

Processos de eliminação de contaminantes microbianos durante o isolamento e a manutenção de linhagens fúngicas de referência

Edson Luiz Zangrando Figueira¹, Eduardo Vicente¹, Yuko Yoshimoto¹, Elisabeth Yurie Satake Ono² e Elisa Yoko Hirooka^{1*}

¹ Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, C.P. 6001, 86051-990, Londrina-Paraná, Brazil. ² Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Londrina, C.P. 6001, 86051-990, Londrina-Paraná, Brazil *Autor para correspondência. e-mail: hirooka@uel.br

RESUMO. Linhagens fúngicas destinadas a pesquisa científica são provenientes de material orgânico, onde ocorre intensa interação entre os mais variados grupos taxonômicos de microrganismos. O desenvolvimento de uma metodologia capaz de remover totalmente esses contaminantes indesejáveis é fundamental para garantir a característica original da linhagem em estudo. Empregando-se isolados de *Fusarium* spp., obtidos de milho e rações animais, analisou-se a interferência de bactérias resistentes a antibióticos e leveduras na manutenção de linhagens fúngicas. O ensaio demonstrou contaminação freqüente de microrganismos resistentes a tetraciclina, estreptomicina e cloranfenicol na microbiota natural de milho e de rações animais. O melhor controle dos interferentes foi obtido com tetraciclina, segundo avaliação por *replica-plate* e crescimento em meio líquido. Na análise de 168 linhagens de *Fusarium* spp. mantidos por seis meses a 4°C, 36 cepas apresentaram contaminantes. A técnica de esgotamento em BDA mais antibiótico repurificou 21 cepas. As 15 cepas restantes só foram repurificadas pela técnica de diluição/plaqueamento, desenvolvida neste trabalho e recomendada para ser utilizada como último recurso na recuperação de linhagens de referências contaminadas.

Palavras-chave: *Fusarium moniliforme*, isolamento, manutenção de linhagens fúngicas

ABSTRACT. Proceedings to avoid contaminants during isolation and storage of standard fungal strains. The fungal strains for scientific purposes are isolated from environments, where interaction of extensive taxonomical groups is a common phenomenon, requiring development of a method that assures elimination of microbial interference and preserves original characteristic of strains. In this study, using *Fusarium* strains isolated from corn and animal food, the interference of antibiotic resistant bacteria and yeast contamination in the fungal strains storage was evaluated. Although frequent contamination by tetracycline, streptomycine and chloramphenicol resistant microorganisms was detected in both corn and animal food, tetracycline showed the best antibacterial effect. Following 6 months storage at 4°C, 36 cultures of 168 single spored *Fusarium* strains developed atypical colonies, indicating some contamination. By plating these cultures in BDA medium added with antibiotic, 21 strains were purified, but the technique was unable to reisolate the remaining ones. The purity of these 15 strains was recuperated using dilution/plate technique proposed here, which used combination of dilution process followed by plating in BDA medium surface. The procedure is recommended as the final step for fungal strains recuperation, which allows elimination of fast growing undesirable organisms.

Key words: *Fusarium moniliforme*, isolation, fungal strain storage.

Pesquisas sobre fisiologia e metabolismo fúngico requerem pureza absoluta na cultura matriz, visando a garantir manutenção das características iniciais da linhagem no decorrer de ensaio, principalmente nos estudos com metabólitos fúngicos que abrangem

desde a produção de compostos antimicrobianos, enzimas, ácidos orgânicos, até micotoxinas (Carvalho *et al.*, 1995; Menezes *et al.*, 1995; Lachmund *et al.*, 1993; Ohno *et al.*, 1992). A linhagem sob enfoque advém de matérias envolvidas

no processo em questão, seja vegetal, animal ou solo, cujo caráter nutricional favorece e propicia a sua prevalência (Scott, 1996; Shepard *et al.*, 1996; González *et al.*, 1995; Scott e Lawrence, 1995; Visconti e Doko, 1994). Nestas matérias, ocorre também microbiota composta por imensa variabilidade taxonômica, cuja competitividade pela sobrevivência dificulta a eliminação de contaminantes durante o isolamento, em vista de maior exigência nutricional ou tempo de geração requeridos pela linhagem-alvo, em relação a saprófitas (Taniwaki, 1996).

