

## Capítulo 5

# Controle Biológico de Fungos Aflatoxigênicos

Tiago Domingues Zucchi & Itamar Soares de Melo\*

*Embrapa Meio Ambiente, CP 69; 13820-000 Jaguariúna, SP, Brasil, e-mail: tdzucchi@terra.com.br; itamar@cnpma.embrapa.br. \*Bolsista do CNPq.*

## Introdução

Na Inglaterra, em 1969, mais de 100.000 perus morreram de uma doença conhecida até então como “Doença X do peru”. Essa doença foi relacionada ao amendoim contido na dieta dessas aves. Posteriormente, constatou-se que os grãos estavam contaminados com o fungo *Aspergillus flavus* e que alguns metabólitos desse fungo, conhecidos hoje como aflatoxinas, foram responsáveis pela morte das aves (Papp *et al.*, 2002). Esse episódio serviu para alertar a comunidade científica sobre a importância dos possíveis compostos nocivos produzidos por fungos. Essas substâncias foram denominadas micotoxinas.

Muitas micotoxinas são classificadas como policetônicos, que são metabólitos secundários biorreativos sintetizados como ácidos graxos (Hopwood & Sherman, 1990). Apesar de alguns policetônicos (por exemplo, antibióticos e drogas anticâncer) serem benéficos, os policetônicos micotoxigênicos representam um problema sério para a saúde humana e animal, além de causar sérios danos econômicos (Keller *et al.*, 1994).

As micotoxinas podem ser definidas como um grupo de metabólitos secundários produzidos por diversos tipos de fungos filamentosos, tais como as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* entre outros (Sweeney & Dobson, 1999). Além disso, alguns fungos são capazes de produzir mais de uma micotoxina e algumas são produzidas por mais de uma espécie de fungo (Hussein & Brasel, 2001). Segundo Papp *et al.* (2002), mais de 200 tipos de toxinas fúngicas já foram identificadas e esse número não para de crescer.

As micotoxinas são formadas durante o crescimento do fungo. Esses compostos podem estar presentes apenas no fungo, enquanto outros são excretados no meio, ou seja, nos alimentos em geral (Filtenborg *et al.*, 1996). Além disso, como a produção dessas toxinas está diretamente relacionada ao desenvolvimento do fungo, a contaminação dos alimentos pode ocorrer no campo, antes e após a colheita e durante o transporte e armazenamento do produto (Caldas *et al.*, 2002). Como esses compostos são extremamente resistentes aos tratamentos físicos e químicos, uma vez que as micotoxinas contaminam os alimentos, como regra geral, permanecem neles durante o processamento e estocagem (Scott *et al.*, 1992).

As aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina, tricotecenos, zearelon, toxinas tremogênicas e ergotoxina estão entre as micotoxinas de maior impacto para a saúde humana e animal. Esses compostos apresentam efeitos adversos em humanos, animais e culturas, os quais resultam em doenças e danos econômicos (Hussein & Brasel, 2001). De acordo com a FDA (Food & Drug Administration, EUA), devido à queda de produtividade, essas perdas econômicas chegam próximo a US\$1 bilhão/ano e mais US\$0,5 milhão/ano para custos de mitigação de apenas três micotoxinas: aflatoxinas, fumonisinas e tricotecenos (*in* Bhatnagar *et al.*, 2006).

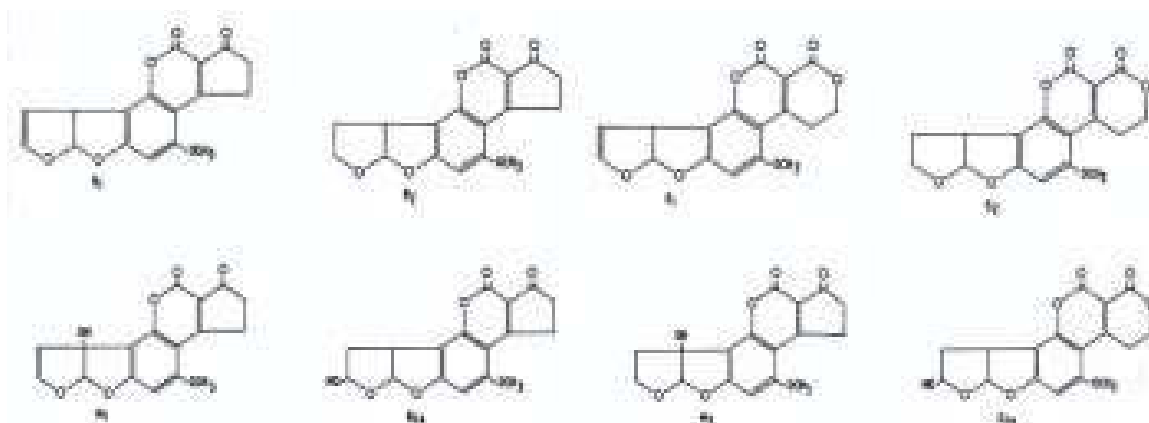
Devido a esses problemas, diversas estratégias têm sido propostas para controlar os fungos micotoxigênicos diminuindo, assim, a concentração desses compostos nos alimentos. Esses estudos envolvem desde fungicidas, controle físico, controle biológico, substâncias inibidoras originárias de plantas ou microrganismos até o uso de engenharia genética para resistência de plantas. Entretanto, muitas dessas estratégias apresentam efeitos limitados (Yan *et al.*, 2004).

No caso das aflatoxinas, o uso de agentes biológicos competidores/antagonistas a *Aspergillus* spp. tem se mostrado uma metodologia viável e promissora. Além disso, o controle biológico de fitopatógenos tem sido estimulado nos últimos anos principalmente pela percepção pública sobre os riscos dos agrotóxicos (Raaijmakers *et al.*, 2002). Essa preocupação é devida, em grande parte, aos efeitos desses compostos no ambiente, em organismos não-alvos e na possibilidade de carcinogenicidade de alguns agrotóxicos. Outro problema relacionado ao uso dessas substâncias inclui a seleção de linhagens de patógenos resistentes, levando-se à gradual eliminação dos fungicidas disponíveis (Heydari & Misaghi, 1998). Neste capítulo será abordado como o controle biológico vem sendo utilizado para diminuir a contaminação de aflatoxinas nos alimentos.

