



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**MICROORGANISMOS E SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS PRESENTES
EM BIOFERTILIZANTES PARA O CONTROLE DE *Phytophthora nicotianae***

ALINE CAROLINE DA SILVA

**Araras
2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**MICROORGANISMOS E SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS PRESENTES
EM BIOFERTILIZANTES PARA O CONTROLE DE *Phytophthora nicotianae***

ALINE CAROLINE DA SILVA

ORIENTADOR: PROF^a. DR^a KATIA CRISTINA KUPPER

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Agroecologia e
Desenvolvimento Rural como requisito
parcial à obtenção do título de
MESTRE EM AGROECOLOGIA E
DESENVOLVIMENTO RURAL

Araras

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S586ms

Silva, Aline Caroline da.

Microrganismos e substâncias antimicrobianas presentes em biofertilizantes para o controle de *Phytophthora nicotianae* / Aline Caroline da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
46 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Agroecologia. 2. Citrus spp. 3. Controle alternativo. I. Título.

CDD: 630 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DE

ALINE CAROLINE DA SILVA

APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL, DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SÃO CARLOS, **EM 29 DE MAIO 2014.**

BANCA EXAMINADORA:



PROF^a. DR^a. KATIA CRISTINA KUPPER
ORIENTADOR
(UFSCar)



PROF^a. DR^a. MARCIA MARIA ROSA MAGRI
(UFSCar)



PROF. DR. MARCOS SILVEIRA NETO
(CENA/USP)

Dedico...

*Aos meus pais Luiz e Benedita,
que desde sempre me ensinaram
os valores e princípios dos quais
jamais me afastarei, por todo
esforço, incentivo e
ensinamentos de vida.*

OFEREÇO

À

*Minha irmã Juliana,
A quem tenho imenso amor,
orgulho e respeito pela pessoa e
profissional que você é...*

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me amparar nos momentos difíceis e me mostrar o caminho certo. Aos meus pais **Luiz e Benedita**, por se doarem totalmente para o meu crescimento, sendo meus exemplos de integridade, força, generosidade, amor e por muitas vezes sonharem os meus sonhos.

A minha irmã **Juliana**, que sempre me incentivou, acreditando muitas vezes mais em mim do que eu mesma.

Aos meus avôs **Maria, Nelson e Antônia** por sempre me apoiarem e acreditarem que sou capaz.

A minha bisavó **Ana** e meu avô **João** (*in memória*) os quais me recordo com muito amor e imensa saudade e estão sempre em meus pensamentos.

A toda a minha **FAMÍLIA**, (tios, tias e primas) por ser meu porto seguro, onde sempre encontro o que preciso.

A minha orientadora **Katia Cristina Kupper**, obrigada primeiramente por me dar essa oportunidade, por agregar à minha vida, à minha profissão, serei eternamente grata pelo seu carinho em todos esses anos, por todos os ensinamentos, conselhos, pelas horas que se dedicou a me ajudar, orientar e por me ouvir sempre que precisei.

À banca examinadora do Exame Geral de Qualificação e da Defesa, Prof. Dr^a. **Mariângela Cristofani Yaly**, Prof. Dr^a. **Silvana Perissatto Meneghin**, Prof. Dr. **Leonardo Boava**, Prof. Dr. **Marcos Siqueira Neto**, Prof. Dr^a. **Márcia Maria Rosa Magri**, por participarem desta importante etapa em minha vida e pelas contribuições no trabalho.

A equipe do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico (**Marcos, Luriany, Tatiane, Pitt, Mariana, Gilmar, Willian, Larissa, Vanessa e Jessica**) por toda ajuda, risadas e esforço incondicional para me ajudar sempre que precisei. Em especial a **Luriany, Tatiane e Mariana**, por estarem do meu lado em todos os momentos, agradeço de todo meu coração, pelo carinho, pela paciência, por acreditar que eu era capaz, porque isso me impulsionou ainda mais para chegar hoje aqui. Ao **Marcos** pela amizade e pelo apoio sempre.

Ao **Pitt**, por ser essa pessoa iluminada, que sempre vê nas dificuldades uma forma de crescer e se fortalecer, e nunca mediu esforços para me ajudar, muito obrigada pelo apoio e pela amizade.

A oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas que levarei por toda a vida, muito obrigada pela amizade, carinho, colaboração e compreensão (**Evandro, Lilian, Francisco, Camilla, Luciana, Bruno, Gean, Thais, Daniela, Maria Gabriela**).

As minhas amigas **Camila, Marcela, Marcella** e **Vanessa** por todos os momentos bons, ruins, divertidos que passamos juntas e pela nossa ETERNA amizade.

Aos meus bons e velhos amigos por serem AMIGOS (AS) para todas as horas.

Ao **Centro de Citricultura Sylvio Moreira /IAC**, pelas oportunidades que obtive durante esse período no Centro.

A todos os funcionários do Centro de Citricultura **Lenice, Vivian, Isabel Fernando, Mariângela, Valéria, Nadji, Elizete, Nidelce, Rose, Silvani, Cida, Marines, Genésio, Spinelli, Everaldo, Vanderlei e Socorro**, que nunca mediram esforços para me ajudar sempre que precisei.

A **Universidade Federal de São Carlos**, Campus de Ciências Agrárias e ao curso de Pós-graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural pelas as oportunidades.

A **CAPES** pela bolsa de mestrado concedida.

A minha eterna gratidão a todos pelo apoio INCONDICIONAL, principalmente por me ajudarem a ver que na vida não conquistamos nada sozinhos e que gestos simples podem mudar e contribuir com o rumo de nossas vidas...

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Suinocultura	3
2.2. Citricultura brasileira	4
2.3. Importâncias de doenças causadas pelo gênero <i>Phytophthora</i> em citros	4
2.4. Utilização de biofertilizantes para o controle de pragas e doenças	6
2.5. Composição microbiológica e nutricional do biofertilizante	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Preparo dos biofertilizantes	10
3.2. Ensaios <i>in vitro</i>	11
3.2.1. Avaliação da população microbiana presente nos biofertilizantes e o efeito dos microrganismos sobre <i>P. nicotianae</i>	11
3.2.2. Efeito de metabólitos livres de células de microrganismos, presentes nos biofertilizantes, no crescimento micelial de <i>P. nicotianae</i>	12
3.2.3. Determinação da influência do pH sobre <i>P. nicotianae</i>	13
3.2.4. Determinação da termoestabilidade dos metabólitos produzidos nos biofertilizantes	14
3.3. Ensaios <i>in vivo</i>	14
3.3.1. Preparo de inóculo	14
3.3.2. Testes <i>in vivo</i> com plantas jovens de limão Cravo	15
3.3.3. Germinação de sementes de porta-enxerto de citros, plantadas em substrato tratado com biofertilizantes e inoculado com <i>P. nicotianae</i>	16
4. RESULTADOS	17
4.1. Ensaios <i>in vitro</i>	17
4.1.1. Avaliação da população microbiana presente nos biofertilizantes e o efeito dos microrganismos sobre <i>P. nicotianae</i>	17
4.1.2. Efeito dos metabólitos presentes nos biofertilizantes sobre o crescimento micelial de <i>P. nicotianae</i>	21
4.1.3. Determinação da influência do pH sobre <i>P. nicotianae</i>	25
4.1.4. Determinação da termoestabilidade dos metabólitos produzidos nos biofertilizantes	25
4.2. Testes <i>in vivo</i>	28
4.2.1. Ensaio <i>in vivo</i> com plantas jovens de limão Cravo	28
4.2.2. Germinação de sementes de porta-enxerto de citros em substrato tratado com biofertilizante e inoculado com <i>P. nicotianae</i>	30
5. CONCLUSÕES	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1. Eficiência de isolados de microrganismos presentes nos biofertilizantes, produzidos pela digestão aeróbica e anaeróbica de esterco suíno, na redução do diâmetro médio da colônia de *Phytophthora nicotianae*, avaliada pela técnica de cultivo pareado. . 19
- Tabela 2. Número de raízes de limão Cravo infectadas com *Phytophthora nicotianae* em substrato tratado com diferentes concentrações de biofertilizantes. 28
- Tabela 3. Porcentagem de discos de folhas de lima ácida 'Tahiti' infectadas com *Phytophthora nicotianae*, pelo método da isca, em substrato tratado com diferentes concentrações de biofertilizante aeróbico e anaeróbico^a. 29
- Tabela 4. . Germinação de sementes de tangerina Sunki e limão Cravo em solo inoculado com *Phytophthora nicotianae* e tratado com diferentes concentrações de biofertilizantes. 31
- Tabela 5. Caracterização química dos biofertilizantes quanto aos teores de elementos nutrientes. 32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da produção dos biofertilizantes.	11
Figura 2. População microbiana, expressa em unidades formadoras de colônias por mL (ufc mL ⁻¹), avaliada a partir de amostras do biofertilizante a cada 5 dias. (A) Meio Nutriente Agar (NA) para determinação de bactérias; (B) BDA + tratamento térmico (80°C) para determinação das colônias de <i>Bacillus</i> spp; e (C) Meio Martin para a contagem das populações totais de fungos.	18
Figura 3. Efeito da inibição do crescimento micelial de <i>P. nicotianae</i> pela utilização de isolados de microrganismos presentes nos biofertilizantes. (A) 51SAN13, (B) Controle e (C) 68SA10.	20
Figura 4. Variação do pH e da temperatura na produção de biofertilizante aeróbico. (A) Curva de pH, monitorado a cada cinco dias de amostragem e (B) Temperatura monitorada diariamente durante todo o período de produção do biofertilizante.	21
Figura 5. Produção de metabólitos livres de células de microrganismos presentes no biofertilizante, produzidos pela digestão aeróbica de esterco suíno, na porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Phytophthora nicotianae</i>	22
Figura 6. Variação do pH e da temperatura na produção de biofertilizante anaeróbico. (A) Curva de pH, monitorado a cada cinco dias de amostragem e (B) Temperatura monitorada diariamente durante todo o período de produção do biofertilizante.	23
Figura 7. Produção de metabólitos livres de células de microrganismos, presentes no biofertilizante, produzido pela digestão anaeróbica de esterco suíno, na inibição do crescimento micelial de <i>Phytophthora nicotianae</i>	24
Figura 8. Efeito do pH na inibição do crescimento micelial de <i>Phytophthora nicotianae</i> . Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.	25
Figura 9. Efeito de diferentes concentrações de metabólitos termoestáveis produzidos pela digestão aeróbica e anaeróbica de esterco suíno, na inibição do crescimento micelial de <i>Phytophthora nicotianae</i> . Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (BSA) e maiúsculas (BSAN) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.	26
Figura 10. Efeito de diferentes concentrações de metabólitos termoestáveis produzidos pela digestão aeróbica de esterco suíno, na inibição do crescimento micelial de <i>Phytophthora nicotianae</i>	27
Figura 11. Efeito de diferentes concentrações de metabólitos termoestáveis produzidos pela digestão anaeróbica de esterco suíno, na inibição do crescimento micelial de <i>Phytophthora nicotianae</i>	27

Figura 12. Discos de folhas de lima ácida Tahiti infectados com *Phytophthora nicotianae* pelo método da isca. (A) Controle inoculado, (B) Controle não inoculado, () Esporângios..... 30

Figura 13. Germinação de sementes de tangerina Sunki em solo inoculado com *Phytophthora nicotianae* e tratado com diferentes concentrações de biofertilizantes. (A) 25% BSAN, (B) 20% BSAN, (C) 15% BSAN, (D) 10% BSAN, (E) 5% BSAN, (F) Controle, (A') 25% BSA, (B') 20% BSA, (C') 15% BSA, (D') 10% BSA, (E') 5% BSA, (F') Controle. 31

MICROORGANISMOS E SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS PRESENTES EM BIOFERTILIZANTES PARA O CONTROLE DE *Phytophthora nicotianae*

Autor: ALINE CAROLINE DA SILVA

Orientador: Prof^a. Dr^a. KATIA CRISTINA KUPPER

RESUMO

Dentre os problemas fitossanitários enfrentados pelo setor citrícola, destacam-se doenças ocasionadas por *Phytophthora* spp. que afetam todos os estádios de desenvolvimento da planta cítrica. Para o controle dessas doenças são utilizadas medidas preventivas associadas com produtos químicos, porém, os problemas advindos do uso intensivo de fungicidas têm aumentado o interesse em desenvolver técnicas alternativas, visando a sustentabilidade agrícola e, dentre essas o uso de biofertilizante. Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivos: (i) avaliar o efeito da microbiota e dos metabólitos presentes em biofertilizantes, produzidos pela digestão aeróbica (BSA) e anaeróbica (BSAN) de esterco suíno, sobre o desenvolvimento micelial de *P. nicotianae*; (ii) verificar o efeito dos compostos sobre propágulos de *P. nicotinae* no solo e nas raízes de citros e, finalmente, (iii) observar o efeito na germinação de sementes de porta-enxertos de citros em substrato inoculado. Os resultados obtidos nesta pesquisa mostraram que os microrganismos e os metabólitos existentes nos biofertilizantes afetaram o desenvolvimento da colônia de *P. nicotianae*; o biofertilizante produzido pela digestão aeróbica de esterco suíno (BSA) foi o que apresentou melhor eficiência quanto à supressão de inóculo de *P. nicotianae*; BSA nas concentrações de 05 e 10% e BSAN a 10% favoreceram a germinação das sementes de tangerina Sunki, em substrato infestado pelo fitopatógeno; enquanto que, para o limão cravo, apenas BSA a 5% teve um efeito promissor na germinação das sementes nas mesmas condições.

Palavras-chaves: Controle alternativo, *Phytophthora parasitica*, *Citrus* spp.

