

Inibição *in vitro* de fungos toxigênicos por *Pichia* sp. e *Debaryomyces* sp. isoladas de frutos de café (*Coffea arabica*)

Darlê Martins Barros Ramos¹, Cristina Ferreira Silva^{2*}, Luís Roberto Batista³ e Rosane Freitas Schwan²

¹Faculdades Unidas do Norte de Minas, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. ²Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Cx Postal 3037, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil. ³Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: cristinafsb@dbi.ufla.br

RESUMO. O café é um produto nacional com grande expressão para a economia brasileira. O uso excessivo de fungicidas tem levado a pesquisas sobre formas alternativas como o controle biológico. Objetivou-se avaliar o potencial antagonístico de leveduras em co-cultivo com fungos filamentosos. Isolados das espécies *Debaryomyces hansenii* (UFLACF 889 e UFLACF 847) e *Pichia anomala* (UFLACF 710 e UFLACF 951) foram inoculados (10^3 a 10^6 células mL⁻¹) com três espécies de fungos filamentosos, *Aspergillus ochraceus*, *A. parasiticus* e *Penicillium roqueforti* (10^3 a 10^6 esporos mL⁻¹). A avaliação do crescimento micelial e a contagem de esporos foram realizadas durante 21 dias. Observou-se que o isolado UFLACF 889 apresentou, em média, maior efeito inibitório na produção de esporos de *A. ochraceus* (inibição de 82%) e *P. roqueforti* (74%). O isolado UFLACF 710 inibiu a produção de esporos, em média, 60 e 75,6% de *A. ochraceus* e *P. roqueforti*, respectivamente. *A. parasiticus* foi o fungo mais resistente à inibição pelas leveduras. O crescimento micelial não foi inibido pela presença da levedura em co-cultivo. Portanto, pode-se concluir que leveduras em cultivo pareado com fungos filamentosos são capazes de inibir a produção de esporos e, potencialmente, diminuir a disseminação destes fungos no processamento de café.

Palavras-chave: leveduras, fungos filamentosos, biocontrole, café, *Debaryomyces*, *Pichia*.

ABSTRACT. *In vitro* inhibition of toxigenic filamentous fungi by *Pichia* sp. and *Debaryomyces* sp. isolates from coffee (*Coffea arabica*) fruits. Coffee is a national product with great importance for the Brazilian economy. The excessive use of pesticides led to research for alternative forms, such as biological control. The objective of this work was to assess the potential antagonistic effect of yeast in dual-culture with filamentous fungi. Isolates of *Debaryomyces hansenii* (UFLACF 889 and UFLACF 847) and *Pichia anomala* (UFLACF 710 and UFLACF 951) species were inoculated (10^3 to 10^6 células mL⁻¹) with three species of filamentous fungi, *Aspergillus ochraceus*, *A. parasiticus* and *Penicillium roqueforti* (10^3 to 10^6 spores mL⁻¹). The assessment of mycelial growth and counting of spores was done for 21 days. It was observed that the isolated UFLA CF 889 attained, on average, the greatest inhibitory effect on the spore production of *A. ochraceus* (inhibition of 82%) and *P. roqueforti* (74%). The isolated UFLA CF 710 inhibited the spore production, on average, 60 and 75.6% of *A. ochraceus* and *P. roqueforti*, respectively. The fungus *A. parasiticus* was the most resistant to inhibition by yeasts. The mycelial growth was not inhibited by the presence of yeast in dual-culture. It could be concluded that yeast in dual-culture with filamentous fungi were able to inhibit the production of spores and potentially reduce the spread of this fungus during coffee processing.

Key words: yeasts, filamentous fungi, biocontrol, coffee, *Debaryomyces*, *Pichia*.

Introdução

A cafeicultura é uma importante atividade agrícola para o Brasil, e o Estado de Minas Gerais produz aproximadamente 50% da produção nacional. Com menor expressão qualitativa atualmente no mercado mundial, porém ainda com volume de exportação significativo, a comercialização do café brasileiro tem

sofrido algumas restrições de compra nos mercados importadores. Um dos fatores que determina o preço do café é a qualidade. A qualidade do café envolve aspectos sensoriais e sanitários. Neste aspecto, a ausência de fungos filamentosos potencialmente toxigênicos e de micotoxinas nos grãos de café é condição prioritária para que o café brasileiro assuma o primeiro lugar nas exportações desta *commodity*.

