



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SÃO PAULO**

***CAMPUS AVARÉ***

**CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA DE BIODIVERSIDADE**

**ISADORA MALVEIRA COSTA FREDERICO**

**APLICAÇÃO DE PRODUTOS FERMENTADOS POR MICRORGANISMOS NO  
CONTROLE DE FUNGO FITOPATOGÊNICO**

**AVARÉ  
2023**

**ISADORA MALVEIRA COSTA FREDERICO**

**APLICAÇÃO DE PRODUTOS FERMENTADOS POR MICRORGANISMOS NO  
CONTROLE DE FUNGO FITOPATOGÊNICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Biosistemas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - *Campus Avaré*, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro de Biosistemas.

Orientador(a): Prof (a). Dr (a). Marcela Pavan Bagagli.

AVARÉ  
2023

Catálogo na fonte  
Instituto Federal de São Paulo – Campus Avaré

Frederico, Isadora Malveira Costa  
Aplicação de produtos fermentados por microrganismos no controle  
de fungo fitopatogênico - Avaré, 2023. 47 p.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Marcela Pavan Bagagli  
Monografia (Graduação - Bacharelado em Engenharia de  
Biosistemas) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São  
Paulo - Campus Avaré, Avaré, 2023.

1. Controle biológico 2. Perdas pós-colheita 3. Produtos fermentados  
4. *Trichoderma harzianum* 5. *Bacillus subtilis* 6. *Bacillus  
thuringiensis* 7. Kombucha 8. *Rhizopus microsporus*. I. Bagagli,  
Marcela Pavan. II. Título.

ATA N.º 23/2023 - CBEB-AVR/DAE-AVR/DRG/AVR/IFSP

### Ata de Defesa de Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação

No dia 23 de novembro de 2023 realizou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado **APLICAÇÃO DE PRODUTOS FERMENTADOS POR MICRORGANISMOS NO CONTROLE DE FUNGO FITOPATOGÊNICO** apresentado pela aluna **Isadora Malveira Costa Frederico (AV3005283)** do Curso **SUPERIOR EM ENGENHARIA DE BIOSISTEMAS**, (Câmpus Campus Avaré). Os trabalhos foram iniciados às 14:00 pela Professora presidente da banca examinadora, constituída pelos seguintes membros:

Membros	IES	Presença (Sim/Não)	Aprovação/Conceito
Marcela Pavan Bagagli (Presidente/Orientador)	IFSP- Câmpus Avaré	Sim	Aprovado
Marcia Cristina Marques (Examinador 1)	IFSP - Câmpus Avaré	Sim	Aprovado
Meliane Akemi Koike (Examinador 2)	IFSP - Câmpus Avaré	Sim	Aprovado

#### Observações:

A banca examinadora, tendo terminado a apresentação do conteúdo da monografia, passou à arguição da candidata. Em seguida, os examinadores reuniram-se para avaliação e deram o parecer final sobre o trabalho apresentado pela aluna, tendo sido atribuído o seguinte resultado:

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Nota Final: 9,9

O segundo examinador é avaliador externo:

Sim  Não

Proclamados os resultados pelo presidente da banca examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, eu lavrei a presente ata que assino juntamente com os demais membros da banca examinadora.

Campus Avaré,

7 de dezembro de 2023

Documento assinado eletronicamente por:

- **Marcela Pavan Bagagli**, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 07/12/2023 08:24:06.
- **Meliane Akemi Koike**, TECNICO DE LABORATORIO AREA, em 07/12/2023 08:58:46.
- **Maria Cristina Marques**, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 07/12/2023 14:59:44.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 07/12/2023. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifsp.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 661808  
Código de Autenticação: b4b7362e54



Dedico aos meus pais, Julia e Marco.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por todos os dias me conceder uma nova oportunidade, por preservar a minha saúde, me fortalecer e me encher de esperança.

Agradeço com todo o meu coração os meus pais, que nunca permitiram que eu desistisse dos meus objetivos e que sempre me afirmaram da minha capacidade de alcançar tudo o que eu escolher para a minha vida. A eles, devo os preciosos valores ensinados e por me oferecer todo o suporte que preciso. E principalmente, por demonstrarem todos os dias o orgulho que sentem de mim.

Não posso deixar de expressar a minha gratidão aos meus irmãos que sempre me apoiaram nos estudos, e que me motivam e me inspiram.

Um agradecimento especial a minha professora e orientadora Marcela, que sempre foi exemplar em seu trabalho, e que para mim é um exemplo.

Também não posso deixar de agradecer aos meus amigos Luana e Cassiano pela sincera amizade durante os anos da graduação, e aos colegas que me auxiliaram no laboratório e que colaboraram para a execução do meu trabalho.

“Imaginar é o princípio da criação. Nós imaginamos o que desejamos, queremos o que imaginamos e, finalmente, criamos aquilo que queremos”.

(George Bernard Shaw)

## RESUMO

No atual cenário agrícola brasileiro, o uso do controle biológico para manejo de pragas e doenças em plantas vem se destacando exponencialmente. Assim como na fruticultura, onde essa prática é de grande relevância no combate de perdas pós-colheita causadas por microrganismos fitopatogênicos, uma vez que os danos causados são responsáveis por até 80% do valor total de frutas produzidas no país. O propósito deste trabalho foi avaliar a inibição causada por produtos fermentados por microrganismos contra um fungo fitopatogênico, utilizando o método de confrontação direta *in vitro*. Os extratos foram obtidos através da fermentação por *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, e da bebida fermentada Kombucha, e estes foram confrontados com o fungo fitopatogênico *Rhizopus microsporus* (INCQS 40290), sendo observada porcentagens de inibição de 69 e 100 %, para *Trichoderma harzianum* e kombucha respectivamente, tornando-os alternativas para controle biológico de doenças causadas por este tipo de fungo fitopatogênico, com relevância para conservação de frutos na fase de pós-colheita.

**Palavras-chave:** Controle biológico. Perdas pós-colheita. Produtos fermentados. *Trichoderma harzianum*. *Bacillus subtilis*. *Bacillus thuringiensis*. Kombucha. *Rhizopus microsporus*.



## ABSTRACT

In the current Brazilian agricultural scenario, the use of biological control to manage pests and diseases in plants has been gaining exponential importance. As in fruit growing, where this practice is of great relevance in combating post-harvest losses caused by phytopathogenic microorganisms, since the damage caused is responsible for up to 80% of the total value of fruit produced in the country. The purpose of this work was to evaluate the inhibition caused by products fermented by microorganisms against a phytopathogenic fungus, using the direct *in vitro* confrontation method. The extracts were obtained through fermentation by *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, and the fermented drink Kombucha, and these were compared with the phytopathogenic fungus *Rhizopus microsporus* (INCQS 40290), with inhibition percentages of 69 and 100% being observed, for *Trichoderma harzianum* and kombucha respectively, making them alternatives for biological control of diseases caused by this type of phytopathogenic fungus, with relevance for fruit conservation in the post-harvest phase.

**Keywords:** Biological control. Post-harvest losses. Fermented products. *Trichoderma harzianum*. *Bacillus subtilis*. *Bacillus thuringiensis*. Kombucha. *Rhizopus microsporus*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Podridão de <i>Rhizopus</i> em fruto de mamão.....	21
Figura 2 – Conidióforos de <i>Trichoderma spp.</i> .....	23
Figura 3 – Medição do raio da colônia do fungo fitopatogênico.....	28
Figura 4 - (A) Crescimento do fungo <i>Trichoderma harzianum</i> e (B) da bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i> após cinco e dois dias de incubação, respectivamente. (C) Extrato fermentado de <i>Trichoderma harzianum</i> e (D) de <i>Bacillus subtilis</i> .....	30
Figura 5 - <i>Rhizopus microsporus</i> (INCQS 40290) em água PDA após incubação por 7 dias a 28°C.....	31
Figura 6 - Extratos de Th (A e B), Kombucha (C e D), Bs (E e F) e Bt (G e H), em seus primeiros e últimos dias de teste por confrontação direta <i>in vitro</i> contra <i>Rhizopus microsporus</i> .....	32
Figura 7 – Diâmetro médio, e respectivos desvios-padrões, do <i>Rhizopus microsporus</i> (INCQS 40290) incubado em confronto direto com Bt, Bs, Th e kombucha ao longo do tempo de incubação.....	33
Figura 8 - Porcentagem de inibição média, e respectivos desvios-padrões, do <i>Rhizopus microsporus</i> (INCQS 40290) pelos extratos fermentados de Bt, Bs, Th e kombucha após o segundo e último dia de incubação. As letras indicam o resultado do teste Tukey com 5 % de significância, sendo letras iguais não diferentes entre si.....	34

## LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

Tabela 1 - Concentração de microrganismos viáveis nos extratos fermentados de <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Trichoderma harzianum</i> em unidades formadoras de colônias por mL de extrato.....	31
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACB	Agentes de Controle Biológico
Bs	<i>Bacillus subtilis</i>
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
ed.	Edição
Ed.	Editor
MIP	Manejo Integrado de Pragas
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Rm	<i>Rhizopus microsporus</i>
SCOBY	Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts
Th	<i>Trichoderma Harzianum</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	14
2 OBJETIVOS .....	16
2.1 Objetivo Geral .....	16
2.2 Objetivos Específicos .....	16
3 REVISÃO DA LITERATURA .....	17
3.1 Controle biológico.....	17
3.2 Perdas pós-colheita.....	18
2.3 Gênero <i>Rhizopus spp.</i> .....	20
2.4 Kombucha .....	21
2.5 Gênero <i>Trichoderma</i> .....	22
2.6 Gênero <i>Bacillus</i> .....	24
4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	26
4.1 Microrganismos .....	26
4.2 Cultivo dos microrganismos utilizados como agentes de controle .....	26
4.3 Cultivo do fungo fitopatogênico para o ensaio de inibição .....	27
4.4 Quantificação dos microrganismos presentes nos extratos fermentados .	28
5 ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	29
5.1 Antagonismo dos produtos fermentados contra fungo fitopatogênico.....	29
6 CONCLUSÃO .....	36
REFERÊNCIAS.....	37

## 1 INTRODUÇÃO

Estima-se que na colheita entre 2009 e 2010, das cinco principais culturas mundiais (arroz, trigo, milho, batatas e soja), se a perda causada por fungos fosse evitada, a quantidade de alimento poderia alimentar 8,5% de toda a população mundial. Além disso, as infecções por fungos ainda prejudicam invertebrados essenciais para a agricultura, como o caso das abelhas (polinizadoras) e de inimigos naturais de insetos, causando desbalanceamento ecológico (Almeida; Rodrigues; Coelho, 2019).