MICROORGANISMS AND ANTIMICROBIAL SUBSTANCES PRESENT IN BIOFERTILIZERS TO CONTROL *Phytophthora nicotianae*

Author: ALINE CAROLINE DA SILVA

Adviser: Prof^a. Dr^a KATIA CRISTINA KUPPER

ABSTRACT

Among the phytosanitary problems faced by citrus sector it is highlighted the root rot caused by *Phytophthora* spp. which affects all stages of development of the citrus trees. Preventive measures associated with chemicals are used to control the disease, but the problems arising from the intensive use of fungicides have increased the interest in developing alternative techniques aimed at agricultural sustainability, among them the use of biofertilizers . Because of these facts, this study aimed to: (i) assess the effect of microbiota and metabolites present in biofertilizers produced from aerobic digestion (BSA) and anaerobic (BSAN) of swine manure on the mycelial growth of *P. nicotianae*; (ii) determining the effect of the products on inoculate of *P. nicotinae* in soil and roots of citrus tree, (iii) observing the effect on germination of citrus rootstocks . The results obtained in this study showed that the existing microorganisms and metabolites in biofertilizers affected the development of the colony of *P. nicotianae*; biofertilizer produced by aerobic digestion of swine manure (BSA) had the best efficiency in the elimination of inoculum of *P. nicotianae* ; BSA at concentrations of 5 and 10% and BSAN at concentration of 10% favored the germination of mandarin Sunki in substrate infested by the pathogen. Moreover BSA at concentration of 5% had a promising effect on seed germination of Rangpur lime under the same conditions.

Keywords: Alternative control, *Phytophthora parasitica*, *Citrus* spp.

1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira está assentada em uma área aproximada de 814 mil hectares, com produção média de 469 milhões de caixas de laranja, nas últimas cinco safras. Cerca de 80% da produção nacional de laranja é proveniente dos pomares do estado de São Paulo, situados em quase 525 mil hectares (AGRIANUAL, 2013).

Não obstante a importância da cultura, o setor citrícola enfrenta sérios problemas fitossanitários representados principalmente por doenças, dentre as quais as do complexo *Phytophthora* spp. – citros, destacando-se a gomose de *Phytophthora*, causada por *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (sin. *Phytophthora parasitica* (Dastur), um oomiceto que pertence ao filo Oomycota e ao reino Stramenopila (ADL et al., 2005; SIMPSON ; ROGER, 2004).

Em citros, esse patógeno pode causar gomose, “damping-off”, lesões em folhas, brotos e hastes, podridão do pé e podridão de raízes e radículas (FEICHTENBERGER, 2001). O principal controle de doenças causadas por *Phytophthora* se dá pela aplicação de fosfitos (GRAHAM, 2011) e de fungicidas sistêmicos, como metalaxyl e fosetyl-AI (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Os problemas advindos do uso intensivo de fungicidas têm aumentado o interesse em desenvolver técnicas alternativas de controle visando à sustentabilidade agrícola. Uma opção econômica e de baixo impacto ambiental é o uso de extratos aquosos de matéria orgânica e biofertilizantes, pelo fato de possuírem uma complexa e elevada comunidade microbiana, com presença de bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos e actinobactérias (ELAD; SHTIENBERG, 1994, FALDONI, 2011, KUPPER et al., 2006, MCQUILKEN et al., 1994), os quais podem agir como agentes de biocontrole ou promoverem o crescimento das plantas.

De acordo com Santos (2001), biofertilizante é a designação dada ao efluente líquido obtido a partir da digestão aeróbica ou anaeróbica de esterco animal, sendo, portanto, o produto final da degradação da matéria orgânica por uma série de microrganismos.

Extratos aquosos de matéria orgânica e biofertilizantes podem ser introduzidos nos agroecossistemas por meio de pulverizações foliares, fertirrigação ou, aplicados diretamente no solo, considerando ainda, que, a utilização de insumos de origem orgânica, como fonte de nutrientes ou, como alternativa de controle de doenças, é uma técnica acessível e encontra-se dentro de propostas agroecológicas e sustentáveis (MENEZES JUNIOR et al., 2004).

Nos últimos anos, a suinocultura passou por profundas alterações tecnológicas, visando principalmente o aumento da produtividade e redução dos custos de produção, o que acarretou em grandes quantidades de dejetos em pequenas extensões em algumas regiões do país. Conseqüentemente, se iniciaram os problemas quanto ao destino dos efluentes (LIMA, 2002). Dessa maneira, a produção de um biofertilizante à base da digestão de esterco suíno e o uso de seu efluente passa a ser uma alternativa viável, como forma de reduzir ou aproveitar os dejetos suínos.

De acordo com Conn e Lazarovits (1999) a adição de chorume de suíno no solo resulta no aumento das populações microbianas e, em particular, de *Trichoderma* spp, um agente de controle biológico utilizado para controle de muitas doenças de solo. Além disso, segundo alguns autores, o chorume de suíno tem alta concentração de ácidos graxos voláteis (AGVs), os quais podem reduzir as populações de patógenos em longo prazo (CONN; LAZAROVITS, 1999; LAZAROVITS et al., 2005).

Vários trabalhos na literatura têm recomendado o uso de biofertilizante, produzido pela digestão anaeróbia de esterco bovino ou de suíno, para o controle de doenças, como aquelas causadas pelos fungos *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. orbiculare*, *C. acutatum*, *Guignardia citricarpa*, *Penicillium digitatum* e *Streptomyces scabies* (KUPPER et al.(2006, 2009), HAYASHIDA et al., 1989, ZHANG et al., 1996).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivos: (i) avaliar o efeito da microbiota e dos metabólitos presentes em biofertilizantes, produzidos pela digestão aeróbica (BSA) e anaeróbica (BSAN) de esterco suíno, sobre o desenvolvimento micelial de *P. nicotianae*; (ii) verificar o efeito dos compostos

sobre propágulos de *P. nicotinae* no solo e nas raízes de citros e, finalmente, (iii) observar o efeito na germinação de sementes de porta-enxertos de citros em substrato inoculado.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Suinocultura

O setor de suinocultura no Brasil tem tido boa repercussão, apresentando um crescimento significativo, sendo considerada uma atividade provedora no setor de exportações agrárias (SILVA, 2009).

Além da importância econômica do setor, há uma importância social envolvendo a suinocultura, pois essa atividade contribui para a fixação do homem no campo; emprega a mão-de-obra familiar e é praticada, em sua maioria, em pequenas propriedades, gerando renda, reduzindo o êxodo rural e os problemas advindos desta questão (PAULA et al., 2011, RANZI, 2012).

No entanto, essa atividade agropecuária tem gerado uma concentração alta de resíduos em determinadas regiões, o que tem provocado preocupações com relação à degradação ambiental e, conseqüente, prejuízo à qualidade de vida das pessoas (MIELLE, 2006, TAKITANE; SOUZA, 2000).

O descarte, uso e tratamento de dejetos devem ter uma atenção especial, principalmente porque se a poluição for estabelecida, a recuperação da área será difícil e onerosa. Além do que, se essas atividades forem realizadas de forma inadequada, as conseqüências só serão percebidas a médio e longo prazo (PERDOMO, 2001).

Para Gusmão (2008), a biodigestão anaeróbia de dejetos animais, principalmente de suínos, apresenta vantagens, através da produção de biogás e de biofertilizantes, os quais podem contribuir para a diminuição da poluição dos recursos hídricos por tais dejetos.

2.2. Citricultura brasileira

O gênero *Citrus*, pertencente à família *Rutacea*, é originário do sul asiático, por volta de 4.000 anos atrás. A laranja foi levada pelos árabes para a Europa na Idade Média; para o continente americano no sec. XIV, pela expedição de Cristóvão Colombo e, introduzida no Brasil logo no início da colonização. No país, a cultura encontrou melhores condições para vegetar e produzir do que nas próprias regiões de origem, expandindo-se por todo o território nacional (NEVES et al., 2010).

A citricultura brasileira está assentada em uma área aproximada de 814 mil hectares, com produção média de 469 milhões de caixas de 40,8 kg, nas últimas cinco safras. Cerca de 80% da produção nacional de laranja é proveniente dos pomares do estado de São Paulo, situados em quase 525 mil hectares (AGRIANUAL, 2013).

O Brasil é responsável por 50% da produção mundial de suco de laranja, exporta 98% do que produz e consegue 85% da participação no mercado mundial (NEVES et al., 2010).

A atividade citrícola é muito importante para o país, não apenas pelo que representa para a economia brasileira, mas por ser um setor que gera empregos e renda, forma capital, agrega valor e atua, também, no desenvolvimento regional (ZULIAN et al., 2013).

2.3. Importâncias de doenças causadas pelo gênero *Phytophthora* em citros

Os principais problemas na produção de mudas em viveiros são ocasionados por fitopatógenos habitantes do solo, que reduzem a quantidade e qualidade dessas mudas, sendo também um dos principais veículos de disseminação de patógenos para áreas ainda não infestadas. (GHINI; BETTIOL, 2000). Os patógenos do gênero *Phytophthora* são endêmicos do solo e estão presentes na maioria das áreas citrícolas do mundo (MEDINA FILHO et al., 2004). Das espécies do complexo *Citrus-Phytophthora*, apenas três, *P. parasitica*, *P. palmivora* e *P. citrophthora* estão identificadas como causadoras da maioria de doenças (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

O oomiceto *P. nicotianae* em citros pode ocasionar várias doenças que afetam diferentes estágios de desenvolvimento da planta, destacando-se o tombamento; mela ou “damping-off”; lesões em brotos, folhas e hastes; podridão do pé e gomose em tronco e ramos, podridões de raízes e radículas e podridão parda de frutos (FEICHTENBERGER, 2001). Dentre estas destacam-se: a gomose e podridão de raízes e radículas.

Os sintomas da gomose geralmente se manifestam no colo da planta, provocando podridão e exsudação de goma, podendo expandir-se para as raízes, principalmente até 20 ou 30 cm abaixo do solo e para cima do tronco. Quando todo o diâmetro do tronco é afetado, a planta morre por estrangulamento devido ao ataque no cambium ou floema, o que interrompe o fluxo descendente de seiva (SILVA et al., 2008).

As infecções de raízes, em geral, são iniciadas pela ação de zoósporos de *Phytophthora* spp., os quais são produzidos e liberados quando há água livre no solo. Os zoósporos nadam para a zona de alongação das raízes ou são atraídos por substâncias produzidas após ferimentos nas mesmas (LUTZ ; MENGE, 1991). Na superfície das raízes, ou de outros órgãos, germinam e produzem hifas que invadem os tecidos suscetíveis. Podem ainda encistar e, desta forma, permanecerem viáveis no solo por longos períodos (LUTZ; MENGE, 1991, TIMMER; MENGE, 1988).

As podridões de raízes e radículas podem ocorrer tanto em viveiros como no campo, uma vez que, por não apresentarem sintomas reflexos da doença, as plantas são levadas contaminadas para o campo o que pode ocasionar perdas elevadas das mesmas em pomares recém-implantados. Essas podridões resultam da infecção e destruição dos tecidos externos do córtex, não comprometendo a parte central lenhosa das raízes, mas é comum a colonização desses tecidos lenhosos por microrganismos secundários, originando podridões de coloração escura, podendo comprometer o sistema radicular (FEICHTENBERGER, 2001).

O manejo das doenças causadas por *Phytophthora* em citros inclui um conjunto de medidas, dentre essas, destacam-se as medidas preventivas nos viveiros para obtenção de mudas saudáveis; uso de porta-enxertos resistentes;

escolha de áreas desfavoráveis à ocorrência da doença; adoção de práticas de conservação de solo; uso de adubos orgânicos que favoreçam uma microbiota antagonista ao patógeno; manejo da irrigação e drenagem; monitoramentos frequentes e controle químico (FEICHTENBERGER, 2001).

Medidas preventivas devem ser tomadas, principalmente para o controle da gomose de *Phytophthora*, tais como: plantar em solos bem drenados e com boa aeração, além de se evitar plantio profundo, acúmulo de adubação nitrogenada e o excesso de matéria orgânica no solo (WHITESIDE et al., 1996).

O controle curativo de *Phytophthora* em tronco e ramos é realizado com pulverizações foliares e pinceladas no tronco com fosetyl-AI. No controle preventivo utiliza-se produtos à base de cobre (FEICHTENBERGER, 2001). O controle de doenças causadas por *Phytophthora* se dá, também, pela aplicação de fosfitos (GRAHAM, 2011) e de fungicidas sistêmicos, como metalaxyl e fosetyl-AI (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Diversos estudos estão sendo desenvolvidos para o manejo de *Phytophthora* spp. pela aplicação ao solo de inúmeras fontes de matéria orgânica (CASALE et al., 1995, ERWIN; RIBEIRO, 1996, LUMSDEN et al., 1983, HOITINK; BOEHM, 1999, WIDMER et al., 1998).

Um aspecto importante para o manejo integrado é a pesquisa de soluções alternativas menos impactantes para o ambiente, visando a redução de inóculo de microrganismos como *Phytophthora* spp. que afetam o sistema radicular e o caule. Portanto, a busca de possíveis agentes, que ativem os mecanismos de resistência, poderão contribuir para a geração de instrumentos de controle efetivo dessas doenças em citros (VILLA, 2010).

2.4. Utilização de biofertilizantes para o controle de pragas e doenças

Diversos problemas ambientais são decorrentes do uso intensivo de agrotóxicos na agricultura, dentre esses, encontra-se a contaminação de alimentos, do solo, da água e dos animais. O uso indiscriminado desses produtos causam danos à saúde das pessoas; ocasionam o surgimento de linhagens de patógenos, pragas e plantas invasoras resistentes; contribuem

para o desequilíbrio biológico, para a alteração da ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica; além de, eliminarem organismos que fazem o controle natural de patógenos; entre outras complicações (BETTIOL et al., 1998).

Segundo Caporal e Costabeber (2000), a tecnologia agroecológica nos proporciona um novo tipo de produção agrícola, capaz de reduzir os custos financeiros, diminuir a degradação ambiental e preservar os recursos naturais, porém, a médio e longo prazo. Portanto, a agroecologia é uma ciência que visa um futuro sustentável, através de uma abordagem transdisciplinar, integrando conhecimentos de diferentes ciências, fazendo uma análise crítica do atual modelo de desenvolvimento e da agricultura convencional, com buscas em estilos de agricultura sustentável e de estratégias para o desenvolvimento rural (CAPORAL; COSTABEBER, 2004).