## Aflatoxina

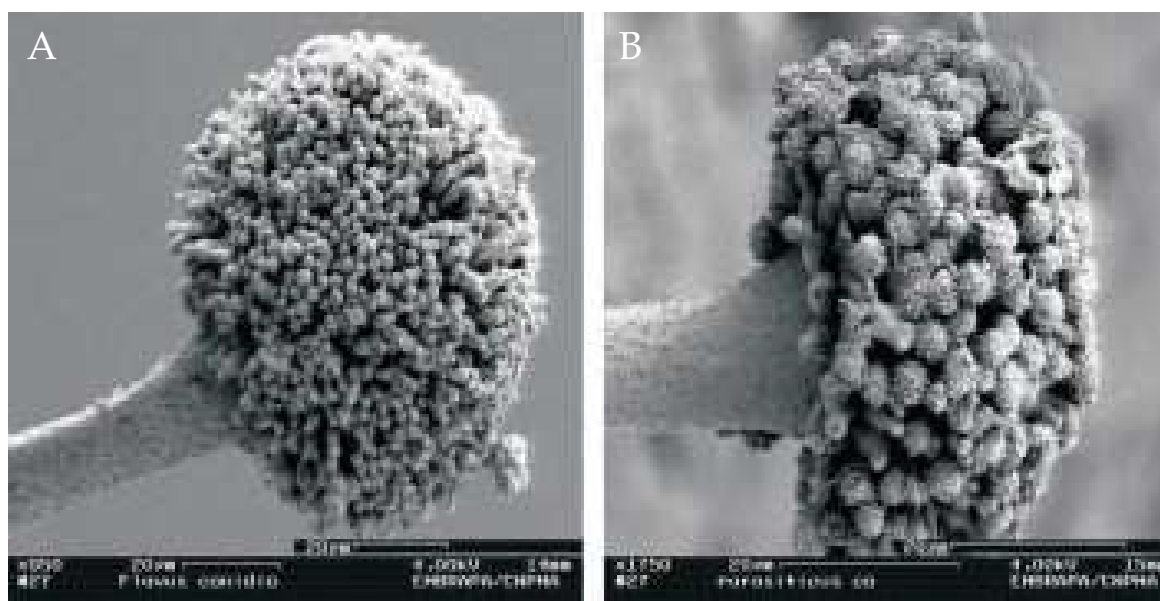
Entre todas as micotoxinas conhecidas, as aflatoxinas produzidas pelas espécies de *Aspergillus* continuam a ser as mais estudadas e compreendidas. Esse fato deve-se principalmente a dois fatores: a habilidade desse fungo em colonizar uma grande variedade de produtos agrícolas (O'Brian *et al.*, 2003) e a aflatoxina B<sub>1</sub> ser reconhecida como o mais potente agente carcinogênico natural conhecido, além de ser teratogênica e mutagênica (Shenasi *et al.*, 2002).

O grupo das aflatoxinas divide-se em quatro metabólitos principais: aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, respectivamente) (Figura 1). Há ainda o tipo M<sub>1</sub> encontrada no leite e produtos lácteos como resultado direto da ingestão de rações contaminadas com AFB<sub>1</sub>, durante a alimentação do gado (López *et al.*, 2003). Esse composto pode ser detectado no leite entre 12 e 24 h após a primeira ingestão e é considerado tão tóxico quanto a AFB<sub>1</sub> para aves e ratos (López *et al.*, 2003).



**Figura 1.** Estrutura das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, B<sub>2A</sub> e G<sub>2A</sub>

Diversos fungos filamentosos, incluindo espécies de *Penicillium* e uma espécie pertencente ao gênero *Chaetomium*, são relatadas como produtoras de esterigmatocistina e outros precursores da aflatoxina (Barnes *et al.*, 1994). Entretanto, apenas algumas espécies de *Aspergillus* são capazes de produzir aflatoxinas, sendo que *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (Figura 2) são as mais comumente relacionadas com contaminação por essa micotoxina (Cotty *et al.*, 1994). Além disso, *Aspergillus parasiticus* é reportado como produtor tanto das AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> como das AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, enquanto *Aspergillus flavus* raramente produz as AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> (Klich & Pitt, 1988).



**Figura 2.** Microscopia eletrônica de varredura dos conidióforos de *Aspergillus flavus* (A) e *Aspergillus parasiticus* (B), respectivamente (Zucchi, 2007).

Apesar de as espécies desse gênero distribuírem-se por todo o globo terrestre, são particularmente mais abundantes na região compreendida entre as latitudes 26°N e 35°S (Klich *et al.*, 1994). Devido à capacidade de *Aspergillus* spp. desenvolverem-se em temperaturas elevadas e com atividade de água ( $a_w$ ) relativamente baixa, essas espécies são capazes de colonizar diversos tipos de grãos e castanhas (CAST, 2003). Esses fatores ambientais juntamente com condições inadequadas de armazenamento de grãos tornam a contaminação por aflatoxina um problema sério, principalmente, nos países em desenvolvimento.

## Toxicidade e Legislação

As aflatoxinas produzem aberrações cromossômicas, síntese de DNA não programada, troca de cromátides irmãs, quebras no cromossomo e ligações com o DNA de células humanas (Wang & Groopman, 1999). Além disso, a AFB<sub>1</sub> foi relatada como sendo inibidora da síntese de DNA, da síntese de RNA mensageiro e conseqüentemente da síntese de proteínas (McLean & Dutton, 1995). Ademais, analisando os efeitos dessa micotoxina em ratos, Eaton & Gallagher (1994) sugeriram que a exposição crônica, mesmo em pequenas concentrações, é objeto de preocupação.

Flannigan (1991) determinou os valores de dose letal (DL<sub>50</sub>) para AFB<sub>1</sub> entre 1,0 mg/kg e 17,9 mg/kg de peso vivo em animais de laboratórios. Entretanto, frangos de 1 dia mostraram-se particularmente mais sensíveis, estando os valores da DL<sub>50</sub> próximos a 0,5 mg/kg. Verifica-se a indução de toxicidade crônica quando ingerido em doses subletais. McLean & Dutton (1995) demonstraram que baixas doses em exposição crônica resultam em neoplasia, principalmente câncer de fígado, em diversas espécies animais.

As rações contaminadas com aflatoxinas podem causar diminuição na eficiência da ração, queda no índice de reprodutividade, retardo no crescimento e elevação na taxa de mortalidade de animais, assim como um decréscimo na produção de alimentos derivados desses animais (Diekman & Green, 1992; Bintvihok *et al.*, 2003). Esses fatores levam a uma perda substancial de produtividade e degradação da qualidade da carne (Rustom, 1997). Em 1986, houve prejuízo de aproximadamente US\$ 140 milhões como consequência direta da perda de peso de frangos-galeto em decorrência do consumo de baixos níveis de aflatoxinas (Palmgreen & Hayes, 1987). Em humanos, a ingestão de aflatoxinas é associada com hepatotoxicidade (Dvorackova, 1990). Além disso, estudos epidemiológicos também indicam que áreas com altos níveis de aflatoxinas são correlacionadas com alta incidência de câncer do fígado (Trail *et al.*, 1995).

A exposição humana às micotoxinas pelo consumo de alimento contaminado é questão de saúde pública no mundo todo. Embora países europeus e os EUA possuam regulação rigorosa para as mais diversas micotoxinas, no Brasil, existe legislação específica apenas para as aflatoxinas. Segundo Caldas *et al.* (2002), o Ministério da Saúde estabelece o limite de 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>+AFG<sub>1</sub> em alimentos de consumo humano e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

estabelece 20 µg/kg de AF totais para matérias-primas de alimentos e rações. Esses valores ainda são considerados altos quando comparados com os de países europeus, onde para AF totais em qualquer tipo de alimento, os valores variam de 1 µg/kg (Bósnia) a 10 µg/kg (França) (Tabela 1) (Creppy, 2002).