Diversos fungos apresentam capacidade de causar doenças em vegetais, sendo denominados fitopatogênicos. Entre alguns exemplos podemos citar a ferrugem asiática da soja, que é uma doença fúngica causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, tal doença é considerada extremamente violenta para o cultivo de soja no mundo (Godoy, *et al.* 2014). Outros exemplos importantes de fungos fitopatogênicos são os *Rhizopus* spp., associados à doenças pós-colheita em diversas frutas e grãos, e o *Sclerotinia sclerotiorum*, responsável pela doença do mofo branco em culturas como soja, girassol e feijão (Lara, 2020).

O controle das doenças é feito pela aplicação de fungicidas, de forma preventiva ou quando os sintomas já estão evidentes. A prática contínua desse meio de controle pode levar a um aumento de resistência contra a eficácia do produto aplicado, fazendo com que haja aumento no desenvolvimento da doença e retardação no crescimento da planta (Fontes; Valadares-Ingliš, 2020).

A respeito de controle de fungos fitopatogênicos, além da utilização de fungicidas químicos também existem os agentes de controle biológico (ACB) que também realizam o processo de prevenção e controle de forma menos agressiva para a planta e solo, diminuindo possíveis chances de resistência do fungo (Souza *et al.*, 2014). O biocontrole de doenças em plantas, visa controlar as populações de agentes patogênicos utilizando outros organismos (Yang *et al.*, 2001). Além disso, a aplicação de produtos naturais e

compostos químicos extraídos de diferentes fontes, tais como extratos de plantas, organismos naturais ou modificados, ou produtos genéticos são outros exemplos de controle biológico (McSpadden; Fravel, 2002; Pal; Gardener, 2006)

A produção de substâncias antifúngicas pelos agentes de controle biológico pode inibir a germinação de esporos reduzindo impactos negativos na planta e auxiliando em seu crescimento. Outro fator importante que afeta a formação e germinação de esporos é a temperatura em faixa favorável à infecção pelo fungo (Kochman, 1979; Harmann, 2000; Fontes; Valadares-Inglis, 2020).

O êxito dos agentes de controle biológico é influenciado tanto por fatores abióticos quanto bióticos. Estes, incluem elementos climáticos, tais como temperatura, umidade e insolação, bem como as características das plantas hospedeiras, como idade, recursos alimentares e infoquímicos e atributos relacionados aos hospedeiros, como disponibilidade, abundância, diversidade etc. Estes fatores desempenham um papel crucial que podem moldar a capacidade adaptativa dos inimigos naturais ao enfrentar desafios ambientais, afetando diretamente sua busca por recursos (Michereff, 2001; Van Lenteren, 2012).

No conjunto de agentes considerados biológicos, fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Gliocladium*, bem como bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* destacam-se dentre os agentes microbiano de controle mais intensamente pesquisados e/ou utilizados atualmente, pois conseguem proporcionar o controle de patógenos habitantes da superfície das sementes e de patógenos veiculados pelo solo (Cawoy *et al.*, 2015). O fungo *Trichoderma spp.* tem atraído atenção devido aos mecanismos antagonistas que apresenta, tais como o micoparasitismo, que envolve a produção de enzimas hidrolíticas que degradam a parede celular de agentes patógenos, capacidade hiper parasitária, competição por recursos (Nawrocka; Malolepsza, 2013) e indução de respostas de defesa nas plantas hospedeiras (Gomes; Costa; De Paula; *et al.* 2015).

Já as bactérias do gênero *Bacillus* são as mais utilizadas em controle biológico, pois são facilmente encontradas no solo, superfície de plantas, rizosfera, grãos

armazenados, insetos mortos etc. E porque apresentam efeitos não poluentes ao meio ambiente, ausência de toxicidade e promovem o crescimento de plantas, além de agirem no controle de doenças (Fontes; Valadares-Ingliš, 2020; Monnerat *et al.*, 2020).

Dentre as culturas microbianas com atividade antifúngica, é mencionado também a Kombucha, a qual é obtida através da fermentação por bactérias e leveduras em um chá adoçado, formando uma cultura simbiótica envolta em celulose microbiana (Yuniarto; Anggadiredja; Aqidah, 2016). Como resultado da fermentação é produzido, majoritariamente, etanol e ácido acético, os quais possuem alto desempenho antimicrobiano contra microrganismos patogênicos (Coelho; Saraiva; *et al.* 2022).

Portanto, este trabalho almejou avaliar a ação de produtos fermentados por microrganismos (*Trichoderma spp.*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* e da Kombucha) como agentes de controle de fungos fitopatogênicos, tendo como modelo o *Rhizopus microsporus*, uma vez que a afeta as culturas de milho e arroz, e que o cultivo deste possui papel expressivo no desenvolvimento socioeconômico do Brasil.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Este trabalho teve como principal propósito avaliar a competência antifúngica dos produtos fermentados por microrganismos (*Trichoderma spp.*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* e da Kombucha) contra o fungo *Rhizopus microsporus*.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Cultivo de *Trichoderma spp.*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus thuringiensis* por fermentação em estado sólido para obtenção de extratos fermentados;
- Aquisição de fermentado de kombucha comercial;



- Realização de testes de inibição de *Rhizopus microsporus* pelos produtos fermentados, utilizando o método de confrontação direta *in vitro*.

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 Controle biológico**

No último século, houve um amplo interesse sobre como controlar pragas usando inimigos naturais de maneira segura e eficaz no manejo integrado de pragas (MIP), especialmente em uma época em que a produção integrada é muito debatida como um passo em direção a uma agricultura sustentável (Parra, 2014; Fontes; Valadares-Ingliš, 2020). Anteriormente o objetivo era erradicar totalmente os patógenos, empregando o uso indiscriminado e contínuo de produtos químicos, sem levar em consideração as consequências desse processo a longo prazo. Esse método resultou em alterações no ambiente, incluindo seleção de patógenos resistentes, propagação de doenças secundárias, redução de microrganismos benéficos, além de apresentar efeitos nocivos ao ser humano, aos animais e ao meio ambiente, em razão do acúmulo de resíduos no solo, água e nos alimentos (Lane; Walker; Grantham, 2023; Júnior; Santos; Auer, 2000).

Embora as pesquisas tenham aumentado recentemente (Barrat; Moran; Bigler, 2018), a utilização de predadores e parasitóides é uma prática conhecida há milhares de anos. No entanto, somente em 1919 o termo “controle biológico” foi proposto por Harry Smith, da Universidade da Califórnia, que o definiu como “a supressão de populações de insetos pela ação de seus inimigos naturais nativos ou introduzidos” (Smith, 1919). Os fundamentos do controle biológico resumem-se entre a dinâmica antagônica estabelecida entre os microrganismos, como: competição, predação, amensalismo e parasitismo. Múltiplos microrganismos inibem fitopatógenos por meio da competição por nutrientes, parasitismo direto e pela produção de metabólitos (Kredics *et al.* 2018; Júnior; Santos; Auer, 2000).

No contexto agrícola, quando patógenos de plantas crescem de maneira prejudicial para a economia e se tornam pragas, é possível gerenciar e introduzir seus

predadores naturais no ambiente. Tal abordagem oferece uma alternativa mais sustentável do que os produtos químicos utilizados (Fontes; Valadares-Ingliš, 2020).

No controle biológico de doenças em plantas, existem três estratégias nas quais são utilizadas: controle do inóculo no patógeno, proteção da superfície da planta e indução da resistência. O controle do inóculo envolve a prevenção do patógeno como a rotação de culturas, aração e aplicação de antagonistas antes do plantio. A proteção da superfície consiste no uso dos antagonistas introduzidos na planta para prevenir doenças. Já a indução da resistência é utilizada contra viroses e patógenos vasculares (Michereff, 2001).

O mercado brasileiro de bio defensivos cresceu de maneira expressiva nos últimos anos. De acordo com dados publicados pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), em 2018 a produção destes produtos registrou um aumento superior a 70%. Dentre os microrganismos destacados na formulação de bio inseticidas, destaca-se a bactéria *Bacillus thuringiensis*, a qual desempenha um papel importante no controle de lepidópteros. Até o ano de 2018, 121 produtos biológicos foram registrados, e dentre eles apenas 20 são produtos ou formulações comerciais à base da bactéria *Bacillus thuringiensis*. Além deste, outros produtos biológicos também são comumente utilizados como: *Bacillus subtilis* para o controle de diversas doenças e *Trichoderma* spp. para o controle de patógenos de solo e substrato e da parte aérea (Bettiol; Morandi, 2009; Medeiros; Silva; Pascholati, 2018).