Segundo Altieri (2004) para que a agricultura possa ser considerada sustentável, o sistema deve buscar um modelo equilibrado, buscando várias técnicas inovadoras que auxiliem o produtor rural a alcançar segurança alimentar e gerar renda a partir de sua produção, com conservação e proteção do meio ambiente.

Considerando que os biofertilizantes possuem grandes concentrações de nutrientes e têm efeito fungistático, inseticida, repelente, bacteriostático e ação fitormonal, os mesmos poderiam proporcionar na propriedade agrícola um manejo mais ecológico das culturas (SANTOS e AKIBA, 1995).

Os biofertilizantes podem controlar doenças em plantas, devido à presença de metabólitos, produzidos pelos microrganismos presentes, como pela sua ação direta sobre o patógeno e sobre o hospedeiro, podendo também ter uma ação direta ou indireta dos nutrientes presentes em sua composição para o controle de doenças (MCQUILKEN et al., 1994; REUVENI et al., 1995; TRATCH; BETTIOL, 1997).

Estudos realizados por Faldoni (2011) mostraram que biofertilizantes à base de esterco bovino são eficientes no controle de *P. nicotianae* quando aplicados a 10% e 20%, e que tais compostos podem ativar genes relacionados à resistência sistêmica em plantas de citros. Outros autores relatam que os biofertilizantes e outros resíduos líquidos e semi-sólidos, que

muitas vezes são utilizados como adubo orgânico, podem controlar e suprimir diversos fitopatógenos por conterem uma complexa e diversificada comunidade microbiana (SANTOS, 1992, BETTIOL et al., 1998, LEONI; GHINI, 2002, MEDEIROS et al., 2003, LITTERICK et al., 2004, KUPPER et al., 2006, BETTIOL; MORANDI, 2009).

Estudos realizados por Kupper et al. (2006 e 2009) verificaram que o uso de biofertilizante foi eficiente no controle de *Phyllosticta citricarpa* e *Colletotrichum acutatum*, agentes causais da mancha preta dos citros e da queda prematura dos frutos cítricos, respectivamente.

Segundo Vairo e Akiba (1996), os biofertilizantes atuam nos insetos-praga confundindo o olfato do inseto, aderindo-os à folha por ação de uma substância adesiva produzida pelo composto e, por fim podem agir na desidratação dos insetos (VAIRO; SAMPAIO, 1993).

Medeiros (2002), estudando o efeito do biofertilizante sobre o ácaro *Brevipalpus phoenicis*, verificou que a sua ação sobre o número de ovos foi diretamente proporcional à concentração utilizada, evidenciando a possibilidade do biofertilizante possuir substâncias hormonais ou inibidores enzimáticos que afetam a reprodução e o metabolismo do ácaro. O mesmo autor verificou ainda que a aplicação do biofertilizante em associação com o fungo *Beauveria bassiana* reduziu em 42% a sobrevivência do ácaro rajado (*Tetranychus urticae*), importante praga de hábito polífago e de ocorrência em hortaliças e olerícolas.

Collard et al. (2001) estudando o efeito do biofertilizante Agrobio em substituição às adubações em cobertura, relataram a promoção do crescimento e da produção do maracujazeiro, além da eficiência do composto na prevenção de doenças fúngicas.

2.5. Composição microbiológica e nutricional do biofertilizante

Na busca por técnicas menos agressivas ao ambiente e que possibilitem o desenvolvimento de uma agricultura menos dependente de produtos industrializados, a utilização de biofertilizante para nutrição de plantas ganhou

destaque nos últimos anos, devido ao alto preço e aos efeitos nocivos dos agroquímicos comumente utilizados (ASERI et al., 2008).

No meio agrônômico, o biofertilizante é resultante da decomposição aeróbia ou anaeróbia de produtos orgânicos puros ou complementados com minerais que podem ser usados na agricultura para vários fins. O uso de resíduos animais para a produção de fertilizante é uma prática que tem sido incentivada, principalmente pela necessidade de reciclagem de nutrientes por questões ambientais e também para se preservar as fontes de reservas minerais finitas (COSTA et al., 2012).

Os biofertilizantes contêm células vivas ou latentes de microrganismos, metabólitos, além de quelatos organo-minerais (MEDEIROS et al., 2002), o que facilita a disponibilidade dos nutrientes necessários para as plantas, quando comparados a outros adubos orgânicos (SOUZA; RESENDE, 2003). Além disso, o processo de decomposição da matéria orgânica, para a formação dos compostos, envolve a participação de uma grande variedade de gêneros de fungos, que produzem enzimas extracelulares que degradam a celulose presente no resíduo orgânico, tornando os metabólitos assimiláveis e, disponíveis às plantas (MAGRINI et al., 2011).

Segundo Braga (2010), diferentes concentrações do biofertilizante, produzido pela digestão anaeróbica de esterco bovino, proporcionaram um aumento linear no conteúdo de clorofila e, conseqüentemente, da taxa fotossintética na cultura do pinhão manso.

Zandonadi et al. (2014) estudaram a utilização de biofertilizantes provenientes de leonardita, de húmus de minhoca e de composto orgânico ou, de outros resíduos agroindustriais e constataram que, na dose e no momento adequado, esses compostos podem ser benéficos para o cultivo de hortaliças por três razões: (i) aumentam a eficiência do uso de nutrientes, pela atividade enzimática existente, que estimulam a absorção e a quelação de alguns elementos minerais; (ii) fornecem moléculas orgânicas promotoras do crescimento vegetal e, finalmente, (iii) modificam positivamente as características físico-químicas da maioria dos solos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparo dos biofertilizantes

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/Instituto Agrônomo de Campinas, em Cordeirópolis/SP.

A produção dos biofertilizantes utilizados no presente trabalho levou em consideração algumas receitas já utilizadas na literatura (BETTIOL et al., 1998, SANTOS, 1992, SILVA et al., 2007), além da disponibilidade local de ingredientes para a sua confecção, dentre esses, a utilização de cinzas.

Sendo assim, a amostra do material, decorrente da queima de plantas cítricas do campo experimental do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, foi encaminhada ao laboratório de solos da Universidade Federal de São Carlos, Araras/SP. O conteúdo nutricional existente na amostra apresentou: pH : 13, C (3.40 %), N (0.25 %), P₂O₅ (5.40 %), K₂O (9.87 %), CaO (31.80 %), MgO (2.50 %), SO₄ (2.01 %), Si (0.20 %), B (50 mg/cm³), Cu (99 ppm), Fe (7790 ppm), Mn (172 ppm), Zn (360 ppm).

Com base nas receitas relatadas em literaturas, os biofertilizantes foram assim confeccionados: 300 mL.L⁻¹ de esterco suíno, 10 mL.L⁻¹ de leite cru, 20 mL.L⁻¹ de caldo-de-cana, 10 g.L⁻¹ de cinzas de citros, 5 g.L⁻¹ de Bórax, 5 g.L⁻¹ de Termofosfato Magnesiano, 1 g.L⁻¹ de Sulfato de Zinco e 1 g.L⁻¹ de Sulfato de Cobre, esses ingredientes foram acondicionados em recipientes de polietileno hermeticamente fechados, com capacidade para 50L.

Esta receita foi produzida por dois métodos distintos, gerando dois tipos de biofertilizantes, um conduzido sob digestão aeróbica (BSA), produzido com auxílio de um aerador e, outro sob digestão anaeróbica (BSAN) (Figura 1). A temperatura e o pH foram monitorados diariamente e a cada 5 dias, respectivamente.



Figura 1. Ilustração da produção dos biofertilizantes.

3.2. Ensaio *in vitro*

3.2.1. Avaliação da população microbiana presente nos biofertilizantes e o efeito dos microrganismos sobre *P. nicotianae*

Para determinar a população microbiana existente nos biofertilizantes ao longo do tempo, foi realizada uma diluição seriada e plaqueamento em diferentes meios de cultura. A partir da data de início do preparo dos dois biofertilizantes, amostras foram coletadas a cada cinco dias até o 60º dia. Em seguida, as amostras foram filtradas em gaze para remoção do material mais grosseiro e submetidas às diluições seriadas que variaram de 10^{-1} a 10^{-9} , conforme a necessidade. De cada diluição homogeneizada, 100 μ L foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura seletivo, utilizando uma alça de Drigalski para a distribuição sobre o meio.

As populações totais de microrganismos foram determinadas utilizando os seguintes meios de cultura: meio de Martin (MARTIN, 1950) modificado por Liu e Baker (1980); meio Nutriente-Ágar (NA) (ROMEIRO, 2001) e batata-dextrose-Ágar (BDA) para a determinação respectivamente de fungos, bactérias e *Bacillus* spp conforme a metodologia descrita por Bettiol (1995).

As culturas foram incubadas em estufa para B.O.D, à $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12/12h. Foram utilizadas três placas para cada diluição e as avaliações foram realizadas com 24h e 48 h de incubação, contando-se o número de colônias em cada placa. Posteriormente, os microrganismos foram repicados para novas placas de Petri contendo BDA e purificados para posteriores testes de antagonismo *in vitro*. Os valores obtidos foram expressos em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com três repetições.

Para avaliar o efeito antagônico de 77 microrganismos presentes nos biofertilizantes sobre o patógeno *P. nicotianae* (isolado IAC-01/95 pertencente à Clínica Fitopatológica do Centro de Citricultura Sylvio Moreira) foi utilizada a técnica de cultivo pareado (DENNIS; WEBSTER, 1971). Discos de 5 mm de diâmetro foram retirados de colônias ativas de *P. nicotianae* (com sete dias de idade) e depositados em placas de Petri contendo meio de cultura cenoura-batata-água (CBA) (ATLAS; PARKS, 1993) a 3 cm de distância de discos de mesmo tamanho de isolados de microrganismos provenientes dos biofertilizantes. O controle correspondeu ao crescimento do patógeno sozinho em CBA. As culturas foram incubadas em estufa para BOD, durante sete dias a 25°C e fotoperíodo de 12h/12h. Para a avaliação do antagonismo mediu-se o diâmetro da colônia do patógeno em dois sentidos perpendiculares. Devido ao grande número, 77 microrganismos foram avaliados em três ensaios diferentes, com uma média de 26 isolados/ensaio. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições (ensaio 1 e 2) e 5 repetições (ensaio 3). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias foi feita pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.2.2 Efeito de metabólitos livres de células de microrganismos, presentes nos biofertilizantes, no crescimento micelial de *P. nicotianae*

Para avaliar o efeito dos metabólitos presentes nos biofertilizantes sobre o crescimento micelial de *P. nicotianae*, adotou-se metodologia utilizada por Cao et al. (2013). Amostras foram coletadas de BSA e BSAN a cada cinco dias,

do primeiro ao 60º dia. As amostras foram filtradas em filtro de papel (84 gm^{-2}), para remoção do material grosseiro, centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e filtradas em membrana Millipore® ($0,22\mu\text{m}$). Em seguida, o filtrado foi transferido para Erlenmeyers contendo meio cenoura-ágar (CA) (KAOSIRI et al., 1978) fundente, nas seguintes concentrações: 0%, 10% e 20%. Os tratamentos controle apresentaram 10% e 20% de água destilada no lugar do filtrado. Posteriormente, os meios foram vertidos para placas de Petri e após a solidificação, discos de 5 mm de diâmetro contendo colônias de *P. nicotianae* foram transferidos para o centro das placas. As culturas foram incubadas em estufa para B.O. D a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo 12/12h.

As avaliações do crescimento micelial do fitopatógeno, nos respectivos tratamentos, foram realizadas quando as colônias nos tratamentos controle atingiram a extremidade da placa, determinando-se o diâmetro médio das colônias. O delineamento foi inteiramente casualizado com esquema de parcelas subdivididas, para as avaliações ao longo do tempo. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Após a obtenção dos resultados destes ensaios, os experimentos foram repetidos utilizando os biofertilizantes com 50 e 40 dias de preparo para BSA e BSAN, respectivamente.

3.2.3 Determinação da influência do pH sobre *P. nicotianae*

Em paralelo, ensaios foram realizados de modo a se determinar a influência do pH sobre o patógeno. Para tal, discos de 5 mm de *P. nicotianae* foram transferidos para o centro de Placas de Petri, contendo meio CA ajustado de acordo com diferentes faixas de pH (5; 6; 7; 8; 9). As culturas foram incubadas em estufa para B.O.D. a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo 12/12h. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições e a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2.4 Determinação da termoestabilidade dos metabólitos produzidos nos biofertilizantes

Para a avaliação da termoestabilidade dos metabólitos produzidos nos biofertilizantes, foram utilizadas amostras com 50 e 40 dias de preparo para o BSA e BSAN, respectivamente, sob temperatura fixa de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Amostras de cada biofertilizante foram filtradas com o auxílio de uma gaze e adicionadas ao meio CA, nas seguintes concentrações: 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30%. Após o preparo dos meios adicionou-se 2,0g de ágar para 100 mL de meio de cultura e foram autoclavados a 120°C por 20 minutos a 1 atm. As testemunhas consistiram do meio CA acrescido de água, nas mesmas concentrações, no lugar dos biofertilizantes.

Posteriormente, os meios foram vertidos em placas de Petri. Discos de 5 mm de diâmetro retirados de colônias ativas de *P. nicotianae* foram transferidos para o centro das placas, justapondo-se a face contendo a colônia diretamente sobre o meio de cultura. A incubação das culturas se deu em estufa para B.O.D. a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12/12h. A determinação do crescimento micelial foi realizada quando a colônia do fitopatógeno, no tratamento testemunha, atingiu a extremidade da placa. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições. Para comparação das médias utilizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3. Ensaio *in vivo*

3.3.1. Preparo de inóculo

Para os testes *in vivo*, utilizou-se o isolado IAC-01/95 de *P. nicotianae* e para a produção de inóculo seguiu a metodologia de Medina Filho et al. (2004). Discos de micélio do patógeno foram transferidos para placas de Petri, contendo 15 mL de meio (CA). As culturas foram incubadas no escuro a 25°C durante seis dias, até o crescimento do micélio em toda a superfície do meio. Em seguida, metade das placas foi mantida sob luz fluorescente contínua, durante cinco dias, para promover o desenvolvimento de esporângios, enquanto a outra metade continuou no escuro no mesmo período.