**Tabela 1.** Limite máximo de micotoxinas em alimentos nos países europeus e EUA.

Micotoxina	Países	Limites máximos (µg/kg ou µg/l)	Alimentos	
Aflatoxina B <sub>1</sub>	Alemanha	2	Todos	
	Bélgica	5	Todos	
	Finlândia	2	Todos	
	Portugal		25	Amendoim
			5	Alimento para
			20	criança
	Suíça		1	Outros
		2	Todos	
Aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub>	França	10	Todos	
		20	Todos	
	Bélgica	5	Amendoim	
	Bósnia	1	Todos	
	Noruega	5	Amendoim e castanhas	
Aflatoxina M <sub>1</sub>	Rússia	0,5	-	
	Bélgica	0,05	Leite	
	EUA	0,5	Leite	
	França	0,03	Leite para criança	
	Holanda		0,05	Leite
			0,02	Mateiga
			0,2	Queijo

Fonte: modificado de Creppy (2002).

## Controle Biológico de Fungos Aflatoxigênicos

O controle biológico tem se mostrado uma estratégia promissora na redução de contaminação de grãos por aflatoxina, tanto em pré- como em pós-colheita (Dorner & Cole, 2002). Diversas tecnologias vêm sendo desenvolvidas, mas poucas chegaram a sair dos laboratórios. Dentre essas técnicas destacam-se o uso de linhagens de *Aspergillus* não produtoras de AF; bactérias; actinobactérias e leveduras.

**Uso de linhagens de *Aspergillus* não produtoras de aflatoxina.** Uma metodologia que é empregada em campo é a aplicação de linhagens de *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus* não produtoras de aflatoxinas, de ácido ciclopiazônico e de nenhum outro precursor da aflatoxina, diretamente no solo ao redor da planta em desenvolvimento. Essas linhagens competem pelo mesmo nicho ecológico que as linhagens produtoras de aflatoxina no campo. Com essa competição, é esperada uma redução no potencial de inóculo da linhagem aflatoxigênica e conseqüentemente redução na produção de aflatoxina. A linhagem não-aflatoxigênica pode por ventura infectar culturas susceptíveis, como o amendoim. Mas mesmo com essa infecção, não haverá contaminação, pois essa linhagem invasora não produz AF (Dorner, 2005).

Utilizando essa tecnologia, Dorner *et al.* (2003) constataram que a concentração de AF em amendoim colhido reduziu significativamente (cerca de 90%) ao longo de dois anos de cultivo. Da mesma maneira, Cotty & Bhatnagar (1994) demonstraram que uma linhagem de *Aspergillus flavus*, produtora de muitas das enzimas envolvidas na biossíntese da aflatoxina, mas não produtora de AF, foi a mais eficiente na redução da contaminação em casa-de-vegetação. Além disso, devido ao melhor entendimento da via de regulação da AF, a eficácia dessas linhagens competidoras pode ser melhorada por meio de engenharia genética (Bhatnagar *et al.*, 2006). Entretanto, o uso de linhagens de *Aspergillus* não produtoras de AF possui uma desvantagem. Algumas dessas linhagens não aflatoxigênicas são instáveis e podem se converter em fenótipo produtor de aflatoxina (Brown *et al.*, 1991). Assim, apesar de os resultados promissores encontrados em alguns trabalhos, a estabilidade genética de linhagens não-aflatoxigênicas deve ser levada em conta num programa de seleção.

Até o momento, apenas dois produtos comerciais que utilizam formulações de fungos não-aflatoxigênicos estão disponíveis no mercado: Afla-guard® – registrado para uso em cultura de amendoim e *Aspergillus flavus* AF-36 – aprovado para uso em cultura de algodão (Dorner, 2005). Mas devido aos avanços e vantagens dessas linhagens na diminuição da contaminação por AF, muito em breve novas formulações deverão ser aprovadas para uso comercial.

**Uso de bactérias antagonicas.** No mercado há diversas linhagens comerciais de bactérias disponíveis para o controle dos mais variados fitopatógenos (Tabela 2). Essas bactérias de controle biológico podem ser aplicadas como produtos secos (granulados ou pó), suspensão de células (com ou sem microencapsulamento) ou tratamento de sementes (Schisler *et al.*, 2004).

**Tabela 2.** Linhagens de bactérias disponíveis comercialmente para o controle de fitopatógenos.

Agentes de controle	Linhagens	Nomes comerciais	Empresas
<i>Bacillus subtilis</i>	GB03	Kodiak®	Gustafson
	MBI600	Subtilex®	Becker Underwood
	QST713	Serenade®	AgraQuest
	BD170	BioPro®	Andermatt Bioc.
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	MA342	Cedomon®	BioAgri
	MA342	Cerall®	BioAgri
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	A506	Blightban®	Nufarm Inc.
<i>Bacillus pumilus</i>	GB34	YieldShield®	Gustafson
	QST713	Rhapsody®	AgraQuest
	QST2808	Sonata®	AgraQuest
	QST2808	Ballad®	AgraQuest
<i>Bacillus liqueniformis</i>	SB3086	EcoGuard®	Novozymes
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GB12+GB99	BioYield®	Gustafson

No caso de fungos aflatoxigênicos, há poucas linhagens registradas e/ou certificadas para uso específico contra esses fitopatógenos. Entretanto, muitos trabalhos (em sua grande maioria *in vitro*) têm demonstrado que o uso de bactérias pode ser tornar uma alternativa viável no controle de *Aspergillus* spp. Essas pesquisas podem ser divididas em três linhas distintas: prospecção de novas biomoléculas ativas contra *Aspergillus* (antibióticos); seleção de linhagens produtoras de enzimas líticas (quitinase e endoglicanase) e, mais recentemente, uso de ácido láctico de bactéria. Alguns exemplos dessas metodologias e seu potencial no controle de fungos aflatoxigênicos serão relatados a seguir.

**Biomoléculas.** Diversas espécies de bactérias são capazes de oferecer algum efeito antagônico, por meio da produção de compostos orgânicos bioativos, às espécies de *Aspergillus*, diminuindo em maior ou menor grau a síntese de AF. Bottone & Pelluso (2003) relataram uma linhagem de *Bacillus pumilus* capaz de produzir um composto de baixo peso molecular que apresenta atividade antifúngica contra *Aspergillus* spp., inibindo a germinação dos esporos e o desenvolvimento das hifas. Em trabalho semelhante, linhagens isoladas de *Bacillus pumilus* foram capazes de inibir a produção de AF da linhagem NRRL 2999 de *Aspergillus parasiticus*. Essa inibição foi devida à produção de um metabólito extracelular pela bactéria durante o seu desenvolvimento (Munimbazi & Bullerman, 1998).

Nesci *et al.* (2005) isolaram linhagens de *Bacillus subtilis* e de *Pseudomonas solonacearum* que apresentaram um forte antagonismo a *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Ambos os fungos tiveram visível redução no seu crescimento nos testes de antagonismo. Essas linhagens de bactérias foram também eficazes na inibição do acúmulo de AFB<sub>1</sub> *in vitro*. Em outro trabalho, isolados de *Bacillus subtilis* foram capazes de inibir o crescimento de *Aspergillus flavus* em milho e *Aspergillus parasiticus* em amendoim (Kimura & Hirano, 1988).