### **3.2 Perdas pós-colheita**

A produção atual de frutas e hortaliças se destaca ao abranger diversas espécies cultivadas, cuja capacidade de consumo vem progredindo e sustentando o setor hortifrutícola. Essa atividade é de extrema importância no agronegócio brasileiro, não apenas a respeito de aspectos socioeconômicos, mas principalmente pelo fornecimento de alimentos essenciais para a população (Ferreira, 2019).

Cerca de 30% da produção total de frutas e vegetais no Brasil se perde ao longo do caminho, começando no campo e se estendendo desde o processo de embalagem

até a fase de transporte e comercialização (Guerra *et al.*, 2014; Neves, 2016). Tais perdas pós-colheita são caracterizadas pela inadequação dos alimentos para consumo devido a presença de danos mecânicos, doenças ou problemas fisiológicos que afetam suas características físicas, químicas, microbiológicas e sensoriais (Santos; Vieira, 2011; Silva, 2017).

Essas perdas podem ser classificadas em duas categorias: as quantitativas, que são visíveis e mensuráveis, e as qualitativas que afetam a qualidade do produto e seu comportamento no mercado. As perdas qualitativas incluem a redução da comestibilidade, nutrição, valor calórico, segurança, aceitabilidade do consumidor e valor econômico. Essas perdas acontecem normalmente antes do produto ser descartado, consumido ou utilizado de outra forma. Já as perdas quantitativas afetam a quantidade disponível para consumo, envolvendo variáveis como massa, volume, valor energético e valor monetário (Rinaldi, 2011; Diniz, 2013; Yahia; Fonseca; Kitinoja, 2019; Dantas *et al.*, 2020).

Especificamente as doenças atribuídas a fungos, bactérias e leveduras surgem com frequência, representando uma parcela considerável de 80% a 90% das perdas totais ocasionadas por patógenos (Oliveira *et al.*, 2006). Em razão do elevado teor de umidade e conteúdo nutritivo, frutas e vegetais são mais propensos a deterioração microbiana na fase de pós-colheita (Yahaya; Mardiyya, 2019).

O processo de infecções quiescentes é caracterizado pela inibição do desenvolvimento do patógeno no tecido do hospedeiro durante o período de infecção, onde ocorre a adaptação do patógeno às condições fisiológicas do hospedeiro (Prusky; Pumbley, 1992). Geralmente, tal tipo de infecção se inicia na fase de pré-colheita, quando os frutos ainda se encontram na planta. Entretanto, a partir do momento em que são colhidos, passam por modificações fisiológicas que os tornam mais vulneráveis à ação dos patógenos (Cavalcanti, 2005). Frequentemente, as infecções quiescentes são causadas por fungos do gênero: *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Lasiodiplodia* e *Botrytis*. No caso de infecções adquiridas, que ocorrem por ferimentos após a colheita, destacam-se

os fungos *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* e outros, que manifestam rapidamente sintomas de podridões (Oliveira et al., 2006).

### **2.3 Gênero *Rhizopus* spp.**

O fungo do gênero *Rhizopus* pertence ao filo *Mucoromycota*, subfilo *Mucoromycotina*, ordem *Mucorales* (Spatafora et al., 2016). O corpo desses fungos é formado por numerosos filamentos denominados hifas, formando um emaranhado que se chama micélio (Spier, 2005). O *Rhizopus* spp. desenvolve-se sobre matéria orgânica úmida, apresentando coloração escura podendo ser encontrado no solo, em frutas, vegetais em decomposição, em fezes de animais e em pão velho (Spier, 2005). Tal coloração escura corresponde à vasta esporulação das colônias do fungo, que inicialmente são brancas e posteriormente escurecem com o tempo (Zheng et al., 2007).

Na agricultura, além de causarem doenças em plantas, também são responsáveis por causarem problemas como a podridão mole, durante o transporte e no armazenamento de frutas e vegetais na fase de pós-colheita (Kwon et al. 2001; Zheng et al., 2007). As complicações causadas por esse fitopatógeno podem ocorrer quando o fruto ainda se encontra na planta, onde o fruto, quando já acometido pelo fungo, tende a cair prematuramente, e a ação da podridão continua também no solo (Fischer; Lourenço; Amorim, 2008).

A podridão mole é uma típica doença de pós-colheita, na maior parte dos casos, ocorre devido a ferimentos causados nos frutos e pela suscetibilidade dos tecidos vegetais durante o processo de amadurecimento (Costa; Ventura; Lopes, 2006). A infecção ocorre em sua superfície, conforme ilustrado na figura 1, lugar onde se encontra o inóculo (Scariot, 2013), e em seguida há o desenvolvimento de micélios, esporangióforos, e esporângios do fungo *Rhizopus* spp. (Tanaka; Betti; Kimati, 1997).

Figura 1 - Podridão de *Rhizopus* em fruto de mamão



Fonte: Oliveira, 2007

A propagação da doença ocorre de forma simples, pelo contato através do suco de um fruto contaminado, o qual contém os esporos, para um fruto saudável. Os frutos atacados também podem apresentar alterações em sua cor e consistência, assim como a percepção de crescimento micelial denso e branco (Scariot, 2013).

## 2.4 Kombucha

A Kombucha é uma bebida fermentada de origem asiática e apresenta uma história milenar, sendo seus primeiros registros observados por volta de 200 a.c. No entanto sua utilização cresceu pelo restante dos continentes devido aos seus efeitos antioxidantes, antimicrobianos, anticancerígenos, entre outras propriedades (Chakravorty *et al.*, 2016). Pesquisas também sugerem que a bebida é rica em probióticos, contribuindo para o equilíbrio da microbiota e a função intestinal (Watawana *et al.*, 2015).

Na produção da Kombucha são comumente utilizados os chás preto e verde em sua fermentação, isso porque possuem alto teor de cafeína necessária para o desenvolvimento da cultura (Rodrigues *et al.*, 2018). A preparação da bebida envolve além da utilização das folhas da planta para o chá, também o uso de sacarose como um substrato para a fermentação, e um SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts), como agente no processo de fermentação (Chakravorty *et al.*, 2016), formado pela simbiose entre bactérias do gênero *Acetobacter* e fungos *Saccharomyces* (Hohmann; Kunz; Vandresen, 2020).

À medida que as leveduras osmofílicas realizam a fermentação do açúcar presente no chá e geram etanol, as bactérias oxidam o álcool e produzem ácido acético (Teoh; Heard; Cox, 2004). Outros ácidos orgânicos também são formados nesse processo tais como: glucônico, láctico, málico, cítrico e tartárico, que também possuem atividade antibacteriana e previnem a contaminação da kombucha por bactérias patogênicas (Leal *et al.*, 2018).

Alguns estudos sobre a Kombucha demonstram sua eficácia antimicrobiana englobando tanto bactérias gram-positivas, quanto gram-negativas. Essa capacidade pode ser primariamente atribuída aos ácidos orgânicos produzidos na fermentação, principalmente o ácido acético, e também a proteínas e catequinas, capazes de inibir microrganismos que apresentam características gram-positivas e gram negativas (Jayabalan *et al.*, 2014). Alguns estudos apontados por Battikh *et al.* (2012), documentaram a capacidade da kombucha contra os seguintes fungos fitopatogênicos: *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*.

## **2.5 Gênero *Trichoderma***

O gênero *Trichoderma* pertence à classe *Sordariomycetes* do filo *Ascomycota*. Nas espécies onde sua fase sexual é conhecida, esta é determinada pela formação de corpos de frutificação denominados de peritécios, os quais se desenvolvem em

estromas, apresentando colorações que variam entre o verde, amarelo, creme e marrom, determinadas pelo substrato colonizado pelo fungo (Magalhães; Heinrich, 2019).

Já na fase assexuada, o micélio vegetativo dá origem a estruturas conhecidas como conidióforos, que possuem um eixo central e ramificações laterais (Jaklitsch, 2009). Estas, culminam em espirais divergentes compostas por células conidiogênicas, chamadas de fiálides, as quais possuem formato de garrafa ou alongado. Nas extremidades das das fiálides é que são produzidos os típicos conídios unicelulares que podem variar de formatos, sendo eles: ovais, alongados ou esféricos (Monte; Bettiol; Hermosa, 2019). A figura ilustra a estrutura dos conidióforos de um *Trichoderma spp.*

Figura 2 - Conidióforos de *Trichoderma spp.*



Fonte: Agroinovadores. Disponível em: <https://agro.genica.com.br/2019/09/27/trichoderma-ssp/> Acessado em: 18 de setembro de 2023.

De acordo com Druzhinina *et al.* (2011), atualmente mais de 250 espécies de *Trichoderma* foram identificadas através de análises moleculares, sendo que a maioria

destas não está amplamente distribuída no solo, mas sim restrita em florestas tropicais, onde atuam como parasitas de outros fungos e como decompositores de madeira. Grande parte das cepas deste fungo é encontrado em climas temperados e em solos ácidos como habitat preferencial. No entanto, possuem a capacidade de se tornarem resistentes a algumas condições extremas, através de estruturas chamadas de clamidósporos e microescleródios (Monte; Bettioli; Hermosa, 2019).

Algumas espécies como *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum lato sensu* e *T. virens* são aplicadas no tratamento de sementes ou até mesmo, aplicada em áreas de cultivo a fim de agirem no controle biológico de doenças em plantas e no crescimento vegetal. Sendo o *Trichoderma harzianum* a 'morfo-espécie' mais comumente empregada no controle biológico de doenças de plantas no mundo todo (Woo *et al.*, 2014).