O fenômeno é exemplificado numa simples rotina laboratorial de controle de qualidade para contagem fúngica em alimentos e rações, onde o desenvolvimento rápido de fungos saprófitos mascaram patógenos como *Fusarium* spp. ou *Aspergillus link flavus* (Taniwaki, 1996). A confiabilidade da pesquisa sobre controle e patogenicidade de fungos micotoxigênicos depende fundamentalmente da pureza da linhagem. Além da contaminação durante a manipulação laboratorial, as cepas isoladas de matérias-primas eventualmente contêm número insignificante de gêneros não-filamentosos, oriundos da microbiota original, que se manifestam no decorrer da manutenção da linhagem, devido a alteração na condição de cultivo, constituindo-se em fator negativo na continuidade do trabalho.

Elegendo-se *Fusarium moniliforme* como modelo, propôs-se uma metodologia capaz de eliminar contaminantes indesejáveis na manutenção de fungos micotoxigênicos, constituídas por microrganismos isolados de milho e de rações envolvidas em toxicose animal.

Material e métodos

Isolados fúngicos e bacterianos. Os isolados de *F. moniliforme* foram obtidos de rações envolvidas em intoxicação animal ou da microbiota natural de milho, analisados no Depto. De Tecnologia de Alimentos e Medicamentos/CCA/UEL. Como referência, empregou-se *F. moniliforme* 113F, produtor de 54,21 e 87,31 µg/g de fumonisina B₁ e B₂ (FB₁ e FB₂), respectivamente.

As bactérias interferentes utilizadas no ensaio originaram-se dos mais variados tipos de alimento animal envolvido em toxicose, constituído de milho e ração granulada.

Seleção de linhagens fúngicas e bacterianas. As linhagens de bactérias ou de *F. moniliforme* foram isoladas de milho ou ração animal empregando-se ágar-batata-dextrose (BDA) ou ágar-coco (CAM)

(Lin e Dianese, 1976). No BDA, adicionou-se 50 µg/mL de cloranfenicol e no CAM 0,3% de Triton X-100 e 50 µg/mL de estreptomicina.

Uma alíquota de 10g de amostra triturada foi homogeneizada com 90mL de água peptonada 0,1% e procedeu-se a diluições seriadas no fator 10. Alíquotas de 1,0mL de cada diluição foram transferidas na superfície do CAM, ou plaqueadas em profundidade em BDA e incubadas a 25°C, por sete dias. As colônias com características de *Fusarium* spp. foram repicadas em tubo contendo BDA, incubadas a 25°C, por sete dias e submetidas a cultura monospórica (Nelson, 1983). As linhagens bacterianas desenvolvidas no CAM foram recuperadas em 2,0mL de caldo *brain-heart-infusion* (BHI) e armazenadas para teste de sensibilidade a antibióticos.

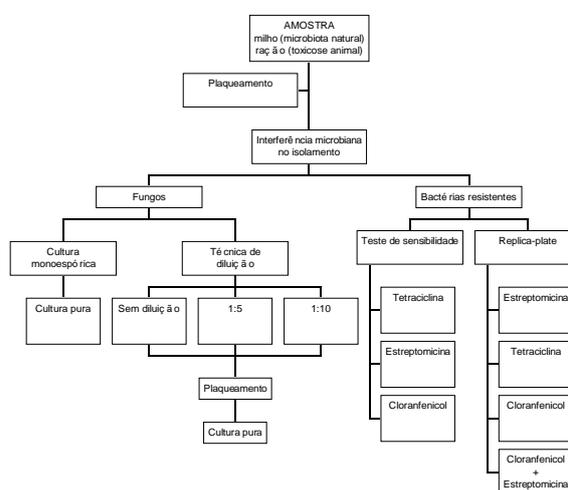


Figura 1. Delineamento experimental

Delineamento experimental. A Figura 1 apresenta o esquema seguido para a execução do experimento. Durante o ensaio, as colônias com características de *Fusarium* spp. foram submetidas à cultura monospórica e armazenadas a 4°C. Nas linhagens com dificuldade na purificação, reforçou-se o procedimento, plaqueando pela técnica de esgotamento ou por técnica de diluição (metodologia proposta).

A presença de bactérias resistentes a antibióticos em alimentos animais foi avaliada por *replica-plate*, e estudos referentes às linhagens bacterianas isoladas a partir do CAM foram submetidas a teste de sensibilidade em meio líquido. Foram testados antibióticos de amplo espectro de ação representados por tetraciclina, estreptomicina e cloranfenicol.

Metodologia proposta de diluição/plaqueamento. As culturas que foram submetidas ao tratamento

descrito no item seleção de linhagens fúngicas e bacterianas e que apresentaram contaminantes foram repurificadas, procedendo-se ao plaqueamento por esgotamento em BDA, seguido pela técnica de diluição/plaqueamento.