Posteriormente, todas as culturas foram mantidas no escuro por mais três dias. Para a preparação do inoculo, o conteúdo de todas as placas, com diferentes propágulos do patógeno, incluindo micélio, esporângios e clamidósporos, foi homogeneizado com água destilada e esterilizada, em liquidificador por 60s, na proporção de 5 placas para cada litro de água .

3.3.2. Testes *in vivo* com plantas jovens de limão Cravo

Sementes de limão Cravo foram superficialmente higienizadas com hipoclorito de sódio a 2% v/v, por 60s e semeadas em tubetes contendo substrato comercial Plantmax® (Eucatex), geralmente utilizado para produção de mudas de citros. Depois da germinação das plântulas, procedeu-se o desbaste, deixando apenas uma muda por tubete. Cento e quarenta e cinco dias após o plantio, as mudas foram transplantadas para saquinhos de polietileno (15x25 cm) contendo substrato e biofertilizante. Os biofertilizantes BSA e BSAN com 50 e 40 dias de maturação, respectivamente, foram adicionados ao substrato nas seguintes concentrações: 0, 10, 20 e 50%, em seguida foram adicionados 66 mL da suspensão de inóculo de *P. nicotianae*, cuja capacidade de campo foi pré-determinada para aplicação dos tratamentos e suspensão de inóculo. Para o tratamento controle as plantas receberam apenas água destilada. Cada tratamento foi composto por cinco repetições.

Após 60 dias, as plantas foram cuidadosamente retiradas do substrato e lavadas em água destilada. Em seguida, fragmentos de 10 mm de comprimento foram cortados a partir da extremidade das raízes (metodologia adaptada de Trotta et al. (1996). Os fragmentos foram então submersos em álcool 70% por 30s, seguido de hipoclorito de sódio a 2% (v/v) por 60s, e por fim, lavados em água destilada. Para cada repetição, 20 fragmentos foram plaqueados em meio seletivo de fubá-ágar (infusão de 50g.L⁻¹ de fubá + 18g de ágar) (adaptação de JEFFERS; MARTIN, 1986, MASAGO et al., 1977) onde foram adicionados Pimaricina 10mg.L⁻¹; Amipicila 250mg.L⁻¹; Rifampicina 10mg.L⁻¹; PCNB 25mg.L⁻¹ e Benomyl 10mg.L⁻¹. As avaliações foram realizadas a cada 2 dias, para identificação e contagem das colônias provenientes dos fragmentos de raízes infectados. Os dados foram submetidos à análise de

variância ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para quantificação dos propágulos de *P. nicotianae* na rizosfera foram adicionados 40g do substrato utilizado para plantio comercial de mudas em Erlenmeyes com capacidade de 250 mL contendo 160 mL de água destilada, sendo em seguida mantidos sob agitação de 150rpm/5min (MASAGO et al., 1977).

Para o teste com iscas de folhas, substrato e água contidos em Erlenmeyes, como descrito acima, foram transferidos para copos plásticos. Na superfície da água foram adicionados dez discos de folha de lima ácida Tahiti (cinco com a face abaxial virada para cima e cinco para baixo). Os copos foram mantido sob luz contínua em temperatura ambiente por quatro dias, após esse período, os discos de folhas foram corados com azul láctico em lâminas de microscopia e avaliados quanto à presença de hifas cenocíticas, clamidósporos e esporângios característicos de *P. nicotianae* em suas bordas. O número de discos de folhas infectados foi computado e convertido em porcentagem, para posterior comparação entre os tratamentos (FEICHTENBERGER, 2001).

3.3.3. Germinação de sementes de porta-enxerto de citros, plantadas em substrato tratado com biofertilizantes e inoculado com *P. nicotianae*

A metodologia utilizada para este ensaio foi adaptada de Widmer et al. (1998). Sementes de limão Cravo e tangerina Sunki foram superficialmente higienizadas com hipoclorito de sódio a 2% v/v, por 60s, secas e armazenadas a 10°C até o momento do uso. A semeadura se deu em tubetes contendo substrato comercial estéril, colocando-se 3 sementes por tubete a 15mm de profundidade. Após a semeadura, foram adicionados 3 mL de biofertilizante (BSA e BSAN) com 103 dias de preparo em diferentes concentrações (0; 5; 10; 15; 20; 25%). Optou-se pela utilização dos biofertilizantes nessa idade, devido aos problemas de fitotoxidez observados nas plantas do ensaio anterior. Vinte e quatro horas após a aplicação do biofertilizante, os substratos foram inoculados com 3 mL de suspensão de inóculo de *Phytophthora* preparado de acordo com o descrito no item 2.3.1. A avaliação do número de plantas germinadas para tangerina Sunki foi realizada após 40 dias do plantio e 10 dias

depois se realizou uma recontagem das plantas vingadas, enquanto que, para limão Cravo, a avaliação foi realizada aos 50 dias depois do plantio, e a recontagem com 60 dias. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1. *Ensaio in vitro*

4.1.1. Avaliação da população microbiana presente nos biofertilizantes e o efeito dos microrganismos sobre *P. nicotianae*

Com relação à população microbiana encontrada nos biofertilizantes, os dados da Figura 2 mostraram que a maior população de microrganismos foi encontrada no biofertilizante produzido aeróbicamente (BSA), sendo que o pico de organismos ocorreu por volta de 25 dias (para fungos e *Bacillus* spp.) e 35 dias para bactérias. No biofertilizante anaeróbico (BSAN), a população de microrganismos foi um pouco mais baixa, principalmente de fungos, e o pico de população ocorreu em torno de 25 dias (fungos e *Bacillus* spp.) e 30 dias para bactérias.

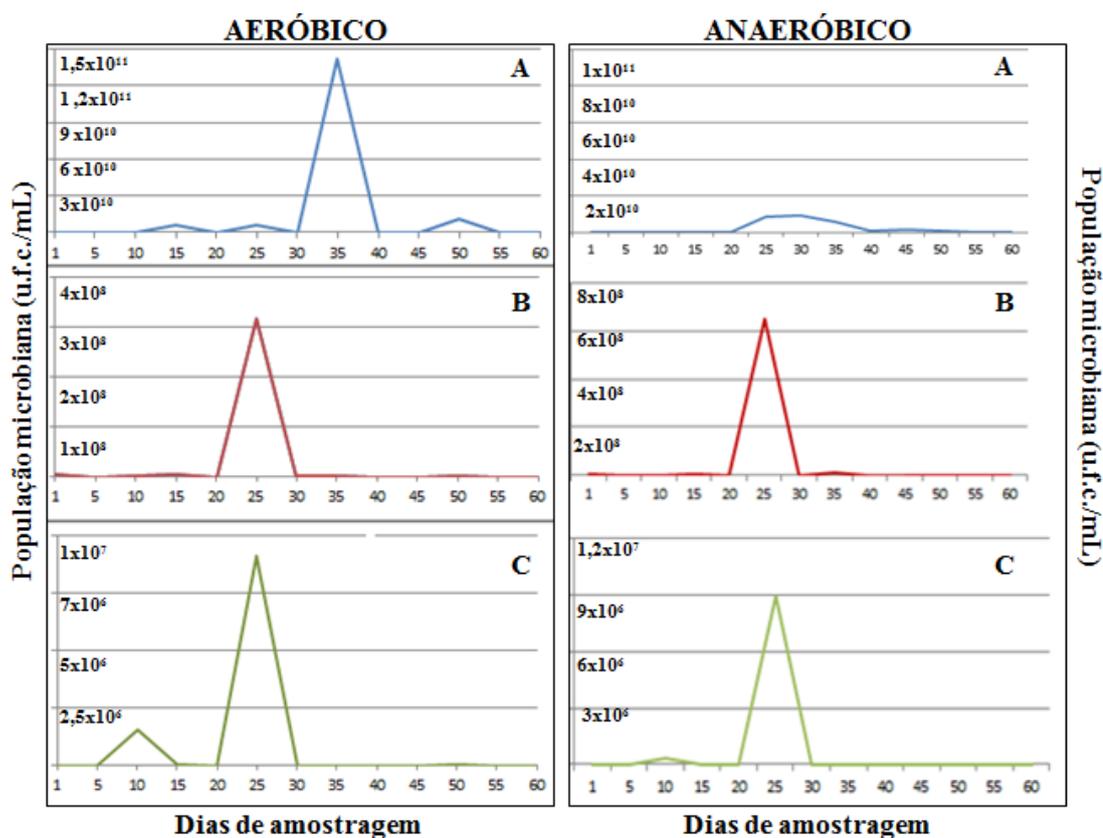


Figura 2. População microbiana, expressa em unidades formadoras de colônias por mL (ufc mL^{-1}), avaliada a partir de amostras do biofertilizante a cada 5 dias. (A) Meio Nutriente Agar (NA) para determinação de bactérias; (B) BDA + tratamento térmico (80°C) para determinação das colônias de *Bacillus* spp; e (C) Meio Martin para a contagem das populações totais de fungos.

Ao todo 77 isolados de microrganismos entre fungos, bactérias e leveduras, com características morfológicas distintas, foram obtidos dos biofertilizantes BSA e BSAN durante as coletas ao longo do tempo. Os resultados de antagonismo dos microrganismos presentes nos biofertilizantes contra *P. nicotianae* encontram-se na Tabela 1. Observou-se que a maioria dos isolados testados promoveu inibições do diâmetro médio da colônia de *P. nicotianae*, sendo que as maiores inibições ocorreram pelos isolados 68SA10 (62,68%) e 51SAN13 (57,61%), sendo esses, bactérias termotolerantes.

Tabela 1. Eficiência de isolados de microrganismos presentes nos biofertilizantes, produzidos pela digestão aeróbica e anaeróbica de esterco suíno, na redução do diâmetro médio da colônia de *Phytophthora nicotianae*, avaliada pela técnica de cultivo pareado.

Microrganismos	BSA	Microrganismos	BSAN
68/C10	62,68	51/C13	57,61
39/C8	42,6	74/C1	32,86
58/C5	34,28	35/C8	32,66
56/C8	30,43	43/C1	31,85
50/C13	29,82	52/C4	29,82
66/C8	28,8	34/C11	25,76
54/C9	24,14	73/9	24,34
59/C7	15,62	41/C12	17,04
53/C11	13,18	63/C7	7,1
45/C5	12,78	62/C5	0
67/C8	3,45	32/C9	-2,23
23/C12	2,84	40/C6	-2,23
71/C12	1,62	61/C9	-2,23
70/11	0,41	60/C7	-2,23
69/C12	-0,61	91/C5	26,92
31/C12	-2,23	88/C9	22,12
92/C5	33,65	87/C1	20,19
99/C3	33,27	94/C13	19,81
98/C12	32,31	97/C8	15
100/C7	28,65	103/C9	14,04
93/C4	22,5	101/C7	13,08
96/C12	19,42	89/C8	9,42
102/C8	14,23	84/C9	7,5
83/C11	10,58	90/C9	5,58
105/C12	10,58	86/C9	5
81/C 13	9,81	27/C4	49,9
104/C9	7,5	2/C1	42,24

Continuação Tab. 1

85/C13	4,42	26/C4	29,19
95/C11	0,19	19/C4	26,92
82/C9	-7,5	8/C1	21,12
3/C1	21,33	7/C2	10,97
25/C4	16,56	2/C3	4,55
14/C4	0,41	10/C2	5,8
9/C2	0,21	6/C1	3,52
22/C4	0	30/C5	2,07
		5/C1	1,86
		1/C1	1,24
		11/C2	0,83
		16/C3	0
		15/C3	-0,41
		24/C4	-0,62
		17/C3	-2,9

*Determinação do nome do microrganismo: o primeiro n^o representa o n^o do isolado, C= coleta e o seu número. Ex: 68/ C10= isolado 68, da coleta 10. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



Figura 3. Efeito da inibição do crescimento micelial de *P. nicotianae* pela utilização de isolados de microrganismos presentes nos biofertilizantes. (A) 51SAN13, (B) Controle e (C) 68SA10.

4.1.2 Efeito dos metabólitos presentes nos biofertilizantes sobre o crescimento micelial de *P. nicotianae*

Os dados apresentados pela curva de pH (Figura 4A e 6A) mostraram que houve uma queda de pH nos 10 primeiros dias de produção dos biofertilizantes, havendo um aumento a partir dos 15 dias até os 55 dias para o BSAN (pH 8,3) e 60 dias para o BSA (pH 8,9).

Pelos dados avaliados na Figura 6 é possível verificar que o biofertilizante BSA, com 45 a 50 dias de idade, produziu metabólitos em quantidades suficientes para causar maior inibição no desenvolvimento do patógeno, em uma faixa de temperatura que variou de 22 a 26°C (Figura 4B) e um pH de 8,7 (Figura 4A).