Um aspecto importante a se analisar é a presença abundante de genes que codificam enzimas hidrolíticas, como glucanases, proteases e quitinases, as quais podem apresentar propriedades de defesa das plantas contra infecções fúngicas, decomposição da matéria orgânica e da parede celular de fungos invasores (Kubicek *et al.*, 2011). As enzimas degradadoras da parede celular de distintas cepas de *Trichoderma* têm demonstrado sua eficácia inibindo a germinação de esporos, no crescimento de hifas e no desenvolvimento de estruturas de resistência em diversos patógenos, dentre eles destaca-se o *Rhizopus spp.* (Monte, 2001).

## **2.6 Gênero *Bacillus***

As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* são amplamente empregadas no controle biológico de pragas, a maioria das espécies são saprófitas, sendo encontradas em diversos tipos de substratos como: solo, rizosfera, superfícies de plantas, grãos armazenados, insetos mortos, entre outros (Boer; Diderichsen, 1991; Monnerat *et al.*, 2020).

As bactérias do gênero *Bacillus* são gram positivas, possuem células com a forma de bastonetes retos, aos pares ou cadeias com extremidades arredondadas ou em ângulo reto; se movem por meio de flagelos peritríquios, formam endósporos ovais ou,



algumas vezes, redondos ou cilíndricos , sendo muito resistentes às condições abióticas extremas, como temperaturas, pH ou exposição a produtos químicos , baixos níveis de umidade; sendo aeróbios ou aeróbios facultativos (Melo; Azevedo, 1998; Bahadir; Liaqat; Eltem, 2018).

No entanto, algumas linhagens desse gênero de bactérias também são reconhecida como uma rizobactéria promotora do crescimento de plantas, possui potencial de suprimir doenças por meio de alguns mecanismos de competição por espaço e nutrientes, e também a indução de resistência contra fungos em plantas (Kloepper, 1999).

Entre os bioinseticidas mais utilizados, *Bacillus thuringiensis* se destaca como agente altamente vantajoso. Isso se deve a sua alta especificidade e por não apresentar atividade tóxica para os mamíferos e plantas. A atividade entomopatogênica do *B. thuringiensis* ocorre devido à presença de cristais protéicos, denominado delta-endotoxinas ou proteínas Cry, que são produzidas na fase estacionária e acumuladas no compartimento da célula mãe durante a esporulação. Essas toxinas têm um amplo espectro de ação, sendo tóxicas a insetos de diversas ordens (Schnepf *et al.*, 1998; Monnerat *et al.*, 2020).

Já o *Bacillus subtilis* é uma bactéria que se destaca pela sua formação de endósporos de forma cilíndrica ou elipsoidal e apresenta multiplicidade de mecanismos antagônicos de defesa contra fitopatógenos (SILVA *et al.*, 2008). Suas colônias podem exibir uma ampla variedade de cores, que vão desde um tom esbranquiçado até um tom mais escuro, isso depende das condições e do meio de cultura em que se desenvolvem (Monnerat *et al.*, 2020). Bactérias antagônicas como *B. subtilis*, de modo geral, agem por antibiose, parasitismos e competição (Kupper; Fernandes; Goes, 2003).

Esta espécie é predominantemente encontrada no solo e na rizosfera, onde desempenha um papel crucial na proteção contra diversos agentes patogênicos que afetam as plantas. O grande interesse em *B. subtilis* reside na sua capacidade de produzir uma variedade de metabólitos secundários, com aplicações tanto na agricultura

quanto na medicina. Na agricultura essa bactéria tem o potencial de formar biofilmes que promovam proteção nas raízes das plantas, além de contribuir na solubilização e mineralização do fósforo, e no crescimento de plantas (Oliveira *et al.*, 2009).

## **4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS**

### **4.1 Microrganismos**

O *Bacillus thuringiensis* (Bt) utilizado no projeto foi isolado de produtos comerciais (Agrinor), o *Trichoderma harzianum* (Th) foi gentilmente cedido pela CATI - Fazenda Ataliba Leonel (cepa IB1917) e o *Bacillus subtilis* (cepa 23) foi gentilmente cedido pelo laboratório de Bioquímica de Alimentos da faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. Os microrganismos foram mantidos no laboratório de microbiologia do IFSP - Campus Avaré em *slants* de ágar nutriente, no caso das bactérias, e batata dextrose, no caso do fungo, recobertos por glicerina estéril, a 5 °C, repicados a cada 6 meses. O SCOBY (cultura simbiótica de bactérias e leveduras) de kombucha foi adquirido em comércio virtual (Kefir life super Food).

O fungo fitopatogênico *Rhizopus microsporus* (INCQS 40290) foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, sendo mantidos no laboratório de microbiologia do IFSP - Campus Avaré em *slants* de ágar batata dextrose recobertos por glicerina estéril, a 5 °C, repicados a cada 6 meses.

### **4.2 Cultivo dos microrganismos utilizados como agentes de controle**

O Bt, Bs e o Th foram cultivados por fermentação em estado sólido (Vidotto *et al.*, 2022) utilizando Erlenmeyers de 250 mL contendo meio composto por 30 g de arroz branco tipo I adicionado de 35 mL de água de torneira, autoclavados a 121°C por 15 minutos. Após resfriados, os Erlenmeyers foram inoculados com 3 discos de ágar (nutriente e batata dextrose, respectivamente) de 1,5 cm de diâmetro, totalmente recobertos pelos microrganismos. Após homogeneização utilizando um bastão de vidro estéril, foram incubados a 28 °C durante 120 h. Os extratos fermentados dos

microrganismos foram obtidos pela adição de 50 mL de solução salina 0,85% (m:v) contendo 0,05% (v:v) de polisorbato 80 estéril em cada frasco, os quais foram agitados por 20 minutos em agitador rotativo a 200 rpm em temperatura ambiente. Os extratos foram filtrados em gaze estéril e imediatamente aplicados nos ensaios de inibição do fungo fitopatogênico. Parte dos extratos remanescentes foram utilizados para as análises de quantificação dos microrganismos neles presentes.

Para o fermentado de kombucha foi utilizado o chá “starter” recebido junto das placas SCOBY do fornecedor, não sendo feito nenhum preparo adicional. Este chá é composto de infusão de chá verde (*Camellia sinensis*) adoçada e fermentada com SCOBY de kombucha.

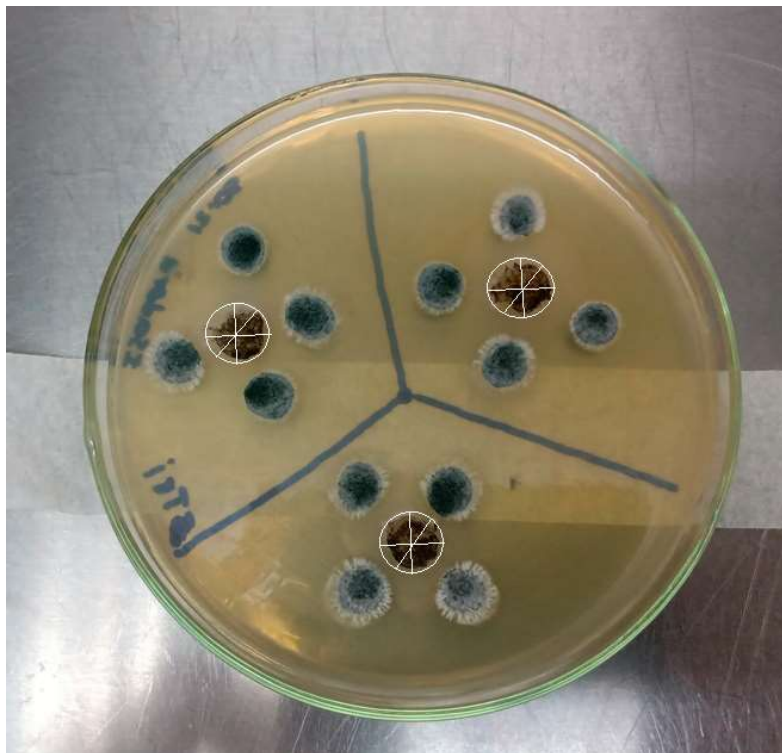
#### 4.3 Cultivo do fungo fitopatogênico para o ensaio de inibição

A capacidade de inibir o crescimento do fungo fitopatogênico *Rhizopus microsporus* (INCQS 40290) pelos extratos fermentados de Bt, Bs, Th e kombucha foram testados pelo método de confrontação direta *in vitro* (adaptado de Fernandes *et al.*, 2019). Para tanto, o fungo *Rhizopus microsporus* (Rm) foi cultivado por 7 dias a 28°C em ágar batata dextrose, utilizando a técnica da picada. Discos de 6 mm foram recortados da borda da cultura pura e dispostos em 3 pontos equidistantes do mesmo meio de cultura em placas de Petri de 10 cm de diâmetro. Ao redor dos discos, foram adicionados 5 µL dos extratos fermentados, em quatro pontos equidistantes entre si e do disco de Rm. Os testes foram realizados em triplicatas e dois controles foram realizados, substituindo os extratos fermentados por água estéril e infusão de chá verde (*Camellia sinensis*) preparado conforme indicação do fornecedor do SCOBY de kombucha. As placas foram incubadas a 28 °C e o crescimento do fungo foi observado por 7 dias, sendo o raio da colônia do fungo medida com uma régua. A percentagem de inibição foi calculada pela equação [1] e os dados analisados estatisticamente por ANOVA e teste Tukey com 95% de confiança.

$$\%inibição = \left(1 - \left(\frac{\text{Crescimento do fungo}}{\text{Crescimento do controle}}\right)\right)100 \quad [1]$$

O diâmetro da colônia do fungo fitopatogênico foi medida utilizando as médias da horizontal, vertical e diagonal de cada colônia da placa, como mostrado na figura 3, como exemplo.

