A106 utilizado no plantio é um híbrido hiperprecoce, com ciclo de 110 dias para colheita normal a 20% de umidade. A planta apresenta estruturas foliares semiereta e porte médio (2,10 m), com uso para a produção de grãos e silagem (DOW AGROSCIENCES, 2011). As plantas da cultura safra 2009/2010, durante o ciclo para produção de grãos, receberam duas aplicações de inseticidas, uma para lagarta rosca e outra para lagarta do cartucho.

Os grãos de milho safras 2008/2009 e 2009/2010 foram colhidos manualmente em 31 Mar. 2009 e 16 Mar. 2010, respectivamente, a partir de três linhas por parcela (50 m²), debulhadas (SDMN 15/30, Nux Maquinagrícola, Itapira, São Paulo, Brasil) e homogeneizadas. Os grãos de cada parcela experimental (250 g) foram armazenados em saco plásticos à 4 °C até a contagem total de bolores e leveduras (dentro de uma semana) e extração de fumonisinas B₁ e B₂.

4.6 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

4.6.1 Contagem Total de Bactérias e Fungos do Dejeito de Suíno

Na contagem de bactérias e fungos, alíquota de 10 mL do dejeito suíno foi ressuspensa em 90 mL de solução salina 0,85% estéril (diluição 10^{-1}), após agitar por 15 s procederam-se as diluições seriadas até 10^{-11} . Para o plaqueamento, uma porção de 0,1 mL de cada diluição foi adicionada placa de Petri com o meio estéril, meio glicose-peptona (bactérias) e o meio de Martin (fungos) e procedeu-se o espalhamento com alça de drigalsk sobre o meio. As placas foram incubadas com a tampa invertida, a temperatura 28 °C em estufa de cultura (002 CB, *Fanem Ltda.*, São Paulo, SP, Brasil) durante o período de 10 dias.

O resultado da contagem de bactérias e fungos em cada placa foi expresso em unidade formadora de colônia (UFC) por mL de DLS analisado.

4.6.2 Contagem Total de Bactérias e Fungos de Solo

De cada amostra de solo de aproximadamente 100 g coletada foi pesado 10 g de solo e ressuspensa em 90 mL de solução salina 0,85% estéril (diluição 10^{-1}). Em seguida foi agitado por 15 s e procedeu-se com diluições seriadas até 10^{-6} . Para o plaqueamento foi utilizado o meio de glicose-peptona para bactérias e o meio de Martin para fungos.

Com o material sólido em suspensão retirou-se porções de 0,1 mL e foi colocado no centro da placa de Petri com o meio estéril, fazendo o espalhamento com movimentos circulares para distribuir homogeneamente a suspensão no meio.

As placas foram incubadas com a tampa invertida, a temperatura ambiente (25 -28 °C) em estufa de cultura bacteriológica (002 CB *Fanem Sf.*) por 10 dias. Após o período de incubação e crescimento de bactérias e fungos nos seus respectivos meios de cultura, as colônias foram enumeradas.

O resultado da contagem de bactérias e fungos em cada placa foi expresso em unidade formadora de colônia (UFC) por g de solo analisado.

4.6.3 Isolamento e Caracterização Fenotípica de Colônias Bacterianas

Após o período de incubação e crescimento de bactérias e fungos nos seus respectivos meios de cultura, as colônias foram enumeradas. As colônias de bactérias foram caracterizadas fenotipicamente e a partir de cada tipo de colônia bacteriana foi realizado o isolamento, em novas placas de Petri com o meio glicose-peptona.

Para a caracterização fenotípica das colônias foi considerado: o tamanho da colônia (<2 mm, 2 a 4 mm ou >4 mm), a forma (circular ou não circular), o aspecto da textura (viscosa, úmida, leitosa ou seca), a produção de goma (não produz ou produz), a elevação (elevada ou plana), as bordas (lisa ou ondulada), a estrutura da superfície (lisa ou granulosa) e a transparência (transparente ou opaca). Na elaboração do dendrograma de dissimilaridade fenotípica, valores binomiais 0 (ausência) e 1 (presença) foram atribuídos as características avaliadas e comparada com o coeficiente Euclidiana pelo método COMPLETE.

As bactérias isoladas foram liofilizadas em ampolas esterilizadas para preservação e armazenamento. O DNA dessas bactérias isoladas foi extraído para posterior identificação.

4.6.4 Extração de DNA dos Isolados de Bactérias

A extração de DNA, de todas as colônias isoladas e caracterizadas fenotipicamente, foi realizada com a adição de uma alçada de cada colônia isolada de cada placa ao tubo de *ependorf* com um mililitro de solução salina 0,85%. O tubo de *ependorf* homogeneizado foi centrifugado ($10.000 \times g \text{ min}^{-1}$). Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* de células bacterianas lavado com solução salina 0,85% e centrifugado por três vezes ($10.000 \times g \text{ 10 min}^{-1}$).

Adicionou-se ao *pellet* lavado 400 μL de TE 50/20, 50 μL de SDS 10%, 10 μL de proteinase K (10 mg mL^{-1}), 10 μL de lisozima (5 mg mL^{-1}) e 2 μL de RNase (10 mg mL^{-1}); os tubos foram incubados em bloco de aquecimento a 37 °C 60 min^{-1} .

Com a utilização de uma ponteira de 1000 μL , o material foi homogeneizado três vezes, por aspirar e soltar, acrescentado de 30 μL solução de NaCl (5M) e 28 μL de água ultra-pura. O tubo foi homogeneizado por inversão e armazenado em geladeira por 60 min. Em seguida, o tubo foi centrifugados (12000 $\times g$ 15 min^{-1}), 300 μL do sobrenadante adicionado a um novo tubo.

Neste tubo de *ependorf* adicionou-se 600 μL de etanol 95% gelado, homogeneizou-se e colocado -20 °C por 18 h. Após este período, o tubo foi centrifugado (12000 $\times g$ 15 min^{-1}) a temperatura ambiente. O sobrenadante descartado e o *pellet* de DNA lavado com etanol 70% e deixado secar. Após secagem do *pellet*, acrescentou-se 100 μL de TE 10/1 e o tubo com o DNA armazenado a -20 °C.

4.6.5 Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante – DGGE

4.6.5.1 Extração do DNA total do solo

O DNA total do solo foi extraído utilizando o Kit Soil DNA Isolation ® (Mo Bio, Laboratories, Inc Carlsbad, CA, USA). Um grama de solo foi colocado no tubo *ependorf* com granada finamente moída e agitado por 5 s (vórtex). A seguir, 60 μL da solução contendo SDS (**S1**) foi adicionado, agitado por 60 s e aquecido a 70 °C por 5 min em banho seco. O tubo agitado por 30 s e deixado sob repouso por 5 min.

Ao tubo 200 μL acrescentou-se da solução removedora de inibidores (**IRS**), agitou-se 10 min. acoplados horizontalmente no vórtex. Após centrifugação 10.000 $\times g$ 90 s^{-1} (5415 D, *Eppendorf*, Hauppauge, NY, EUA), o sobrenadante (400 a 450 μL) foi transferido para outro tubo *ependorf* do *kit* e adicionado 250 μL da solução de precipitação de proteínas (**S2**). Após agitação por 10 s no vórtex, o tubo foi incubado a 4 °C 5 min^{-1} e centrifugado (10.000 $\times g$ 60 s^{-1}).

O sobrenadante (450 μL) foi acondicionado em novo tubo, adicionado de 900 μL da solução salina (**S3**) e homogeneizado. A seguir, 700 μL foi transferido a

um tubo com *Spin filter* (kit Mo Bio) e centrifugado ($10.000 \times g \ 60 \text{ s}^{-1}$). O filtrado foi descartado, o DNA retido no filtro foi limpo com 300 μL de solução de etanol (**S4**) e centrifugado ($10.000 \times g \ 30 \text{ s}^{-1}$).

O filtro foi transferido para novo tubo, adicionado de 50 μL de solução tampão de eluição estéril (10 mM Tris) (**S5**) e centrifugado ($10.000 \times g \ 60 \text{ s}^{-1}$). O filtro foi descartado e o DNA (filtrado) foi mantido sob repouso à 4 °C 12 h⁻¹ e armazenado a -20 °C.

O DNA total do solo extraído foi submetido à eletroforese em cuba horizontal com tampão Tris-borato-EDTA – TBE (Tris-HCl 89 mM (Invitrogen *Life Technologys*, Carlsbad, CA, USA); EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3). Para verificar a qualidade do DNA, 6 μL de DNA adicionado à 3 μL de corante azul de bromofenol (0,25%) em gel agarose 1% (Invitrogen *Life Technologys*, Carlsbad, CA, USA). Após a eletroforese o gel foi corado em brometo de etídeo (0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$), visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador (IVA, Vilber Lourmat, Marne la Vallée, França) e fotografado (programa Kodak Digital Science , Kodak 10tm).

4.6.5.2 Reação da polimerase em cadeia - PCR

Todas as reações de amplificação foram realizadas em um termociclador (PTC-100TM 6.0, MJ Research, CA, EUA). A PCR foi desenvolvida utilizando pares de oligonucleotídeos iniciadores universais na amplificação de rDNA 18S e 16S do DNA total do solo. Para a amplificação de rDNA 16S (bactérias) foi empregado o par de iniciadores fD1 e rD1 (WEISBURG *et al.*, 1991). E para o rDNA 18S (fungos) utilizou-se o par de iniciadores EF4f e EF3r (SIMON *et. al.*, 1992). Os amplicons destas reações foram utilizados para o Nested PCR com os pares de iniciadores F e R (WEISBURG *et al.*, 1991) para rDNA 16S, enquanto para rDNA 18S foi adicionado par de oligonucleotídeo EF4f e NS3r (SIMON *et. al.*, 1992). Os tamanhos das sequências do rDNA amplificados e as respectivas sequências dos oligonucleotídeos iniciadores podem ser observados na Tabela 2.

Na reação de amplificação de rDNA 16S, para cada reação, foi adicionado 1,0 μL de DNA (30 ng); 5 μL de tampão para PCR 10 X (Tris-HCl, 200 mM,

pH 8,4, KCl, 500 mM) (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 3 µL de dNTP (1,5 mM) (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 1,5 µL MgCl₂(50 mM); 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U) (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 1,5 µL do par de iniciadores F e R (10 pmol) (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 36,3 µL de água ultrapura.

A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: 95 °C por 2 min; 94 °C por 15 s; 93 °C por 45 s; 55 °C por 45 s; 72 °C por 2 min; 10 ciclos (94 °C por 15 s, 93 °C por 45 s, 55 °C por 45 s, 72 °C por 2 min); e 72 °C por 5 min.

Tabela 3 – Região conservada 16S para bactéria e 18S para fungos, nome dos oligonucleotídeos iniciadores, seqüência e tamanho em pares de bases (pb) do fragmento de rDNA amplificado.

Região conservada	Oligonucleotídeos Iniciadores	Seqüência 5'- 3'	Tamanho (pb)
16S	fD1	CCGAATTCGTGACAACAG	1500
		AGTTTGATCCTGGCTCAG	
	rD1	CCCGGGATCCAAGCTTAA	
		GGAGGTGATCCAGCC	
F	CGCCCGGGGCGCGCCCGG	433	
	GCGGGGCGGGGGCACGGGG		
	GGAAGCCGAAGAACCTTAC		
R	GCGTGTGTACAAGACCC		
18S	EF4f	GGAAGGGTGTATTTATTAG	1500
	EF3r	TCCTCTAAATGACCAGTTTG	
	NS3r	CGCCCGCCGCGCCCGCG	530
CCCGGCCCGCCCCGCC			
CCGGCTGGCACCAGACTTG			

* **16S**: Weisburg *et al.*,(1991); **18S**: Simon *et. al.*, (1992).

Para o Nested PCR 16S para cada reação foi adicionado 1,0 µL da reação fd1 e rD1; 2,5 µl de tampão para PCR 10 X (Tris-HCl, 200 mM, pH 8,4, KCl, 500 mM) (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 5,0 µL de dNTP (1,5 mM) (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 1,3 µL MgCl₂(50 mM); 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U) (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 1,0 µL do par de iniciadores F e R (10 pmol) (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 13,0 µL de água ultrapura.

A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: 95 °C por 2 min; 94 °C por 15 s; 93 °C por 45 s; 55 °C por 45 s; 72 °C por 2 min; 20 ciclos (94 °C por 15 s, 93 °C por 45 s, 55 °C por 45 s, 72 °C por 2 min); e 72 °C por 10 min.

Para primeira reação de amplificação de rDNA 18S foi adicionado 1,0 µL de DNA 30 ng); 5 µL de tampão para PCR 10 X(Tris-HCl, 200 mM, pH 8,4, KCl, 500 mM) (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 6,6 µL dNTP(1,5 mM) (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 3,75 µM MgCl₂ (50 mM); 1U de *Taq* DNA polimerase) (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 1,0 µL do par de iniciadores EF4f e EF3r; e 29,65 µL água ultrapura esterilizada (SOUZA *et al.*, 2004). A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 94 °C por 2 min; 25 ciclos de 94 °C por 30 s, 59 °C por 60 s, 72 °C 2,5 min; 72 °C 10 min.

Para o Nested PCR 18S para cada reação foi adicionado 2 µL da primeira reação de PCR diluída (1:10); 5 µL de tampão para PCR 10 X(Tris-HCl, 200 mM, pH 8,4, KCl, 500 mM) (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 6,6 µL dNTP(1,5 mM) (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 3,75 µM MgCl₂ (50 mM); 1U de *Taq* DNA polimerase) (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 1,0 µL de par de iniciadores EF4f e NS3r; e 29,65 µL água ultrapura esterilizada (SOUZA *et al.*, 2004).

A segunda reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: 94 °C por 4 min; 25 ciclos de 94 °C por 30 s, 59 °C por 60 s, 72 °C 2,5 min; 72 °C 5 min.

4.6.5.3 Análise dos produtos de amplificação

Na análise dos produtos de amplificação, 5 µL de cada tubo de PCR, descrito anteriormente foram adicionados a 5 µL de azul de bromofenol (0,25%) e

analisados por eletroforese em gel 1% agarose (Invitrogen Life Technologys, Carlsbad, CA, USA) por 90 min a 70V, em cuba horizontal com tampão TBE 1X. Após a eletroforese, o gel foi corado em brometo de etídeo ($0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$), visualizado com transiluminador (IVA, Vilber Lourmat, Marne la Vallée, França) sob UV e fotodocumentado em câmera digital (programa Kodak Digital Science, Kodak 10tm).

4.6.5.4 Preparo do gel de eletroforese em gel de gradiente desnaturante - DGGE

A análise de DGGE para separação dos amplicons de rDNA de 16S foi desenvolvida utilizando o DCodeTM Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Munich, Alemanha) e o gradiente desnaturante de 25% a 55% de desnaturação.