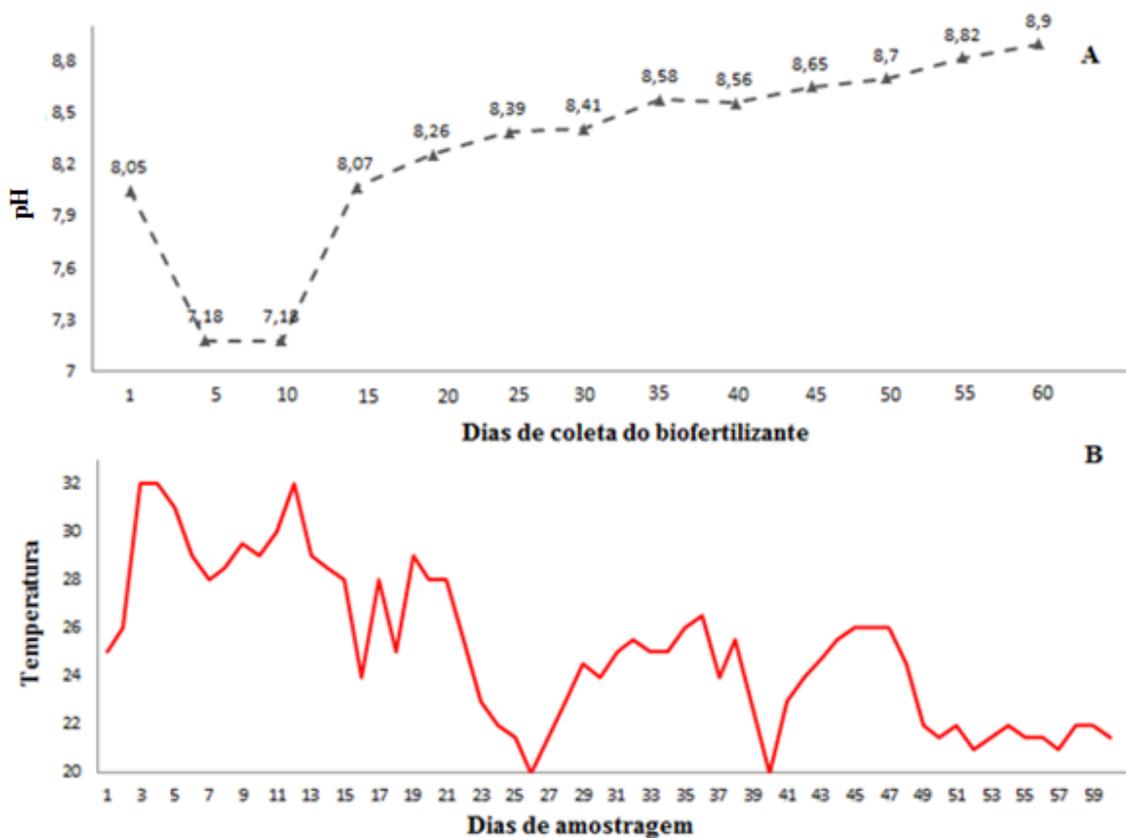


Figura 4. Variação do pH e da temperatura na produção de biofertilizante aeróbico. (A) Curva de pH, monitorado a cada cinco dias de amostragem e (B) Temperatura monitorada diariamente durante todo o período de produção do biofertilizante.

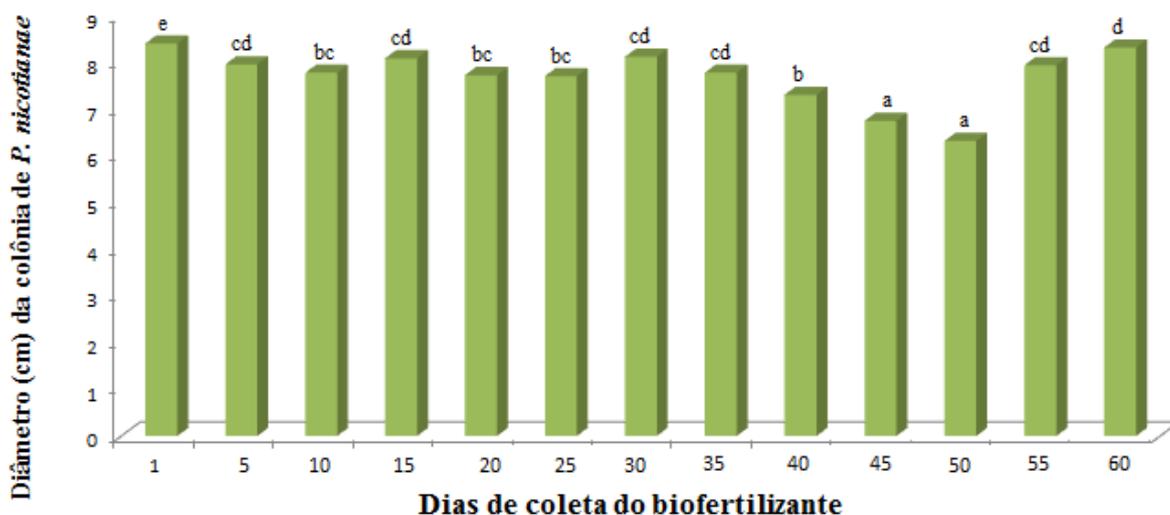


Figura 5. Produção de metabólitos livres de células de microrganismos presentes no biofertilizante, produzido pela digestão aeróbica de esterco suíno, e o seu efeito no diâmetro da colônia de *Phytophthora nicotianae*.

Com relação à produção de metabólitos no biofertilizante produzido de forma anaeróbica, os dados apresentados na Figura 7 mostraram que o composto com 40 dias de idade apresentou metabólitos em quantidades suficientes para afetar o desenvolvimento micelial de *P. nicotianae*, em pH de 8,2 (Figura 6^a) e na temperatura de 20°C (Figura 6B).

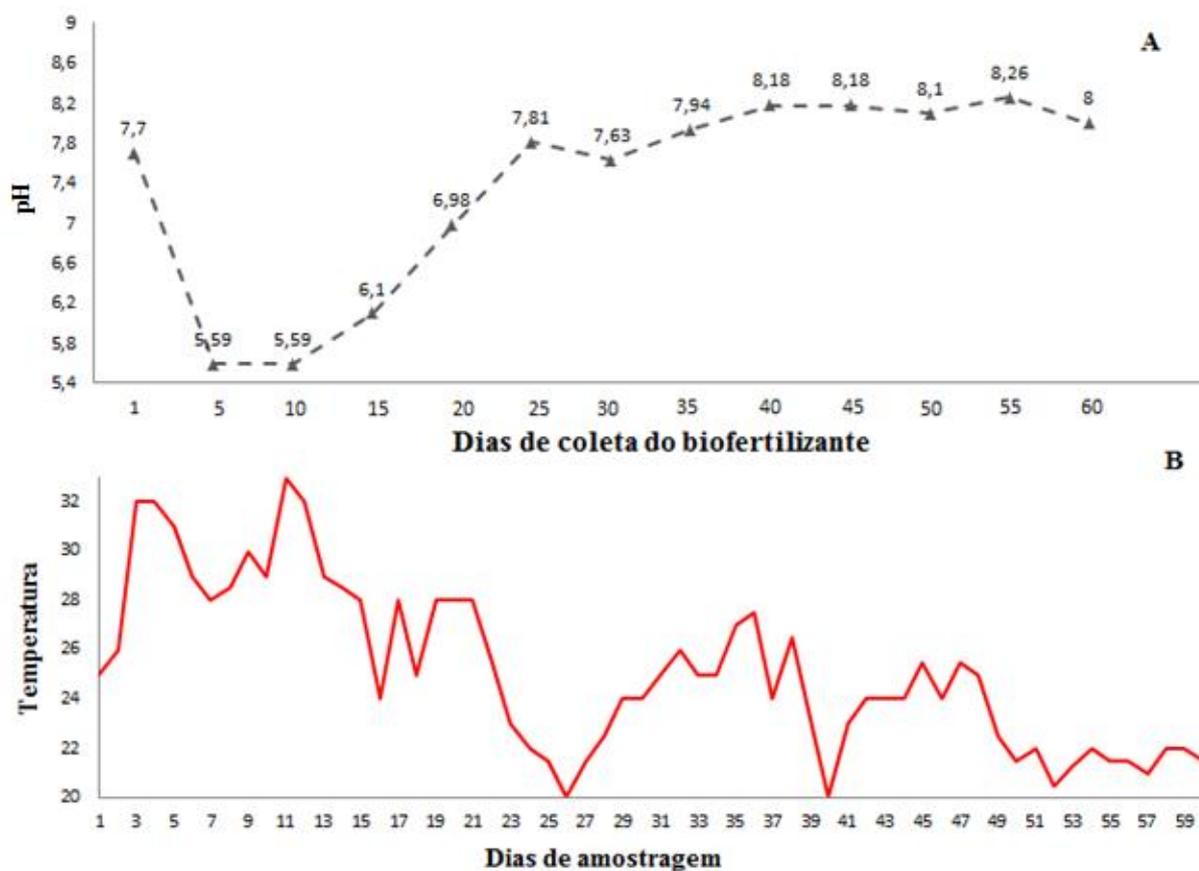


Figura 6. Variação do pH e da temperatura na produção de biofertilizante anaeróbico. (A) Curva de pH, monitorado a cada cinco dias de amostragem e (B) Temperatura monitorada diariamente durante todo o período de produção do biofertilizante.

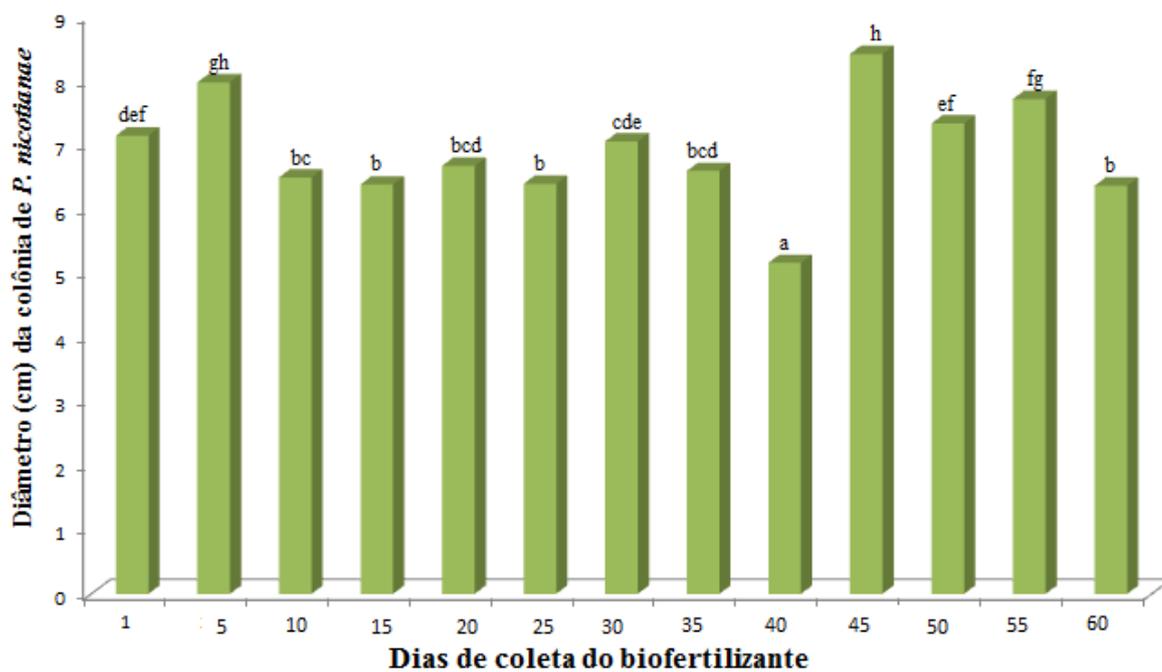


Figura 7. Produção de metabólitos livres de células de microrganismos presentes no biofertilizante, produzido pela digestão anaeróbica de esterco suíno, e o seu efeito no crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae*.

4.1.3 Determinação da influência do pH sobre *P. nicotianae*

Com relação à influência do pH sobre *P. nicotianae*, os dados mostraram que a faixa de pH testada não interferiu no desenvolvimento micelial do fitopatógeno (Figura 8).

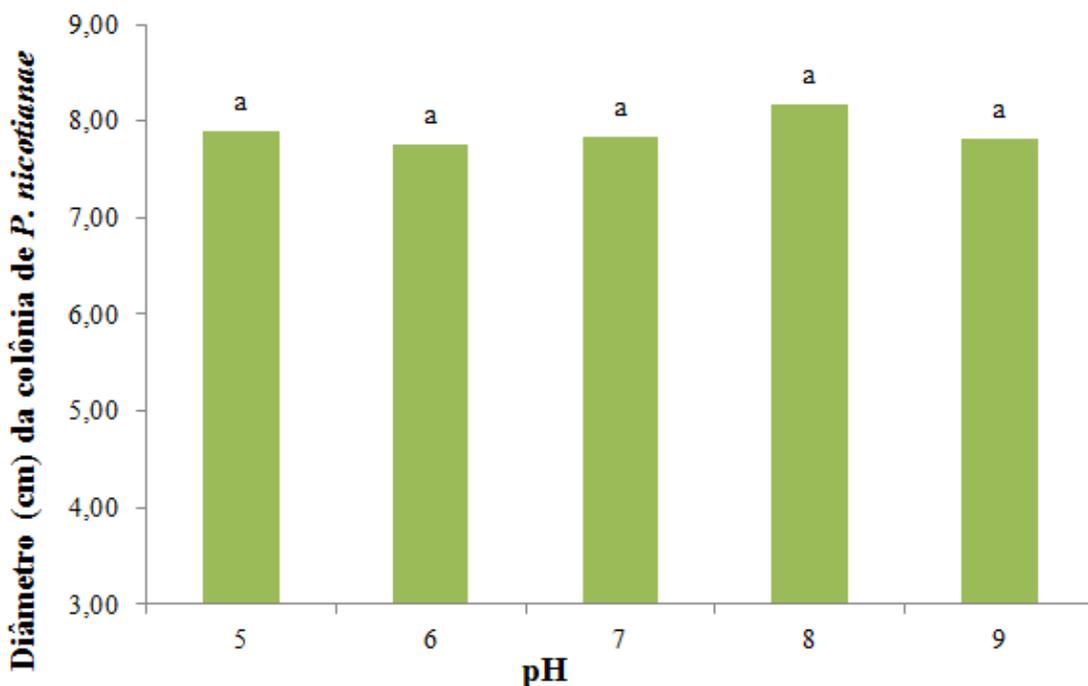


Figura 8. Efeito do pH na inibição do crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae*. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

4.1.4 Determinação da termoestabilidade dos metabólitos produzidos nos biofertilizantes

Quando se avaliou a termoestabilidade de metabólitos, em diferentes concentrações, verificou-se que, concentrações acima de 25% de metabólitos termoestáveis a partir do BSA reduziram, significativamente, a colônia do fitopatógeno, sendo que na concentração do produto a 30% houve inibições do desenvolvimento da cultura de 81% (Figura 9).