O controle biológico microbiano pode ser utilizado principalmente em culturas perenes, como a cultura do café, tendo como princípio a competição microbiana (TIMMS-WILSON et al., 2004). As leveduras apresentam características que as tornam promissoras para utilização como agentes de biocontrole, tais como: i) não produzem esporos alergênicos e não produzem toxinas como fazem os fungos filamentosos; ii) não sintetizam antibióticos como as bactérias (DROBY; CHALUTZ, 1994); iii) exigem nutrientes simples, podendo, inclusive, ser utilizados resíduos de indústrias como fonte de carbono (FREDLUND et al., 2002); e iv) não apresentam riscos ao consumidor (PASSOTH et al., 2006).

A ação antagonista que algumas espécies de leveduras exercem sobre o desenvolvimento de fungos filamentosos tem sido explorada por alguns autores, especialmente para utilização em grãos armazenados (MASOUD; KALTOF, 2006; PETERSON; SCHNÜRER, 1998; PETERSSON et al., 1998). Petersson e Schnürer (1998) relataram a ação antagonista de *Pichia anomala* sobre o desenvolvimento de *Penicillium roqueforti* em centeio, trigo e cevada armazenados em condições inadequadas de umidade e observaram que a levedura foi capaz de inibir totalmente o crescimento do fungo a uma concentração celular de 5×10^4 UFC g⁻¹.

No Brasil, o processamento dos frutos de café é realizado quase que na sua totalidade pelo processamento seco, resultando nos cafés naturais. Neste processamento, os frutos de café podem sofrer contaminação fúngica na árvore, durante o processamento dos frutos e armazenamento dos grãos (BATISTA et al., 2003; SILVA et al., 2003). Fungos filamentosos da seção *Flavi* e do gênero *Penicillium* podem ser potencialmente toxigênicos e são frequentemente isolados de frutos e grãos de café (BATISTA et al., 2003; SILVA et al., 2000; TANIWAKI et al., 2003). Apesar de Batista et al. (2003) afirmarem que a presença do fungo potencialmente toxigênico não é indicativo de produção de toxinas, este risco deve ser evitado.

Leveduras, além de fungos filamentosos, são microrganismos presentes naturalmente em frutos de café (SILVA et al., 2000). Este trabalho teve como objetivo a avaliação do grau de desenvolvimento de fungos potencialmente toxigênicos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em cultivo pareado com *Debaryomyces hansenii* e *Pichia anomala* isolados de frutos e grãos de café processados via seca.

Material e métodos

Microrganismos

As leveduras foram isoladas da superfície de frutos e grãos de café processados via seca (SILVA et al., 2000) e são pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia (UFLA).

Foram utilizados quatro isolados de leveduras, sendo os isolados UFLACF 710 e UFLACF 951 pertencentes à espécie *Pichia anomala* e os isolados UFLACF 889 e UFLACF 847 da espécie *Debaryomyces hansenii*. As leveduras preservadas a -80°C foram reativadas em meio MEA (Malt Extract Agar) contendo em g L⁻¹: extrato de malte 20, peptona bacteriológica 1, glicose 10 e ágar 20, pH 5,6. As culturas foram incubadas a 28°C por 24h. Após este período, foi realizada suspensão de células a serem utilizados no teste *in vitro*.

Os isolados de *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus* e *Penicillium roqueforti* foram isolados a partir do plaqueamento direto dos grãos de café (BATISTA et al., 2003) e pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia e Micotoxinas do Departamento de Ciência dos Alimentos (UFLA).

Os isolados de fungos filamentosos foram estocados em meio YEPG (g L⁻¹: extrato de levedura 10; peptona 20; glicose 20; ágar 15) e reativados em meio MEA, com inoculação pontual, no centro da placa, e incubados a 28°C por cinco dias. Após este período, foi realizada suspensão de esporos a serem utilizados no teste *in vitro*.