Os géis de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1; m:m) 6% com soluções desnaturante de 25% e 55%, a partir de solução estoque desnaturante de 0% (15 mL acrilamida/bisacrilamida (Invitrogen Life Technologys, Carlsbad, CA, USA) a 40%; 2 mL de tampão TAE 50X - 2 M Tris base, 1 M ácido acético glacial (CAAL, Santa Cecília, São Paulo, SP, Brasil), água ultrapura para volume final de 1000 mL; 83 mL de água ultra pura; 100 μL persulfato de amônio (10%); 10 μL Temed (Invitrogen Life Technologys, Carlsbad, CA, USA) e da solução estoque desnaturante de 100% (15 mL acrilamida/bisacrilamida a 40%, 2 mL de tampão TAE 50X - 2 M Tris base, 1 M ácido acético glacial, água ultrapura para volume final de 1000 mL; 40 mL de formamida deionizada (Invitrogen Life Technologys, Carlsbad, CA, USA); 40 mL de uréia ultrapura (Invitrogen Life Technologys, Carlsbad, CA, USA); água ultrapura para o volume final de 100 mL; 100 μL persulfato de amônio (10%), 10 μL Temed (Invitrogen Life Technologys, Carlsbad, CA, USA). Após a polimerização do gel (16x16x1 mm), o suporte do sanduíche de gel gradiente paralelo foi acondicionado na cuba vertical (Bio-Rad Laboratories, Munich, Alemanha) para a pré-corrída por 60 min, a 85V e o aquecimento do tampão de corrida a 60 °C.

O volume de produto de PCR utilizado foi de 20 μL por amostra acrescentou-se 20 μL de tampão de amostra 2X (0,05% azul de bromofenol, 0,05% xileno cianol, 70% glicerol, água ultrapura para volume final de 10 mL). A separação

dos amplicons por DGGE na corrida em tampão TAE 1X (40 mM Tris-base, 1mM EDTA, pH 8,0) por 17 h, a 85V e temperatura de 60 °C. O gel foi corado em brometo de etídeo (0,05 µg mL⁻¹) e fotografado em câmera digital (programa Kodak Digital Science, Kodak 10tm).

4.6.6 Contagem Total de Bolores e Leveduras dos Grãos de Milho

A contagem total de bolores e leveduras foi efetuada segundo a metodologia de plaqueamento em superfície. O milho triturado (20 *mesh*), uma alíquota de 10g homogeneizada em 90 mL de água peptonada 0,1 %, seguido de preparação de diluições seriadas de 10⁻² a 10⁻⁶, sendo 0,1 mL de cada diluição plaqueado sobre meio de Ágar Batata Dextrose (BDA). As placas de petri foram incubadas por cinco dias a 25 °C. Após incubação, as colônias foram identificadas e contadas, de acordo com Nelson; Toussoun; Marasas (1983) e Samson; Hoeskstra; Frisvad (1995).

O resultado da contagem fúngica em cada placa foi expresso em unidade formadora de colônia (UFC) por g de milho analisado.

A atividade de água (aW) dos grãos de milho foi determinada em analisador de atividade de água (CX-2, Aqualab, *Decagon Devices Inc.*, Canadá, USA).

4.6.7 Determinação de Fumonisinas (FB₁ e FB₂) em Grãos de Milho por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

4.6.7.1 Extração da amostra

A extração e determinação de fumonisinas foram realizadas segundo metodologia descrita por Shephard *et al.* (1990), modificada por Ueno *et al.* (1993). As amostras de grãos de milho foram trituradas e peneiradas (50 *mesh*). Sendo 10 g de cada amostra, adicionadas 30 mL de metanol:água (3:1, v/v), deixado em repouso por 10 min à temperatura ambiente. Depois foi agitada por 1 h a 150 r.p.m a 10 °C (incubadora refrigerada Marconi®) e filtrada (papel filtro Watman nº1) para obtenção do extrato para a etapa de pré-limpeza.

4.6.7.2 Pré-limpeza da amostra

Um mililitro do filtrado (extrato bruto da amostra) foi aplicado em minicoluna de troca aniônica Sep-Pak accell plus QMA (Waters Co., Ltda, Irlanda), acondicionada com 5 mL de metanol, seguida de 5 mL de metanol:água (3:1, v/v). Em seguida, 6 mL de metanol:água (3:1, v/v) foi aplicado, seguido de 3 mL de metanol (J.T.Baker, USA).

A amostra foi eluída com 10 mL de solução com ácido acético (CH_3COOH) e 0,5% em metanol (CH_3OH), colocada para secar a 45 °C. Depois, ressuspenso em 2 mL de metanol:água (3:1, v:v), seco sob gás N_2 a 45 °C.

Para a quantificação de fumonisina da amostra, o resíduo contido no tubo foi ressuspendido com 800 μL de metanol:água (3:1, v/v), agitado por 1 min, aliquotado em tubos com 200 μL cada e secos em gás N_2 a 45 °C.

4.6.7.3 Preparo da fase móvel

A solução de dihidrogenofosfato de sódio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (J.T. Baker, USA) 0,1 M preparada pesando-se 2 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e adicionado 160 mL de água ultrapura. O volume de 160 mL da solução de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1 M, foi acrescentada de 640 mL de metanol grau CLAE. O pH foi corrigido para pH=3,30 com ácido ortofosfórico (H_3PO_4) e a solução filtrada em membrana de nylon 0,45 μm de poro, 47 mm de diâmetro.

4.6.7.4 Quantificação da amostra por CLAE

Os tubos com 200 μL (secos em gás nitrogênio) foram ressuspendidos em 100 μL de acetonitrila:água (1:1, v/v), adicionado 200 μL da solução derivatizadora OPA (OPA, Sigma Co., USA), agitado por 30 s e injetado no aparelho de CLAE. O preparo do reagente OPA constituiu-se de diluição de 40 mg de o-phtaldeído em 1 mL de metanol grau CLAE, adicionado de 5 mL de tetraborato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 50 μL de 2-mercaptoetanol.

As fumonisinas foram analisadas em sistema isocrático de fase reversa C18 por CLAE (bomba LC-10 AD e detector de fluorescência RF 535, Shimadzu, Japão), usando coluna Luna 5 μ (4,6 x 250 mm; Phenomenex®, EUA). Foi utilizado comprimento de onda de excitação 335 nm e de emissão de 450 nm. E os limites de detecção de FB₁ e FB₂ foram de 27,5 e 35,3 ng g⁻¹, respectivamente.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na avaliação dos resultados de análises microbiológicas e analítica foi aplicado Teste t (p=0,05), Análise de Variância (ANOVA), realizando o teste de comparação de médias, Teste de Tukey (p=0,05), utilizando o Programa SAS/Statística versão 7.0, para comparação entre os tratamentos de aplicação do dejetos de suíno na cultura do milho.

Para a avaliação de diversidade bacteriana entre os isolados do DLS e de solos, construiu-se uma matriz binária com valores binomiais 0 (ausência) e 1 (presença) de características fenotípicas, e a similaridade dos isolados e comparada pelo coeficiente Euclidiana pelo método COMPLETE.

Na análise das bandas do gel de DGGE utilizou-se o programa Kodak Digital Science, uma matriz binária foi construída com os valores de 0 para a ausência e 1 para a presença de bandas; a similaridade do DLS e do solo e comparada pelo coeficiente de Jaccard e os dados foram agrupados pelo método UPGMA.

Os isolados bacterianos caracterizados fenotipicamente e os perfis de DLS e de solo por DGGE foram agrupados em dendrogramas utilizando o programa NTSYS-pc (Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System, versão 2.1, Exeter Software, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram apresentados em três capítulos para posterior publicação, sendo divididos conforme os objetivos específicos e material analisado, dessa forma descrito a seguir:

Capítulo 1- Caracterização química, microbiológica e molecular de dejetos líquido de suíno e seu efeito na micologia e produção de fumonisinas em grãos de milho sob plantio direto

Capítulo 2- Avaliação microbiológica de solo fertilizado com dejetos líquido de suíno em cultivo de milho (*zea mays* L.)

Capítulo 3- Efeito de adubação com dejetos líquido de suíno na micologia e produção de fumonisinas em grãos de milho (*zea mays* L.)

5.1 CAPÍTULO 1- CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR DO DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNO E SEU EFEITO NA MICOLOGIA E PRODUÇÃO DE FUMONISINAS EM GRÃOS DE MILHO SOB PLANTIO DIRETO

A análise microbiológica da amostra de dejetos líquido de suíno (DLS), após a análise descrita no item 4.6.1, apresentou a média de contagem fúngica igual a $4,3 \times 10^3$ UFC e de $5,8 \times 10^7$ UFC de bactérias por mililitro de DLS.

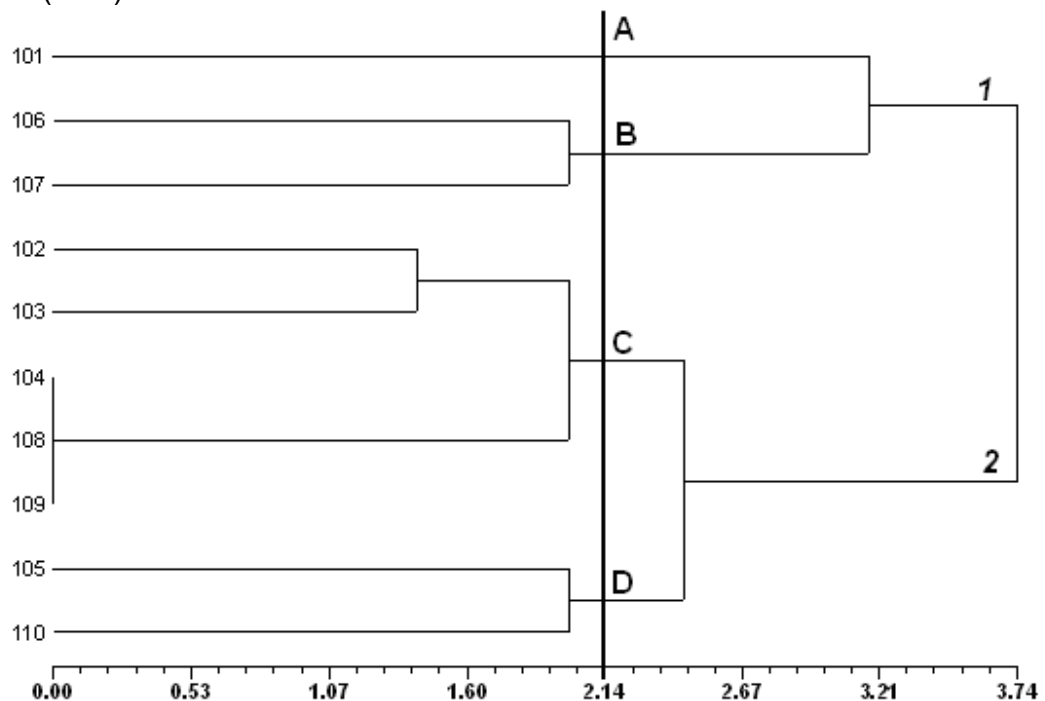
As características químicas do dejetos líquido de suíno, determinadas conforme metodologia de Miyazawa *et al.*(1999) e Pavan *et al.* (1992), podem ser observadas na Tabela 4. O DLS apresentou 2,63% de MS, a cada quilograma (kg) de MS a principal composição de macronutrientes 29,8g de nitrogênio (N) e 29,0g de potássio (K). Os micronutrientes 1.801 mg de cobre (Cu) e 3.483 mg de Zinco (Zn) por kg de MS de dejetos suíno.

Tabela 4 – Caracterização química do dejetos líquido de suíno (DLS)

Macronutrientes					Micronutrientes				
	N	P	K	Ca	Mg	Cu	Zn	B	Mn
MS DLS g kg ⁻¹ mg kg ⁻¹			
	29,77	41,60	29,00	24,67	11,07	1.801,00	3.483,00	64,50	621,60

A partir da caracterização fenotípica dos 10 isolados do dejetos líquido de suíno (DLS), conforme a descrição do item 4.6.3, identificadas de 101 a 110, o dendrograma elaborado agrupou os isolados entre o coeficiente 0,0 e 3,74, pelo coeficiente Euclidiana (Figura 4). Com base nesta caracterização dos isolados bacterianos de DLS, houve a formação de dois grandes grupos, que ao coeficiente 2,14 forma subdivididos em quatro subgrupos distintos; o grupo A foi constituído apenas do isolado 101 do DLS, enquanto que o grupo B, agrupou os isolados 106 e 107. O grupo C foi dividido em mais dois grupos, 30% dos isolados apresentam 100% de similaridade fenotípica 104, 108 e 109, e o quarto grupo foi formado pelas bactérias 105 e 110.

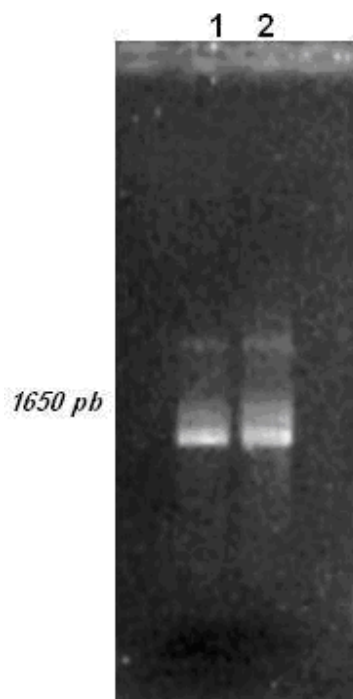
Figura 4 –Dendrograma de dissimilaridade fenotípica pelo método COMPLETE e Coeficiente Euclidiana de isolados de bactérias de dejetos líquido de suíno (DLS).



*101 a 110 – Identificação dos isolados bacterianos.

Na Figura 5 estão representados os produtos de amplificação de PCR 16S do DLS utilizado na adubação de solo, conforme descrito no item 4.6.5. O DLS apresentou a formação duas bandas próximas a 1650 pares de bases.

Figura 5 – Foto ilustrativa do de amplificação de Nested PCR 16S de DNA total de do dejetos líquido de suíno (DLS) aplicado no solo.



Linhas: 1 e 2 = DLS

A variação no teor de nutrientes do dejetos suíno é constantemente observada em análises físico-químicas, porque há alterações no tipo de alimentação fornecida aos animais, no tipo de tratamento físico ou químico aplicado ao resíduo, o tipo de armazenamento, a representatividade no momento da coleta e na homogeneização da amostra analisada. Assim, Sørensen e Fernández (2003) observaram elevados teores de nitrogênio em dejetos quando os suínos receberam dieta com alta concentração de fibras fermentáveis e de proteína bruta. Os nutrientes primários N, P e K foram encontrados em dejetos suíno coletado em 41 suinoculturas comerciais na Coréia do Sul, com maior concentração de nitrogênio de 3-6 mg L⁻¹ (11,4% do total de sólidos) com sólidos totais variando de 0,6-12,6% (SURESH *et al.*, 2009). Por outro lado, Binh (2007) determinou concentração de 2,72 g L⁻¹ de N total, P

de 1,71 g L⁻¹ e maior concentração de K com 3,3 g L⁻¹, em dejetos suínos com 8,78% de MS em estação experimental com 800 suínos.

A estocagem de DLS sob diferentes condições climáticas proporcionou que a concentração de N fosse reduzida em 48-57%, sendo 23-24% na forma de NH₃, isto devido ao ciclo de temperatura de degradação variável de 60-70 °C (PETERSEN; LIND; SOMMER, 1998). CHANTIGNY *et al.* (2008), no estudo de desempenho de adubação com DLS em cultura milho, observou que houve redução de N de 36-62% no DLS decantado, de 48-78% DLS digerido e 71-90% após filtração e digestão/floculação; entretanto comprovaram que todos os tipos de DLS, utilizado em quantidade equivalente 100 kg N ha⁻¹, foram tão eficiente quanto a adubação mineral (NH₄NO₃) no aumento de rendimento de grãos de milho no decorrer de três safras. E em solo adubado com DLS ocorreu uma maior disponibilidade de nutrientes P, Mg e Ca, também com maiores valores de pH que solo com adubação química (SUZUKI *et al.*, 2009).