Além das espécies de *Bacillus* e de *Pseudomonas*, outros gêneros de bactérias também são relatados por produzir compostos antagônicos contra fungos aflatoxigênicos. Um exemplo recente foi dado por Yadav *et al.* (2005), que apresentaram o primeiro relato dos efeitos supressivos das moléculas bioativas de *Escherichia coli* sobre *Aspergillus* spp. Entretanto, os compostos produzidos por essa linhagem ainda não foram identificados.

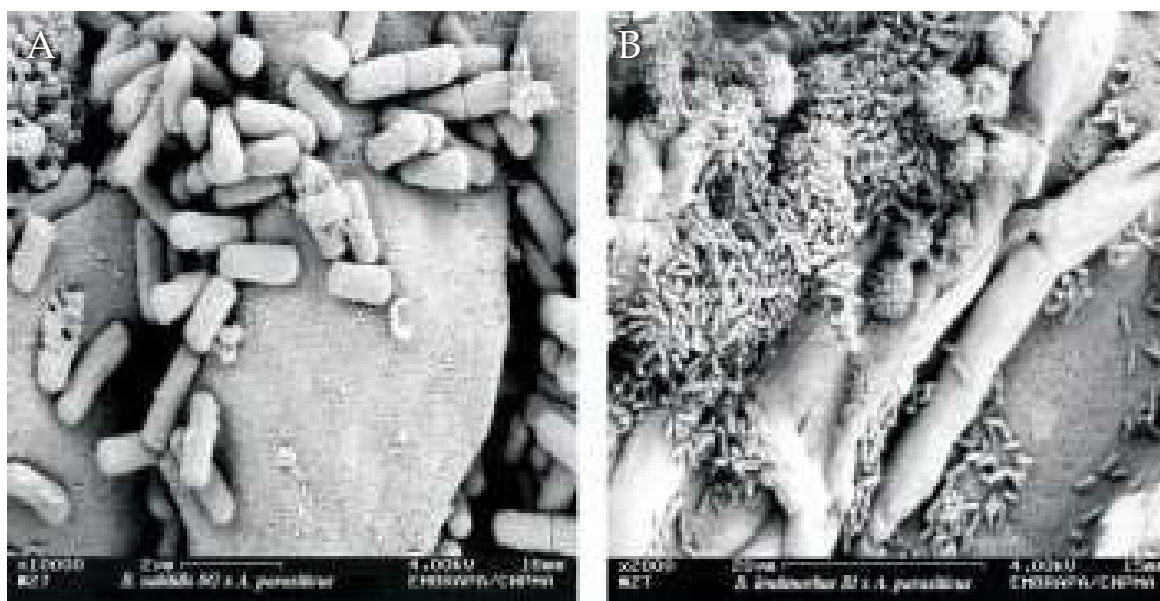
Apesar da diversidade de bactérias que produzem metabólitos contra fungos aflatoxigênicos, existem poucos trabalhos que os identifiquem de fato. Uma exceção foi a identificação de um ciclodipeptídeo, ciclo(L-Leu-L-Pro), capaz de afetar a produção de aflatoxina, regulando-a (Yan *et al.*, 2004). A identificação dos metabólitos bioativos de bactérias é importante, pois caso esses compostos sejam pouco tóxicos (aos seres humanos e animais) poderiam ser usados para fabricação de novas formulações contra esses fitopatógenos.

**Enzimas líticas (quitinasases).** Os fungos filamentosos, em geral, possuem parede celular composta principalmente de quitina associada a proteínas e outros carboidratos, tais como  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4 ou  $\beta$ -1,6-glicanas (Cohen-Kupiec & Chet, 1998). A quitina é um homopolímero com ligação 1,4- $\beta$  N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), sendo degradada pela ação das quitinases que hidrolisam as ligações 1,4- $\beta$ . Essas enzimas são divididas em endoquitinases e exoquitinases ou quitibiosidase.

As endoquitinases são enzimas que catalizam aleatoriamente a hidrólise das ligações 1,4- $\beta$  de GlcNAc em toda a extensão da microfibrila da quitina. As exoquitinases catalizam a liberação de unidades de diacetil-quitobiose das cadeias de quitina (Chernin *et al.*, 1995).

Vários organismos (vírus, bactérias, fungos, plantas e animais) produzem quitinases com funções diversas em cada um deles. Por exemplo, nas bactérias, as quitinases mostram-se importantes na digestão da quitina para utilizá-la como fonte de carbono e energia (Wang & Chang, 1997). Além disso, quitinases de bactérias e fungos são comumente associadas ao micoparasitismo (Haran *et al.*, 1996), enquanto nas plantas estão associadas à proteção contra fitopatógenos e insetos (Graham & Sticklen, 1994).

A habilidade das bactérias em parasitar e degradar esporos e hifas de fungos patogênicos está amplamente descrita na literatura (Whipps, 2001). Esse parasitismo leva a uma inibição do crescimento do fungo e pode abranger desde a simples fixação de células às hifas, até a sua completa quebra e degradação. A aderência da célula de bactérias às hifas ocorre muitas vezes devido à produção de biofilme (Whipps, 2001). Zucchi (2007) demonstrou que linhagens de *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus lentimorbus*, produtoras de quitinase, são capazes de parasitar *Aspergillus parasiticus* (Figura 3).



**Figura 3.** Eletromicrografia mostrando o micoparasitismo das linhagens antagônicas contra o fungo aflatoxigênico. A. *Bacillus subtilis* 0G x *Aspergillus parasiticus*. B. *Paenibacillus lentimorbus* BL x *Aspergillus parasiticus*.

Em razão da capacidade em degradar a parede celular de fungos filamentosos, tais como espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* e *Colletotrichum* entre outros, as quitinases são consideradas uma importante aliada no controle de fungos fitopatogênicos. Além disso, por apresentarem baixa toxicidade para humanos e animais, os genes responsáveis pela produção dessas enzimas vêm sendo inseridos em plantas, por técnicas de transgenia, para torná-las resistente aos fitopatógenos (Melchers & Stuiver, 2000). Entretanto, até o momento, não foi realizado nenhum trabalho para avaliar o potencial inibitório dessas plantas transgênicas sobre *Aspergillus* spp.



**Ácido lático de bactéria (LAB).** O ácido lático de bactéria (LAB) é usado para a detoxificação ou inibição da síntese de AF. Assim, o uso de bactérias que possuam a habilidade de remover aflatoxina do meio vem sendo largamente estudado. Algumas dessas substâncias também apresentam propriedades anticarcinogênicas (Goldin & Gorbach, 1984). Em muitos estudos, foi mostrada a habilidade de algumas espécies produzirem diversos tipos de LAB que interagem ou removem a AF do meio ou inibem a germinação dos esporos de fungos aflatoxigênicos. Onilude *et al.* (2005) demonstraram que por meio da produção de LAB, *Lactobacillus planarum* inibe o crescimento vegetativo e esporulação de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, enquanto *Lactobacillus brevis* e *Lactococcus* spp. inibem apenas *Aspergillus parasiticus*.