Uma alçada do cultivo de *F. moniliforme* contaminado foi transferida para um tubo contendo 5,0mL de solução estéril de Tween 80 a 0,1% homogeneizada e alíquotas de 0,1, 0,2 e 1,0mL foram plaqueadas pela técnica de semeadura em profundidade. A mesma suspensão fúngica foi utilizada para proceder a duas diluições subseqüentes (1:5 e 1:10) e plaquearam-se novamente 0,1, 0,2 e 1,0mL de cada diluição, repetindo-se sucessivamente o processo até obtenção de cultura pura.

Avaliação de sensibilidade a antibióticos. As linhagens bacterianas resistentes foram detectadas submetendo-se a teste de sensibilidade contra cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina, utilizando-se a técnica de *réplica-plate* e meio líquido com antibiótico.

Replica-plate. No ensaio, plaqueou-se 0,1mL da diluição 1:10 (procedimento descrito no item seleção de linhagens fúngicas e bacterianas) de milho triturado, ração granulada e milho na superfície de placas contendo BHI e incubadas a 25°C por 24 horas. A seguir, as colônias foram transferidas (com replicador de superfície aveludada estéril), para placas de BHI contendo 50µg/mL de cloranfenicol, 50µg/mL de tetraciclina, 50µg/mL de estreptomicina ou associação contendo 50µg/mL de cloranfenicol e de estreptomicina. Após incubação a 25°C por 24 horas, analisou-se a resistência antimicrobiana.

Sensibilidade em meio líquido. As bactérias foram repicadas em tubos 16x180mm contendo caldo BHI e 0, 25, 50 e 150µg/mL de tetraciclina, cloranfenicol ou estreptomicina. Após incubação a 25°C por 48 horas, analisou-se a turbidez, por absorbância em 600nm.

Resultados e discussão

Os cereais apresentaram uma microbiota diversificada, composta por microrganismos de solo, ambiente, armazenagem e contaminantes de processamento, sendo fonte para obtenção de linhagens para o estudo em nível de toxicologia, biotecnologia ou biocontrole. Nestes produtos, a baixa atividade de água favorece os fungos, por

injuriar e impedir o crescimento bacteriano. O gênero *Bacillus*, que predomina principalmente no ambiente xerofílico se manifesta, porém, quando introduzido em meios que satisfaçam condições de desenvolvimento (Franco e Landgraf, 1996). As bactérias eventualmente interferem na contagem total ou no isolamento de fungos, assim como podem ser carregadas junto aos micélios ou conídios, dificultando a purificação e a identificação.

Dessa forma, esses contaminantes inaparentes podem gradativamente recuperar a vitalidade e causar problemas no decorrer da manutenção de linhagens fúngicas destinadas ao estudo fisiológico e bioquímico. A Tabela 1 mostra o aspecto microbiológico de amostras de milho e alimentação animal, onde a contagem de bolores e leveduras variou de $2,0 \times 10^3$ a $4,9 \times 10^6$ UFC/g. Das 12 amostras analisadas, em 9 ocorreu interferência de bactérias e leveduras, que eventualmente mascararam a contagem de fungos filamentosos. Beuchat (1979) recomendou o uso de antibióticos e acidificação de meio para impedir o crescimento bacteriano. Não obstante, Taniwaki (1996) concorda parcialmente com esta recomendação, já que a adição de antibióticos na proximidade de pH neutro recuperou os conídios injuriados, não ocorrendo o mesmo com acidificação, pois fungos estressados não toleram acidez.

O desenvolvimento predominante e rápido da família Mucoraceae afetou a contagem e isolamento de fungos micotoxigênicos em três amostras (Tabela 1). Para minimizar a interferência destes fungos durante a contagem de bolores e leveduras na análise de alimentos, Hocking e Pitt (1980) sugeriram o uso de glicerol. Os resultados da Tabela 2 indicaram que a adição de Triton X-100 atingiu o objetivo, permitindo a visualização de fungos micotoxigênicos e interferentes bacterianos resistentes a antibióticos em 5 alimentos envolvidos em toxicose animal. Estes alimentos foram submetidos a estudo de resistência bacteriana diante de antibióticos por técnica de *replica-plate* e as linhagens bacterianas isoladas foram utilizadas na investigação sobre a sensibilidade aos antibióticos em meio líquido. Assim, elegeu-se 9 linhagens bacterianas resistentes à associação antimicrobiana (Tabela 2), sendo 7 linhagens de bacilos Gram positivos (isolados nº 1, 2, 3, 5, 6, 8 e 9), um bacilo Gram positivo esporulado (isolado nº 4) e um coco Gram positivo (isolado nº 7).