Referente ao atributo de avaliação microbiológica, a microbiota bacteriana presente em resíduos de origem animal, mantido sob estabilização, tratado ou aplicado como fertilizante no solo, apresenta tendência de alterações decorrentes de mudança no ambiente, composição de nutrientes e de gases atmosféricos. No monitoramento de manutenção de comunidades naturais de bactérias fecais de dejetos suínos, Ricca, Ziemer e Kerr (2001) observaram média de 10⁸ UFC mL⁻¹ de bactérias aeróbias em dejetos suínos frescos (Ágar nutriente, a 37 °C por 24 h), com redução a 10⁶ UFC mL⁻¹, no sexto dia de fermentação, e população inferior a 10⁴ UFC mL⁻¹ após este período. Do mesmo modo, Leung e Topp (2001) determinaram inicialmente contagem bacteriana total de 1,0 x 10¹⁰ UFC mL⁻¹ em DLS, após sete semanas de tratamento as bactérias aeróbias reduziram de 1,2 x 10⁶ a 3,0 x 10⁵ UFC mL⁻¹ sob anaerobiose e aumentou de 7,3 x 10⁵ a 1,1 x 10⁸ UFC mL⁻¹ em aerobiose.

Segundo Hanajima *et al.* (2009) a comunidade microbiana de DLS em decomposição foi bastante variável no decorrer de sete dias, com predominância de *Bacillus* spp., a presença deste microrganismo estava associada a composição de C orgânico. As alterações de comunidade bacteriana em DLS foram observadas por

DGGE, aos 7 e 14 dias de incubação, sob a influência de enriquecimento com bactérias produtoras de escatol (COOK *et al.*, 2007).

Também, na avaliação de dejetos suíno acrescentado de esterco bovino em etapas de compostagem, foi observado de $1,9 - 8,0 \times 10^9$ UFC g⁻¹ população de bactérias heterotróficas mesófilas (Ágar triptico de soja, a 20 °C por 15 dias) e os fungos variaram de $3,76 - 9,35 \times 10^5$ UFC g⁻¹, segundo os autores, esta elevada contagem fúngica foi devido aos fungos presentes na palha de cevada utilizada no processo de compostagem (VUORINEN; SAHARINEN, 1997).

Sobre a avaliação dos efeitos de fatores químicos e físicos na redução de patógenos em material bioestabilizado, Wong e Selvam (2009) notaram que a adição de 4% de calcário em DLS fresco, que durante a estabilização manteve a temperatura superior a 45 °C, foi capaz de reduzir a população de bactérias patogênicas em apenas 4 dias de incubação. E na Coréia do Sul, a análise de dejetos suíno de lagoa de estabilização e após tratamento em lagoa anaeróbia (LA) e por digestão aeróbica autotérmica (DAA), apresentou redução na diversidade bacteriana para ambos os tratamentos, nenhuma detecção de patógeno foi observada no tratamento DAA, houve redução de presença de patógenos humanos e animais (HAN *et al.*, 2010).

5.2 CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE SOLO FERTILIZADO COM DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNO EM CULTIVADO COM MILHO (*ZEA MAYS* L.)

A análise microbiológica de solo sob cultivo de milho foi realizada como descrito no item 4.6.2, e as coletas dessas amostras foram realizadas em duas épocas, na safra 2009/2010, pós- semeadura aos 45 dias depois de aplicar o dejetos líquidos de suíno (DLS) e aos 120 dias na colheita do milho. Os valores de contagem bacteriana pós-semeadura e na colheita estão apresentados na Tabela 5. Na pós-semeadura, a população bacteriana para todos os tratamentos variaram entre $8,0 \times 10^7$ a $2,0 \times 10^8$ UFC por grama de solo. O solo na colheita do milho, com a aplicação de 150 kg N ha^{-1} de DLS apresentou $4,0 \times 10^7$ UFC g⁻¹, valor inferior ao controle com $2,0 \times 10^8$ UFC g⁻¹; sendo que o solo sob adubação com dose maior de DLS 200 kg N ha^{-1} foi observado $3,0 \times 10^8$ UFC g⁻¹ de bactérias, no entanto não houve diferença estatística.

Tabela 5 – Número de bactérias total do solo sob adubação com dejetos líquidos de suíno (DLS) safra de milho 2009/2010 – Londrina PR.

Tratamento (kg N ha ⁻¹ ano ⁻¹)	Bactéria Total (UFC g ⁻¹ de solo)	
	Pós-semeadura	Colheita
Controle	2,0 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸
Adubação Mineral -150	8,0 x 10 ⁷	6,0 x 10 ⁷
Dejeto líquido de suíno - 150	2,0 x 10 ⁸	4,0 x 10 ⁷
Dejeto líquido de suíno - 200	2,0 x 10 ⁸	3,0 x 10 ⁸

Pós-semeadura = 45 dias após a semeadura e colheita = 120 dias após a semeadura.
Médias de duas repetições. Não significativo pelo teste t ($p > 0,05$).

Com base no índice de Shannon de bactérias isoladas de solo e do DLS (Tabela 6), pode-se observar uma maior diversidade bacteriana em solo sob adubação mineral aos 45 dias após a aplicação do dejetos líquidos de suíno (DLS); este diferiu somente da aplicação da dose de 150 kg N ha de DLS, com índice de Shannon 0,9503. A adubação com 150 kg N ha de DLS não apresentou diferença significativa na diversidade comparada ao controle e a aplicação de 200 kg N ha de DLS.

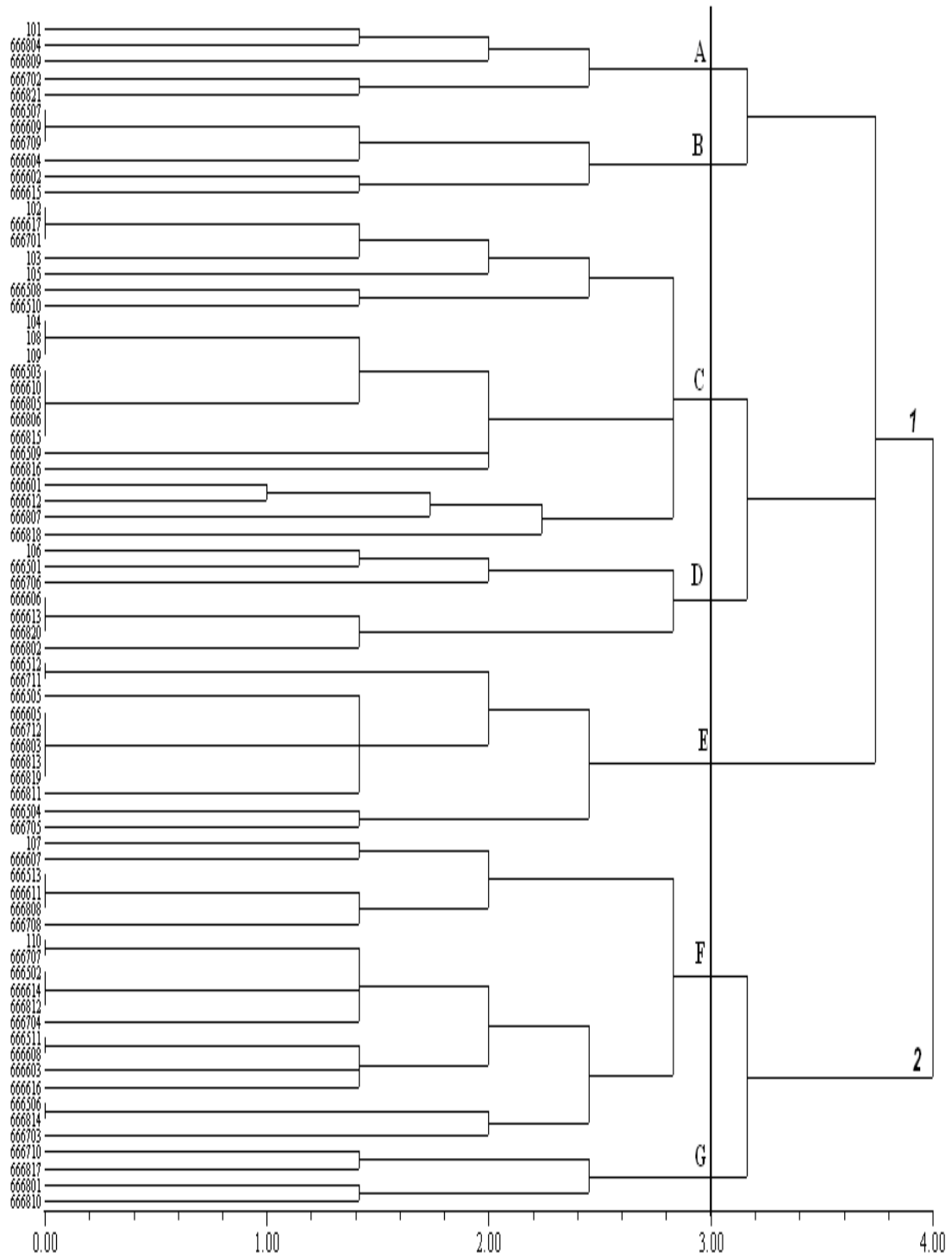
Tabela 6 – Distribuição de índices de diversidade nos diferentes tratamentos a partir do dendrograma fenotípico pelo método COMPLETE e coeficiente Euclidiana de isolados de bactérias do dejetos líquidos de suíno e de solo aos 45 dias após a semeadura.

Tratamento (kg N ha ⁻¹ ano ⁻¹)	Índice Shannon H
Controle	1,479
Adubação Mineral - 150	1,792
Dejeto líquido de suíno - 150	0,9503*
Dejeto líquido de suíno - 200	1,215

* Significativo pelo Teste t ($p < 0,05$).

Na avaliação dos isolados bacteriano de solo na época da colheita dos grãos de milho (Figura 6 e Tabela 7), o solo do tratamento com 200 kg N ha de DLS apresentou índice de 1,089 e o solo do tratamento o índice de Shannon de 1,461. Não houve diferença na diversidade independente da adubação com DLS ou adubo mineral.

Figura 6 – Dendrograma de dissimilaridade de isolados bacterianos de dejetto líquido de suíno e do solo na colheita do milho, com base nas características fenotípicas pelo método COMPLETE e Coeficiente Euclidiana.



Isolados bacterianos **101-110** de DLS e de solo conforme adubação (equivalente kg N ha⁻¹ ano⁻¹) **6665** controle, **6666** adubação mineral (150), **6667** DLS (150) e **6668** DLS (200).

Tabela 7 – Distribuição de índices de diversidade nos diferentes tratamentos a partir do dendrograma fenotípico pelo método COMPLETE e coeficiente Euclidiana de isolados de bactérias do dejetto líquido de suíno e de solo na colheita do milho

Tratamento ($kg\ N\ ha^{-1}\ ano^{-1}$)	Índice Shannon <i>H</i>
<i>Controle</i>	1,433
<i>Adubação Mineral - 150</i>	1,461
<i>Dejetto líquido de suíno - 150</i>	1,594
<i>Dejetto líquido de suíno - 200</i>	1,732

Não significativo pelo Teste t ($p>0,05$).

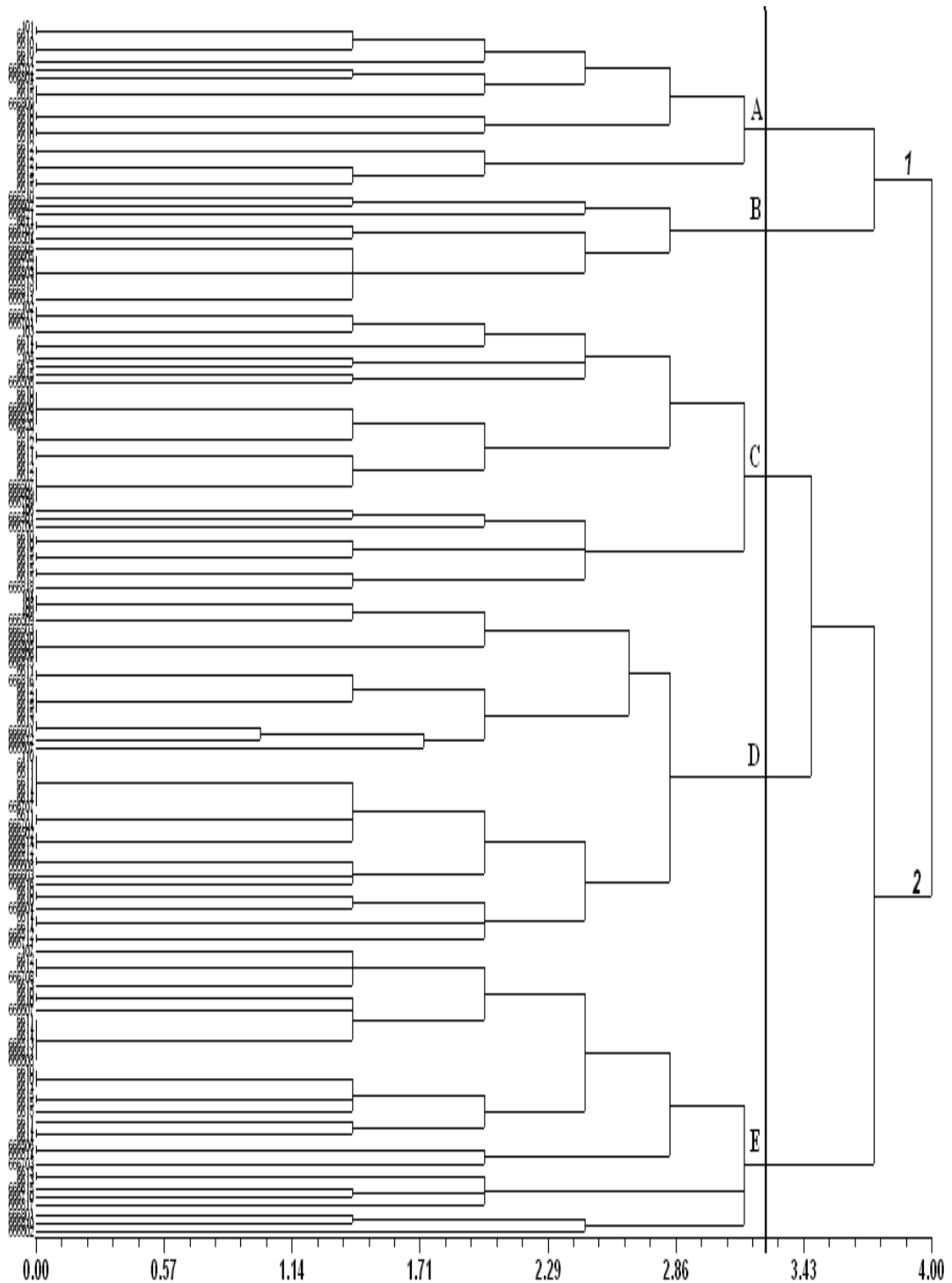
Foi isolado e com características fenotípicas diferentes um total de 150 colônias de bactérias a partir das amostras de solo em duas épocas de coleta. Sendo que, aos 45 dias após-semeadura, foram isoladas 78 colônias e na época da colheita do milho foram isoladas 72 colônias bacterianas. A partir deste isolados bacteriano do solo foi elaborado o dendrograma fenotípico (Figura 7) e a Tabela 8 com os índices de diversidade. Os solos coletados na pós-semeadura e na colheita não apresentaram diferença significativa na diversidade bacteriana independente da adubação utilizada na cultura de milho.