Ensaios *in vitro*

Foi realizada uma suspensão de células de leveduras e ajustadas as concentrações a fim de se obter de 10^3 a 10^6 células mL⁻¹. O mesmo procedimento foi realizado com os isolados de fungos filamentosos. As concentrações de células e de esporos dos fungos filamentosos foram obtidas a partir da contagem em Câmara de Neubauer. Cada concentração de células de leveduras foi testada com cada concentração de esporos; foram plaqueadas, em meio MEA, pontualmente, alíquotas de 100 µL de cada concentração a ser testada, distantes 4 cm. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

A Tabela 1 apresenta a esquematização dos ensaios.

Tabela 1. Esquema dos ensaios realizados para avaliar o efeito antagônico de duas espécies de leveduras sobre o desenvolvimento de fungos potencialmente toxigênicos com diferentes concentrações celulares.

Fungos	Leveduras							
	<i>D. hansenii</i> (células mL ⁻¹)				<i>P. anomala</i> (células mL ⁻¹)			
	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
<i>A. parasiticus</i> (esporos mL ⁻¹)	10 ³	x	x	x	x	x	x	x
	10 ⁴		x	x	x		x	x
	10 ⁵			x	x		x	x
	10 ⁶				x		x	x
<i>A. ochraceus</i> (esporos mL ⁻¹)	10 ³	x	x	x	x	x	x	x
	10 ⁴		x	x	x		x	x
	10 ⁵			x	x		x	x
	10 ⁶				x		x	x
<i>P. roqueforti</i> (esporos mL ⁻¹)	10 ³	x	x	x	x	x	x	x
	10 ⁴		x	x	x		x	x
	10 ⁵			x	x		x	x
	10 ⁶				x		x	x

As placas inoculadas foram incubadas em B.O.D., a 28°C, por até 21 dias.

Cada isolado de fungo filamentoso foi inoculado em ponto no meio MEA, a partir da suspensão de esporos das concentrações testadas e mantidas nas mesmas condições de cultivo que os ensaios, porém sem a inoculação das leveduras. Estas placas foram consideradas como testemunhas.

Avaliação do crescimento vegetativo

Para avaliação do crescimento vegetativo micelial, foram realizadas medidas do diâmetro (cm) da colônia. Estas medidas foram realizadas aos sete, 14 e 21 dias após a inoculação, utilizando-se um paquímetro e considerando-se o diâmetro a partir do ponto de inoculação.

Avaliação da produção de esporos

A contagem de esporos foi realizada após 21 dias. Com o auxílio de um estilete, foram retirados três cortes de 7 mm da colônia do fungo, à distância de 2,5 cm da colônia da levedura, e três cortes da colônia fúngica em contato com a colônia leveduriforme. Estes cortes foram colocados em tubos de ensaio com 10 mL de água estéril + Tween 20 e agitados. Logo em seguida, foi feita a contagem de esporos em Câmara de Neubauer, sendo realizadas diluições quando necessárias. A porcentagem de inibição da produção de esporos pelos fungos testados foi obtida considerando como 100% de produção a contagem de esporos realizada na suspensão obtida sem contato com a colônia de levedura.

Análise estatística

Foram comparadas as médias de inibição da produção de esporos utilizando-se o teste de

Tukey (p < 0,05), por meio do software Statistica versão 6.0.

Resultados e discussão

Frutos e grãos são amplamente contaminados por fungos filamentosos e apresentam riscos à saúde humana. Quando se trata de fungos potencialmente toxigênicos, a contaminação do alimento deve ser evitada, uma vez que as toxinas podem apresentar efeitos carcinogênicos e teratogênicos (BATISTA et al., 2003; LA PENNA et al., 2004).

As duas espécies de leveduras testadas quanto ao potencial efeito inibitório no desenvolvimento de fungos filamentosos apresentaram diferenças no grau de inibição da produção de esporos das diferentes espécies de fungos filamentosos (Tabela 2). Observa-se que há diferença no grau de inibição de cada isolado de levedura, em relação à espécie fúngica.