Tabela 1. Aspecto microbiológico das amostras de alimentação natural na contagem total de bolores

Origem	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>	Mucoraceae	Bactéria/ levedura	Contagem total de bolores (UFC/g)
Espigas de milho trituradas	+	+	+	+	+	4,9 X 10 ⁶
Ração granulada	+	+	+	+	+	1,2 x 10 ⁴
Resíduo de soja	+	+	-	-	-	3,2x 10 ⁶
Palha de aveia	-	-	+	-	-	1,0 x 10
Milho	-	+	+	-	+	3,0 x 10 ⁵
Milho	+	+	+	-	+	1,0 x 10 ⁴
Ração	-	-	+	-	+	2,0 x 10 ³
Ração	+	+	+	+	+	1,0 x 10 ⁵
Ração de milho	-	+	+	-	+	2,1 x 10 ⁶
Triguilho	+	+	+	-	+	3,0 x 10 ⁵
Triguilho, milho e mistura mineral	+	+	-	-	-	3,5 x 10 ⁵
Feno "cros cros"	-	+	+	-	+	1,5 x 10 ⁶

+ crescimento; - sem crescimento

Tabela 2. Fungos micotóxicos e interferentes bacterianos resistentes, isolados no meio CAM adicionado de Triton X-100 e antibióticos

Origem	Fungo	Bactérias Interferentes	
		Isolado n°	Morfologia/Coloração
Milho	<i>Fusarium</i>	9	bacilo Gram (+)
	<i>Penicillium</i>		
Ração granulada A	<i>Aspergillus</i>	6	bacilo Gram (+)
	<i>Fusarium</i>	7	coco Gram (+)
	<i>Penicillium</i>		
Ração granulada B	-	3	bacilo Gram (+)
		4	bac. esporul. Gram (+)
Ração granulada C	<i>Fusarium</i>	8	bacilo Gram (+)
Milho triturado	<i>Aspergillus</i>	1	bacilo Gram (+)
	<i>Fusarium</i>	2	bacilo Gram (+)
	<i>Penicillium</i>	5	bacilo Gram (+)

Tabela 3. Estudo comparativo da sensibilidade a antibióticos de microrganismos interferentes na contagem de bolores

Antibiótico (µg/mL)	Isolados microbianos																								
	1		2		3		4		5		6		7		8		9								
	T	S	C	T	S	C	T	S	C	T	S	C	T	S	C	T	S	C							
0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4							
25	4	4	4	-	2	3	4	4	4	-	4	4	4	4	4	4	-	3	-	3	2	-	4	-	
50	4	4	4	-	2	2	4	4	4	-	4	4	4	4	4	4	-	1	-	-	-	1	-	-	-
100	1	4	4	-	2	2	-	4	4	-	3	4	-	4	4	1	4	4	-	-	-	-	-	-	-
150	-	4	3	-	2	2	-	4	4	-	-	4	3	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

T: tetraciclina; S: estreptomicina; C: cloranfenicol; -: inibição total; 1 a 4: intensidade de turbidez, devido ao crescimento celular

Submetendo-se estas linhagens perante teste de sensibilidade em meio líquido (Tabela 3), a tetraciclina mostrou-se mais eficiente, atingindo inibição total em concentrações de 25µg/mL para os isolados n° 2, 4, 7, 8 e 9. Em concentrações de 100µg/mL, inibiu o crescimento de isolados n° 3 e 5 e inibiu parcialmente os isolados n° 1 e 6, sendo que aumentando para 150µg/mL não se observou turbidez (Tabela 3). O cloranfenicol inibiu o crescimento de isolados n° 7 e 9 em concentrações de 25µg/mL, sendo que o aumento gradativo inibiu os isolados n° 1, 2, 5, 6 e 8, porém não afetou o crescimento de isolados n° 3 e 4. A estreptomicina apresentou-se inferior, não se recomendando a sua adição no meio para isolamento fúngico. A técnica de *replica-plate* também confirmou a superioridade da