Em relação aos resultados apresentados na Figura 9, verifica-se que concentrações acima de 20% de metabólitos termoestáveis, produzidos pelo

BSAN, afetaram significativamente a colônia de *Phytophthora*, com valores de inibições que variaram de 15 a 65%.

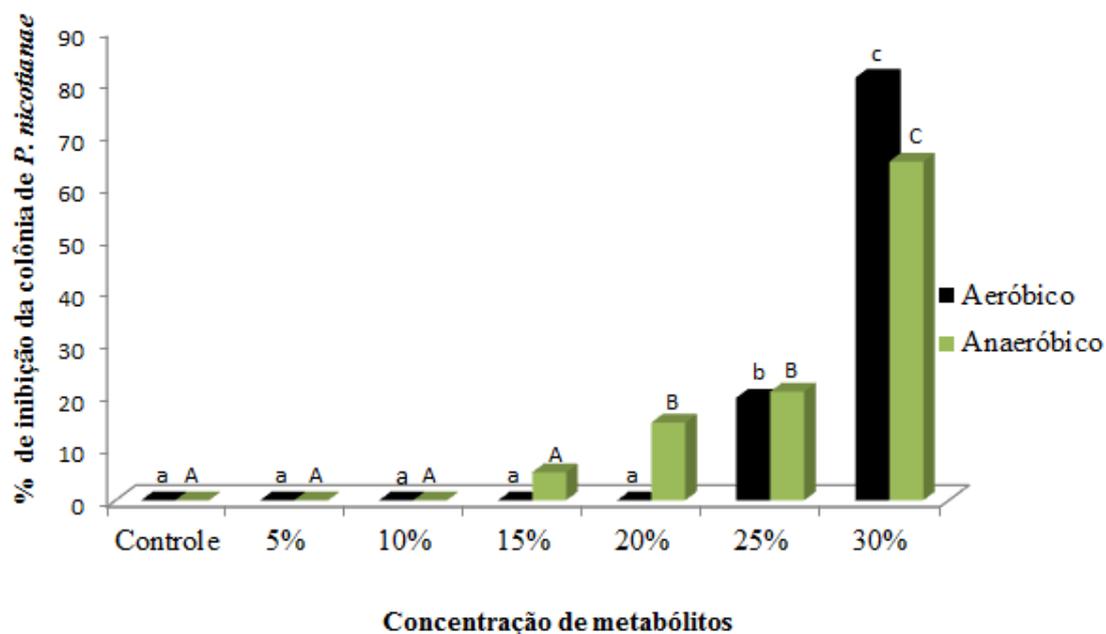


Figura 9. Efeito de diferentes concentrações de metabólitos termoestáveis produzidos pela digestão aeróbica e anaeróbica de esterco suíno, na inibição do crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae*. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (BSA) e maiúsculas (BSAN) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

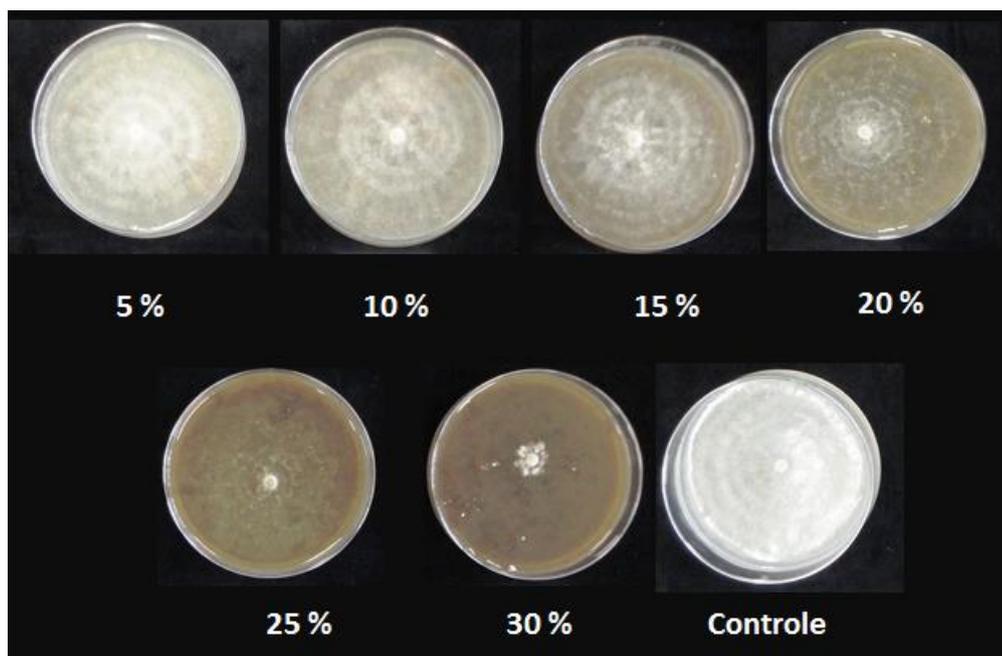


Figura 10. Efeito de diferentes concentrações de metabólitos termoestáveis produzidos pela digestão aeróbica de esterco suíno, na inibição do crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae*.

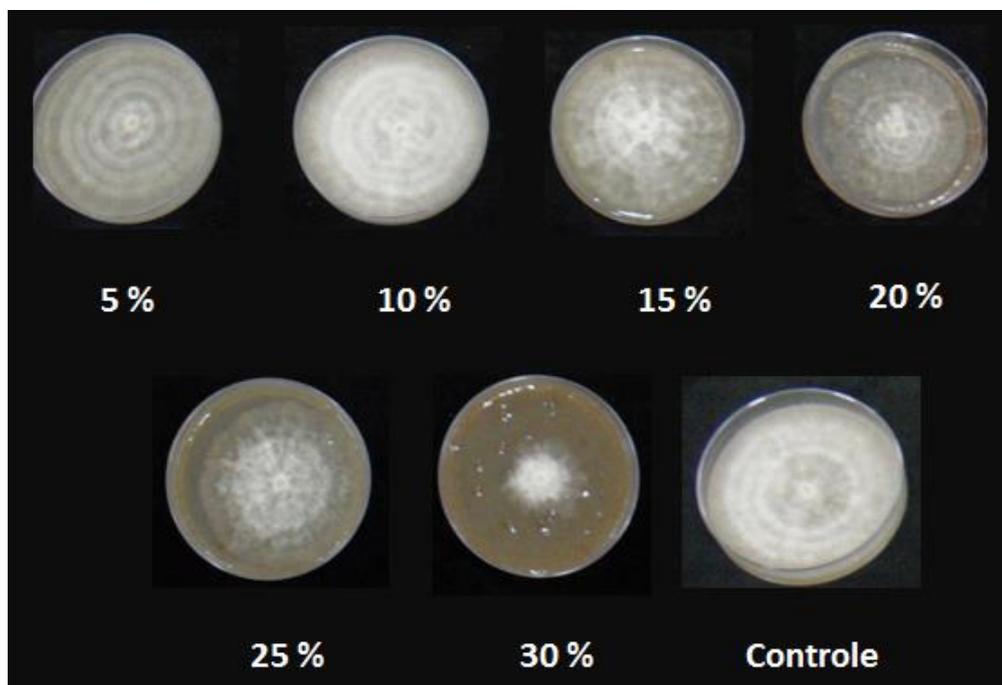


Figura 11. Efeito de diferentes concentrações de metabólitos termoestáveis produzidos pela digestão anaeróbica de esterco suíno, na inibição do crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae*.

4.2. Testes *in vivo*

4.2.1. Ensaio *in vivo* com plantas jovens de limão Cravo

Os resultados obtidos do teste com plantas jovens de limão Cravo, inoculadas e tratadas com os biofertilizantes aeróbico e anaeróbico no substrato, mostraram que biofertilizante aeróbico em todas as concentrações testadas reduziu significativamente o número de raízes infectadas pelo patógeno. Quando se observam os dados de controle pelo biofertilizante anaeróbico, nota-se que o produto reduziu o número de raízes infectadas apenas quando se utilizou o biofertilizante na concentração de 50% (Tabela 2).

Tabela 2. Número de raízes de limão Cravo infectadas com *Phytophthora nicotianae* em substrato tratado com diferentes concentrações de biofertilizantes.

Concentrações dos Biofertilizantes	Número de raízes infectadas	
	Aeróbico ^a	Anaeróbico
0%	7,60a	5,50a
10%	0,60 b	5,00a
20%	0 b	1,75ab
50%	0 b	0,50 b
Sem inoculação	0 b	0,00b

^a Biofertilizante aeróbico e anaeróbico aplicados com 50 e 40 dias de maturação, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando se avaliou, pelo método da isca, a porcentagem de discos de folhas de lima ácida Tahiti infectados com *P. nicotianae* em análise de substratos inoculados e tratados previamente com diferentes concentrações de biofertilizantes, verificou-se que, o biofertilizante aeróbico, em todas as concentrações testadas, reduziu significativamente a porcentagem de folhas infectadas. Quando se observam os dados de controle pelo biofertilizante

anaeróbico, nota-se que o produto reduziu a porcentagem de discos de folhas infectados, quando se utilizou o biofertilizante na concentração de 50% (Tabela 3).

É importante mencionar que as plantas que receberam concentrações dos biofertilizantes acima de 20% apresentaram sintomas de fitotoxidez (amarelecimento, necrose e queda das folhas), só ocorrendo a recuperação das plantas quando os biofertilizantes foram utilizados na concentração mais baixa (20%).

Tabela 3. Porcentagem de discos de folhas de lima ácida 'Tahiti' infectadas com *Phytophthora nicotianae*, pelo método da isca, em substrato tratado com diferentes concentrações de biofertilizante aeróbico e anaeróbico^a.

Concentrações dos Biofertilizantes	% de discos de folhas infectados	
	Aeróbico ^a	Anaeróbico
0%	100%a	100%a
10%	88%ab	96%a
20%	72% bc	82%a
50%	64% c	48% b
Substrato não inoculado e não tratado	0% d	0% c

^a Biofertilizante aeróbico e anaeróbico aplicados com 50 e 40 dias de maturação, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

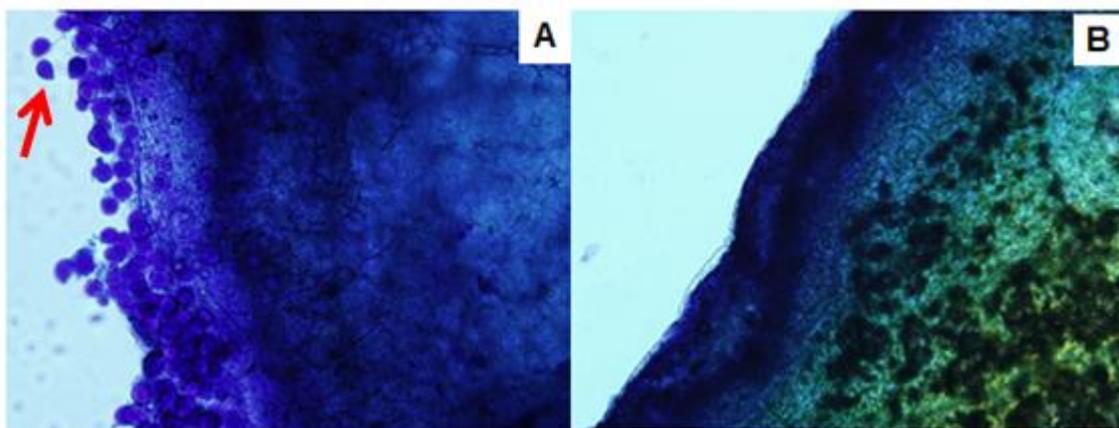


Figura 12. Discos de folhas de lima ácida Tahiti infectados com *Phytophthora nicotianae* pelo método da isca. (A) Controle inoculado, (B) Controle não inoculado, (↗) Esporângios. Visualização em microscópio óptico utilizando-se a objetiva de 40X.

4.2.2. Germinação de sementes de porta-enxerto de citros em substrato tratado com biofertilizante e inoculado com *P. nicotianae*

Para o teste de germinação de sementes em substrato inoculado com *P. nicotianae* e tratado com diferentes concentrações dos biofertilizantes (Tabela 4), observou-se que concentrações de 05 e 10% do BSA e 10% de BSAN favoreceram a germinação das sementes de tangerina Sunki. Para o limão Cravo, considerado um porta-enxerto moderadamente suscetível, o controle da doença por meio da utilização de biofertilizantes não foi expressivo, somente o biofertilizante produzido pela digestão aeróbica na concentração de 5% promoveu maior germinação das sementes desta variedade.

Tabela 4. Porcentagem de germinação de sementes de tangerina Sunki e limão Cravo, em solo inoculado com *Phytophthora nicotianae* e tratado com diferentes concentrações dos biofertilizantes.

Concentração	Aeróbico ^a				Anaeróbico			
	Sunki		Cravo		Sunki		Cravo	
0%	0	c ^b	11,1	c	11,1	c	16,6	b
5%	72,2	ab	72,2	ab	33,3	bc	33,3	b
10%	55,5	ab	61,1	abc	55,5	ab	44,4	ab
15%	22,2	bc	50	abc	16,6	bc	27,8	b
20%	33,4	bc	33,4	bc	44,4	bc	55,5	ab
25%	38,9	abc	22,2	bc	27,8	bc	27,8	ab
Sem inoculação	88,9	a	100	a	94,5	a	100	a

^aBiofertilizante anaeróbico e aeróbico foram aplicados com 103 dias de maturação. ^bMédias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Figura 13. Germinação de sementes de tangerina Sunki em solo inoculado com *Phytophthora nicotianae* e tratado com diferentes concentrações de biofertilizantes. (A) 25% BSAN, (B) 20% BSAN, (C) 15% BSAN, (D) 10% BSAN, (E) 5% BSAN, (F) Controle, (A') 25% BSA, (B') 20% BSA, (C') 15% BSA, (D') 10% BSA, (E') 5% BSA, (F') Controle.