Observou-se que as leveduras inibiram a esporulação, mas não causaram interferência no crescimento micelial (Figura 1). Os isolados de *D. hansenii* foram os mais efetivos, inibindo, em média, 32% da esporulação, enquanto os isolados de *P. anomala* inibiram a esporulação, em média, 27%. Microrganismos usados como agentes do controle biológico podem agir impedindo que estruturas ou mecanismos de virulência sejam desencadeados sem interferir no crescimento do microrganismo patogênico. Dong et al. (2004) relataram que a presença de *Bacillus thuringiensis* inibiu o desenvolvimento da virulência de *Erwinia carotovora*, mas não impediu seu crescimento na planta.

Tabela 2. Inibição (%) de *Pichia anomala* (UFLACF 710 e 951) e *Debaryomyces hansenii* (UFLACF 847 e 889) na produção de esporos de *Aspergillus ochraceus*, *A. parasiticus* e *Penicillium roqueforti*.

	<i>P. anomala</i>		<i>D. hansenii</i>	
	UFLACF 710	UFLACF 951	UFLACF 847	UFLACF 889
<i>A. ochraceus</i>	60,3 bB	31,3 aC	-	82aA
<i>A. parasiticus</i>	23,5 cA	29,6 aA	33 aA	31,6 bA
<i>P. roqueforti</i>	75,6 aA	32 aB	28,6aB	74,1aA

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p > 0,05). Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p > 0,05).

Os isolados que apresentaram melhor efeito antagônico foram os isolados UFLACF 889 (*D. hansenii*) e o isolado UFLACF 710 (*P. anomala*), que inibiram, em média, 82 e 60,3% da produção de esporos de *A. ochraceus* e 74,1 e 75,6% da produção de esporos de *P. roqueforti*, respectivamente. *A. parasiticus* foi o isolado fúngico que menos apresentou efeito inibitório das espécies antagonistas, apresentando, em média, decréscimo na produção de esporos de 29%.

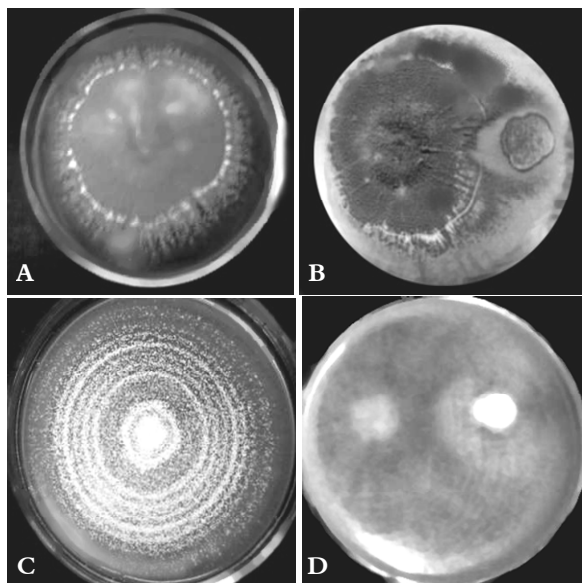


Figura 1. (A) Colônia de *Penicillium roqueforti* crescido em meio MEA, a 28°C, por 21 dias. (B) Cultivo pareado de *P. roqueforti* com *Debaryomyces hansenii* (UFLACF 847). (C) Colônia de *Aspergillus ochraceus*. (D) Cultivo pareado de *A. ochraceus* com *Pichia anomala* (UFLACF 951) evidenciando a inibição da produção de esporos.

O isolado UFLACF 889 inibiu até 98,4% da produção de esporos de *A. ochraceus* e 52,4% em *A. parasiticus*. O mesmo isolado leveduriforme foi capaz de inibir 85,3% da produção de esporos de *P. roqueforti* (Tabela 3). O isolado UFLACF 847 inibiu a produção de esporos em 52,6% em *A. parasiticus* (máxima inibição observada para este isolado fúngico) e 66,7% da produção de esporos de *P. roqueforti*.

Tabela 3. Inibição (%) da produção de esporos de *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium roqueforti*, com concentração de 10^3 a 10^6 esporos mL^{-1} , em cultivo pareado com *Debaryomyces hansenii* (UFLACF 889) em diferentes concentrações do inóculo (células mL^{-1}).