tetraciclina sobre o cloranfenicol e estreptomicina, sendo verificada área de resistência em apenas três amostras quando testou-se tetraciclina, contra quatro quando testou-se cloranfenicol; já com estreptomicina observou-se área de resistência em todas as amostras (Tabela 4). A maior eficiência da tetraciclina sobre o cloranfenicol, evidenciado pelos resultados da Tabela 3, está de acordo com Koburger e Rodgers (1978), que também verificaram a superioridade de clorotetraciclina sobre o cloranfenicol e gentamicina. Segundo Taniwaki (1996), cloranfenicol e clorotetraciclina, em conjunto ou isoladamente, proporcionaram melhores resultados. Em termos de praticidade na rotina laboratorial, esses resultados ora apresentados apontaram a vantagem para o uso de cloranfenicol, já que devido à termoestabilidade, pode ser adicionado ao meio antes da esterilização (Korolkovas, 1988).

Uma desvantagem do uso de antibióticos no isolamento ou contagem de bolores e leveduras deve-se ao caráter deletério a eucariotos (Janes e Tilbuny 1981; Cory 1982). Além de injuriar o fungo desejado, o pequeno número de bactérias resistentes ou leveduras remanescentes podem ser carregados nos micélios ou esporos fúngicos, manifestando-se no decorrer da manutenção de cultura. Por outro lado, embora triton-X-100 usado no trabalho inibisse eficientemente o crescimento desenfreado de *Mucoraceae*, seu efeito detergente pode afetar a membrana citoplasmática, desencadeando fusão celular e alteração gênica da linhagem original, fato este desaconselhável no isolamento de microrganismos.

Em consideração a estes fatores indesejáveis resultantes da adição de compostos seletivos no meio de cultura, o ideal seria desenvolver uma técnica capaz de recuperar e garantir a pureza do isolado, empregando um meio simples. A metodologia recomendada para obter linhagem fúngica pura consiste no cultivo monospórico, que empregando

somente ágar elimina ao máximo o risco de pluricelularidade advinda de cultivo micelial, isto é, a técnica resgata um conídio em fase inicial de germinação, já que a possibilidade do conídio conter apenas um núcleo é relativamente maior.

Tabela 4. Avaliação da presença natural de microrganismos resistentes a antibióticos em alimentos animais pela técnica de *replica plate*

Antibiótico (50µg/mL)	Alimentação animal ¹				Milho
	Milho triturado	Ração granulada A	Ração granulada B	Ração granulada C	
Sem antibiótico	+(C)	+(C)	+(C)	+(C)	+(C)
Estreptomina	+(C)	+(i/P)	+(i/P)	+(P)	+(C)
Tetraciclina	+(C)	+(P)	+(i)	-	+(C)
Cloranfenicol	+(P)	+(i/P)	+(i/P)	-	+(C)
Cloranf. + estrept.	+(P)	(i)	+(i)	-	+(C)

¹: plaqueamento de 0,1mL da diluição 10⁻⁴; +: crescimento bacteriano; C: placas com crescimento confluinte; P: placas com crescimento sob forma de alguns pontos confluentes; i: placas com crescimento de colônias isoladas; -: ausência de crescimento bacteriano

Na etapa seguinte, analisou-se variação de características culturais na manutenção de linhagens fúngicas aparentemente isentas de contaminação, purificadas pela cultura monospórica e armazenadas a 4°C no decorrer de seis meses. A Tabela 5 mostra a análise de 168 cepas de *Fusarium* spp. obtidas de 113 amostras de milho adquiridas no Estado do Paraná. Em 36 cepas submetidas a cultura monospórica e consideradas puras, houve desenvolvimento de contaminantes no decorrer da manutenção, constituídos principalmente de leveduras, seguida de bactérias. A técnica de isolamento por esgotamento em BDA repurificou 21 cepas, sendo que em 9 culturas atingiu o objetivo no segundo plaqueamento por esgotamento, enquanto que 12 culturas necessitaram uma série seqüencial de 3 plaqueamentos (Tabela 5).

Tabela 5. Purificação de linhagens de *Fusarium* spp. pela técnica de esgotamento em placas e diluição/plaqueamento

<i>Fusarium</i> spp. (cultura monospórica)	Contaminadas	Purificação			
		Téc. esgotamento Repetição	N. (cepas)	Diluição/Plaqueamento*	N. (cepas)
168	36	1x	0	1x	3
		2x	9	2x	5
		3x	12	3x	7
Total		21		15	

* Realizado com 15 linhagens de *Fusarium* spp. que não foram purificadas pela técnica de esgotamento

Entretanto, o mesmo não ocorreu com as 15 culturas, cuja dificuldade impediu o reisolamento inclusive pela técnica de cultivo monospórico. Submetendo-se à técnica de diluição seguida de plaqueamento, estas foram purificadas após, no máximo, 3 repetições do procedimento, mostrando-se como alternativa complementar eficaz na

purificação de linhagens de *Fusarium* spp. Conseqüentemente, em 3 cepas, o objetivo foi atingido procedendo-se a apenas uma única técnica de diluição, 5 culturas necessitaram duas repetições e 7 requereram 3 repetições (Tabela 5).