Tabela 8 – Distribuição de índices de diversidade na pós-semeadura e na colheita a partir do dendrograma fenotípico pelo coeficiente Euclidiana de isolados bacterianos de solo.

Época	Índice Shannon <i>H</i>
<i>Pós-semeadura</i>	1,464
<i>Colheita</i>	1,533

Pós-semeadura = 45 dias após aplicação de DLS e semeadura; e colheita = 120 dias após a semeadura. Não significativo pelo Teste t ($p>0,05$).

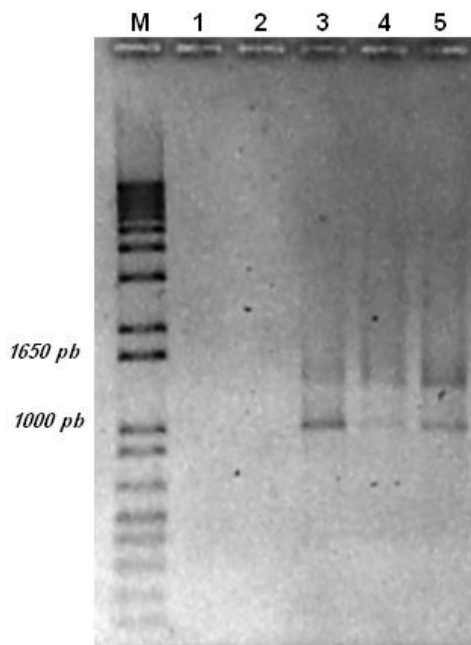
Figura 7 –Dendrograma de dissimilaridade de isolados de bactérias de dejetto líquido de suíno e de solo, da pós semeadura e da colheita do milho, baseado em características fenotípicas pelo método COMPLETE e Coeficiente Euclidiana.



Isolados bacterianos **101-110** de DLS e de solo conforme adubação (equivalente $\text{kg N ha}^{-1} \text{ano}^{-1}$) **6665** controle, **6666** adubação mineral (150), **6667** DLS (150) e **6668** DLS (200).

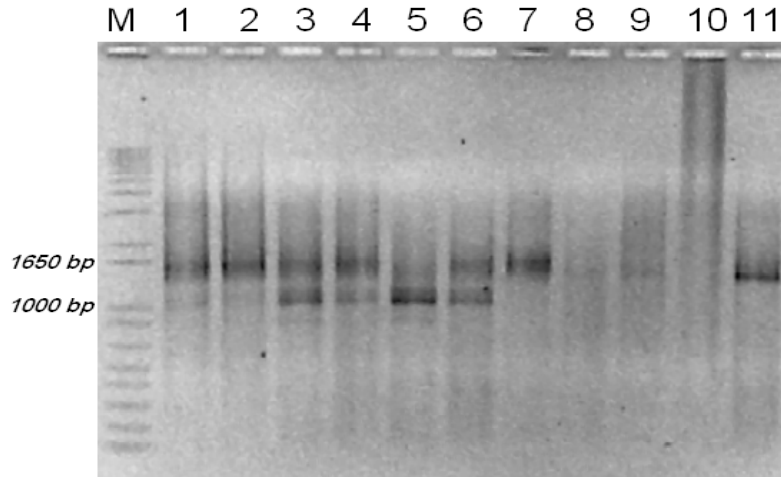
Os produtos de amplificação de PCR 16S e 18S de DNA total de dejetos líquidos de suíno (DLS) utilizados na adubação e dos solos, coletados aos 45 e 120 dias após a semeadura, são apresentados nas Figuras de 8 a 11. A Figura 9 apresenta as amplificações Nested PCR 16S com bandas a 1650 e 1000 pares de bases, com mudanças nas concentrações de DNA de 15 a 60 ng e de 1,5 e 10 mM de dNTP. A melhor amplificação foi visualizada com a utilização de DNA na concentração de 30 ng e de dNTP de 1,5 mM. Não houve amplificação do DNA com o emprego de alta concentração de dNTP a 10 mM ou de 60 ng de DNA.

Figura 8 –Foto ilustrativa de amplificação de 1ª reação de PCR 16S de DNA total de solo adubado com dejetos líquidos de suíno (DLS) aos 45 dias após a semeadura.



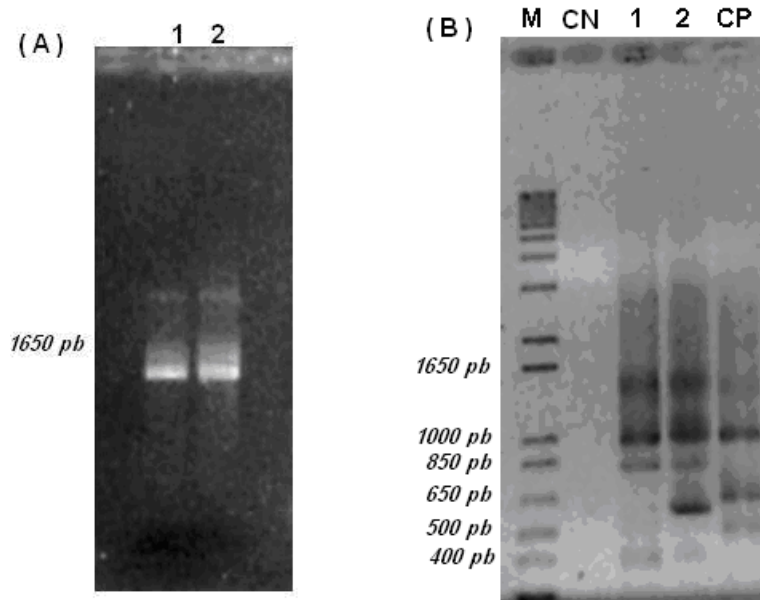
Linhas **M**= marcador 1 Kb *Plus DNA ladder*, **1**= controle, **2**= DLS (200 kg N ha¹ ano⁻¹), **3**= adubação mineral, **4**= DLS (150 kg N ha¹ ano⁻¹) e **5**= solo controle.

Figura 9 –Foto ilustrativa de amplificação de Nested PCR 16S de DNA total de solo adubado com dejetto líquido de suíno (DLS) aos 120 dias após a semeadura.



Linhas **M**= marcador 1 Kb *Plus DNA ladder*, controle (sem adubação) **1** e **2**= 30 ng DNA e 1,5 mM dNTP, **3** e **4**= 60 ng DNA e 1,5 mM dNTP, **7**= 30 ng DNA e 10 mM dNTP, **8**= 60 ng DNA e 10 mM dNTP; solo controle **5** e **6**= 15 ng DNA e 1,5 mM dNTP, **9**=30 ng DNA e 10 mM dNTP; e bactéria controle positivo **10**= 10mM dNTP e **11**= 1,5mM dNTP.

Figura 10 –Foto ilustrativa do de amplificação de Nested PCR 16S de DNA total de solo adubado com dejetto líquido de suíno (DLS) aos 120 dias após a semeadura.



Linhas: **(A)** **1** e **2** = DLS. **(B)** **M**= marcador 1 Kb *Plus DNA ladder*, **CN** = controle negativo, **1** = DLS (150 kg N ha⁻¹ ano⁻¹), **2** = DLS (200 kg N ha⁻¹ ano⁻¹) e **CP** = controle positivo (bactéria isolada de solo com DLS 200 kg N ha⁻¹ ano⁻¹).

A contagem fúngica na pós-semeadura foi em torno de 10^5 UFC g⁻¹ de solo sob controle, adubação mineral e DLS (Tabela 9). Na colheita, a adubação mineral apresentou $8,0 \times 10^7$ UFC g⁻¹ e a menor contagem de $1,0 \times 10^5$ UFC g⁻¹ foi observada no solo sob aplicação de 150 kg N ha^{-1} de DLS, não houve diferença estatística pelo Teste t ($p > 0,05$).

Estes dados de contagem fúngica apresentam-se aproximados aos resultados apresentados por Pratt (2008), que analisou solo argiloso em três áreas de pastagem sob aplicação de 1-3 vezes por semana de DLS no período de seis meses, verificou que a contagem de fungos variou de 0 a $5,67 \times 10^4$ UFC g⁻¹ (Ágar BDA, a 25 °C por 5 dias); houve correlação entre a população fúngica e a concentração de nutrientes, que positiva com N, K, Fe, C, Mg, Na, P e Mn e notou correlação negativa com Zn.

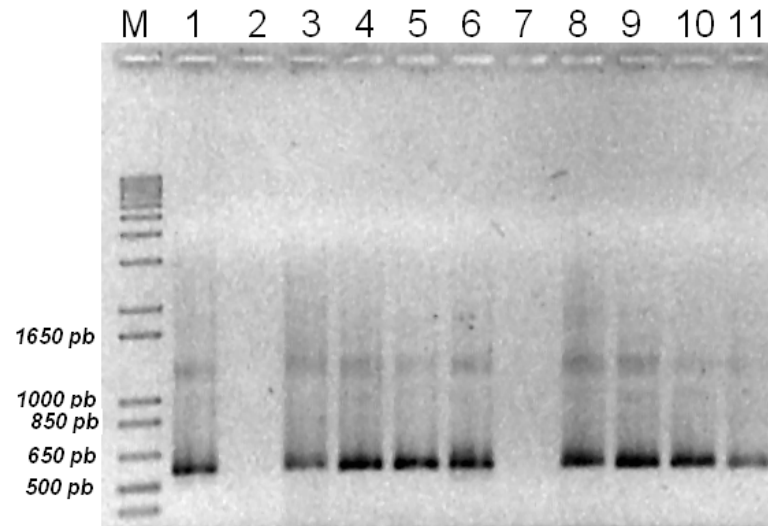
Tabela 9 – Número de fungos total do solo sob adubação com dejetos líquidos de suíno (DLS) safra de milho 2009/2010 – Londrina PR.

Tratamentos (kg N ha ⁻¹ ano ⁻¹)	Fungos Total (UFC g ⁻¹ de solo)	
	Pós-semeadura	Colheita
Controle	$6,9 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$
Adubação Mineral -150	$3,3 \times 10^5$	$8,0 \times 10^7$
Dejeto líquido de suíno - 150	$8,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$
Dejeto líquido de suíno - 200	$4,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$

Pós-semeadura = 45 dias após a semeadura; e colheita = 120 dias após a semeadura.
Médias de duas repetições. Não significativo pelo teste t ($p > 0,05$).

Na reação de amplificação de Nested PCR 18S (Figura 11), não houve amplificação do DNA total de solo com adubação mineral, coletado aos 45 dias após a semeadura do milho. O DNA total de solo do controle e sob adubação com DLS equivalente a 150 e $200 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ apresentaram bandas entre 500 e 1.650 pares de bases.

Figura 11 –Foto ilustrativa de amplificação de Nested PCR 18S de DNA total de solo adubado com dejetos líquidos de suíno (DLS) aos 45 dias após a semeadura.



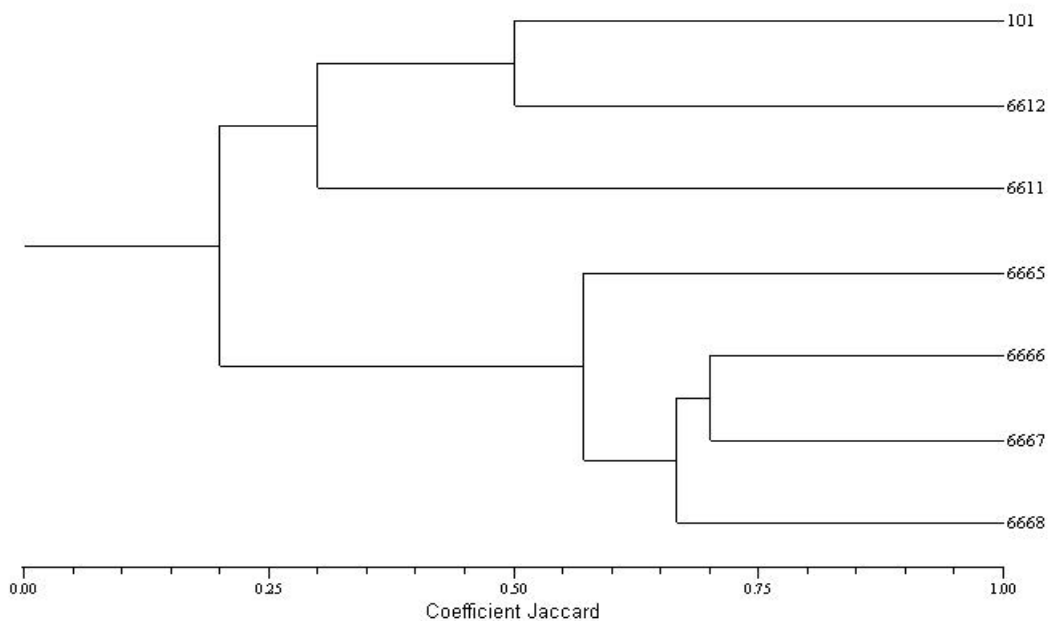
Linhas **M**= marcador 1 Kb *Plus DNA ladder*, **1** e **6**= controle, **2** e **7**= adubação mineral, **3**, **8** e **11**= DLS ($150 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$); **4** e **9**= DLS ($200 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$), e **5** e **10**= solo controle.

No dendrograma genotípico (Figura 12), elaborado a partir do perfil de bandas em DGGE descrito anteriormente no item 4.6.5, observa-se que ao coeficiente 0,3 de similaridade houve a formação de três grupos distintos, onde o produto de Nested PCR do DNA total DLS 101 foi agrupado somente com o solo 6612, que recebeu dose equivalente a 150 kg N ha^{-1} de DLS, coletado aos 45 dias após aplicação do DLS. O segundo grupo, formado pelo solo 6611, sob adubação mineral aos 45 dias pós-semeadura, constituiu-se de um grupo isolado com perfil diferente dos demais solos. E o terceiro grupo formado por todos os solos coletados na época da colheita do milho, o controle, adubação mineral e as duas doses de DLS.

A similaridade do perfil de bandas de 16S por DGGE de 57% foi apresentado entre os solos da colheita, o controle, a adubação mineral, 150 e 200 kg N ha^{-1} com DLS. Os 67% de similaridade foi observado entre a adubação mineral e DLS equivalente a 150 e 200 kg N ha^{-1} , na colheita. Assim, na época da colheita, a diversidade genotípica de bactérias de solo adubado com DLS não diferiu do controle e da adubação mineral. Além disso, o perfil de bandas do DLS não foi agrupado com solos que receberam doses de DLS, coletados na época da colheita, ou seja, isto indica

que as bactérias do DLS não foram detectadas no solo após 120 dias da aplicação como adubo.

Figura 12 –Dendrograma de similaridade genotípica de perfil de DGGE de solo sob cultivo de milho safra 2009/2010 adubado com dejetos líquidos de suíno (DLS) pelo método UPGMA e coeficiente de Jaccard.



Época de coleta e adubação (equivalente $\text{kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$): **101** DLS, aplicado no solo, e solos, aos 45 dias pós-semeadura, **6611** adubação mineral (150) e **6612** DLS (150); e na colheita do milho (120 dias após-semeadura) **6665** controle, **6666** adubação mineral (150), **6667** DLS (150) e **6668** DLS (200).