<i>D. hansenii</i> (células mL^{-1})	<i>A. ochraceus</i> (Esporos mL^{-1})			
	10^3 %	10^4 %	10^5 %	10^6 %
10^3	98,0	89,6	79,2	83,3
10^4	81,6	73,0	98,0	98,4
10^5	75,0	92,3	83,3	86,5
10^6	93,3	91,0	-	87,5
<i>D. hansenii</i> (células mL^{-1})	<i>P. roqueforti</i> (Esporos mL^{-1})			
	10^3 %	10^4 %	10^5 %	10^6 %
10^3	45,5	77,4	75,9	68,9
10^4	76,7	83,3	69,7	81,8
10^5	75,0	85,3	73,2	76,9
10^6	76,9	75,9	73,3	69,9

Não foi possível estabelecer padrão de inibição para esses isolados; entretanto, quando a concentração de células de leveduras foi menor que a concentração de esporos, observou-se tendência de

menor efeito de inibição, embora estatisticamente não-significativa ($p > 0,05$). Ou seja, independentemente da concentração de células do antagonista, houve inibição da produção de esporos. Masoud e Kaltoft (2006) observaram que com o aumento da concentração de células de leveduras de 10^4 para 10^6 células mL^{-1} também ocorreu aumento da inibição sobre o crescimento de *A. ochraceus*, em testes *in vitro*.

A concentração celular inicial do microrganismo antagonista parece ser um dos fatores que interfere no grau de inibição. Essa afirmação pode ser comprovada neste trabalho, pois, uma vez que a concentração de células de leveduras foi menor que a concentração de esporos testados nos ensaios, a produção de esporos durante o desenvolvimento da colônia foi fracamente inibida em torno de 0 a 6%.

A comercialização e o consumo de frutos de café brasileiro sofrem restrição no mercado mundial pelas frequentes contaminações por fungos potencialmente toxigênicos e por micotoxinas (TANIWAKI et al., 2003).

Os esporos são estruturas reprodutivas assexuadas de fungos filamentosos que também podem apresentar acúmulo de toxinas (DE PEÑA; HERRERA, 1997). Em cafés brasileiros, foi observado que 75% dos isolados de *A. ochraceus* eram produtores de ocratoxina A (OTA) (TANIWAKI et al., 2003); portanto, o controle de seu desenvolvimento é uma alternativa para incremento da qualidade sanitária dos frutos e grãos de café.

As leveduras podem atuar na descontaminação de produtos com micotoxinas (SHETTY; JESPERSEN, 2006). Para a cultura do café, em especial quando o processamento dos frutos é realizado via seca e em regiões onde há maior índice pluviométrico durante a colheita e secagem dos frutos em terreiros, o controle preventivo da contaminação dos frutos é dificultado. Sendo assim, a ação descontaminante das leveduras sobre as toxinas fúngicas representa uma alternativa para a comercialização segura dos grãos de café. Muitos países desenvolvidos já apresentam normas rígidas para a comercialização de produtos agrícolas sujeitos a riscos de contaminação. Porém, em países em desenvolvimento, a falta de legislação, a pobreza e a má nutrição favorecem o consumo de alimentos contaminados, o que compromete a saúde da população (SHETTY; JESPERSEN, 2006).

As duas espécies de leveduras aqui testadas (*Pichia anomala* e *Debaryomyces hansenii*) e outras espécies dos gêneros *Saccharomyces*, *Candida* e *Zygosaccharomyces* já foram relatadas em literatura quanto ao potencial de descontaminação de

alimentos contaminados com aflatoxina B1, por meio da adsorção destas moléculas (SHETTY; JESPERSEN, 2006).

Os dois isolados de *Pichia anomala* apresentaram efeito inibitório semelhante ou inferior, quando comparados com os isolados de *D. hansenii*. Estudos sobre o efeito inibitório da espécie sobre o desenvolvimento de fungos deterioradores de grãos foi realizado por Fredlund et al. (2002), e por Passoth et al. (2006), que verificaram os possíveis mecanismos de ação antifúngica da levedura. Estes autores observaram que a competição por substrato não seria o fator de inibição de *P. anomala* no desenvolvimento de *P. roqueforti* e concluíram que possivelmente o modo de ação de *P. anomala* seja a produção de acetato de etila durante o seu crescimento. Durante a fase inicial do crescimento lag, foi observado que houve menor produção de acetato de etila. A concentração inicial de células está entre os parâmetros que podem interferir no período da fase lag e que poderiam estender esta fase, inibindo a produção de acetato de etila. Masoud et al. (2005) avaliaram o efeito inibitório de compostos produzidos por leveduras predominantes isoladas de café e observaram que o crescimento e a produção da ocratoxina A foram fortemente inibidos pelo acetato de etila.