Figura 3 - Medição do raio da colônia do fungo fitopatogênico.



Fonte: Aatoria própria

#### 4.4 Quantificação dos microrganismos presentes nos extratos fermentados

O extrato de Bt e Bs foram caracterizados pelo seu pH e contagem de esporos de *Bacillus*, realizado conforme metodologia descrita por Monnerat *et al.* (2020), utilizando meio ágar nutriente adicionado de sais. Uma alíquota de 1,5 mL do extrato foi transferida, sem qualquer diluição, para um tubo Eppendorf. Este tubo foi então submetido a um choque térmico, imerso em um banho-maria a uma temperatura de 80°C, por um período

de 12 minutos, seguido de resfriamento em banho de gelo durante 5 minutos. Esse procedimento visou a eliminação das células vegetativas, deixando apenas os esporos viáveis. Posteriormente, a amostra passou por diluições decimais seriadas em tubos contendo solução salina 0,85% (m:v) contendo 0,05% (v:v) de polisorbato 80. Logo após, as diluições  $10^{-6}$  de Bs e  $10^{-7}$  de Bt foram plaqueadas, em triplicata, em placas de Petri contendo ágar nutriente adicionado de sais.

O extrato de Th foi caracterizado pelo seu pH e contagem de esporos viáveis em meio ágar batata dextrose, sendo o extrato diluído em solução salina 0,85% (m:v) contendo 0,05% (v:v) de polisorbato 80, em uma sequência decimal. Em seguida, a diluição  $10^{-7}$  foi plaqueada, em triplicata, em placas de Petri contendo ágar batata dextrose (PDA).

O extrato de kombucha foi caracterizado pelo seu pH.

## **5 ANÁLISE DOS RESULTADOS**

### **5.1 Antagonismo dos produtos fermentados contra fungo fitopatogênico**

Os extratos fermentados que foram obtidos após a inoculação em estado sólido, de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* e da Kombucha, foram testados quanto a sua capacidade de inibição contra o fungo fitopatogênico *Rhizopus microsporus*. A figura 4 ilustra o meio de fermentação recoberto para *T. harzianum* e *B. thuringiensis*, bem como os extratos fermentados obtidos.

Figura 4 - (A) Crescimento do fungo *Trichoderma harzianum* e (B) da bactéria *Bacillus thuringiensis* após cinco e dois dias de incubação, respectivamente. (C) Extrato fermentado de *Trichoderma harzianum* e (D) de *Bacillus subtilis*



Fonte: Autoria própria, 2023

A figura 5 apresenta o comportamento do crescimento do *Rhizopus microsporus* (INCQS 40290) em água PDA após incubação por 7 dias a 28°C.

Figura 5 - *Rhizopus microsporus* (INCQS 40290) em água PDA após incubação por 7 dias a 28°C.



Fonte: Autoria própria, 2023

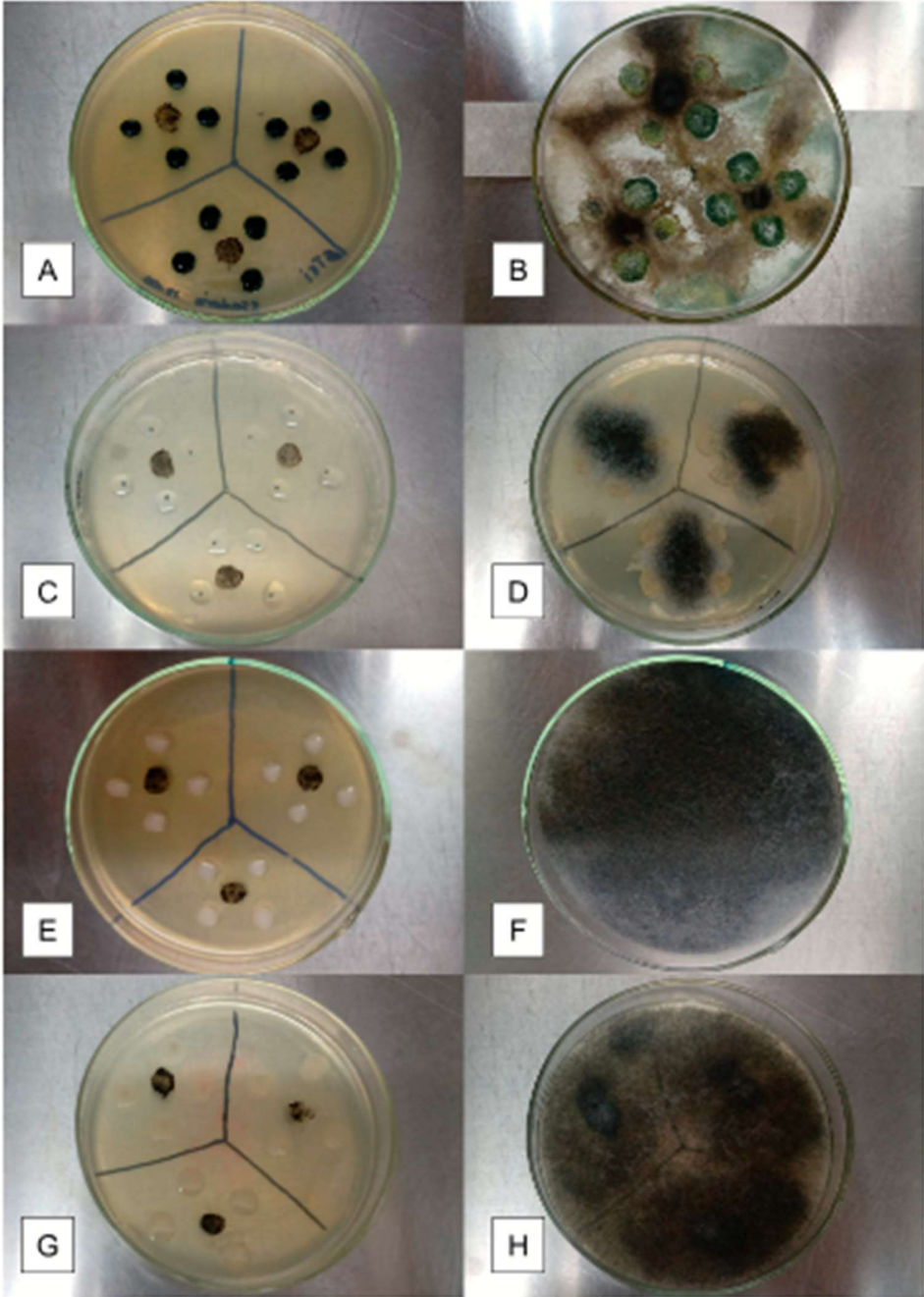
A quantificação de microrganismos nos extratos fermentados de Bt, Bs e Th estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração de microrganismos viáveis nos extratos fermentados de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum* em unidades formadoras de colônias por mL de extrato.

<b>Microrganismo</b>	<b>Concentração dos extratos fermentados (UFC/mL)</b>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	$2,1 \cdot 10^9$
<i>Bacillus subtilis</i>	$3,0 \cdot 10^8$
<i>Trichoderma harzianum</i>	$2,7 \cdot 10^8$

A figura 6 traz os ensaios de confronto direto dos extratos fermentados com o fungo fitopatogênico em estudo, comparando o início da incubação e o término desta.

Figura 6 - Extratos de Th (A e B), Kombucha (C e D), Bs (E e F) e Bt (G e H), em seus primeiros e últimos dias de teste por confrontação direta *in vitro* contra *Rhizopus microsporus*.



Fonte: De autoria própria, 2023



As figuras 7 e 8 apresentam o tamanho da colônia de *Rhizopus microsporus* (INCQS 40290) ao longo dos dias de incubação em confronto com os extratos fermentados e a porcentagem de inibição calculada para o segundo dia de incubação e no último dia (variou de microrganismo para microrganismo), respectivamente.

Figura 7 - Diâmetro médio, e respectivos desvios-padrões, do *Rhizopus microsporus* (INCQS 40290) incubado em confronto direto com Bt, Bs, Th e kombucha ao longo do tempo de incubação.