Na avaliação de frequência bacteriana e fúngica de solo sob pastagem, observou-se que a população bacteriana de $10 \times 10^8 \text{ cel g}^{-1}$, com a aplicação de 200 kg N ha^{-1} de estrume bovino, foi significativamente maior que a adubação mineral de $5,9 \times 10^8 \text{ cel g}^{-1}$; e a biomassa fúngica diminuiu em relação ao tratamento controle. Enquanto que, no estudo de influencia de adubação, química, estrume bovino e DLS, em comunidade microbiológica de solo, Suzuki *et al.* (2009) evidenciaram que as comunidades bacterianas são mais variáveis com o tipo de solo. Enquanto que a população de fungos, pode ser melhor monitorada pelo tipo de adubação aplicada no solo para o cultivo agrícola.

Como efeito da adubação com DLS, um estudo em solo sob pastagem relatou um aumento no carbono de biomassa microbiana e de biomarcador de fungos variados ao aplicar 200 e 400 kg N ha⁻¹ ano⁻¹ de DLS, elevando também a relação fungos/bactérias do solo. Este fato foi correlacionado a maior concentração de C solúvel presente no solo, proveniente da adubação com resíduo orgânico. Ao mesmo tempo, foi observada maior reestruturação de comunidade microbiana de solo ao aplicar DLS que quando aplicado adubação com nitrato de amônio (IYYEMPERUMAL e SHI, 2007).

Além disso, trabalhos que avaliaram o DLS aplicado como fertilizante, constataram que o DLS apresentou-se significativo no aumento de UFC total bacteriana de solo argiloso e arenoso, assim como no efeito sobre a estrutura de comunidade bacteriana. E ainda o perfil de bandas do DLS por DGGE (16S) encontrava-se no solo após a adição do dejetos, porém, este perfil foi detectado apenas até o 18º dia após sua aplicação no solo (GUERRERO *et al.*, 2007; BINH, 2007). A Avaliação específica da presença de coliformes em solo evidenciou que a aplicação de elevada dose de DLS fresco, equivalente a 210 kg N ha⁻¹, inicialmente apresentou maior concentração de coliformes fecais, e neste mesmo trabalho, elevada população de coliformes totais foi observada na adubação mineral. Mas, após 50 dias da aplicação, houve redução em todos os tratamentos, visto que, a sobrevivência de bactérias no solo depende de fatores como temperatura, umidade e da presença de outros microorganismos (RUFETE *et al.*, 2006).

Quanto ao efeito acumulativo de adubação orgânica, Enwall *et al.* (2007) na avaliação de comunidade microbiana de solo após o cultivo de milho, sob longo período de adubação nitrogenada orgânica e inorgânica, notou semelhança no padrão de bandas por DGGE entre solos sob aplicação de esterco bovino (8 m³ ha⁻¹ de MS), adubado a bases de Ca(NO₃)₂ (80 kg N ha⁻¹), solo sem adubação e o controle sem cultivo e sem adubação; e a menor diversidade bacteriana (16S) foi observada no solo com adubação inorgânica utilizando (NH₄)₂SO₄ (80 kg N ha⁻¹).

Ainda sobre os efeitos de adubação com resíduos de produção animal, Berenguer *et al.* (2008), durante seis anos de aplicação de 51 m³ ha⁻¹ ano⁻¹ de DLS em monocultivo de milho, constatou aumento gradual e significativo de matéria orgânica no

solo, possibilitando complexar metais ficitóxicos, além de maior produção de biomassa e rendimento de grãos. Outro estudo, de longa duração sobre a utilização de estrume animal como fertilizante, salientou que o estrume animal permitiu um aumento da biomassa bacteriana no solo, isto é devido a adição de bactéria presente no próprio resíduo (BITTMAN; FORGE; KOWALENKO, 2005).

5.3 CAPÍTULO 3 - EFEITO DE ADUBAÇÃO COM DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNO NA MICOLOGIA E PRODUÇÃO DE FUMONISINAS EM GRÃOS DE MILHO (*ZEAMAYS* L.)

Os resultados de micologia dos grãos de milho, realizada conforme descrito no item 4.6.6, de *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* spp. estão representados na Tabela 10. O total de bolores e leveduras foi de $2,5 \times 10^6$ a $1,1 \times 10^7$ e $5,4 \times 10^4$ a $5,3 \times 10^6$ UFC g⁻¹, para as safras de 2008/09 e 2009/10, respectivamente; com presença de *Fusarium* spp. em todas as parcelas experimentais. Assim, aplicando-se doses de dejetos líquidos de suíno (DLS) de 50, 100, 150, 200 e 300 kg N ha⁻¹ ano⁻¹, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Na safra 2008/09, a contagem de *Fusarium* spp. foi de $6,2 \times 10^5$ a $3,0 \times 10^6$ UFC g⁻¹ e de *Penicillium* spp. $8,2 \times 10^4$ a $8,0 \times 10^5$ UFC g⁻¹ de milho. Enquanto que apenas a contagem de *Penicillium* sp., na safra de 2009/10, foi significativamente maior $3,0 \times 10^4$ UFC g⁻¹ ($p < 0,05$) para o tratamento 300 DLS; no entanto, não diferindo do controle de $2,5 \times 10^3$ UFC g⁻¹. Nesta mesma safra, a contagem de *Fusarium* spp. foi de $2,5 \times 10^4$ a $8,8 \times 10^5$ UFC g⁻¹ de milho. A amostra do híbrido 2A106 utilizado no plantio foi analisada quanto a micologia e apresentou *Fusarium* spp a $1,0 \times 10^2$ UFC de. por grama de semente.

A contagem de *Fusarium* spp., nos grãos da safra 2009/10, assemelham-se com o monitoramento de ONO *et al.* (2004), com prevalência de *Fusarium verticillioides* $2,4 \times 10^4$ - $6,5 \times 10^5$ UFC g⁻¹ em amostras de milho comerciais e de campo experimental do estado do Paraná, nos anos 1991, 1995 e 1997. Na avaliação de efeito da adubação associado a doenças provocadas por *Fusarium* spp., Reid, Zhu e Ma (2001) notaram aumento significativo de sintomas de podridão em milho

causada por *Fusarium graminearum* (*Giberella*) com 200 kg N ha⁻¹ aplicando adubação química com NH₄NO₃, comparado a dose de 100 kg N ha⁻¹ em dois anos consecutivos.

As médias de resultados de contagem de *Penicillium* spp., deste trabalho utilizando adubação com DLS, estão dentro da faixa de valores encontrados os em 37 amostras de milho, naturalmente contaminadas, coletadas na região norte do Estado do Paraná, que a contagem de *Penicillium* spp. variou de 5,5 x 10³ a 2,8 x 10⁶ UFC g⁻¹ (ONO *et al.*, 1999). Hasegawa *et al.* (2008), na avaliação da adubação nitrogenada em grãos de milho, com doses de 0, 50 e 100 kg N ha⁻¹, observaram maior frequência de *Penicillium* spp., possivelmente devido a condições ambientais, interação entre as espécies fúngicas e, principalmente, ao teor de atividade de água dos grãos.

Tabela 10 – Perfil micológico em milho produzido sob adubação com dejetos líquidos de suíno (DLS) safra 2008/2009 e 2009/2010 - Londrina - PR.

Tratamentos (kg N ha ⁻¹ ano ⁻¹)	Micologia em grãos de milho (Contagem em UFC g ⁻¹)				
	Total de bolores e leveduras	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	Leveduras
Safra 2008/2009					
Controle	3,5 x 10 ⁶	6,2 x 10 ⁵	9,3 x 10 ⁴	3,8 x 10 ²	1,3 x 10 ⁶
AM - 150	2,5 x 10 ⁶	1,1, x 10 ⁶	7,7 x 10 ⁵	2,5 x 10 ²	2,4 x 10 ⁴
DLS - 50	3,6 x 10 ⁶	1,6 x 10 ⁶	8,0 x 10 ⁵	ND	4,2 x 10 ⁵
DLS - 100	1,1, x 10 ⁷	3,0 x 10 ⁶	8,2 x 10 ⁴	ND	2,4 x 10 ⁴
DLS - 150	6,7 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁶	3,5 x 10 ⁵	ND	1,4 x 10 ⁶
DLS - 200	3,6 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	4,1 x 10 ³	3,1 x 10 ⁵
Safra 2009/2010					
Controle	1,8 x 10 ⁶	5,7 x 10 ⁴	2,5 x 10 ^{3ab}	ND	1,7 x 10 ⁶
AM - 150	3,9 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁵	9,4 x 10 ^{1b}	ND	2,5 x 10 ⁵
DLS - 100	5,4 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁴	ND ^b	1,4 x 10 ²	2,4 x 10 ³
DLS - 150	1,3 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵	3,1 x 10 ^{2b}	2,5 x 10 ³	1,4 x 10 ⁴
DLS - 200	5,3 x 10 ⁶	8,2 x 10 ⁴	ND ^b	5,1 x 10 ²	5,0 x 10 ⁶
DLS - 300	3,4 x 10 ⁶	8,8 x 10 ⁵	3,0 x 10 ^{4a}	ND	1,3 x 10 ⁶

*AM - Adubação Mineral.

** DLS - Dejetos Líquidos de Suíno.

*** ND = não detectável (<100 UFC g⁻¹).

A contagem total de bolores e leveduras inclui a contagem de gêneros fúngicos não identificados.

Médias de quatro repetições. Médias seguidas de letra diferente na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

A capacidade de defesa da planta pode influenciar na incidência de contaminação fúngica de plantas e grãos. Assim, o estudo de indução de resistência contra a infecção de patógeno no tecido da planta, apresentou resposta variável conforme em condições a campo, devido aos fatores ambientais, a espécie cultural e pela nutrição da planta (WALTERS; FOUNTAINE, 2009). O estresse a planta provocado por fatores como o desequilíbrio nutricional, excesso de luminosidade, baixas temperaturas, mecanismos de injúria e o déficit de água, podem interferir na deposição de lignina, que é um componente da parede celular da planta, e que apresenta funções estruturais e de defesa contra invasão de microrganismos (MOURA *et al.*, 2010). Dessa forma, o suprimento de macronutrientes nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio(K), a adubação tem sido importante na agricultura para melhorar a produtividade, sustentabilidade e a resistência das plantas (WHITE; BROWN, 2010).

Devido ao fato de fungos extraírem N da planta para o crescimento, a disponibilidade de N no solo para o desenvolvimento vegetal pode alterar a distribuição deste nutriente nos seus tecidos, a forma em que é absorvido pelo patógeno, seja proteínas, aminoácidos, amônia ou nitrato, e o crescimento do fungo toxigênico (WALTERS; BINGHAM, 2007). A deficiência de N no solo resulta em prejuízos na qualidade e na produtividade agrônômica, também, pode provocar o enfraquecimento da planta, aumentando a sua suscetibilidade a doenças. Por outro lado, a adubação nitrogenada excessiva pode aumentar as lesões na planta e facilitar a infecção de patógenos. Isto ocorre devido às alterações no metabolismo de absorção de nutrientes pela planta, promove o crescimento dos tecidos, mas com deficiências no mecanismo de defesa e disponibiliza maior quantidade de nutrientes para o desenvolvimento dos patógenos (SOLOMON; TAN; OLIVER, 2003).

Com isso, a adubação nitrogenada e a ocorrência de doenças em plantas tem sido objetivo de alguns trabalhos, como o de Yoshida, Nakajima e Tonooka (2008) que, assim como os resultados deste trabalho, não observaram efeito significativo das doses de N sobre doenças provocadas por espécies de *Fusarium* e na produção de micotoxinas, demonstrado em experimento de cultivares de trigo a campo e em casa de vegetação no Japão, sob utilização de três doses de N de 0, 4 e 8 g/m² com sulfato de amônio. Por outro lado, na avaliação de adubação nitrogenada no

cultivo de cevada, foram observados sintomas mais severos de infecção por *Fusarium graminearum* e produção de micotoxinas nas plantas adubadas com baixo teor de N (15 kg ha⁻¹) do que nas que receberam alto teor de N (100 kg ha⁻¹) (YANG *et al.*, 2010).

A determinação de fumonisina total (FB₁+FB₂), realizada conforme o item 4.6.7, variou de 0,5 a 1,2 µg g⁻¹ na safra 2008/09, a FB₁ de 0,4 µg g⁻¹ observada nos tratamentos com DLS de 50 e 150; e de 0,8 µg g⁻¹ com 200 DLS e no controle (Tabela 11). Na segunda safra, o nível de FB₁ de 0,3 µg g⁻¹ em 100 DLS e controle, e de 0,9 µg g⁻¹ em grãos com adubação mineral. Os níveis de fumonisina FB_{total} de grãos de milho das duas safras, não apresentaram diferença significativa pelo Teste de Tukey (p>0,05) e os valores forma inferiores aos limites máximos toleráveis pela Consulta pública nº100/2009 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2009) de 2 µg g⁻¹ de fumonisina FB₁+FB₂ em milho não processado.

Tabela 11 – Perfil da contaminação de fumonisina em milho produzido sob adubação com dejetos líquidos de suíno (DLS) safra 2008/2009 e 2009/2010 Londrina – PR.

Tratamentos (kg N ha ⁻¹ ano ⁻¹)	Fumonisinas (µg g ⁻¹)		
	FB ₁	FB ₂	FB ₁ + FB ₂
Safra 2008/09			
Controle	0,8	0,4	1,2
AM - 150	0,7	0,5	1,2
DLS – 50	0,4	0,1	0,5
DLS – 100	0,5	0,3	0,8
DLS – 150	0,4	0,3	0,7
DLS - 200	0,8	0,4	1,2
Safra 2009/10			
Controle	0,3	0,2	0,5
AM - 150	0,9	0,5	1,4
DLS – 100	0,3	0,2	0,5
DLS – 150	0,5	0,2	0,8
DLS - 200	0,8	0,4	1,2
DLS - 300	0,4	0,2	0,6

*AM - Adubação Mineral.

** DLS - Dejetos Líquidos de Suíno.

Médias de quatro repetições. Não significativo pelo teste de Tukey (p>0,05).

FB_{total} = Fumonisinas Totais (FB₁ + FB₂). Quantificação por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Limite de detecção do método para FB₁ e FB₂, 27,5 e 35,3 ng g⁻¹, respectivamente.

A média de atividade de água (Aa) dos grãos de 0,701 e 0,749 nas safras de 2008/09 e 2009/10, respectivamente. Na época da colheita dos grãos, nos meses de março, as condições meteorológicas eram temperaturas médias 20 e 18,5 °C mínima e máxima de 31,2 e 30,8 °C; umidade relativa de 70,6 e 63,5.% e índice pluviométrico médio de 6,8 e 7,6 mm, para as safras 2008/09 e 2009/10, respectivamente.

Os resultados de fumonisinas apresentam se inferiores ao máximo determinado no estado de São Paulo, por Hasegawa *et al.* (2008) que determinaram níveis de 0,3 a 24, 3 $\mu\text{g g}^{-1}$ para FB₁ e de 0,05 a 5,42 $\mu\text{g g}^{-1}$ para FB₂, utilizando adubação com uréia nas doses de 0, 50 e 100 kg N ha⁻¹. E aos níveis de FB₁ variando de 10 a 3816 $\mu\text{g kg}^{-1}$ por Blandino, Reyneri e Vanara (2008), sob cultivo com doses de uréia de 0, 100, 200, 300 e 400 kg por há; o cultivo de milho com baixo nível de N resultou em aumento nas concentrações de fumonisina FB₁.