Apesar de a receita inicial ter sido a mesma para a produção dos dois biofertilizantes, os teores finais de carbono, nitrogênio, fósforo, cálcio, enxofre, ferro, manganês e zinco foram maiores em SA, com exceção do cobre que foi encontrado em maior quantidade no SAN.

Tabela 5. Caracterização química dos biofertilizantes com 105 e 120 dias de maturação .

AMOSTRA		pH	C	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca O	Mg O	SO ₄
LAB.	SOLIC.								
		%							
01	SAN*	7,5	2,7	0,70	0,93	1,35	1,56	0,82	0,32
02	SA	8,3	3,7	0,95	4,80	1,49	2,83	1,30	1,11
		Cu	Fe	Mn	Zn				
		ppm							
01	SAN	4117	5832	55	126				
02	SA	1321	18144	136	341				

*(SAN): Biofertilizante suíno anaeróbico; (SA) Biofertilizante suíno aeróbico.

DISCUSSÃO

Compreender o processo produtivo dos biofertilizantes (digestão aeróbica e anaeróbica) e, conhecer o efeito dos microrganismos e dos metabólitos presentes nestes compostos, são importantes para a consolidação desta técnica alternativa de controle de doenças, quando se pretende uma agricultura mais sustentável e ecologicamente correta.

Os resultados apresentados neste estudo mostraram que o biofertilizante produzido pela digestão aeróbica de esterco suíno (BSA) apresentou um efeito maior na supressão de *P. nicotianae*, quando comparado com o biofertilizante produzido pela digestão anaeróbica de esterco suíno (BSAN). Fato esse que pode ser explicado pela quantidade de microrganismos cultiváveis encontrados no BSA (Figura 2) e, muitos daqueles que foram isolados se mostraram promissores para controle do patógeno nos testes *in vitro* (Tabela 1). Ainda com relação à comunidade microbiana, Grosch et al. (2012) relataram que a atuação de diferentes agentes de biocontrole tem maior eficiência quando comparado à aplicação individual do antagonista no solo. Além disso, a diversidade nos mecanismos de ação dos diferentes microrganismos existentes no composto pode ampliar o espectro de controle sobre o patógeno.

Dados de literatura mostram que biofertilizantes podem ser enriquecidos com agentes de biocontrole. Segundo Hayashida et al. (1989), quando um biofertilizante, produzido a partir da digestão anaeróbica de esterco suíno, foi enriquecido com *Streptomyces albidoflavus* houve um controle da sarna da batata em até 93%, promovendo um aumento na produção da cultura. Estudos de Kupper et al. (2009) mostraram que os biofertilizantes produzidos pela digestão anaeróbica e aeróbica de esterco bovino, em concentrações acima de 10% e, quando em associação com isolados de *Trichoderma* spp., promoveram maiores inibições na germinação de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão floral dos citros. Portanto, como proposto neste estudo, conhecer a comunidade microbiana existente em biofertilizantes, no decorrer do tempo de preparo e de acordo com os componentes da receita destes compostos, é

imprescindível quando se almeja encontrar microrganismos com potenciais antagonistas para patógenos de plantas, podendo os mesmos serem utilizados no enriquecimento de futuros compostos preparados com matérias primas disponíveis em outras propriedades agrícolas.

Nossos estudos mostraram que o pico de microrganismos cultiváveis existentes nos biofertilizantes está entre 25 e 35 dias (Figura 2), enquanto que a produção de metabólitos com capacidade para afetar o desenvolvimento micelial de *P. nicotianae* está entre 40 e 50 dias (Figura 5 e 7), porém, a temperatura e o pH mostraram ser fatores importantes, ou seja, para o surgimento desses picos, BSA precisou de temperatura em torno de 22 a 26°C e BSAN de temperatura mais amena (20°C), sendo o pH para ambos em torno de 8 (Figura 4 e 6). A não variação do pH também foi observado por Castro et al.(2013) ao testarem diversos tratamentos utilizando extrato aquoso de suínos. Para Tesseroli Neto (2006), o pH, assim como, a concentração da solução, a mistura da matéria-prima e dos minerais deverão estar compatibilizados para que quimicamente o produto final seja benéfico à planta e não cause injúrias. Diante disso, é importante mencionar que, após os picos populacionais dos microrganismos, a comunidade microbiana se estabilizou nos dois biofertilizantes com o processo de maturação, fato esse também relatado por Soares e Switzenbaum (1996).

A importância dos microrganismos existentes nestes compostos pode não estar restrita ao antagonismo, mas também, pode ser uma estratégia nutricional e biodinâmica para o vegetal. Dessa maneira, a importância do biofertilizante como fertilizante não estaria na quantidade dos seus nutrientes, mas na diversidade da composição mineral, onde compostos que não são disponíveis para a planta poderiam ser disponibilizados pela atividade biológica promovida nestes compostos, agindo mais como um ativador enzimático do metabolismo vegetal (PRATES; MEDEIROS, 2001). Considerando esses fatos, os dados da Tabela 5 revelam a importância dos microrganismos na quantidade de macro e micronutrientes presentes no biofertilizante, produzido pela digestão aeróbia de esterco suíno, os quais poderiam ser liberados para

as plantas, proporcionando equilíbrio nutricional e, tornando-as menos suscetíveis ao ataque de patógenos.

Além disso, segundo Campos (2008), o biofertilizante produz diversos compostos, como enzimas, ácidos orgânicos, hormônios, vitaminas e aminoácidos que podem atuar no mecanismo de defesa da planta, deixando-a mais fortalecida.

Diante do exposto, os biofertilizantes podem atuar no manejo do sistema biológico edáfico com o intuito de promover a saúde das plantas, seja por meio da redução de inóculo de *P. nicotianae* no solo, ou pelo seu efeito protetor ao sistema radicular. No entanto, ainda é necessário investigar mais sobre a capacidade de colonização e sobrevivência dos microrganismos veiculados pelos biofertilizantes na rizosfera, quanto aos seus efeitos à microbiota benéfica do solo, tendo em vista, a importância da ecologia desses sistemas na proteção de plantas, como, também, mencionado por Boland e Kuykendall (1998).

Com relação à produção de metabólitos pelos biofertilizantes, o respectivo trabalho mostrou que houve produção de substâncias antifúngicas (livre de células e termoestáveis) sob digestão anaeróbica e aeróbica de esterco suíno e, que tais metabólitos apresentaram efeito sobre o diâmetro médio da colônia de *P. nicotianae* (Figura 9). Esses resultados estão de acordo com os obtidos na literatura, onde concentrações acima de 10 e 15% de biofertilizantes inibiram o crescimento e a germinação *in vitro* de fungos fitopatogênicos (KUPPER et al., 2009, TRATCH; BETTIOL, 1997). Ainda nesse enfoque, Alves et al. (2001) relatam que os compostos bioativos, que resultam da fermentação de compostos orgânicos que contêm células vivas ou latentes de microrganismos ou, compostos provenientes de seus metabolismos, são constituídos de quelatos organominerais que funcionam como indutores de resistência, promotores de crescimento e protetores de plantas.

O biofertilizante BSA, em todas as concentrações testadas, mostrou reduções de raízes infectadas de limão Cravo (Tabela 2) e de porcentagens de folhas infectadas pelo método da isca, indicando que o BSA afetou a sobrevivência dos diferentes propágulos do fitopatógeno no substrato. Dados

semelhantes foram obtidos por Sang et al. (2010), onde os autores verificaram inibições da germinação de zoósporos (76-91,2%), redução no comprimento do tubo germinativo de 59,4 a 80,2% e inibição do crescimento micelial de *P. capsici*.

Por outro lado, embora o BSAN também tenha promovido redução de propágulos do patógeno, a sua eficiência no controle só foi obtida quando a concentração mais alta (50%) do produto foi utilizada (Tabela 3). Considerando que em concentrações mais altas, os biofertilizantes causaram sintomas de fitotoxidez nas plantas, a utilização do biofertilizante BSA mostra-se mais viável para o controle da doença. Devede et al. (2000), após a aplicação de biofertilizante em concentrações acima de 20% em pepino, soja e milho, verificaram, também, sintomas de fitotoxicidade nas plantas.

Sobretudo, os resultados obtidos nesta pesquisa incrementam o conhecimento científico desta área, mostrando o potencial de controle e supressão de *P. nicotianae* por meio da utilização do efluente obtido pela digestão aeróbica de esterco suíno. É esperado que, as informações geradas neste trabalho possam contribuir para a construção de tecnologias alternativas mais sustentáveis àquelas que predominam no processo produtivo agrícola atual.

5. CONCLUSÕES

- i) Os resultados obtidos nesta pesquisa mostraram que os microrganismos e os metabólitos existentes nos biofertilizantes inibiram o desenvolvimento da colônia de *P. nicotianae*;
- ii) o biofertilizante produzido pela digestão aeróbica de esterco suíno (BSA) apresenta melhor eficiência quanto na supressão de *Phytophthora nicotianae*;
- iii) BSA nas concentrações de 05 e 10% e BSAN a 10% favoreceram a germinação das sementes de tangerina Sunki, em substrato infestado pelo fitopatógeno; enquanto que, para o limão cravo, apenas BSA a 5% teve um efeito promissor na germinação das sementes nas mesmas condições.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADL, S.M., SIMPSON, A.G.B., FARMER, M.A., ANDERSEN, R.A., ANDERSON, O.R., BARTA, J.R., BOWSER, S.S., BRUGEROLLE, G.U.Y., FENSOME, R.A., FREDERICQ, S., JAMES, T.Y., KARPOV, S., KUGRENS, P., KRUG, J., LANE, C.E., LEWIS, L.A., LODGEJ, L. D.H., MANN, D.G., MCCOURT, R.M., MENDOZA, L., MOESTRUP, O., MOZLEY, S. S. E., NERAD, T.A., SHEARER, C.A., SMIRNOV, A.V., SPIEGEL F.W., TAYLOR, M.F.J.R. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, p. 52:399-451.
- AGRIANUAL. 2013. Anuário da agricultura brasileira. São Paulo. Informa economics/FNP, p. 256-258.
- ALTIERI, M. 2004. Agroecologia: a dinâmica produtiva da agricultura sustentável. 4 ed. Porto Alegre: UFRGS.
- ALVES, S. B.; MEDEIROS, M. B.; TAMAI, M. A.; LOPES, R. B. 2001. Trofobiose e microrganismos na proteção de plantas: Biofertilizantes e entomopatógenos na citricultura orgânica. *Biociência* Ciência and Desenvolvimento, n.21, p.16-21.
- ASERI, G.K.; JAIN, N.; PANWAR, J.; RAO, A.V.; MEGHWAL P.R. 2008. Biofertilizers improve plant growth, fruit yield, nutrition, metabolism and rhizosphere enzyme activities of Pomegranate (*Punicagranatum* L.) in Indian Thar Desert. *Scientia Horticulturae*, n.117, p.130–135.
- ATLAS, R.M., PARKS, L.C., 1993. *Handbook of Microbiological Media*. CRC Press, London.
- BETTIOL, W. Isolamento seletivo de *Bacillus*. In: Melo, I. S. and Sanhueza, R. M. V. 1995. Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos: Manual técnico. Jaguariúna, Embrapa – CNPMA, p. 35-36.
- BETTIOL, W., TRATCH, R.; GALVÃO J.A.H. 1998. Controle de doenças de plantas com biofertilizantes. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, p. 22.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. 2009. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. *Brasileira* 32: 14-20

- BOLAND GJ, KUYKENDALL LD. 1998. *Plant-microbe interactions and biological control*. New York: Marcel Dekker.
- BRAGA, E. S. Crescimento inicial e aspectos fisiológicos do pinhão manso fertirrigado com biofertilizante bovino. 2010. p.43 . Monografia (Curso de graduação em agronomia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- CAMPOS, A. C. 2008. Cuidando da terra, cultivando a biodiversidade, colhendo soberania alimentar. Terra livre de transgênicos e sem agrotóxicos construindo o projeto popular e soberano para a agricultura. 7º Jornada de Agroecologia.
- CAO, Y., CHANG, Z., WANG, J., MA, Y., FU, G. 2013. The fate of antagonistic microorganisms and antimicrobial substances during anaerobic digestion of pig and dairy manure, *Bioresource Technology*, Volume 136, May, Pages 664-671, ISSN 0960-852, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.052>.
- CAPORAL, F. R.; COSTABEBER, J. A. 2004. *Agroecologia e extensão rural: contribuições para a promoção do desenvolvimento rural sustentável*. Brasília: MDA/SAF/DATER-IICA.
- CASALE, W.L., MINASSIAN, V., MENGE, J.A., LOVATT, C.J., POND, E., JOHNSON, E. & GUILLEMET, F. 1995. Urban and agricultural wastes for use as mulches on avocado and citrus and for delivery of microbial biocontrol agents. *Journal of Horticultural Science* 70:315- 352.
- CASTRO, B. B. de. ; SOARES, R.T. R. N.; MANHÃES, C.M. C.; FRANCELINO, F. M. A. 2013. Avaliação da fitotoxicidade durante o processo de compostagem de dejetos de matrizes suínas *Cadernos de Agroecologia – ISSN 2236-7934 – v. 8, n. 2*.
- COLLARD, F.H.; ALMEIDA, A.; COSTA, M.C.R.; ROCHA, M.C. 2001. Efeito do uso de biofertilizante Agrobio na cultura do maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg) *Revista Biociências*, Taubaté, v.7, n.1, p.15-21.
- CONN, K. L.; LAZAROVITS, G. 1999. Impact of animal manures on verticillium wilt, potato scab, and soil microbial populations. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 21, p. 81-92.