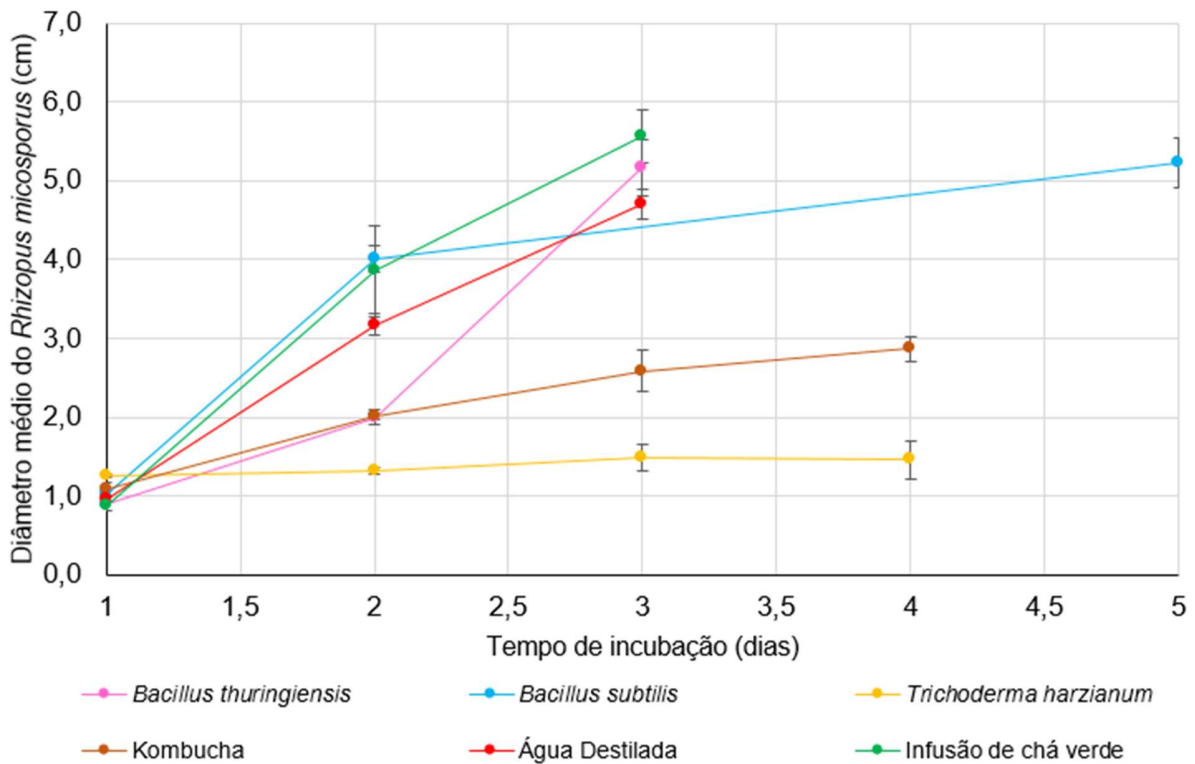
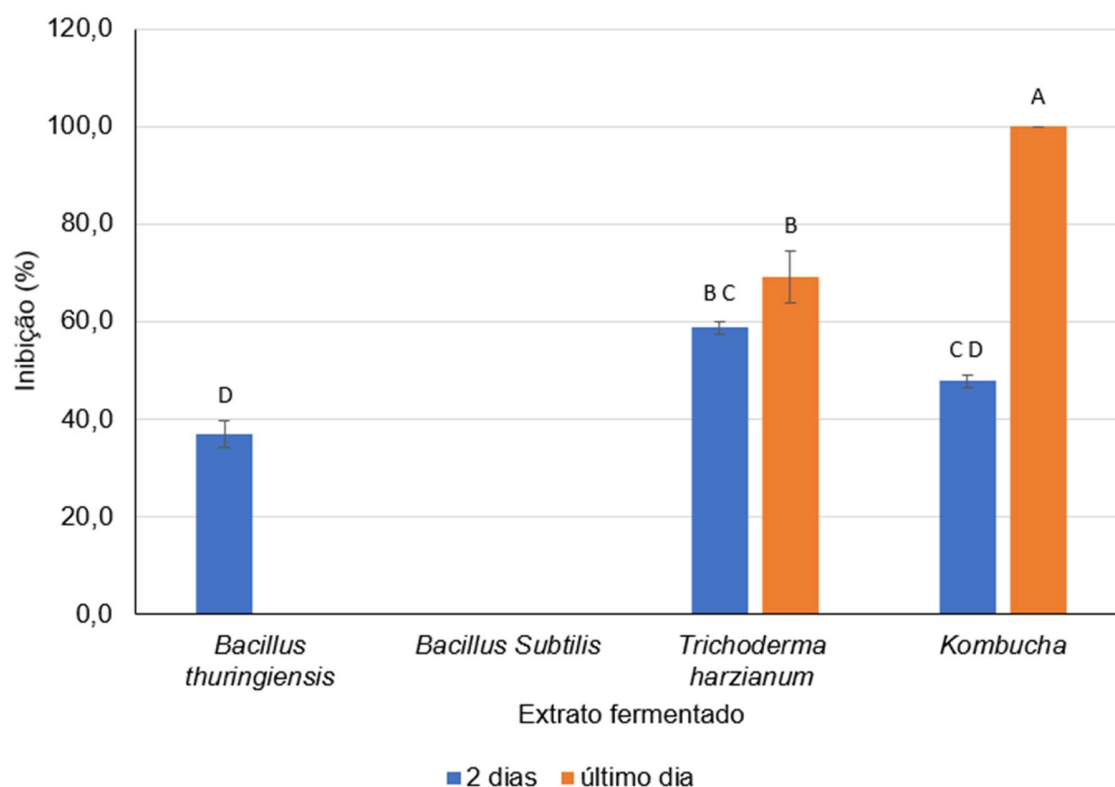


Figura 8 - Porcentagem de inibição média, e respectivos desvios-padrões, do *Rhizopus microsporus* (INCQS 40290) pelos extratos fermentados de Bt, Bs, Th e kombucha após o segundo e último dia de incubação. As letras indicam o resultado do teste Tukey com 5 % de significância, sendo letras iguais não diferentes entre si.



Os extratos de *Trichoderma* e Kombucha apresentaram capacidade de inibição significativa contra *Rhizopus microsporus* (INCQS 40290), sendo a porcentagem de inibição máxima de 69% e 100%, respectivamente. Nota-se principalmente que, durante os 4 dias de observação, o fungo fitopatogênico não cresceu onde esses extratos foram disponibilizados nas placas, isso porque o desempenho dos extratos fermentados como antagonistas é considerado alto, em relação ao fungo fitopatogênico utilizado. No que se refere a inibição do Th, considera-se que a resposta obtida pode ser ocasionada pela presença de enzimas degradadoras da parede celular encontradas em distintas cepas de *Trichoderma*, essa por sua vez, têm demonstrado grande eficácia, inibindo a germinação de esporos, no crescimento de hifas e no desenvolvimento de estruturas de

resistência em diversos patógenos, dentre eles destaca-se o *Rhizopus spp.* (Monte, 2001).

Outra observação interessante foi que inicialmente (2 dias de incubação) o Bt apresentou alguma inibição do fungo, em relação ao controle, porém no terceiro dia de incubação não havia efeito inibitório algum. Situação similar foi evidenciada com o Th, uma vez que no início da incubação a inibição foi estatisticamente igual à observada no fermentado de kombucha, porém, após o quarto dia de incubação a kombucha superou a inibição do Th.

Em um estudo proposto por Bhattacharya *et al.* (2016) foi descrito a progressão da atividade antimicrobiana da Kombucha contra bactérias entéricas, onde foi possível determinar alguns componentes responsáveis pela atividade antimicrobiana da bebida fermentada como, compostos fenólicos, flavonóides, acetato de etila e ácidos orgânicos.

A alta inibição do extrato fermentado de kombucha pode estar relacionada ao ácido acético produzido durante a fermentação, isso porque alguns fungos não se desenvolvem em meios ácidos. Četojević-Simin *et al.* (2008) e Vukmanović *et al.* (2022) realizaram testes de inibição em microrganismos Gram-negativos (*Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*) e Gram-positivo (*Staphylococcus aureus*) em comparação com inibição por ácido acético,concluindo que esse composto presente na kombucha foi um dos principais causadores da inibição.

O efeito antagônico de *Trichoderma asperellum* e de *Bacillus subtilis* foi demonstrado em um trabalho elaborado por Gabardo *et al.* (2020). Nele foi empregado o método de Gibbs pelo teste de culturas pareadas *in vitro*. No experimento utilizando Bs evidenciaram o surgimento de halo de inibição e formação de escleródios para *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum* e *C. dematium* var *truncata*. Já para a produção de metabólitos tóxicos voláteis o fungo *T. asperellum* se mostrou mais eficiente, sendo capaz de inibir o crescimento micelial de todos os fitopatógenos aplicados no estudo, tais como *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum dematium* var. *Truncata*.

Já os extratos de Bt e Bs, foram os que menos apresentaram capacidade de inibição, nestes casos, a placa foi precocemente preenchida pelo fungo, indicando que ambas as bactérias do gênero *Bacillus* utilizadas neste trabalho não apresentaram capacidade antagônica contra esse fungo *Rhizopus microsporus* (INCQS 40290). De acordo com Passari *et al.* (2014), 16 isolados de Bt foram analisados a partir de solo rizosférico e verificaram que nove destes isolados apresentaram atividade inibitória significativa contra os fungos *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* e *Fusarium oxysporum*, com percentagem de inibição variando de 47% a 76%.

A avaliação da inibição de crescimento de fungo fitopatogênico utilizando *B. subtilis* como antagonista também foi testada por Méndez-Úbeda; Hernández; Páramo-Aguilera (2017). No estudo, o Bs apresentou melhor percentual inibitório contra *Fusarium equiseti* e *Fusarium sp.*, de 83% a 100%, utilizando do método de duplo confronto *in vitro* entre o antagonista e o fitopatógeno.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a Kombucha e o fungo *Trichoderma harzianum* são os principais inibidores do crescimento do *Rhizopus microsporus* (INCQS 40290) demonstrando porcentagens de inibição de 69 e 100 %, tornando-os alternativas para controle biológico de doenças causadas por este tipo de fungo fitopatogênico, com relevância para conservação de frutos na fase de pós-colheita.