É difícil prever o possível modo de ação antifúngica dos isolados de *P. anomala* testadas neste trabalho; parece evidente, no entanto, que a competição por nutrientes, produção de substâncias Killer e produção de 1,3 β glucanase não foram responsáveis pelos mecanismos inibitórios. Grevesse et al. (2003) estudaram a ação de exoglucanase produzida por *P. anomala* como agente inibitório. O isolado de *Pichia anomala* (UFLACF 710) apresentou maior eficiência de inibição (75,6%) sobre a esporulação de *P. roqueforti* e houve maior inibição quando a concentração de células do antagonista era de 10^4 células mL⁻¹ (Tabela 4). Droby et al. (1999) relataram o crescimento e a eficiência antagonista de *Pichia anomala* sobre a germinação dos esporos de *Penicillium digitatum* isolados de pomelo. Alguns isolados da levedura inibiram em 70% ou mais a infecção por *P. digitatum*; outros foram capazes até mesmo de proteger integralmente o fruto da infecção pelo fungo. Em escala piloto e testes comerciais, a viabilidade da produção e da aplicação da biomassa leveduriforme já foram testadas por Droby et al. (1993; 1998), que utilizaram substratos de resíduos de indústria como semente de algodão e líquido de maceração do milho. Recentemente, já há

disponível no mercado produtos comerciais que contem leveduras antagonistas como *Candida saitoana* (CASTORIA et al., 2008).

Testes seletivos de microrganismos com potencial efeito inibitório sobre o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos podem ser realizados *in vitro* e em bioensaios, utilizando-se diferentes técnicas. Saligkarias et al. (2002) avaliaram o potencial antagonista de *C. guilliermondii* sobre o desenvolvimento de *Botrytis cinerea* em tomates e observaram que, o maior efeito inibitório foi conseguido quando a levedura foi inoculada 24h antes da inoculação de *B. cinerea*, sugerindo que a competição por nutrientes pode estar envolvida com o modo de ação.

Tabela 4. Inibição da produção de esporos de *Penicillium roqueforti*, com concentração de 10^3 a 10^6 esporos mL⁻¹, em cultivo pareado com *Pichia anomala*, (UFLACF 710) em diferentes concentrações do inóculo (células mL⁻¹).

<i>Pichia anomala</i> (células mL ⁻¹)	<i>Penicillium roqueforti</i> (esporos mL ⁻¹)			
	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
	%	%	%	%
10 ³	65,0cA	66,7cA	69,7acA	64,3bA
10 ⁴	81,6bA	69,0 cB	55,0dC	86,4aA
10 ⁵	85,2abA	85,7aA	86,0aA	84,7aA
10 ⁶	88,1aA	76,2bB	78,2bB	67,2bC

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p > 0,05). Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p > 0,05).

Neste trabalho, a inoculação dos isolados de leveduras foi realizada concomitantemente à inoculação dos isolados de fungos filamentosos, distantes 4 cm, permitindo que ambos os isolados se desenvolvessem antes do contato direto da colônia de levedura com a de fungo filamentoso, o que aconteceu, em média, sete dias após a inoculação. Isto poderia justificar o maior efeito inibitório de isolados de leveduras sobre a esporulação do que no desenvolvimento micelial. A concentração do inóculo do antagonista e o grau de inibição parecem ser fatores diretamente proporcionais, ou seja, quanto maior a concentração do inóculo da espécie antagonista maior o efeito inibitório sobre a esporulação.

Conclusão

Este estudo revelou que espécies de *Pichia* e *Debaryomyces* podem reduzir a esporulação de fungos potencialmente toxigênicos e naturalmente presentes em frutos de café.