A avaliação de amostras de milho, de três safras naturalmente contaminadas na Espanha, sob manejo orgânico com adubo composto apresentaram contaminação inferior de fumonisinas FB₁ e FB₂ quando comparada ao milho convencional com adubação mineral (Ariño *et al.*, 2006). Estudo na Itália relata aumento na concentração de fumonisina FB₁ e FB₂ com a adubação nitrogenada, a avaliação de milho em três anos consecutivos adubado 270 kg N ha⁻¹(NH₄NO₃) aumentou significativamente FB_{total} de 687 $\mu\text{g g}^{-1}$ no ano 2000 para 7361 e 3064 $\mu\text{g g}^{-1}$ em 2001 e 2002, respectivamente (MAROCCO *et al.*, 2008).

Além da adubação, outros manejos agrícolas causam efeito sobre a contaminação dos grãos por fumonisinas, que são a época de colheita, a época do plantio e o controle de insetos (MARIORANO, 2009). O efeito sinérgico destes fatores pode ser minimizado com práticas de rotação de cultura, uso de controle biológico e adequação do sistema de plantio no solo conforme a região de cultivo (EDWARDS, 2004). As condições ambientais como seca, calor e estresse, do mesmo modo, podem afetar a contaminação da planta por fungos toxigênicos, o crescimento fúngico e a produção de fumonisinas (TIRADO *et al.*, 2010).

Blandino *et al.* (2009) notaram efetivo aumento na contaminação por fumonisina não somente por elevada adubação nitrogenada (400 kg N ha⁻¹), mas

também pela alta densidade de plantas e a semeadura tardia. O plantio direto possibilita a manutenção da umidade na palhada sobre o solo, com menor estresse a planta e pode reduzir a contaminação por *Fusarium* spp (COTTON; MUNKVOLD, 1998). Segundo Doohan, Brennan e Cooke (2003), em uma revisão da influência de fatores climáticos sobre espécies de *Fusarium*, a temperatura ótima para o seu crescimento está relacionada com *aw*, pois para uma determinada *aw*, a temperatura pode desempenhar influência significativa no crescimento, assim como, na interação entre as espécies fúngicas como *Penicillium* e *Aspergillus* spp.

Pereira, Nesci e Etcheverry (2007) na avaliação de agentes de biocontrole de *F. verticillioides* em grãos de milho, observaram significativa redução de FB₁ com *M. oleovorans*, FB₂ com *B. amyloliquefaciens*, e também na contagem de *F. verticillioides* para ambos os tratamentos com bactérias quando comparados ao controle e adubação química. Um estudo de inoculação de 10⁶ UFC mL⁻¹ de bactérias, com predominância dos gêneros *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Agromyces* e *Pseudomonas* isoladas de solo sob cultivo de milho, reduziu significativamente a colonização de *Fusarium verticillioides* na rizosfera, em estudo *in vitro* (CAVAGLIERI *et al.*, 2005).

Também, a inoculação de dois isolados de *Streptomyces* spp. no solo foi significativa na redução da doença causada por *Fusarium* spp. em milho, a menor incidência da doença foi correlacionada a maior concentração de células do inoculante (BRESSAN; FIGUEIREDO, 2008). E Hamel *et al.*(2005), na avaliação do efeito de comunidades microbianas do solo cultivado com aspargo sobre a incidência de *Fusarium* spp. patogênico, observou que ao longo do cultivo houve aumento na diversidade de bactérias e fungos, os casos de acréscimo de doenças provocada por *Fusarium* spp. ocorreram quando o aspargo era sucedido a cultura de milho, favorecendo dessa forma a presença do patógeno.

6 CONCLUSÃO

O dejetos líquido de suíno apresentou até 2,5 vezes mais bactérias do que fungos na sua análise inicial quando da aplicação no solo. O dejetos líquido de suíno constitui-se de uma fonte rica em nutrientes, podendo ser utilizado como fertilizante orgânico.

Na colheita, os solos de todos os tratamentos apresentaram 67% de similaridade genotípica. Também, não foi detectado o perfil de bandas do dejetos líquido de suíno nos solos na época da colheita do milho, após 120 dias da sua aplicação no solo.

A aplicação de dejetos líquido de suíno como fertilizante em grãos de milho não apresentou efeito quanto à infecção por fungos, especialmente por *Fusarium* spp., patógeno comumente encontrado em milho e na produção de fumonisinas quando comparada com a adubação mineral e ao controle.

REFERÊNCIAS

- ABIPECS – Associação Brasileira de Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. **Estatística produção nacional**. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/>>. Acesso em: 12 Fev. 2011.
- ADAMS, M.W.W. Thermophilic Archaea: na overview. In: **Archaea-laboratory manual**, p. 3-7, 1995.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Consulta Pública nº 100, de 21 de dezembro de 2009**. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 19 Jan. 2011.
- ALBERTS, J. F.; GELDERBLOM, W. C. A.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O.; VAN SCHALKWYK, D. J.; BEHREND, Y. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p.1729-1733, 1990.
- ARIÑO, A.; ESTOPAÑAN, G.; JUAN, T.; HERRERA, A. **Estimation of dietary intakes of fumonisins B₁ and B₂ from conventional and organic corn**. Food Control, v.18, p.1058-1062, 2007.
- BAPTISTA, A.S.; HORII, J.; BAPTISTA, A.S.; **Fatores físico-químicos e biológicos ligados à produção de micotoxinas**. B.CEBP.CPEAP, Curitiba, v.22, n.1, p.1-14, Jan./Jun. 2004.
- BASSO, C.J.; CERETTA, C.A.; DURIGON, R.; POLETTO, N.; GIROTTO, E. **Dejeto líquido de suínos: II – perdas de nitrogênio e fósforo por percolação no solo sob plantio direto**. Ciência Rural, Santa Maria, v.35, n.6, p.1305-1312, nov-dez, 2005.
- BERENQUER, P.; CELA, S.; SANTIVERI, F.; BOIXADERA, J.; LLOVERAS, J. **Copper and Zinc Soil Accumulation and Plant Concentration in Irrigated Maize Fertilized with Liquid Swine Manure**. Agronomy journal, v.100, n.4, p.1056-1061, 2008.
- BERENQUER, P.; SANTIVERI, F.; BOIXADERA, J.; LLOVERAS, J.. **Fertilisation of irrigated maize with pig slurry combined with mineral nitrogen**. European Journal of Agronomy, v.28, 4, p.635-645, May 2008.
- BELLI FILHO, P.; CASTILHOS JR., A.B.; COSTA, R.H.R.; SOARES, S.R.; PERDOMO, C.C. **Tecnologias para o tratamento de dejetos de suínos**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande, v.5, n.1, p.166-170, 2001.
- BERTORA, C.; ALLUVIONE, F.; ZAVATTARO, L.; GROENIGEN, J.W.V.; VELTHOF, G.; GRIGNANI, C. **Pig slurry treatment modifies slurry composition, N₂O, and CO₂ emissions after soil incorporation**. Soil Biology & Biochemistry, v.40, p.1999–2006, 2008.

- BINH, C. T. T.; HEUER, H.; GOMES, N. C. M.; KOTZERKE, A.; FULLE, M.; WILKE, B. M.; SCHLOTTER, M.; SMALLA, K. **Short-term effects of amoxicillin on bacterial communities in manured soil.** FEMS Microbiol Ecol, v.62, p.290-302, 2007.
- BITTMAN, S.; FORGE, T.A.; KOWALENKO, C.G. **Responses of the bacterial and fungal biomass in a grassland soil to multi-year applications of dairy manure slurry and fertilizer.** Soil Biology & Biochemistry, v. 37, p. 613-623, 2005.
- BLANDINO, M.; REYNERI, A.; COLOMBARI, G.; PIETRI, A. **Comparison of integrated field programmes for the reduction of fumonisin contamination in maize kernels.** Field Crops Research, v.111, p.284-289, 2009.
- BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. **Influence of nitrogen fertilization on mycotoxin contamination of maize kernels.** Crop Protection, v. 27, p. 222-230, 2008.
- BLUMA, R.V.; ETCHEVERRY, M.G. **Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation.** Food Microbiology, v.25, n.2, p.324-334, Feb. 2008.
- BRESSAN, W.; FIGUEIREDO, J. E. F. **Efficacy and dose-response relationship in biocontrol of Fusarium disease in maize by *Streptomyces* spp..** Eur. J. Plant Pathol., v.120, p.311-316, 2008.
- BRITO, A.B.; STRINGHINI, J.H.; CRUZ, C.P.; XAVIER, S.A.G.; LEANDRO, N.S.M.; CAFÉ, M.B. **Efeito do germen integral de milho sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.57, n.2, p.241-249, 2005.
- BUITRAGO, M.J.; GÓMEZ-LÓPEZ, A.; MELLADO, E.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L.; CUENCA-ESTRELLA, M. **Detección de *Aspergillus* spp. mediante PCR en tiempo real en un modelo murino de infección pulmonar.** Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Volume 23, 8, Pages 464-46, Aug. 2005.
- CANH, T.T.; AARNINK, A.J.A.; SCHUTTE, J.B.; SUTTON, A.; LANGHOUT, D.J.; VERSTEGEN, M.W.A. **Dietary protein affects nitrogen excretion and ammonia emission from slurry of growing-finishing pigs.** Livestock Production Science, n.56, p.181-191, 1998.
- CARPENTER, S.R., CARACO, N.F., CORRELL, D.L., HOWARTH, R.W., SHARPLEY, A.N., SMITH, V.H. **Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen.** Ecol. Appl. v.8, p.559-568, 1998.
- CASTRO, C.M.; ALMEIDA, D.L.; RIBEIRO, R.L.D.; CARVALHO, J.F. **Plantio direto, adubação verde e suplementação com esterco de aves na produção orgânica de berinjela.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.40, n.5, p.495-502, maio 2005.

CAVAGLIERI, L. R.; ANDRÉS, L.; IBÁÑEZ, M.; ETCHEVERRY, M. G. **Rhizobacteria and their potential to control *Fusarium verticillioides*: effect of maize bacterisation and inoculum density**. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.87, p. 179-187, 2005.

CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; GUARINO, C.; MOTTO, M.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R.; LAGANA, A.; BERARDO, N. **Mycotoxins produced by *Fusarium* genus in maize: determination by screening and confirmatory methods based on liquid chromatography tandem mass spectrometry**. *Food Chemistry*, v.105, p.700–710, 2007.

CECCHERINI, M. T.; CASTALDINI, M.; PIOVANELLI, C.; HASTINGS, R. C.; MCCARTHY, A. J.; BAZZICALUPO, M. ; MICLAUS, N. **Effects of swine manure fertilization on autotrophic ammonia oxidizing bacteria in soil**. *Applied Soil Ecology*, v. 7, n. 2, p.149-157, Jan. 1998.

CHAMPEIL, A.; DORÉ, T.; FOURBET, J.F. ***Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains**. *Plant Science*, v.166, Issue 6, p.1389-1415, Jun. 2004.

CHANTIGNY, M. H.; ANGERS, D. A.; BÉANGER, G.; ROCHETTE, P.; HAMEL, N. E.; BITTMAN, S.; BUCKLEY, K.; MASSÉ, D.; GASSER, M. O. **Yield and Nutrient Export of Grain Corn Fertilized with Raw and Treated Liquid Swine Manure**. *Agronomy Journal*, v. 100, n. 5, p.1303-1309, 2008.

CHULZE, S.N.; RAMIREZ, m.L.; FARNOCHI, M.C.; PASCALE, M.; VISCONTI, A.; MARCH, G. ***Fusarium* and Fumonisin Occurrence in Argentinian Corn at Different Ear Maturity Stages**. *J. Agric. Food Chem.*, v.44, p.2797-2801, 1996.

COELHO, A.M.; FRANÇA, G.E.; BAHIA FILHO, A.F.C. **Nutrição e adubação do milho**. Embrapa Milho e Sorgo, 1995.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Produção de milho em grãos em toneladas nas Regiões, safras 2007-2009**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/sureg/PA/MILHOAGO10A14_2009.pdf>. Acesso em: 02 Fev. 2011.

COOK, K. L.; ROTHROCK JR, M. J.; LOUGHRIN, J. H.; DOERNER, K. C. **Characterization of skatole-producing microbial populations in enriched swine lagoon slurry**. *FEMS Microbiol Ecol*. v.60, p.329-340, 2007.

COTTON, T.K.; MUNKVOLD, G.P. **Survival of *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* in maize stalk residue**. *Phytopathology*, v.88, p.550-555, 1998.

DAGA, J.; CAMPOS, A.T.; FEIDEN, A.; KLOSOWSKI, E.S.; CÂMARA, R.J. **Análise da adequação ambiental e manejo dos dejetos de instalações para suinocultura em propriedades na região oeste do Paraná**. *Eng. Agríc.*, Jaboticabal, v.27, n.3, p.587-595, set./dez.2007.

DENG, S.P.; PARHAM, J.A.; HATTEY, J.A.; BABU, D. **Animal manure and anhydrous ammonia amendment alter microbial carbon use efficiency, microbial biomass, and activities of dehydrogenase and amidohydrolases in semiarid agroecosystems.** Applied Soil Ecology, v.33,n.3, p.258-268, Oct. 2006.

DENTI, E.A.; Reis, E.M. **Levantamento de Fungos Associados às Podridões do Colmo e Quantificação de Danos em Lavouras de Milho do Planalto Médio Gaúcho e dos Campos Gerais do Paraná.** Fitopatol. bras. v.28, n.6, nov - dez 2003.

DOOHAN, F.M.; BRENNAN, J.; COOKE, B.M. **Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals.** European Journal of Plant Pathology, v.109, p.755-768, 2003.

DOW AGROSCIENCES. **Catálogo 2A106: o híbrido mais precoce do mercado.** Disponível em: <<http://www.dowagro.com/br/produtos/sementes/>>. Acesso em: 08 Jan. 2011.

EDWARDS, S. G. **Influence of agricultural practices on fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins.** Toxicology Letters v.153, p.29-35, 2004.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema brasileiro de classificação de solos.** Brasília: Embrapa Produção de Informações; Rio de Janeiro: Embrapa Solos. 2006. 412p

ENWALL, K.; NYBERG, K.; BERTILSSON, S.; CEDERLUND, H.; STENSTRO, J.; HALLIN, S. **Long-term impact of fertilization on activity and composition of bacterial communities and metabolic guilds in agricultural soil.** Soil Biology & Biochemistry, v.39, p.106-115, 2007.

FANCELLI, A.L.; LIMA, U.A. **Milho - produção, préprocessamento e transformação agro-industrial.** São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia. Governo do Estado de São Paulo, 1982. 112p. (Série Extensão Agro-Industrial, 5)

FANGUEIRO, D.; RIBEIRO, H.; VASCONCELOS, E.; COUTINHO, J.; CABRAL, F. **Treatment by acidification followed by solid-liquid separation affects slurry and slurry fractions composition and their potential of N mineralization.** Bioresource Technology, v.100, 20, p.4914-4917, Oct. 2009.

FARIAS, A.X.; ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A.M. ANDERSEN, P.M.; CORRÊA, T.B.S. **Contaminação endógena por *Aspergillus spp.* em milho pós-colheita no estado do Paraná.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.35, n.3, p.617-621, mar. 2000.