As linhagens de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus lactis* reduzem em mais de 20% a concentração de AF no meio e uma linhagem de *Lactobacillus rhamnosus* reduz a concentração em até 45% (Zinedine *et al.*, 2005). Essa remoção específica da toxina se dá por meio de uma ligação física formando um complexo entre o fator produzido pelas bactérias e a AFB<sub>1</sub> (Haskard *et al.*, 2001). Além disso, Oatley *et al.* (2000) demonstraram que quando a AF encontra-se ligada a esse fator, a micotoxina torna-se inviável para absorção pelo trato digestivo. Essas descobertas sugerem que as linhagens produtoras de LAB podem ser exploradas numa metodologia para detoxificação, em condições de armazenamento, de alimentos contaminados com aflatoxinas e/ou impedirem o desenvolvimento de *Aspergillus* spp. (Onilude *et al.*, 2005).

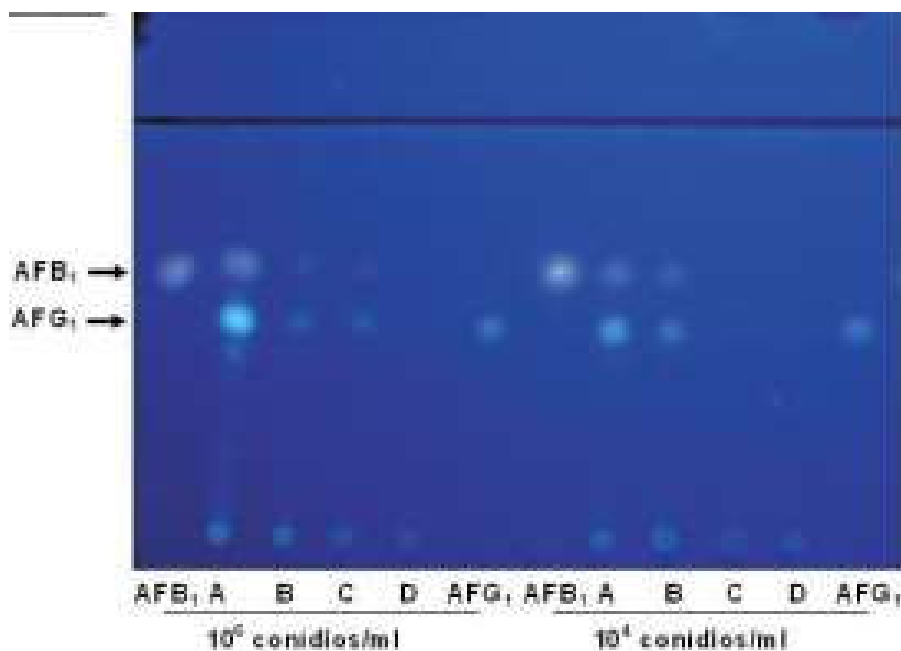
**Uso de actinobactérias.** As bactérias filamentosas são intensamente exploradas como fontes de inseticidas, fungicidas, antibióticos, agentes anticâncer e enzimas (Ômura & Crump, 2004; von Bubnoff, 2006; Clardy *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2006; van Wezel *et al.*, 2006). Essas actinobactérias também produzem metabólitos secundários que podem ser utilizados como biorremediadores, atuando, por exemplo, na biodegradação de agrotóxicos (de Schrijver & de Mot, 1999; Watanabe, 2001). Podem, ainda, ser exploradas como células hospedeiras para a produção de proteínas recombinantes (Nakashima *et al.*, 2005). No entanto, a maioria desses estudos concentra-se em um único gênero de actinobactérias, *Streptomyces*, o qual é facilmente isolado e cultivado em amostras de origens diversas. Atualmente, devido a essa predileção por *Streptomyces*, pode-se dizer que existe um completo desconhecimento do potencial biotecnológico dos demais gêneros de actinobactérias (Clardy *et al.*, 2006; van Wezel, 2006). A ordem Actinomycetales é a maior fonte de antibióticos conhecidos com cerca de 3.000 moléculas, sendo 90% produzidas pelo gênero *Streptomyces* (Clardy *et al.*, 2006). Além disso, dos mais de 6.000 antibióticos descritos nos últimos anos, cerca de 65% são produzidos pelas espécies de *Streptomyces* (Araújo, 1998).

Esse imenso potencial de *Streptomyces* spp. em produzir moléculas de interesse biotecnológico, reflete também na escolha desse gênero de actinobactéria para o controle de fitopatógenos. No caso de fungos aflatoxigênicos, o uso de *Streptomyces* spp. é largamente estudado tanto para produção de enzimas líticas como metabólitos secundários que apresentem algum grau de controle.

Com relação às enzimas líticas, as pesquisas com actinobactérias para o controle de *Aspergillus* spp. concentram-se principalmente nas quitinasases. Gomes *et al.* (2001) descreveram uma linhagem de *Streptomyces* sp. RC1071, isolada de solo do cerrado, como sendo produtora de enzimas líticas com ação para diversos fungos patogênicos, inclusive *Aspergillus parasiticus*. Esses autores relataram uma inibição de aproximadamente 15% a esse fungo.

Os metabólitos secundários produzidos por actinobactérias têm se mostrado efetivos no controle de *Aspergillus* spp. Em um trabalho recente, foi demonstrado que *Streptomyces maritimus* produz um fator de citotoxicidade moderada, extraído com acetato de etila, capaz de inibir o desenvolvimento de *Aspergillus flavus* (Al-Bari *et al.*, 2007). Alguns compostos isolados de *Streptomyces* sp. (aflastatinas A e B, blasticidina A e dioctatina A) inibiram a produção de AF, mas não o crescimento do fungo (Sakuda *et al.*, 1996; Sakuda *et al.*, 1999; Sakuda *et al.*, 2000a, b; Yoshinari *et al.*, 2007).

A maioria das pesquisas que envolve o controle de fungos aflatoxigênicos por espécies de bactérias filamentosas é realizada apenas *in vitro*. Uma exceção a essa regra foi demonstrada por Zucchi *et al.* (2008) em testes *in vivo*, nos quais a linhagem de *Streptomyces* sp. ASBV-1 foi capaz de controlar o desenvolvimento do *Aspergillus parasiticus* diretamente nos grãos de amendoim e diminuir drasticamente a produção de aflatoxina (Figura 4). Como mecanismo de controle constatou-se que a ASBV-1 produz quitinase e um composto orgânico, ambos com atividade contra *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus* (Zucchi, 2007). Até o momento, os esforços têm sido na identificação do composto orgânico e, como resultados preliminares, sabe-se que essa molécula pertence à classe dos triterpenos, possuindo uma longa cadeia de ácidos graxos.



**Figura 4.** Cromatografia de Camada Delgada (CCD) para detecção da produção das aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> após tratamento das sementes de amendoim com a linhagem *Streptomyces* sp. ASBV-1. A. controle; B. patógeno inoculado 24 h antes do agente de controle; C. patógeno inoculado no mesmo dia que o agente de controle; D. patógeno inoculado 24 h após a inoculação da actinobactéria (modificado de Zucchi, 2007).