Agradecimentos

Os autores agradecem à pesquisadora Dra. Carla L. S. Ávila a ajuda nas análises estatísticas.

Referências

- BATISTA, L. R.; CHALFOU, N. S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 293-300, 2003.
- CASTORIA, R.; WRIGHT, S. A. I.; DROBY, S. Biological control of mycotoxigenic fungi in fruits. In: BARKAI-GOLAN, R.; PASTER, N. (Ed.). **Mycotoxin in fruits and vegetables**. San Diego: Academic Press, 2008. p. 311-334.
- DE PEÑA, D. G.; HERRERA, J. R. Relationship between aflatoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus parasiticus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 21, n. 2, p. 198-205, 1997.
- DONG, Y. H.; ZHANG, X. F.; XU, J. L.; ZHANG, L. H. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 954-960, 2004.
- DROBY, S.; CHALUTZ, E. Mode of action of biocontrol agents for postharvest diseases. In: **Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables - Theory and Practice**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 63-75.
- DROBY, S.; COHEN, L.; DAUS, A.; WEISS, B.; HOREV, B.; CHALUTZ, E.; KATZ, H.; KEREN-TZUR, M.; SHACHNAI, A. Commercial testing of aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. **Biological Control**, v. 12, n. 2, p. 97-101, 1998.
- DROBY, S.; HOFSTEIN, R.; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M.; FRIDLERNER, B.; COHEN, L.; WEISS, B.; DAUS, A.; TIMAR, D.; CHALUTZ, E. Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: a biocontrol agent of Postharvest diseases of citrus fruit. **Biological Control**, v. 3, n. 1, p. 47-52, 1993.
- DROBY, S.; LISCHINSKI, S.; COHEN, L.; WEISS, B.; DAUS, A.; CHAND-GOYAL, T.; MANULIS, S. Characterization of an epiphytic yeast of grapefruit capable of suppression of green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. **Biological Control**, v. 16, n. 1, p. 27-34, 1999.
- FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.; BOYSEN, M. E.; LINGSTEN, K. J.; SCHNURER, J. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 3, p. 395-402, 2002.
- GREVESSE, C.; LEPOIVRE, P.; JIJAKLI, M. H. Characterization of the Exoglucanase-Encoding gene PaEXG2 and study of its role in the biocontrol activity of *Pichia anomala*. **Phytopathology**, v. 93, n. 9, p. 1145-1152, 2003.
- 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**, v. 38, n. 4, p. 257-264, 2004.
- MASOUD, W.; KALTOFT, H. C. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 4, p. 229-234, 2006.
- MASOUD, W.; POLL, L.; JAKOBSEN, H. Influence of volatile compounds produced by yeast predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **Yeast**, v. 22, n. 14, p. 1133-1142, 2005.
- PASSOTH, V.; FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.; SCHNURER, J. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 1, p. 3-13, 2006.
- PETERSSON, S.; HANSEN, M. W.; AXBERG, K.; HULT, K.; SCHNÜRER, J. Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonistic yeast *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Mycological Research**, v. 102, n. 8, p. 1003-1006, 1998.
- PETERSSON, S.; SCHNÜRER, J. *Pichia anomala* as a biocontrol agent of *Penicillium roqueforti* in high moisture wheat, rye, barley, and oats stored under airtight conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 471-476, 1998.
- SALIGKARIAS, I. D.; GRAVANIS, F. T.; EPTON, H. A. S. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: I. *in vivo* studies. **Biological Control**, v. 25, n. 2, p. 143-150, 2002.
- SHETTY, P. H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 2, p. 48-55, 2006.
- SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F. Incidência de *Aspergillus* produtores de micotoxinas em frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Armazenagem**, n. 7, p. 30-36, 2003.
- SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 2-3, p. 251-260, 2000.
- TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; TEIXEIRA, A. A.; IAMANAKA, B. T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 85-92, 2003.
- TIMMS-WILSON, T. M.; KILSHAW, K.; BAILEY, M. J. Risk assessment for engineered bacteria used in biocontrol of fungal disease in agricultural crops. **Plant and Soil**, v. 266, n. 1-2, p. 57-67, 2004.

Received on May 12, 2008.

Accepted on August 7, 2008.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.