- DENNIS, C., WEBSTER, J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. *Transactions of the British Mycological Society*, v.57, n.3, p.359-363.
- DEVIDE, A.C.P.; AGUIAR, L.A.; MIRANDA, S.C.; RICCI, M.S.F.; ALMEIDA, D.L.; RIBEIRO, R.L.D. 2000. Determinação do efeito fitotóxico de um biofertilizante líquido utilizado em viveiros de café, por meio de bioensaios em casa-de-vegetação. *Seropédica: Embrapa*,. 4p. (Comunicado técnico).
- ELAD, Y. & SHTINBERG, D. 1994. Effect of compost water extracts on grey mould (*Botrytis cinerea*). *Crop Protection* 13, 109-114.
- ERWIN, D.C., RIBEIRO, O.K. 1996. *Phytophthora disease worldwide*. St Paul, APS Press, 562p.
- FALDONI, L. 2011. Efeito do biofertilizante no desenvolvimento de porta-enxertos de citros e na indução de resistência à gomose de *Phytophthora*. Araras: CCA UFScar. Dissertação (Mestrado).
- FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. 2001. In: Luz, E. D. M. N.; Santos, A. F.; Matsuoka, K.; Bezerra, J.L. (Eds). *Doenças causadas por Phytophthora no Brasil*. Campinas. Livraria e Editora Rural Ltda. p. 283-342.
- FEICHTENBERGER, E., BASSANEZI, R.B., SPÓSITO, M.B. AND BELASQUE JR., J. 2005. Doenças dos Citros. In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. (Eds.). *Manual de Fitopatologia*, São Paulo: Editora Ceres, v. 2, p. 239-269.
- GHINI, R., BETTIOL, W. 2000. Proteção de plantas na agricultura sustentável. *Caderno de Ciências & Tecnologia*, v. 17, p. 61-70.
- GLIESSMAN, S. R. 2001. *Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável*. 2. Ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 653p.
- GRAHAM, JAMES H. 2011. Phosphite for control of *Phytophthora* diseases in citrus: model for management of *Phytophthora* species on forest trees? *New Zealand Journal of Forestry Science* . Supplement 8, v. 41, p.S49-S56. 8p.

- GROSCH, R.; DEALTRY, S.; SCHREITER, S.; BERG, G.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SMALLA, K. 2012. Biocontrol of *Rhizoctonia solani*: complex interaction of biocontrol strains, pathogen and indigenous microbial community in the rhizosphere of lettuce shown by molecular methods. *Plant and Soil*, p.361, 343–357.
- GUSMÃO, M. M. F. C. C. 2008. Produção de biogás em diferentes sistemas de criação de suínos em Santa Catarina. Universidade Federal de Santa Catarina. Dissertação (Mestrado).
- HAYASHIDA, S.H.; CHOI, M.Y.; NANRI, N.; YOKOYAMA, M. AND UEMATSU, T. 1989. Control of potato common scab with an antibiotic biofertilizer produced from swine feces containing *Streptomyces albidoflavus* CH-33. *Agric. and Biol. Chem.* p. 53:349-354.
- HOITINK, H.A.J. & BOEHM, M.J. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology* 37:427-446. 1999.
- JEFFERS, S. N.; MARTIN, S. B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease*, vol. 70 n.11, p. 1038-1043.
- KAOSIRI, T., ZENTMYER, G.A. AND ERWIN, D.C. 1978. Stalk length as a taxonomic criterion for *Phytophthora palmivora* isolates from cacao. *Canadian Journal of Botany*, v. 56, p.1730-1738.
- KUPPER, K. C.; BELLOTTE, J. A. M.; GOES, A.DE. 2009. Controle Alternativo de *Colletotrichum acutatum*, Agente Causal da Queda Prematura dos Frutos Cítricos. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v. 31, n. 4, p. 1004-1015.
- KUPPER, K.C.; BETTIOL, W.; GOES, A. DE; SOUZA, P.S. DE; BELLOTTE, J.A.M. 2006. Biofertilizer for control of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *Crop Protection, Amsterdam*, v. 25, p.569-573.
- LAZAROVITS, G.; CONN, K. L.; ABBASI, P.A. 2005. Understanding the mode of action of organic soil amendments provides the way for improved management of soilborne plant pathogens. In: Vanachter, A (Ed). *Proceedings of the Sixth International Symposium on Chemical and Non-Chemical Soil and Substrate Desinfestation*, p. 215-222.

- LEONI, C.; GHINI, R. 2002. Efeito do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade in vitro a *Phytophthora nicotianae*. Fitopatologia Brasileira. v. 28 p.067-075.
- LIMA, G. J. M. M. A. 2002. Poluição Ambiental por Dejetos de Suínos e o Papel dos Técnicos e Nutricionistas. EMBRAPA Suíno e Aves.
- LITTERICK, A. M, L. HARRIER, P. WALLACE, C. A. WATSON, M. WOOD. The Role of Uncomposted Materials, Composts, Manures, and Compost Extracts in Reducing Pest and Disease Incidence and Severity in Sustainable Temperate Agricultural and Horticultural Crop Production: A Review. Critical Reviews in Plant Sciences. Vol. 23, Iss. 6, 2004.
- LIU, S.; BAKER, R. 1980. Mechanism of biological control in soil supressive to *Rhizoctonia solani*. Phytopathology. v. 70 p.404-412.
- LUMSDEN, R.D.; LEWIS, J.A.; MILLER, P.D. 1983. Effect of composted sewage sludge on several soilborne and diseases. Phytopathology, v.73, p.1543-1548.
- LUTZ, A. L.; MENGE, J. A. 1991. Population fluctuations and the numbers and types of propagules of *Phytophthora parasitica* that occur in irrigated citrus groves. Plant Disease, v. 75, p. 173-179.
- MAGRINI, F. E., CAMATTI-SARTORI, V., FINKLER, R., TORVES, J., VENTURIN, L. 2011. Características químicas e avaliação microbiológica de diferentes fases de maturação do biofertilizante Bokashi Dourados, v.4, n.12, p.146-151.
- MARTIN, J. P. 1950. The use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. Soil Science. v. 69 p. 215-232.
- MASAGO, H., YOSHIKAWA, M., FUKADA, M., AND NAKANISHI, N. 1977. Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants. Phytopathology 67: 425-428.
- MCQUILKEN, M.P.; WHIPPS, J.M.; LYNCH, J.M. 1994. Effects of water extracts of a composted manure-straw mixture on the plant pathogen *Botrytis cinerea*. World Journal Microbiology and Biotechnology, p.10:20-26.

- MEDEIROS, M. B.; WANDERLEY, P. A.; WANDERLEY, M. J. A. 2003. Biofertilizantes líquidos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v.31, p.38-44.
- MEDEIROS, M. B; D'ANDREA, P.A. 2002. Biofertilizantes biodinâmicos na nutrição e proteção de hortaliças. In: *Hortibio: 1º Congresso Brasileiro de Horticultura Orgânica, Natural, Ecológica e Biodinâmica. Resumos*. Botucatu- SP:Agroecológica, p.225-232.
- MEDINA FILHO, H.P., BORDIGNON, R., SIQUEIRA, W.J., FEICHTENBERGER, E., CARVALHO, M.R.T. 2004. Tolerância de híbridos e clones de porta-enxertos de citros à infecção de raízes por *Phytophthora nicotiana*. *Fitopatol Bras* 28: 534-540.
- MENEZES JÚNIOR, F.O.G. 2004. Crescimento e avaliação nutricional da alface cultivada em "NFT" com soluções nutritivas de origem química e orgânica. *Hortic. Bras.*, Brasília, v. 22, n. 3, p. 632-637.
- MIELE, M. 2006. Contratos, especialização, escala de produção e potencial poluidor na suinocultura de Santa Catarina. Tese Doutorado. Porto Alegre: UFRGS, p. 286.
- NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G; MILAN, P.; LOPES, F. F.; PEREIRA, F. C.; KALAKI, R. B. 2010. O Retrato da Citricultura Brasileira. Editora Marcos Fava Neves, Ribeirão Preto, SP, p. 137.
- PAULA, G.; PEROSA, J. M. Y.; RECHZIEGEL, W.; BUENO, O. C. 2011. Suinocultores da agricultura familiar do município de Marechal Cândido Rondon (PR). *Revista ADMpg Gestão Estratégica*, Ponta Grossa, v. 4, n. 1, p.19-26.
- PERDOMO, C. C.; LIMA, J.M.M.; NONES, K. 2001. Produção de suínos e meio ambiente. 9º Seminário Nacional de Desenvolvimento da Suinocultura, p. 24.
- PRATES, H.S.; MEDEIROS, M.B. 2001. Entomopatógenos e biofertilizantes na citricultura orgânica. Campinas: SAA/ Coordenadoria de defesa Agropecuária.
- RANZI, T. J. D. 2012. Estudo de viabilidade de transformação de esterqueiras e bioesterqueiras para dejetos de suínos em biodigestores rurais visando o aproveitamento do biofertilizante e do biogás. Disponível em:

<http://www.proceedings.scielo.br/pdf/agrener/n5v1/058.pdf>. Acesso em 12/03/14.

REUVENI, M.; AGAPOV, V.; REUVENI, R. Suppression of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) by foliar sprays of phosphate and potassium salts. *Plant Pathology*, v.44, p.31-39,1995.

ROMEIRO, R.S. 2001. Preservação de bactérias fitopatogênicas. In: Romeiro, R.S. *Métodos em Bacteriologia de Plantas*. Viçosa. UFV. p.87-96.

SANG, M. K., KIM, J. G., KIM, K. D. 2010 .Biocontrol Activity and Induction of Systemic Resistance in Pepper by Compost Water Extracts Against *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*, v. 100, N.8.

SANTOS, A. C.; AKIBA, F. 1996. Biofertilizantes líquidos: uso correto na agricultura alternativa. Seropédica: Imprensa Universitária/UFRRJ. P.35.

SANTOS, L.A.C.V. 1992. Biofertilizante líquido, o defensivo da natureza. *Agropecuária Fluminense* 8, Niterói, EMATER, p.16.

SANTOS, L.A.C.V. 2001. A ação múltipla de biofertilizante líquido como ferti e fitoprotetor em lavouras comerciais. In: Resumos do 1º Encontro de Processos de Proteção de Plantas: Controle ecológico de pragas e doenças. Botucatu: Agroecológica, p.91-96.

SILVA, A. F., PINTO, J. M., FRANÇA, C. R. R. S., FERNANDES, S. C., GOMES, T. C DE A., SILVA, M. S. L. DA E MATOS, A. N. B. 2007. Preparo e Uso de Biofertilizantes Líquidos. EMBRAPA.(Comunicado Técnico da Embrapa Semi-Árido,130).

SILVA, T. V.; RESENDE, E. D.; VIANA, A. P.; PEREIRA, S. M. F.; CARLOS. 2008. v.28, p.545-550,.

SILVA, P. L. Zoonoses Emergentes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 21., 2009, Porto Alegre. Anais eletrônicos. Porto Alegre: Engormix, 2009. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-avicultura/saude/artigos/zoonoses-emergentes-t160/16.html>>. Acesso em: 21 jan. 2012.

- SIMPSON, A.G.B., ROGER, A.J. 2004. The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Current Biololy* 14: R693- R696.
- SOARES, H.M.; SWITZENBAUM, M.S. 1996. Avaliação de métodos para medir o grau de estabilidade de produtos da compostagem. Joinville: Centro de Desenvolvimento Biotecnológico.
- SOUZA, J. L.; RESENDE, P. 2003. Manual de horticultura orgânica. Viçosa: Aprenda Fácil, 564p.
- TAKITANE I. C. e SOUZA M. C. M. 2000. Produção de suínos no Brasil: Impactos ambientais e sustentabilidade. XXXVIII Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural. p.15.
- TESSEROLI NETO, E. A. 2006. Biofertilizantes: caracterização química, qualidade sanitária e eficiência em diferentes concentrações na cultura da alface. Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo (Departamento de Solos e Engenharia Agrícola), Universidade Federal do Paraná.
- TIMMER, L.W. & MENGE, J.A. 1988. Phytophthora – induced diseases. In: Whiteside, J.O. Garnsey, S.M. & Timmer, L.W. (Eds). *Compendium of Citrus diseases*. Saint Paul. American Phytopathological Society Press.. pp.22- 24.
- TRATCH, R., BETTIOL, W. 1997. Efeito de biofertilizantes sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.32, n.11, p.1131-1139.
- TROTTA,A., VARESE, G.C., GNAVI, E., FUSCONI, E., SAMPO, S., BERTA, G.1996. Interaction between the soil-borne pathogen *Phytophthora parasitica* var. *parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plants. *Plant Soil* 185:199– 209.
- VAIRO , A . C. dos S.; SAMPAIO, H. N. 1993. Efeito do biofertilizante líquido obtido a partir da fermentação anaeróbia do esterco bovino, no controle de insetos prejudiciais à lavoura de citros e seus inimigos naturais. In: SEMINÁRIO BIENAL DE PESQUISA, 6., 1993, Resumos...Seropédica: UFRRJ.
- VAIRO, A. C. S.; AKIBA, F. 1996. Biofertilizante líquido: uso correto na agricultura alternativa. Seropédica:Imprensa Universitária.

- VILLA, G.A.S. Indução de resistência em citros contra *Phytophthora citrophthora* e *Phytophthora nicotinae*: método de inoculação, seleção de indutores, aspectos fisiológicos e bioquímicos. Piracicaba: ESALQ/USP. Dissertação de Mestrado.
- WHITESIDE, J.O., GARNSEY, S.M., TIMMER, L.W. 1996. Compendium of citrus diseases. APS Press. St. Paul, 80p.
- WIDMER, T.L., GRAHAM, J.H., MITCHELL, D.J. 1998 Composted municipal waste reduces infection of citrus seedlings by *Phytophthora nicotianae*. Plant Dis 82:683 – 688.
- ZANDONADI DB; SANTOS MP; MEDICI LO; SILVA J. 2014. Ação da matéria orgânica e suas frações sobre a fisiologia de hortaliças. Horticultura
- Zhang, W.; Dick, W.A., Hoitink, H.A.J. 1996. Compost-induced systemic acquired resistance in cucumber to *Pythium* root rot and anthracnose. Phytopathology 86: 1066-1070.
- ZULIAN, A., DÖRR, A. C., ALMEIDA, S.C. 2013. Citricultura e agronegócio cooperativo no Brasil. v. 11, nº 11, p. 2290-2306.