Apesar de existirem no mercado linhagens de bactérias filamentosas registradas para o controle de fitopatógenos (Tabela 3), nenhuma linhagem comercial está sendo usada para o controle de *Aspergillus* spp.

**Tabela 3.** Produtos comerciais de controle biológico contendo linhagens de actinobactéria.

Nome comercial	Espécie	Fitopatógeno-alvo	Formulação	Empresa
Actinovate®	<i>Streptomyces lydicus</i>	Patógenos de solo	Grânulos solúveis	Natural Industries
Mycostop®	<i>Streptomyces griseoviridis</i>	<i>Fusarium</i> spp., <i>Alternaria brassicola</i> , <i>Phomopsis</i> spp., <i>Botrytis</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp.	Pó	Kemira Agro

Fonte: modificado de Gardener & Fravel (2002).

**Uso de leveduras saprofíticas.** As leveduras saprofíticas são facilmente encontradas nas superfícies de frutos e folhas de plantas (Hua, 2004). As leveduras, tanto *in vitro* como em condições de armazenamento, podem agir como microrganismos antagônicos diminuindo consideravelmente o crescimento de fungos filamentosos (La Penna *et al.*, 2004). Além disso, algumas dessas leveduras competem exaurindo os nutrientes necessários para a germinação e crescimento de patógenos em pós-colheita, como *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea* (Katz *et al.*, 1995; Leibinger *et al.*, 1997; Janisiewicz & Korsten, 2002).

Hua *et al.* (1999) propuseram pela primeira vez o uso de leveduras saprofíticas para o controle de *Aspergillus flavus* e conseqüentemente da aflatoxina. Esses autores desenvolveram um sistema com o mutante *Aspergillus flavus* Papa827. Essa linhagem produz AFB<sub>1</sub> e traços de AFB<sub>2</sub>, mas acumula grande quantidade de ácido norsolorínico (NOR), pigmento laranja-avermelhado facilmente observado na placa de cultivo. Assim, tornou-se possível observar visualmente a interação das leveduras quanto à inibição do crescimento do *Aspergillus flavus* e/ou acúmulo de NOR. Posteriormente, a redução na produção de AF foi estimada por meio de cromatografia líquida (HPLC). De todas as linhagens utilizadas (Tabela 4), a linhagem de *Pichia anomala* WRL-076 foi a que melhor inibiu a síntese de AF. Essa linhagem proporcionou resultados promissores no controle de *Aspergillus flavus* em testes de campo em árvores de pistache (Hua, 2004).

**Tabela 4.** Espécies de leveduras utilizadas por Hua *et al.* (1999) para inibição da síntese de aflatoxina.

Espécie	Linhagem
<i>Candida guilliermondii</i>	WRL-015
<i>Candida kruzei</i>	WRL-038
<i>Candida oleophila</i>	WRL-084
<i>Cryptococcus laurentii</i>	WRL-024
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	WRL-053
<i>Pichia anomala</i>	WRL-076

O uso de leveduras no controle de *Aspergillus* spp. é interessante pois suas linhagens podem ser utilizadas diretamente sobre os grãos em condições de armazenamento (La Penna *et al.*, 2004; La Penna & Etcheverry, 2006). De fato, muitas espécies de levedura são utilizadas diretamente em rações, mas para outros fins. Por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* é usada como um aditivo para rações de ruminantes (Chaucheyras *et al.*, 1996). Recentemente essa espécie de levedura foi relatada como capaz de reduzir a produção de AFB<sub>1</sub> em ração para frango (Kusumaningtyas *et al.*, 2006). Até o momento, não há relato de linhagem comercial de levedura para o controle de fungos produtores de AF.

## Considerações Finais

Os agentes microbianos de controle biológico têm surgido como alternativa mais efetiva do que os diversos fungicidas agrícolas existentes no mercado para o controle de fitopatógenos em pré- e/ou pós-colheita. Por serem considerados mais seguros à saúde humana e ao ambiente, esses agentes atendem à crescente demanda da sociedade para a diminuição do uso de agrotóxicos. Entretanto, no caso de *Aspergillus* spp., poucas metodologias chegaram a sair dos laboratórios. Porém, pelos resultados promissores apresentados nos trabalhos em pré-colheita por meio de linhagens não-aflatoxigênicas e em pós-colheita com o uso de bactérias, actinobactérias e leveduras, é de se esperar grande avanço no controle biológico desses fungos.

Além disso, nos últimos anos tem ocorrido um aumento na procura de novos organismos antagônicos aos fungos produtores de AF, resultando na identificação de novas moléculas bioativas. Esses compostos podem agir bloqueando (completa ou parcialmente) a síntese de AF e/ou impedindo o desenvolvimento do fungo aflatoxigênico. Caso essas substâncias apresentem uma toxicidade relativamente baixa aos seres humanos e animais, poderão ser utilizadas em novas formulações.

A biotecnologia pode se tornar uma ferramenta poderosa no controle de *Aspergillus* spp. diretamente no campo. Aliás, o uso de plantas transgênicas – contendo os genes, principalmente provenientes de bactérias, responsáveis pela produção de quitinase e/ou endoglicanase – tem mostrado resultados promissores para o controle de vários fitopatógenos. Por meio da identificação de bactérias produtoras de enzimas líticas ativas contra fungos aflatoxigênicos, não é de se admirar que em breve essa tecnologia também seja empregada em culturas que possuam problemas com contaminação por AF.

## Referências

- Al-Bari, M.A.A.; Sayeed, M.A.; Khan, A.; Islam, M.B.; Khondokar, P.; Rahman, M.M.S. & Islam, M.A. In vitro antimicrobial activities and cytotoxicity of ethyl acetate extract from *Streptomyces maritimus*. *Biotechnology* 6: 81-85. 2007.