Portanto, para isolar fungo alvo de matéria-prima com microbiota abundante e diversificada, recomenda-se iniciar com meio contendo antimicrobiano de amplo espectro de ação, seguido de cultivo monospórico. Se contaminantes interferirem no decorrer de manutenção de linhagens, a pureza deverá ser recuperada pela técnica de esgotamento e diluição, a fim de garantir as características originais da cultura, assegurando a confiabilidade dos ensaios bioquímicos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro, a Capes pela bolsa de Mestrado concedida ao primeiro autor e às estagiárias de iniciação científica Elisabete Hiromi Hassegawa e Fábria Yumi Funo.

Referências bibliográficas

- Beuchat, L.R. Comparison of acidified and antibiotic-supplemented potato dextrose agar from three manufacturers for its capacity to recover fungi from foods. *J. Food Prot.*, 42:427-428, 1979.
- Carvalho, P.O.; Silva, M.T.C.; Park, Y.K.; Pastore, G.M. Produção de ácidos gama-linolênicos por novas linhagens de microrganismos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 2(15):181-184, 1995.
- Cory, J.E.L. Assessment of the selectivity and productivity of media used in analytical mycology. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 33:160-164, 1982.
- González, H.H.L.; Resnik, S.L.; Boca, R.T.; Marasas, W.F.O. Mycoflora of Argentinian corn harvested in the main production area in 1990. *Mycopathologia*, 130:29-36, 1995.
- Franco, B.D.M.; Landgraf, M. *Microbiologia de alimentos*, São Paulo: Atheneu, 1996.
- Hocking, A.D.; Pitt, J.I. Dichloran-glycerol medium form enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39:488-492, 1980.
- Janes, L.; Tilbury, R.H. A comparison of media and methods for the enumeration of yeasts and moulds in refined sugar products. *J. Appl. Bacteriol.*, 51, 1981.
- Koburge, J.A.; Rodgers, M.F. Single or multiple antibiotic - amended media to enumerate yeast and molds. *J. Food Prot.*, 41:367-369, 1978.
- Korolkovas, A.; Burckhalter, J.H. *Química farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.
- Lachmund, A.; Urmann, U.; Minol, K.; Wirsal, S.; Ruttkovski, E. Regulation of α -amylase formation in

- Aspergillus oryzae* and *Aspergillus nidulans* transformants. *Curr. Microbiol.*, 26:47-51, 1993.
- Lin, M.T.; Dianese, J.C. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology*, 66:1466-1469, 1976.
- Menezes, T.J.B.; Salva, T.J.G.; Baranauskas, M.; Su, J.; Fluminhan, A. Isolamento e seleção de microrganismos que degradam o colesterol. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 2(15):181-184, 1995.
- Nelson, P.E.; Toussoun, T.A.; Marasas, W.F.O. *Fusarium* species. In: *Illustrated manual for identification*. The Pennsylvania State University Press, 1993.
- Ohno, N.; Ijuin, T.; Song, S.; Uchiyama, S.; Shinoyama, H.; Ando, A.; Fujii, T. Purification and properties of amylases extracellularly produced by an imperfect fungus, *Fusarium* sp. BX-1 in a glycerol medium. *Biosci., Biotechnol. Biochem.*, 56(3):465-471, 1992.
- Shepard, G.S.; Thiel, P.G.; Stockenstrom, S.; Sydenham, E.W. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *J. AOAC Int.*, 79(3):671-687, 1996.
- Scott, P.M. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *J. AOAC Int.*, 79(4):875-882, 1996.
- Scott, P.M.; Lawrence, G.A. Analysis of beer fumonisins. *J. Food Prot.*, 58(12):1379-1382, 1995.
- Taniwaki, M.H. Meios de cultura para a contagem de fungos em alimentos. *Bol. Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 30(2):132-141, 1996.
- Visconti, A.; Doko, M.B. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. *J. AOAC Int.*, 77(2):546-550, 1994.

Received on September 15, 1999.

Accepted on January 17, 2000.