FASOLIA, E.; PASTORELLO, E.A.; FARIOLIC, A.; SCIBILIAB, J.; ALDINID, G.; CARINID, M.; MAROCCOE, A.; BOSCHETTIF, E.; RIGHETTIA, P.G. **Searching for allergens in maize kernels via proteomic tools.** Journal of proteomics, v.72, p.501-510, 2009.

FNP – Consultorias, safras e mercado. **Estatísticas FNP: Anualpec 2009**. Disponível em: <<http://economia.uol.com.br/ultnot/reuters/2008/07/29/ult29u62666.jhtm>>. Acesso em: 10 Fev. 2011.

FRANZOLINA, M.R.; GAMBALEB, W.; CUEROC, R.G.; CORREA, B. **Interaction between toxigenic *Aspergillus flavus* Link and mites (*Tyrophagus putrescentiae* Schrank) on maize grains: effects on fungal growth and aflatoxin production**. Journal of Stored Products Research, v.35, p.215-224, 1999.

GAMANYA, R.; SIBANDA, L. Survey of *Fusarium moniliforme* (*F. verticillioides*) and production of fumonisin B₁ in cereal grains and oilseeds in Zimbabwe. International Journal of Food Microbiology, v.71, Issues 2-3, n.30, p.145-149, Dec. 2001.

GELDERBLOM, W.C.A., KRIEK, N.P.J., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G. **Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1 in rats**. Carcinogenesis, v.12, p.1247–1251, 1991.

GIBBON, B.C.; LARKINS, B.A. **Molecular genetic approaches to developing quality protein maize**. TRENDS in Genetics, v.21, n.4, Apr. 2005.

GONZÁLEZ, G.; HINOJO, M.J.; MATEO, R.; MEDINA, A.; JIMÉNEZ, M. **Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen**. International Journal of Food Microbiology, v.105, 1, n.15, p.1-9, Nov. 2005.

GOULART, A.C.P. **Tratamento de sementes de milho (*Zea mays* L.) com fungicidas**. Revista Brasileira de Sementes, v. 15, n. 2, p. 165-169, 1993.

GOYARTS, T.; DÄNICKE, S.; TIEMANN, U.; ROTHKÖTTER, H.J. **Effect of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) on IgA, IgM and IgG concentrations and proliferation of porcine blood lymphocytes**. Toxicology in Vitro, v.20, 6, p.858-867, Sep. 2006.

GUERRERO, C.; MORAL, R.; GÓMEZ, I.; ZORNOZA, R.; ARCENEGUI, V. **Microbial biomass and activity of an agricultural soil amended with the solid phase of pig slurries**. Bioresource Technology, v. 98, p.3259-3264, 2007.

HAMEL, C.; VUJANOVIC, V.; JEANNOTTE, R.; NAKANO-HYLANDER, A.; ST-ARNAUD, M. **Negative feedback on a perennial crop: *Fusarium* crown and root rot of asparagus is related to changes in soil microbial community structure**. Plant and Soil, v.268, p.75-87, 2005.

HAN, I.; CONGEEVARAM, S.; KI, D. W.; OH, B. T.; PARK, J. **Bacterial community analysis of swine manure treated with autothermal thermophilic aerobic digestion**. Appl Microbiol Biotechnol, p.1-8, 2010.

HANAJIMA, D.; HARUTA, S.; HORI, T.; ISHII, M.; HAGA, K.; IGARASHI, Y. **Bacterial community dynamics during reduction of odorous compounds in aerated pig manure slurry**. Journal of Applied Microbiology, v.106, p.118-129, 2008.

HASSEGAWA, R. H.; FONSECA, H.; FANCELLI, A. L.; SILVA, V. N.; SCHAMMASS, E. A.; REIS, T. A.; CORREA, B. **Influence of macro- and micronutrient fertilization on fungal contamination and fumonisin production in corn grains.** Food Control, v.19, p. 36 - 43, 2008.

K. Hell, K. F. Cardwell, M. Setamou, H. -M. Poehling. **The influence of storage practices on aflatoxin contamination in maize in four agroecological zones of Benin, west Africa.** Journal of Stored Products Research, v.36, 4, n.15, p.365-382, Oct. 2000.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola.** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/calendario2011>>. Acesso em: 02 Fev. 2011.

International Agency for Research on Cancer – World Health Organization (IARC-WHO). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and atyrene. In: **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human**, Lyon: IARC Working Group, World Health Organization. v. 82, p. 301-311, 2002.

IMHOFF, S.; SILVA, A.P.; TORMENA, C.A. **Aplicações da curva de resistência no controle da qualidade física de um solo sob pastagem.** Pesq. agropec. bras. vol.35 no.7 Brasília July 2000.

IYYEMPERUMAL, K.; SHI, W. **Soil microbial community composition and structure: residual effects of contrasting N fertilization of swine lagoon effluent versus ammonium nitrate.** Plant Soil, v.292, p.233-242, 2007.

JAHNEL, M.C.; CARDOSO, E>J>B>N>; DIAS, C.T.S. **Determinação do número mais provável de microrganismos do solo pelo método de plaqueamento por gotas.** Rev. Bras. Ciência do Solo, v. 23, p.553-559, 1999.

KAPETANAKOU, A.E.; PANAGOUE, E.Z.; GIALITAKI, M.; DROSINOS, E.H.; SKANDAMIS, P.N. **Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins.** Food Control, v. 20, n.8, p. 725-732, Aug. 2009.

KELLERMAN, T.S., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., GELDERBLUM, W.C.A., CADWOOD, M.E., COETZER, J.A.N. **Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1.** Onderstepoort. J. Vet. Res. v.57, p.269–275, 1990.

KONZEN, E. **Fertilização de lavoura e pastagens com dejetos de suínos e cama de frango.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2003. 16p.

KRSTANOVIC´, V.; KLAPEC, T.; VELIC´, N.; MILAKOVIC, Z. **Contamination of malt barley and wheat by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* from the**

crop years 2001–2003 in eastern Croatia. Microbiological Research, v.160, p.353-359, 2005.

KUBENA, L. E.; HARVEY, R. B.; PHILLIPS, T. D.; CORRIER, D. E.; HUFF, W. E. **Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate.** Poultry Science, v.69, p.727- 735, 1990.

KWONA, S.J.; CHOB, S.Y.; LEEB, K.M.; YUB, J.; SONB, M.; KIM, K.H. **Proteomic analysis of fungal host factors differentially expressed by *Fusarium graminearum* infected with *Fusarium graminearum* virus-DK21.** Virus Research, In Press, Corrected Proof, Available online 15 April 2009.

LEUNG, K.; TOPP, E. **Bacterial community dynamics in liquid swine manure during storage: molecular analysis using DGGE/PCR of 16S rDNA.** FEMS Microbiology Ecology, v. 38, p.169-177, 2001.

LÓPEZ-ERRASQUÍN, E.; VÁZQUEZ, C.; JIMÉNEZ, M.; GONZÁLEZ-JAÉN, M.A. **Real-Time RT-PCR assay to quantify the expression of *fum1* and *fum19* genes from the Fumonisin-producing *Fusarium verticillioides*.** Journal of Microbiological Methods, v.68, n.2, p.312-317, Feb. 2007.

MAIORANO, A.; REYNERI, A.; SACCO, D.; MAGNI, A.; RAMPONI, C. **A dynamic risk assessment model (FUMAgrain) of fumonisin synthesis by *Fusarium verticillioides* in maize grain in Italy.** Crop Protection, v.28, n.3, p.243-256, Mar. 2009.

MARASAS, W.F., *et al.* **Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize.** J. Nutr. v.134, p.711-716, 2004.

MAROCCO, A.; GAVAZZI, C.; PIETRI, A.; TABAGLIO, V. **On fumonisin incidence in monoculture maize under no-till, conventional tillage and two nitrogen fertilisation levels.** J. Science Food Agriculture, n. 88, p. 217-1221, 2008.

MCKEAN, C.; TANG, L.; TANG, M.; BILLAM, M.; WANG, Z.; THEODORAKIS, C.W.; KENDALL, R.J.; WANG, J.S. **Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ in animals and human cells.** Food and Chemical Toxicology, v.44, 6, p.868-876, Jun. 2006.

MÁRCIA, B.A.; LÁZZARI, F.A. **Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá.** Ciênc. Tecnol. Aliment. v. 18, n. 4, Campinas Oct./Dec. 1998.

MARIO, J.L.; REIS, E.M. **Método simples para diferenciar *Diplodia macrospora* de *D. maydis* em testes de patologia de sementes de milho.** Fitopatol. bras. v.26, n.3, p.670-672, set. 2001.

MAIORANO, A.; REYNERI, A.; MAGNI, A.; RAMPONI, C. **A decision tool for evaluating the agronomic risk of exposure to fumonisins of different maize crop management systems in Italy.** *Agricultural Systems* v.102, p.17-23, 2009.

MARQUES, O.J.; VIDIGAL FILHO, P.S.; DALPASQUALE, V.A.; SCAPIM, C.A.; PRICINOTTO, L.F.; MACHINSKI JÚNIOR, M. **Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita.** *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 31, n. 4, p. 667-675, 2009

MELO, W.M.C.; PINHO, R.G.V.; CARVALHO, M.L.M.; PINHO, E.V.R.V. **Avaliação de cultivares de milho para produção de silagem na região de Lavras - Mg.** *Ciênc. e Agrotec.*, Lavras, v.23, n.1, p.31-39, jan./mar. 1999.

MI, S.; MENG, K.; WANG, Y.; BAI, Y.; Yuan, T.; LUO, H.; YAO, H. **Molecular cloning and characterization of a novel α -galactosidase gene from *Penicillium* sp. F63 CGMCC 1669 and expression in *Pichia pastoris*.** *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, 5, n.3, p.1373-1380, Apr. 2007.

MILLER, JD. **Epidemiology of Fusarium ear disease of cereals.** In: Miller JD, Trenholm HL, editors. *Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin*. St. Paul, Minn.: Eagan Press; 1994. p. 302–3.

MILLER, J.D. **Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research.** *J. Stored Prod. Res.*, v.31, n.1, p.1-16, 1995.

MOREIRA, I.; OLIVEIRA, G.C.; FURLAN, A.C.; PATRICIO, V.M.I.; MARCOS JUNIOR, M. **Utilização da farinha pré-gelatinizada de milho na alimentação de leitões na fase de creche: digestibilidade e desempenho.** *Rev. bras. zootec.*, v.30, n.2, p.440-448, 2001.

MOTTO, M.; HARTINGS, H.; MADDALONI, M.; LOHMER, S.; SALAMINI, F.; THOMPSON, R. **Genetic manipulations of protein quality in maize grain.** *Field Crops Research*, v.45, n.1-3, p.37-48, May 1996.

MOURA, J. C. M. S. ; BONINE, C. A. V.; VIANA, J. O. F.; DORNELAS, M. C.; MAZZAFERA, P. **Abiotic and Biotic Stresses and Changes in the Lignin Content and Composition in Plants.** *Journal of Integrative Plant Biology*, v.52, n.4, p.360-376, 2010.

MOUEIUM, Z.S.A.; TINAY, A.H.E.; ABDALLA, A.W.H. **Effect of germination on protein fractions of corn Cultivars.** *Food Chemistry*, v.57, n.3, p.381-384, Nov. 1996.

MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A.; MURAOKA, T.; CARMO, C. A. S.; MELO, W. J. **Análise química de tecido vegetal.** In: Silva, F. C. (Ed). **Manual de análises químicas dos solos, plantas e fertilizantes.** Brasília: EMBRAPA – Comunicação de transferência de tecnologia, p.171-223, 1999.

- MIZUBUTI, I.Y.; RIBEIRO, E.L.A.; ROCHA, M.A.; SILVA, L.D.F.; PINTO, A.P.; FERNANDES, W.C.; ROLIM, M.A. **Consumo e Digestibilidade Aparente das Silagens de Milho (*Zea mays L.*), Sorgo (*Sorghum bicolor (L.) Moench*) e Girassol (*Helianthus annuus L.*)**. R. Bras. Zootec., v.31, n.1, p.267-272, 2002.
- NAYAKA, S. C.; SHANKAR, A. C. U.; NIRANJANA, S. R.; WULFF, E. G.; MORTENSEN, C. N.; PRAKASH, H. S. **Detection and quantification of fumonisins from *Fusarium verticillioides* in maize grown in southern Índia**. World J Microbiol Biotechnol, n.26, p.71-78, 2010.
- NAZARENO, N.R.X. **O milho no Paraná**. Londrina, 1982. 177p. (Circular IAPAR, 29).
- NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* species: an illustrated manual for identification**. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, 1983.
- NORRED, W.P. **Fumonisin - Mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme***. J. Toxicol. Environ. Health, v.38, p.309-328, 1992.
- OLIVEIRA, P.A.V. de.; coord. Manual de manejo e utilização dos dejetos de suínos. Concórdia: EMBRAPA CNPSA, 1993. 188 p. (EMBRAPA-CNPSA. Documentos, 27).
- ONO, E. Y. S.; FUNGARO, M. H. P.; SOFIA, S. H.; FIGUEIRA, E. L.Z.; GERAGE, A. C.; ICHINOE, M.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. **Trends of fumonisin contamination and animal intoxication through monitoring 1991 to 1997 corn crop in the State of Parana', Brazil**. Mycopathologia, v.158, p.451-455, 2004.
- ONO, E. Y. S.; SUGIURA, Y.; HOMECHIN, M.; KAMOGAE, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. **Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Parana', Brazil**. Mycopathologia, v.147, p.139-148, 1999.
- PATERNIANI, E. Métodos tradicionais de melhoramento no milho. BULL, L.T.; CONTORELLA, H. In: **Cultura do Milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafos, 1993, p.23-43.
- PAVAN, M. A.; BLOCK, M. F.; ZEMPULSKY, H. C.; MYAZAWA, M.; ZOCOLER, D. C. **Manual de análise química do solo e controle de qualidade**. Londrina: IAPAR, 1992. 40 p. Circular Técnica, n.76.
- PEIXOTO, C.M.; HENTSCHE, C.; AGUIRRE, A. **Manejo de nitrogênio**. Caderno Técnico, Revista Cultivar, n.54, Pelotas 2003. 10 p.
- PERÄLÄ, P.; KAPUINEN, P.; ESALA, M.; TYYNELÄ, S.; REGINA, K. **Influence of slurry and mineral fertiliser application techniques on N₂O and CH₄ fluxes from a barley field in southern Finland**. Agriculture, Ecosystems & Environment, v.117, 1, p.71-78, Oct. 2006.

PEREIRA, L. M. P.; CARAMORI, P.H.; RICCE, W.S.; CAVIGLIONE, J.H. **Análise comparativa de dados meteorológicos obtidos por estação convencional e automática em Londrina – PR.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 29, n. 2, p. 299-306, abr./jun. 2008.

PEREIRA, P.; NESCI, A.; ETCHEVERRY, M. **Effects of biocontrol agents on *Fusarium verticillioides* count and fumonisin content in the maize agroecosystem: Impact on rhizospheric bacterial and fungal groups.** Biological Control v.42, p.281-287, 2007.

PERSSON, T.; GARCIA, A.G.; PAZ, J.A.; JONES, J.W.; HOOGENBOOM, G. Net energy value of maize ethanol as a response to different climate and soil conditions in the southeastern USA. Biomass and bioenergy n.33p.1055-1064, 2009.

PETERSEN, S. O.; LIND, A.-M.; SOMMER, S. G. **Nitrogen and organic matter losses during storage of cattle and pig manure.** Journal of Agricultural Science, Cambridge, v.130, p.69-79, 1998.