- Araújo, J.M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (Eds.) *Ecologia microbiana*. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPMA. 1998. pp. 351-367.
- Barnes, S.F.; Dola, T.P.; Bennett, J.W. & Bhatnagar, D. Synthesis of sterigmatocystin on a chemically defined medium by species of *Aspergillus* and *Chaetomium*. *Mycopathologia* 125: 173-178. 1994.
- Bhatnagar, D.; Cary, J.W.; Ehrlich, K.; Yu, J. & Cleveland, T.E. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia* 162: 155-166. 2006.
- Bintvihok, A.; Ponpornpisit, A.; Tangtrongpiros, J.; Panichkriangkrai, W.; Rattanapanee, R.; Doi, K. & Kumagai, S. Aflatoxin contamination in shrimp feed and effects of aflatoxin addition to feed on shrimp production. *Journal of Food Protection* 66: 882-885. 2003.
- Bottonne, E.J. & Peluso, R.W. Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against *Mucoraceae* and *Aspergillus* species: preliminary report. *Journal of Medical Microbiology* 52: 69-74. 2003.
- Brown, R.L.; Cotty, P.J. & Cleveland, T.E. Reduction in aflatoxin content of maize by atoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection* 54: 223-226. 1991.
- Caldas, E.D.; Silva, S.C. & Oliveira, J.N. Aflatoxins and ochratoxin A in food and the risks to human health. *Revista de Saúde Pública* 36: 319-323. 2002.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology). *Mycotoxins: Risk in Plant, Animal and Human Systems*. Task Force Report no 139. 2003.
- Chaucheyras, F.; Fonty, G.; Bertin, G.; Salmon, J.M. & Gouet, P. Effect of a strain *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell SC1), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism in vitro. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 927-933. 1996.
- Chernin, L.; Ismailov, Z.; Haran, S. & Chet, I. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1720-1726. 1995.
- Clardy, J.; Fischback, M.A. & Walsh, C.T. New antibiotic from bacterial natural products. *Nature Biotechnology* 24: 1541-1550. 2006.
- Cohen-Kupiec, R. & Chet, I. The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology* 9: 207-277. 1998.
- Cotty, P.J. & Bhatnagar, D. Variability among atoxigenic *Aspergillus flavus* strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxina biosynthetic pathway enzymes. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2248-2251. 1994.
- Cotty, P.J.; Bayman, D.S.; Egel, D.S. & Elias, K.S. Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. In: Powell, K. (Ed.) *The genus Aspergillus*. New York. Plenum Press. 1994. pp. 1-27.
- Creppy, E.E. Update of survey, regulation and toxic of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 127: 19-29. 2002.
- De Schrijver, A. & De Mot, R. Degradation of pesticides by actinomycetes. *Critical Reviews in Microbiology* 25: 85-119. 1999.
- Diekman, M.A. & Green, M.L. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *Journal of Animal Science* 70: 1615-1627. 1992.
- Dorn, B.; Musa, T.; Krebs, H.; Fried, P.M. & Forrer, H.R. Control of late blight in organic potato production: evaluation of copper-free preparations under field, growth chamber and laboratory conditions. *European Journal of Plant Pathology* 119: 217-240. 2007.
- Dorner, J.W. Biological control of aflatoxin contamination of crops. In: Abbas, H.K. (Ed.) *Aflatoxin and food safety*. Boca Raton. CRC Press. 2005. pp. 333-352.
- Dorner, J.W. & Cole, R.J. Effect of application of nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on subsequent aflatoxin contamination of peanuts in storage. *Journal of Stored Products Research* 38: 329-339. 2002.
- Dorner, J.W.; Cole, R.J.; Connick, W.J.; Daigle, D.J.; McGuire, M.R. & Shasha, B.S. Evaluation of biological control formulations to reduce aflatoxin contamination in peanuts. *Biological Control* 26: 318-324. 2003.
- Dvorackova, I. *Aflatoxins and Human Health*. Boca Raton. CRC Press. 1990.
- Eaton, D.L. & Gallagher, E.P. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology* 34: 135-172. 1994.
- Filténborg, O.; Frisvad, J.C. & Thrane, U. Moulds in food spoilage. *Food Microbiology* 33: 85-102. 1996.
- Flannigan, B. Mycotoxins. In: D'Mello, J.P.F.; Duffus, C.M. & Duffus, J.H. (Eds.) *Toxic substances in crop plants*. Cambridge. The Royal Society of Chemistry. 1991. pp. 226-257.

- Gardener, B.B.M. & Fravel, D.R. Biological control of plant pathogens: research, commercialization and application in USA. APSnet. 2002.
- Goldin, B. R. & Gorbach, S. L. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *American Journal of Clinical Nutrition* 39: 756-761. 1984.
- Gomes, R.C.; Sêmedo, L.T.A.S.; Soares, R.M.A.; Linhares, L.F.; Ulhoa, C.J.; Alviano, C.S. & Coelho, R.R.R. Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology* 90: 653-661. 2001.
- Graham, L.S. & Sticklen, M. B. Plant chitinases. *Canadian Journal of Botany* 72: 1057-1083. 1994.
- Guimarães, L.H.S.; Peixoto-Nogueira, S.C.; Michelin, M.; Rizzatti, A.C.S.; Sandrim, V.C.; Zanoelo, F.F.; Aquino, A.C.M.M.; Junior, A.B. & Polizeli, M.L.T.M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 474-480. 2006.
- Haas, D. & Défago, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews in Microbiology* 3: 307-319. 2005
- Haran, S.; Schiekler, H. & Chen, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 142: 2321-2331. 1996.
- Haskard, C.A.; El-Nezami, H.S.; Kankaanpää, P.E.; Salminen, S. & Ahokas, J.T. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3086-3091. 2001.
- Heydari, A. & Misaghi, I.J. Biocontrol activity of *Burkholderia cepacia* against *Rhizoctonia solani* in herbicide-treated soils. *Plant and Soil* 202: 109-116. 1998.
- Hopwood, K.A. & Sherman, D.H. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annual Review of Genetics* 24: 37-66. 1990.
- Hua, S.-S.T.; Baker, J.L. & Flores-Espiritu, M. Interactions of saprophytic yeasts with a nor mutant of *Aspergillus nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2738-2740. 1999.
- Hua, S.-S.T. Field assessment of an effective yeast strain to control aflatoxina-producing fungus, *Aspergillus flavus*. *Proceedings, IV. California Conference on Biological Control, Berkeley*. 2004. pp. 154-157.
- Hussein, H.S. & Brasel, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167: 101-134. 2001.
- Janisiewicz, W. & Korsten, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review in Phytopathology* 40: 411-441. 2002.
- Katz, H.; Berkovitz, J.; Chalutz, E.; Droby, S.; Hofstein, R. & Keren-Tzoor, M. Compatibility of Ecogen's biofungicide ASPIR™, a yeast based preparation, with other fungicides commonly used for the control of post-harvest decay of citrus. *Phytopathology* 85: 1123. 1995.
- Keller, N.P.; Kantz, N.J. & Adams, T.H. *Aspergillus nidulans* verA is required for production of the mycotoxin sterigmatocystin. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1444-1450. 1994.
- Kimura, N. & Hirano, S. Inhibition strain of *Bacillus subtilis* for grown and aflatoxin-production of aflatoxicogenic fungi. *Agricultural and Biological Chemistry* 52: 1173-1179. 1988.
- Klich, M.A. & Pitt, J.I. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Transactions of the British Mycological Society* 91: 99-108. 1988.
- Klich, M.A.; Tiffany, L.H. & Knaphus, G. Ecology of the aspergilli of soils and litter. In: Klich, M.A. & Bennett, J.W. (Eds.) *Aspergillus biology and industrial applications*. Boston. Butterworth-Heinemann. 1994. pp. 329-353.
- Kusumaningtyas, E.; Widiastuti, R. & Maryam, R. Redution of aflatoxina B1 in chicken feed by using *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oligosporus* and their combination. *Mycopathology* 162: 307-311. 2006.
- La Penna, M. & Etcheverry, M. Impact on growth and aflatoxin B1 accumulation by *Kluyveromyces* isolates at different water activity conditions. *Mycopathology* 162: 347-353. 2006.
- La Penna, M.; Nesci, A. & Etcheverry, M. In vitro studies on the potential for biological control on *Aspergillus* section Flavi by *Kluyveromyces* spp. *Letters in Applied Microbiology* 38: 257-264. 2004.
- Leibinger, W.; Breuker, B.; Hahn, M. & Mendgen, K. Control of postharvest pathogens and colonization of apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* 87: 1103-1110. 1997.