Como continuidade do trabalho sugere-se avaliar os agentes microbianos na inibição de outros fungos fitopatogênicos de importância comercial para o Brasil, além de explorar os compostos presentes no extrato fermentado de kombucha que pode conduzir a inibição tão significativa, contribuindo para o desenvolvimento, por exemplo, de filmes de cobertura com atividade antimicrobiana para frutas.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F.; RODRIGUES, M.L., COELHO, C. **The still underestimated problem of fungal diseases worldwide**. *Frontiers in Microbiology*, v.10, 2019.
- ANDRADE, P. J. M.; ANDRADE, D. F. de A. A., **Ferrugem asiática: uma ameaça à sojicultura brasileira: Sintomatologia**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Chapadão do Sul: Fundação Chapadão, 2002.
- BAHADIR, P. S.; LIAQAT, F.; ELTEM, R. **Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing Bacillus species isolated from the Aegean Region of Turkey**. *Turquia: Turkish Journal of Botany*, 2018. v. 42, n. 2, p. 183-196.
- BARRATT, B. I. P; MORAN, V. C; BIGLER, F. **The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future**. *Bio Control*, 2018. 63, 15—167.
- BATTIKH, H.; BAKHROUF, A.; AMMAR, E. **Antimicrobial effect of kombucha analogues**. *LWT - Food Science and Technology*, 2012. V. 47, n. 1, p. 71–77.
- BETTIOL, W. M. A. B. MORANDI, M. A. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.
- BHATTACHARYA, D.; BHATTACHARYA, S.; PATRA, M.M.; CHAKRAVORTY, S.; SARKAR, S.; CHAKRABORTY, W.; KOLEY, H.; GACHHUI, R. **Antibacterial activity of polyphenolic fraction of Kombucha against enteric bacterial pathogens**. *Current Microbiology*, v. 73, n.1, p. 885-896, 2016
- BOER, A. S.; DIDERICHSEN, B. **On the safety of Bacillus subtilis and B. amyloliquefaciens: a review**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 1991.
- CAVALCANTI, L. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005.
- CAWOY, H., DEBOIS, D., FRANZIL, L., DE PAUW, E., THONART, P., ONGENA, M. **Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by Bacillus subtilis/amyloliquefaciens**. *Microb. Biotechnol.* 8, 2015. 281–295 p

ČETOJEVIĆ-SIMIN, D. D.; BOGDANOVIC, G. M.; CVETKOVIĆ, D. D.; VELIĆANSKI, A. **S. Antiproliferative and antimicrobial activity of traditional Kombucha and Satureja montana L. Kombucha**, Journal of BUON, v.13, p. 395-401, 2008

CHAKRAVORTY, S.; BHATTACHARYA, S.; CHATZINOTAS, A.; CHAKRABORTY, W.; BHATTACHARYA, D.; GACHHUI, R. **Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics**. International Journal of Food Microbiology. Holanda: Elsevier B.V, 2016. p. 63-72

COELHO, E. B.; SARAIVA, B. B.; RODRIGUES, B. M.; SILVA JÚNIOR, R. C. da.; CAMPANHOLI, K. da S. S.; MARICATO, D. M. B.; PINTRO, P. M.; POZZA, M. S. dos S. **Antibacterial activity of Kombucha against Escherichia coli and Staphylococcus aureus and Minas Frescal cheese production with Scoby**. Research, Society and Development, v. 11, n. 2, 2022.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plants pathogens**, p.539, 1983

COSTA, H; VENTURA, J. A; LOPES, U. P. **Doenças do morangueiro: diagnóstico e manejo**. In: BALBINO, J. M. S. (Ed.). Tecnologias para produção, colheita e pós-colheita de morangueiro. Vitória: Incaper, p. 41-57, 2006.

DANTAS, R. L; FERREIRA, L. S; FIGUEIRINHA, K. T; RIBEIRO, W. S. **Perdas pós-colheita de frutas e hortaliças no Maranhão: estimativas, causas, impactos e soluções**. Cap. 3 Perdas pós-colheita de frutas e hortaliças. São Luís: Edufma, 2020, p. 31-40.

DINIZ, M. D. M. S. **Propriedades texturais, físico-químicas, reológicas e enzimáticas da manga “Tommy Atkins” durante o armazenamento em atmosfera modificada sob refrigeração**. 2013. 159 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

DRUZHININA, I. S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M., MONTE, E.; KUBICEK, C. P. **Trichoderma: the genomics of opportunistic success**. Texas: Nature Reviews Microbiology, 2011. v. 9, n. 10, p. 749

ECKERT, J.W. **Post-harvest diseases of citrus fruits**. Agriculture Outlook,1993. Cap. 54: 225-232

FERNANDES, T.A.; OLIVEIRA, M.C.; BATISTA, F.C.; RIBEIRO V.P.; GOMES, E.A.; VALICENTE, F.H.; PAIVA, C.A.O. **Potencial multifuncional de isolados de Bacillus**

**thuringiensis para controle de fungos fitopatogênicos e promoção de crescimento vegetal.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Milho e Sorgo, 2019, 198 p. ISSN 1679- 0154.

FERREIRA, L. S. **Perdas pós-colheita de hortifrutis, em sete municípios maranhenses inseridos em diferentes microrregiões.** 2019. 44f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, 2019.

FISCHER, I. H.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. **Doenças pós-colheita em citros e caracterização da população fúngica ambiental no mercado atacadista de São Paulo.** Tropical Plant Pathology, Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia. 2008. V. 33, n. 3, p. 219-226.

FONTES, E.M.G.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Controle biológico de pragas da agricultura.** Brasília, DF: Embrapa, 2020. 510p.

GABARDO, G; PRIA, M. D; PRESTES, A. M. C; SILVA, H. L. ***Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* como antagonistas no crescimento de fungos fitopatogênicos *in vitro*.** Brazilian Journal of Development: Ponta Grossa - PR, 2020.

GODOY, C. V; SEIXAS, C. D. S; MEYER, M. C; SOARES, R. M. **Ferrugem asiática de soja.** Londrina: Embrapa Soja (Documento 428) 2014.

GOMES, E.V.; DO NASCIMENTO, C. M.; DE PAULA, R.G.; DE AZEVEDO, R.R.; SILVA, F.L.; NORONHA, E.F.; ULHOA, C.J.; MONTEIRO, V.N.; CARDOZA, R.E.; GUTIÉRREZ, S.; et al. **The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self-cell wall protection.**2015.

GUERRA, A. M. N. M.; FERREIRA, J. B. A.; COSTA, A. C. M.; TAVARES, P. R. F.; MARACAJÁ, P. B. **Perdas pós-colheita em tomate, pimentão e cebola no mercado varejista de Santarém – PA.** Revista Agropecuária Científica no SemiÁrido, v. 10, p. 08-17, 2014.

GULLINO, M.L. **Lotta biologica a funghi agenti di marciumi della frutta in post-raccolta.** Informatore Fitopatologico, 1994. 4:5-13.

HANSEN, B.M; SALAMITOU, S; CHARLES, J. F; DELÉCLUSE, A; LE ROUX, C. N. **Virulence of *Bacillus thuringiensis*.** Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Holanda: Kluwer Academic Publishers. 2000. pp.41–44

HARMAN G. **Myths and dogmas of control. Changes in perceptions** derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 2000

HOHMANN, F.; KUNZ, M. D.; VANDRESEN, D. F. **Análise da atividade antibacteriana da kombucha em chá preto e verde**. *Revista de Iniciação Científica e Extensão*, 2020. V. 3, n. 2,

HUME, C.P.B.P. **Kombucha artesanal e comercial: aspectos microbiológicos e parâmetros físico-químicos**. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Nutrição), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto-MG, 2021.

JAKLITSCH, W. M. **European species of Hypocrea Part I. The green-spored species. Studies in Mycology**. Viena, 2009. v. 63, p. 1-91

JAYABALAN, R.; MALBASA, R. V.; LONCAR, E. S.; VITAS, J. S.; SATHISHKUMAR, M. A. **A Review on Kombucha Tea: Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus**. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. Estados Unidos: Wiley Subscription Services, 2014. V.13, p. 538–550

JÚNIOR, A. G., DOS SANTOS, Á. F., AUER, C. G. **Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais**. Curitiba: Floresta, 2000. V. 30, n. 1/2

KLOEPPER, J. W. **Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases**. *Australasian Plant Pathology*, Rockhampton, 1999. v. 28, n. 1, p. 21-26.

KOCHMAN, J. K. **Effect of temperature on development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*)**. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 30, p. 273-277, 1979.

KREDICS, L.; CHEN, L.; KEDVES, O.; BÜCHNER, R.; HATVANI, L.; ALLAGA, H.; VÁGVÖLGYI, C. **Molecular Tools for Monitoring *Trichoderma* in Agricultural Environments**. *Frontiers in Microbiology*, 2018.

KUBICEK, C. P.; HERRERA-ESTRELLA, A.; SEIDL-SEIBOTH, V. *et al.* **Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral lifestyle of *Trichoderma***. Vienna: *Genome Biology*, 2011.

KUPPER, K.C.; FERNANDES, N. G; GOES, A. de. **Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos**.



Fitopatologia Brasileira. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2003. v. 28, p.251-257.

KWON, J. H; KANG, S. W; KIM, J. S; PARK, C. S. **Rhizopus Soft Rot on Cherry Tomato Caused by Rhizopus stolonifer in Korea**. Mycobiology, 2001. V. 29, n. 3, p. 176–178.

LANE, D.E.; WALKER, T.J.; GRANTHAM, D.G. **IPM Adoption and Impacts in the United States**. J. Integrated Pest Management, 2023.

LARA, L.L.S. **Análise da composição química do óleo essencial da casca de Zanthoxylum riedelianum e avaliação de sua atividade antifúngica**. 2020. Dissertação (Mestre em agroquímica) - Instituto Federal Goiano - Rio Verde, 2020.

LEAL, M., SUAREZ, V., JAYABALAN, R., OROS, H., ESCARLANTE-ABURTO, A., 2018. **A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites**. CyTA - Journal of Food. Abingdon: Taylor & Francis, 2018. V. 16, n. 1, p. 390–399.