PEU, P.; BIRGAND, F.; MARTINEZ, J. **Long term fate of slurry derived nitrogen in soil: A case study with a macro-lysimeter experiment having received high loads of pig slurry (Solepur).** Bioresource Technology n.98, p.3228–3234, 2007.

PLAZA, C.; HERNÁNDEZ, D.; GARCÍA-GIL, J.C.; POLO, A. **Microbial activity in pig slurry-amended soils under semiarid conditions.** Soil Biology & Biochemistry n.36 p.1577–1585, 2004.

PLAZA, C.; SENESI, N.; POLO, A.; BRUNETTI, G.; GARCÍA-GIL, J.C.; D'ORAZIO, V. **Soil fulvic acid properties as a means to assess the use of pig slurry amendment.** Soil and Tillage Research, v.74, 2, p.179-190, Dec. 2003.

PRATT, R.G. **Fungal population levels in soils of commercial swine waste disposal sites and relationships to soil nutrient concentrations.** Applied Soil Ecology, v.38, p.223-229, 2008.

PRESELLO, D.A.; BOTTA, G.; IGLESIAS, J.; EYHÉRABIDE, G.H. **Effect of disease severity on yield and grain fumonisin concentration of maize hybrids inoculated with *Fusarium verticillioides*.** Crop Protection, v.27, 3-5, p.572-576, Mar-May 2008.

RAMESSAR, K.; SABALZA, M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. **Maize plants: An ideal production platform for effective and safe molecular pharming.** Plant Science n.174 p.409–419, 2008.

RAMIREZ, M.L.; CHULZE, S.; MAGAN, N. **Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain.** International Journal of Food Microbiology, v.106, 3, n.15, p.291-296, Feb. 2006.

- REID, L. M.; ZHU, X.; MA, B. L. **Crop rotation and nitrogen effects on maize susceptibility to gibberella (*Fusarium graminearum*) ear rot.** Plant and Soil, v.237, p.1-14, 2001.
- REIS, T. A.; ZORZETE, P.; POZZI, C. R.; SILVA, V. N.; ORTEGA, E.; CORRÊA, B. **Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian sorghum from sowing to harvest.** J. Sci Food Agric, v.90, p.1445-1451, 2010.
- REIS, W.; JOBIM, C.C.; MACEDO, F.A.F.; MARTINS, E.N.; CECATO, U.; SILVEIRA, A. **Desempenho de Cordeiros Terminados em Confinamento, Consumindo Silagens de Milho de Grãos com Alta Umidade ou Grãos de Milho Hidratados em Substituição aos Grãos de Milho Seco da Dieta.** Rev. bras. zootec., v.30, n.2, p.596-603, 2001.
- REQUENA, F.; SAUME, E.; LEON, A. **Micotoxinas: Riesgos y prevención.** Zootecnia Trop., vol.23, no.4, p.393-410, Ene. 2005.
- RICCA, D.M.; ZIEMER, C.J.; KERR, B.J. **Changes in bacterial communities from swine feces during continuous culture with starch.** Anaerobe, v.16, p.516-521, 2010.
- RODRIGUES, P.B.; FREITAS, R.T.F.; FIALHO, E.T.; SILVA, H.O.; GONÇALVES, T.M. **Digestibilidade dos nutrientes e desempenho de suínos em crescimento e terminação alimentados com rações à base de milho e sorgo suplementadas com enzimas.** Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.1, n.2, p.91-100, 2002.
- ROSS, P.F., NELSON, P.E., RICHARD, J.L., OSWEILER, G.D., RICE, L.G., PLATTNER, R.D., WILSON, T.M. **Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolated associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine.** Appl. Environ. Microbiol. v.56, p.3225–3226, 1990.
- ROSSETTO, C.A.V.; SILVA, E.F.; ARAÚJO, A.E.S. **Influência da calagem, da época de colheita e da secagem na incidência de fungos e aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados.** Ciência Rural, v.35, n.2, mar-abr, 2005.
- RUFETE, B.; PEREZ-MURCIA, M.D.; PEREZ-ESPINOSA, A.; MORAL, R.; MORENO-CASELLES, J.; PAREDES, C. **Total and faecal coliform bacteria persistence in a pig slurry amended soil.** Livestock Science, v.102, 3, p.211-215, Jul. 2006.
- RUIZ-RUIZ, J.; MARTÍNEZ-AYALA, A.; DRAGO, S.; GONZÁLEZ, R.; BETANCUR-ANCONA, D.; CHEL-GUERRERO, L. **Extrusion of a hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and quality protein maize (*Zea mays* L.) flour blend.** Food Science and Technology v.41, p.1799-1807, 2008.
- SAMAPUNDO, S.; MEULENAER, B.D.; OSEI-NIMOH, D.; LAMBONI, Y.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, F. **Can phenolic compounds be used for the protection of corn**

from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage? Food Microbiology, v.24, 5, p.465-473, Aug. 2007.

SAMSON, R. A.; HOESKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food-borne fungi**. 4 ed. The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995.

SÁNCHEZ, M.; GONZÁLEZ, J.L. **The fertilizer value of pig slurry. I. Values depending on the type of operation**. Bioresource Technology n.96, p.1117–1123, 2005.

SANGOI, L.; ALAMEIDA, M.L. **Doses e épocas de aplicação nitrogênio para a cultura do milho num solo com alto teor de matéria orgânica**. Pesq. Agropec. Bra., Brasília, v.21, n.1, p.13-24, jan.1994.

SANGOI, L.; ENDER, M.; GUIDOLIN, A.F.; BOGO, A.; KOTHE, D.M. **Incidência e severidade de doenças de quatro híbridos de milho cultivados com diferentes densidades de plantas**. Ciência Rural, Santa Maria, v.30, n.1, p.17-21, 2000.

SANTURIO, J.M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. Rev. Bras. Cienc. Avic. V.2 n.1 Campinas Jan./Apr. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php>>. Acesso em: 29 Dez. 2010.

SCHOBER, T.J.; BEAN, S.R. **Sorghum and maize**. Gluten-Free Cereal Products and Beverages, p.101-118, 2008.

SENGER, C.C.D.; MÜHLBACH, P.R.F.; SÁNCHEZ, L.M.B.; PERES NETTO, D.; LIMA, L.D. **Composição química e digestibilidade 'in vitro' de silagens de milho com distintos teores de umidade e níveis de compactação**. Ciência Rural, Santa Maria, v.35, n.6, p.1393-1399, nov-dez, 2005.

SEWRAM, V.; MSHICILELI, N.; Shephard, G.S.; VISMER, H.F.; RHEEDER, J.P.; LEE, Y.W.; LESLIE, J.F.; MARASAS, W.F.O. **Production of Fumonisin B and C Analogues by Several Fusarium Species**. J. Agric. Food Chem. n.53, p.4861-4866, 2005.

SHEPHARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; GELDERBLUM, W.C.A. **Quantitative determination of fumonisins B1 and B2 by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection**. Journal of Liquid Chromatography, v.13, p.2077- 2087, 1990.

SIMON, L.; LÉVESQUE, R. C.; LALONDE, M. **Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction**. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 59, n. 12, p. 4211-4215, Dec. 1992.

SINHA, K.K. & SINHA, A.K. **Effect of *Sitophilus oryzae* infestation on *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination in stored wheat**. J. Stored Prod. Res., v.27, n.1, p.65-68, 1991.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 50p.

SOLOMON, P. S.; TAN, K. C.; OLIVER, R. P. **The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study**. *Molecular Plant Pathology*, v.4, n. 3, p. 203-210, 2003.

SØRENSEN, P.; FERNÁNDEZ, J. A. **Dietary effects on the composition of pig slurry and on the plant utilization of pig slurry nitrogen**. *Journal of Agricultural Science*, v.140, p.343-355, 2003.

SORIANO, J.M.; DRAGACCI, S. **Occurrence of fumonisins in foods**. *Food Research International*, v.37, 10, p.985-1000, 2004.

SOUZA, C.F.; CAMPOS, J.A.; SANTOS, C.R.; BRESSAN, W.S.; MOGAMI, C.A. **Produção volumétrica de metano - dejetos de suínos**. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 32, n. 1, p. 219-224, jan./fev., 2008.

SOUZA, F.A.; *et al.* **PCR- denaturing gel electrophoresis profiling of Inter.-and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity an accurate and sensitive method to assess species diversity of Arbuscular Micorrhizal Fungi of the genus *Gigaspora***. *Applied and Environmental Microbiology*. v.70, p.1413-1424, 2004.

SNIJDERS, C.H.A. **Resistance in wheat to *Fusarium* infection and trichothecene formation**. *Toxicology Letters* n.153, p.37-46, 2004.

SURESH, A.; CHOI, H. L.; OH, D. I.; MOON, O. K. **Prediction of the nutrients value and biochemical characteristics of swine slurry by measurement of EC – Electrical conductivity**. *Bioresource Technology*, v.100, p.4683-4689, 2009.

SUZUKI, C.; NAGAOKA, K.; SHIMADA, A.; TAKENAKA, M. **Bacterial communities are more dependent on soil type than fertilizer type, but the reverse is true for fungal communities**. *Soil Science and Plant Nutrition*, v.55, p.80-90, 2009.

SWEENEY, M.J.; DOBSON, A.D.W. **Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species**. *International Journal of Food Microbiology*, v.43, 3, n.8, p.141-158, Sep. 1998.

THIEL, P.G., SYDENHAM, E.W., SHEPARD, G.S., GELDERBLOM, W.C. **The implications of naturally occurring levels of fumonisin in maize for human and animal health**. *Mycopathologia* n.117, p.3-9, 1992.

TIRADO, M. C.; CLARKE, R. JAYKUS, L. A.; MCQUATTERS-GOLLOP, A.; FRANK, J. M. **Climate change and food safety: A review**. *Food Research International*, v.43, p.1745-1765, 2010.

TORELLI, E.; FIRRAO, G.; LOCCI, R.; GOBBI, E. **Ochratoxin A-producing strains of *Penicillium* spp. isolated from grapes used for the production of “passito” wines**. *International Journal of Food Microbiology*, v.106, 3, n.15, p.307-312, Feb. 2006.

- UENO Y.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; WANG, D.S.; LEE, U.S.; HIROOKA, E.Y.; HARA, S.; KARKI, T.; CHEN, G.; YU, S.Z. **A limited survey of fumonisin in corn and corn-based products in Asian countries.** Mycotoxin Research, v.9, p.27-34, 1993.
- VAZOLLER, R.F., MANFIO, G.P., CANHOS, V.P. **Diversidade no domínio Archaea.** Domínio Archaea. São Paulo, p. 16-24, 2003
- VELLUTI, A.; MARTIN, S.; BETTUCCI, L.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. **The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B and zearalenone formation.** International Journal of Food Microbiology, n.59, p.59 –66, 2000.
- VIEIRA, F.C.S.; NAHAS, E. **Quantificação de bactérias totais e esporuladas no solo.** Scientia Agricola, v.57, n.3, p.539-545, jul./set. 2000.
- VLIET, P.C.J.; BLOEM, J.; GOEDE, R.G.M. **Microbial diversity, nitrogen loss and grass production after addition of Effective Micro-organisms® (EM) to slurry manure.** Applied Soil Ecology, v.32, n.2, p.188-198, Jun. 2006.
- VUORINEN, A. H.; SAHARINEN, M. H. **Evolution of microbiological and chemical parameters during manure and straw co-composting in a drum composting system.** Agriculture, Ecosystems and Environment, v.66, p.19-29, 1997.
- WALTERS, D.R.; BINGHAM, I.J. **Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control.** Ann Appl Biol, v.151, p.307-324, 2007.
- WALTERS, D. R.; FOUNTAINE, J. M. **Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions.** Journal of Agricultural Science, v.147, p.523-535, 2009.
- WEBSTER, R.K., GUNNEL, P.S. (Eds.), 1992. **Compendium of Rice. Diseases.** APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. **16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study.** Journal of Bacteriology, Washington, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.
- WHITE, P. J.; BROWN, P. H. **Plant nutrition for sustainable development and global health.** Annals of Botany, v.105, p.1073-1080, 2010.
- WILLIAMS, W.P.; WINDHAM, G.L.; BUCKLEY, P.M.; PERKINS, J.M. **Southwestern corn borer damage and aflatoxin accumulation in conventional and transgenic corn hybrids.** Field Crops Research, v.91, n.14, p.329-336, Feb. 2005.
- WONG, J. W. C.; SELVAM, A. **Reduction of indicator and pathogenic microorganisms in pig manure through fly ash and lime addition during alkaline stabilization.** Journal of Hazardous Material, v. 169, p.882-889, 2009.

YANG, F.; JENSEN, J. D.; SPLIID, N. H.; SVENSSON, B.; JACOBSEN, S.; JØRGENSEN, L. N.; JØRGENSEN, H. J. L.; COLLING, D. B.; FINNIE, C. **Investigation of the effect of nitrogen on severity of Fusarium Head Blight in barley.** Journal of Proteomics, v.73, p.743-752, 2010.

YOSHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; TONOOKA, T. **Effect of nitrogen application at anthesis on Fusarium head blight and mycotoxin accumulation in breadmaking wheat in the western part of Japan.** Gen Plant Pathol, v.74, p.355-363, 2008.

ZAIN, M.E. **Impact of mycotoxins on humans and animals.** Journal of Saudi Chemical Society. Impact of mycotoxins on humans and animals. p.1-16, 2010.

ANEXOS

ANEXO A

Composição de Meios de Cultura

Meio de Martin

O meio Martin foi utilizado para a contagem de fungos do dejetto líquido de suíno e do solo. O meio foi preparado conforme descrito por Jahnel (1999) adicionando-se 10 g de glicose, 5 g de peptona, 1,0 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 0,05 g de rosa bengala em 990 mL água destilada. Após ajustado o pH para pH = 5,0, adicionou-se 18 g de ágar e o meio foi autoclavado por 20 min. No meio resfriado a 50 °C, adicionou-se estreptomicina (Sigma) (10 mL solução 10%) previamente esterilizada por filtração (Millipore 45 µm de diâmetro) adicionou-se ao meio e imediatamente vertido na placa de Petri.

Meio Glicose- peptona

O meio Glicose-Peptona foi utilizado para a contagem de bactérias do dejetto líquido de suíno e do solo. Dessa forma, o meio foi preparado conforme Vieira (2000) com a adição de 1,5 g de glicose, 0,5 g de peptona, 0,5 g de K_2HPO_4 , 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 0,01 g de $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 9H_2O$ em 990 mL de água destilada. Após o ajuste do pH para pH = 7,0, adicionou-se 18 g ágar e o meio foi esterilizado por 20 min. Ao meio resfriado a temperatura de 50 °C, adicionou-se cicloheximida (10 mL solução 10%) previamente esterilizada por filtração (Millipore 45 µm de diâmetro) adicionou-se ao meio e foi imediatamente vertido na placa de Petri.

Meio de Ágar Batata Dextrose (BDA)

O meio de Ágar Batata Dextrose (BDA), utilizado na contagem total de bolores e leveduras em grãos de milho, sendo preparado com a adição de 39 g de meio BDA em um litro de água destilada, fundido em forno microondas e autoclavado por 20

min. Ao meio resfriado a temperatura de 50 °C, foi adicionado 10 mL de ácido tartárico (10 %), esterilizado separadamente por 20 min, para acidificação do meio a pH 4,0.