- López, C.E.; Ramos, L.L.; Ramadán, S.S. & Bulacio, L.C. Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina. *Food Control* 14: 31-34. 2003.
- McLean, M. & Dutton, M.F. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacology and Therapeutics* 65: 163-192. 1995.
- Melchers, L.S. & Stuiver, M.H. Novel genes for disease-resistance breeding. *Current Opinion in Plant Biology*. 3: 147-152. 2000.
- Munimbazi, C. & Bullerman, L.B. Inhibition of aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by *Bacillus pumilus*. *Mycopathologia* 140: 163-169. 1998.
- Nakashima, N.; Mitani, Y. & Tamura, T. Actinomycetes as host cells for production of recombinant proteins. *Microbial Cell Factories* 4: 7. 2005.
- Nesci, A.V.; Bluma, R.V. & Etcheverry, M.G. In vitro selection of maize rhizobacteria to study potential biological control of *Aspergillus* section Flavi and aflatoxin production. *European Journal of Plant Pathology* 113: 159-171. 2005.
- Oatley, J.T.; Rarick, M.D.; Linz, J.E. & Ji, G.E. Binding of aflatoxin B1 to bifidobacteria in vitro. *Journal of Food Protection* 63: 1133-1136. 2000.
- O'Brian, G.R.; Fakhoury, A.M. & Payne, G.A. Identification of genes differentially expressed during aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genetics & Biology* 39: 118-127. 2003.
- Ômura, S. & Crump, A. The life and times of ivermectin a success story. *Nature Reviews in Microbiology* 2: 984-989. 2004.
- Onilude, A.A.; Fagade, O.E.; Bello, M.M. & Fadahunsi, I.F. Inhibition of aflatoxina-producing aspergilli by lactic acid bacteria isolates from indigenously fermented cereal gruels. *African Journal of Biotechnology* 4: 1404-1408. 2005.
- Palmgreen, M.S. & Hayes, A.W. Aflatoxins in foods. In: Krogh, P. (Ed.). *Mycotoxins in food*. London. Academic Press. 1987. pp. 65-96.
- Papp, E.; H-Otta, K.; Zaray, G. & Mincsovcics, E. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. *Microchemical Journal* 73: 39-46. 2002.
- Paulitz, T.C. & Bélanger, R.R. Biological control in greenhouse systems. *Annual Reviews of Phytopathology* 39: 103-133. 2001
- Raaijmakers, J.M.; Vlami, M. & Souza, J.T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek, Journal of Microbiology* 81: 37-547. 2002.
- Rustom, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry* 59: 57-67. 1997.
- Sakuda, S.; Ono, M.; Furihata, K.; Nakayama, J.; Suzuki, A. & Isogai, A. Aflastatin A, a novel inhibitor of aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*, from *Streptomyces*. *Journal of the American Chemical Society* 118: 7855-7856. 1996.
- Sakuda, S.; Ono, M.; Ikeda, H.; Sakurada, M.; Nakayama, J.; Suzuki, A. & Isogai, A. Aflastatins: new *Streptomyces* metabolites that inhibit aflatoxin biosynthesis. In: Cutler, H.G. & Cutler, S.J. (Eds.) *Biologically active natural products: agrochemicals*. Boca Raton. CRC Press. 1999. pp. 185-199.
- Sakuda, S.; Ono, M.; Ikeda, H.; Nakamura, T.; Inagaki, Y.; Kawachi, R.; Nakayama, J.; Suzuki, A.; Isogai, A. & Nagasawa, H. Blastidicin A as an inhibitor of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* 53: 1265-1271. 2000a.
- Sakuda, S.; Ikeda, H.; Nakamura, T.; Kawachi, R.; Kondo, T.; Ono, M.; Sakurada, M.; Inagaki, H.; Ito, R. & Nagasawa, H. Blastidicin A derivatives with highly specific inhibitory activity toward aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* 53: 1378-1384. 2000b.
- Schisler, D.A.; Slininger, P.J.; Behle, R.W. & Jackson, M.A. Formulation of *Bacillus* spp. For biological control of plant diseases. *Phytopathology* 94: 1267-1271. 2004.
- Scott, P.M.; Lombaert, G.A.; Pellaers, P.; Bacler, S. & Lappi, J. Ergot alkaloids in grain foods sold in Canada. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International* 75: 773-779. 1992.
- Shenasi, M.; Aidoo, K.E. & Candlish, A.A.G. Microflora of date fruits and production of aflatoxins at various stage of maturation. *International Journal of Food Microbiology* 79: 113-119. 2002.
- Sweeney, M.J. & Dobson, A.D.W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters* 175: 49-163. 1999.

- Trail, F.; Mahanti, N. & Linz, J. Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Microbiology* 141: 755-765. 1995.
- van Wezel, G.P.; Krabben, P.; Traag, B.A.; Keijser, B.J.F.; Kerste, R.; Vijgenboom, E.; Heijnen, J.J. & Kraal, B. Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5283-5288. 2006.
- von Bubnoff, A. Seeking new antibiotics in nature's backyard. *Cell* 127: 867-869. 2006.
- Wang, S.L. & Chang, W.T. Purification and characterization of bifunctional chitinases lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell power medium. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 380-386. 1997.
- Wang, J.-S. & Groopman, J.D. DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research* 424: 167-181. 1999.
- Watanabe, K. Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Microbiology* 12: 237-241. 2001.
- Whipps, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-511. 2001.
- Yadav, V.; Gupta, J.; Mandhan, R.; Chhillar, A.K.; Dabur, R.; Singh, D.D. & Sharma, G.L. Investigation of anti-*Aspergillus* properties of bacterial products. *Letters in Applied Microbiology* 41: 309-314. 2005.
- Yan, P.-S.; Song, Y.; Sakuno, E.; Nakajima, H.; Nakagawa, H. & Yabe, K. Cyclo (L-Leucyl-L-Prolyl) produced by *Achromobacter xylosoxidans* inhibits aflatoxina production by *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 7466-7473. 2004.
- Yoshinari, T.; Akiyama, T.; Nakamura, K.; Kondo, T.; Takahashi, Y.; Muraoka, Y.; Nonomura, Y.; Nagasawa, H. & Sakuda, S. Diocatin A is a strong inhibitor of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Microbiology* 153: 2774-2780. 2007.
- Zinedine, A.; Faid, M. & Benlemlih, M. In vitro reduction of aflatoxina B1 by strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan Sourdough Bread. *International Journal of Agricultural Biology* 7: 67-70. 2005.
- Zucchi, T.D. Potencial de linhagens de *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus lentimorbus* e *Streptomyces* sp. no controle de fungos aflatoxigênicos em amendoim (*Arachis hypogaea*) e aspectos de biossegurança. Tese de Doutorado. São Paulo SP. Universidade de São Paulo. 2007.
- Zucchi, T.D.; Moraes, L.A.B. & Melo, I.S. *Streptomyces* sp. ASBV-1 reduces aflatoxin accumulation by *Aspergillus parasiticus* in peanut grains. *Journal of Applied Microbiology* 105: 2153-2160. 2008.