MAGALHÃES L. A; HEINRICH L. P; **Trichoderma: uso na agricultura: O gênero Trichoderma**. Brasília-DF: Embrapa, 2019. Cap 3, 164-165 p.

MCSPADDEN GARDENER, B.B., FRAVEL, D.R. **Biological control of plant pathogens: research, commercialization, and application in the USA**. Plant Health, 2002.

MEDEIROS, F. H. V.; SILVA, J. C. P.; PASCHOLATI, S. F. **Manual de Fitopatologia. 5 ed**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2018. Cap. 17.2, v. 1, p. 261.

MELO, I. S; AZEVEDO, J. L. **Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos**. Controle biológico. Jaguariúna: Embrapa, CNPMA, 1998. p. 17- 67

MÉNDEZ-ÚBEDA, J. M; HERNÁNDEZ, M. S. F; PÁRAMO-AGUILERA, L.A. **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACILLUS subtilis Y EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO IN VITRO FRENTE HONGOS FITOPATÓGENOS**. Nexo Revista Científica: Manáguá, 2017. Vol. 30, No. 02, p. 96-110.

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de Fitopatologia**. Recife-PE: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2001.

MONNERAT, R.; MONTALVÃO, S.; QUEIROZ, E. M.; QUEIROZ, P. M.; SILVA, E. Y. Y.; GARCIA, A.; CASTRO, M.; ROCHA, G. T.; FERREIRA, A. D. C.; GOMES, A. C. M. M. **Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero Bacillus para uso na agricultura**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020. 46 p. (Documentos, 369).

MONTE E; BETTIOL W; HERMOSA R; **Trichoderma: uso na agricultura**: Trichoderma e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas, Brasília-DF : Embrapa, 2019. Cap 4, 182-185 p.

MONTE, E. **Understanding Trichoderma: between biotechnology and microbial ecology**. Salamanca: International Microbiology, 2001. v. 4, n. 1, p. 1-4

NAWROCKA, J.; MAŁOLEPSZA, U. **Diversity in plant systemic resistance induced by Trichoderma**. Biol. Control 2013, 149–156.

NEVES, L. C. **Manual pós-colheita da fruticultura brasileira**. 1. ed. Londrina: EDUEL, 2016, p. 518.

OLIVEIRA, A. A. R.; SANTOS FILHO, H. P. **Podridão de Rhizopus**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2007. Disponível em: [https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPMPF/24011/1/mamao\\_26.pdf](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPMPF/24011/1/mamao_26.pdf).

Acesso em: 22 de julho de 2023.

OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M. C.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; SCOTTI, M. R.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; SÁ, N. M. H. **Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome**. Soil Biology and Biochemistry. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. v. 41, n. 9, p. 1782-1787.

OLIVEIRA, S. M. A. et al. Patologia Pós-colheita. In: OLIVEIRA, S. M. A. et al. **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2006. 855 p.

PAL, K.K., GARDENER, B.M. **Biological control of plant pathogens**. Plant Health, 2006. 1117–1142.

PARRA, J. R. P. (2014). **Biological Control in Brazil: An overview**. Scientia Agricola, 2014.

PASSARI, A. K.; MISHRA, V. K.; ZOTHANSANGA, R.; KUMAR, N. S.; SINGH, B. P. **Biocontrol activity of Phosphate-solubilizing Bacillus thuringiensis (Bt) strains isolated from rhizosphere soil.** Science & Technology Journal of Mizoram University, v. 2, n. 2, p. 6-12, 2014.

PAULL, R.E., NISHIJIMA, W., REYES, M.; CAVALETTO, C.C. **Postharvest handling and losses during marketing of papaya (*Carica papaya* L.).** Postharvest Biology and Technology, 1997. V.11:165-179.

POLANCZYK, R.A; ALVES, S. **Estudos de Bacillus thuringiensis Berliner visando ao controle de Spodoptera frugiperda.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2004.

PRUSKY, D. PUMBLEY, R. A. **Quiescent infections of Colletotrichum in tropical and subtropical fruits.** *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control.* Wallingford, Inglaterra, 1992.

RINALDI, M. M. **Perdas pós-colheita devem ser consideradas.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011, p. 15-17.

RODRIGUES, R. S.; MACHADO M. R. G.; BARBOZA G. G. R.; SOARES L. S.; HEBERLE T.; LEIVAS Y. M. **Características físicas e químicas de kombucha à base de chá de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*, L.).** In: Simposio de Segurança Alimentar, 6, 2018, Gramado. Anais. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2018.

SANTOS, K.; VIEIRA, W. **Destino final: o lixo. Comunicado especial:** Abastecer Brasil, Associação Brasileira das Centrais de Abastecimento, 2011. n. 5, p. 8-12.

SCARIOT, G. N. **Óleos essenciais no controle de mofo cinzento e podridão mole e seus efeitos na qualidade pós-colheita de morango.** 2013. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Agronomia). Universidade Federal do Paraná: Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo. Curitiba, 2013.

SCHNEPF, H.E, CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D.R. & DEAN, D.H. **Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins.** Microbiology and Molecular Biology Review, American Society for Microbiology, 1998.

SILVA, J.R. C; SOUZA, R. M.; ZACARONE, A.B.; SILVA, L.H.C.P.; CASTRO, A.M.S. **Bactérias endofíticas no controle e inibição in vitro de Pseudomonas syringae pv. tomato, agente da pinta bacteriana do tomateiro.** Lavras: Ciência e Agrotecnologia, 2008. v.32, p.1062-1072,

SILVA, L. R. **Perdas pós-colheita de frutas na microrregião de Chapadinha, Maranhão–Brasil.** 2017. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, 2017.

SINCLAIR, J.B.; HARTMAN, G.L. **Management of Soybean Rust.** In: soybean rust workshop. 1995. College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences, 1995.

SMITH, H. S. **On some phases of insect control by the biological method.** *Journal of Economic Entomology*, [S.l.], 1919. V. 12, n. 47, p. 288-292,

SOUZA, J. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; LUZ, J. M. Q.; AMARAL, C. L. F.; FIGUEIREDO, R. M. SANTANA, C. M. **Potencialidade de fungicidas biológicos no controle de requeima do tomateiro.** *Horticultura Brasileira*. v. 32. p. 115-119, 2014.

SPATAFORA, J. W. et al. **A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data.** *Mycologia*. Inglaterra: Taylor & Francis, 2016. v. 108, n. 5, p. 1028–1046.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas ( $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase) por fermentação no estado sólido.** 2005. 178p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

TANAKA, M. A S.; BETTI, J. A; KIMATI, H. **Manual de Fitopatologia: Doenças do Morangueiro.** 4. ed. Doenças de Plantas Cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 556 -571.

TEOH, A.L.; HEARD, G.; COX, J. **Yeast ecology of Kombucha fermentation.** *International Journal of Food Microbiology*. Amsterdã: Elsevier B.V, 2004. V.95, p. 119–126.

van LENTEREN, J. C. **IOBC Internet Book of Biological Control, version 6,** 2012. Cap 12. 94 p.

VIDOTTO, J. C. D.; FERREIRA, D. E.; MOREIRA, V. A. R.; AGUIAR, A. B. Q.; BAGAGLI, M. P. **Comparação entre meios de cultura aplicados na produção de**

**bactérias bacillus thunringiensis para uso na agricultura.** In: 13º Congresso de Inovação Ciência e Tecnologia (CONICT), São Paulo, 2022.

VUKMANOVIĆ S.; VITAS J.; RANITOVIĆ, A.; CVETKOVIĆ, D.; TOMIĆ, A.; MALBAŠA, R. **Certas variáveis de produção e atividade antimicrobiana do novo kombucha à base de efluente de vinícola,** Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie - Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 154, 2022.

WANG, R.; AHMAD, A., DU, H.; XU, X.; ZHANG, Y.; YAO, C.; ZHONG, Y.; WU, T. **First Report of Rot Disease Caused by *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* on Leaf Mustard (*Brassica juncea*) in Guangzhou, China.** Plant Disease, 104:7, p. 2029-2029, 2020.

WATAWANA, M. I; JAYAWARDENA, N.; GUNAWARDHANA, C. B; WAISUNDARA, V.Y. **Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha.** Journal of Chemistry. Sri Lanka: Hindawi, 2015.v. 2.015, p. 1-11.

WOO, S. L.; RUOCCO, M.; VINALE, F.; NIGRO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; LORITO, M. **Trichoderma-based products and their widespread use in agriculture.** Portici: The Open Mycology Journal, 2014. v. 8, n. 1.

YAHAYA, S., MARDIYYA, A., 2019. **Review of Post-Harvest Losses of Fruits and Vegetables.** Biomedical Journal of Scientific & Technical Research, 2019.

YAHIA, E. M.; FONSECA, J. M.; KITINOJA, L. Postharvest Losses and Waste. In: YAHIA, E. M. (Eds). **Postharvest Technology of Perishable Horticultural Commodities.** 1. ed. Woodhead Publishing, p. 43-69, 2019.

YANG, C.H., CROWLEY, D.E., MENGE, J.A. **DNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and Phytophthora infected avocado roots.** FEMS Microbiol, 2001. Ecol. 35, 129–136.

YUNIARTO, A.; ANGGADIREDDA, K.; ANNISA NUR AQIDAH, R. **Antifungal activity of kombucha tea against human pathogenic fungi.** Embase Indexed Journals, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 253–255, 2016.

ZHENG R. Y.; CHEN, G. Q; HUANG, G.; LIU, X. Y. **A monograph of Rhizopus. Sydowia,** 2007. V. 59, n. 2, p. 273–372.

