



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

**BIOFERTILIZANTES, A BASE DE ESTERCO BOVINO, NO CONTROLE DE  
*Phytophthora nicotianae* EM CITROS**

**PITT PAUL WEHR**

**Araras  
(2014)**



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

**BIOFERTILIZANTES, A BASE DE ESTERCO BOVINO, NO CONTROLE DE  
*Phytophthora nicotianae* EM CITROS**

**PITT PAUL WEHR**

**ORIENTADOR: PROF. Dra. 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**

W414bb Wehr, Pitt Paul.  
Biofertilizantes, a base de esterco bovino, no controle de  
*Phytophthora nicotianae* em citros / Pitt Paul Wehr. -- São  
Carlos : UFSCar, 2014.  
63 f.

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

1. Fertilizantes orgânicos. 2. Biofertilizantes. 3. Esterco  
bovino. 4. Microorganismos. I. Título.

CDD: 631.86 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DE

**PITT PAUL WEHR**

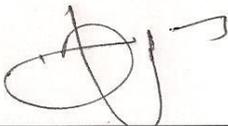
APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL, DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE SÃO CARLOS, **EM 08 DE JULHO 2014.**

BANCA EXAMINADORA:



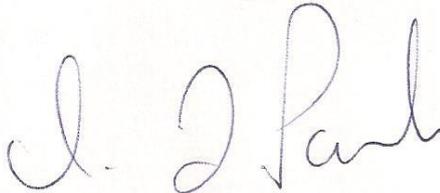
---

**PROF<sup>ª</sup>. DR<sup>ª</sup>. KATIA CRISTINA KUPPER**  
**ORIENTADOR**  
**(UFSCar)**



---

**PROF. DR. DIRCEU DE MATTOS JUNIOR**  
**(IAC)**



---

**PROF. DR. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**  
**(USP)**

## **AGRADECIMENTOS**

Dedico este trabalho à maior alegria da minha vida, minha filha,  
Surya Caliman Wehr, você foi minha inspiração, minha força e minha melhor  
lição de vida, te amo!

Aos meus pais, sem eles, nada do que foi realizado nestes dois anos teria sido  
possível, não só pelo apoio e carinho, mas por tudo que vocês me ensinaram  
na vida, minha admiração e amor por vocês é muito maior do que as palavras  
podem descrever.

À Elaine, por me incentivar e me apoiar em todos os momentos, este trabalho  
jamais teria acontecido se não fosse por ela, guardo carinho e admiração que  
vão durar pelo resto da minha vida.

A toda minha família, pessoas maravilhosas que me inspiram à dar o melhor de  
mim em todos os momentos, vocês são meu exemplo e meu orgulho.

Aos amigos e amigas incríveis que conheci nestes dois anos no centro de  
Citricultura, pessoas maravilhosas que tornaram este trabalho possível e sem  
dúvida nenhuma mais feliz. Do laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico  
levarei muito mais que somente amigos! À Katia e Aline que me apoiaram o  
tempo todo, incluindo nos momentos mais difíceis. Nunca vou esquecer o que  
vocês fizeram por mim.

Aos amigos de Araras, da Comuna, aos amigos de longa data espalhados por  
este mundo!

a Deus, e a sincronia do universo.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT .....	v
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	4
2.1. Agente causal.....	4
2.1.1. Importância.....	4
2.1.2. Biologia.....	5
2.1.3 Controle.....	8
2.2. Uso de biofertilizantes no controle fitossanitário.....	9
2.3. Importância do uso de resíduos na agricultura .....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1. Preparo dos biofertilizantes .....	17
3.2. Ensaio <i>in vitro</i> .....	19
3.2.1 Efeito do filtrado livre de células e substâncias termoestáveis presentes nos biofertilizantes, sobre o crescimento micelial de <i>P. nicotianae</i> . .....	19
3.2.2. Efeito dos microrganismos presentes nos biofertilizantes sobre <i>P. nicotianae</i> . .....	21
3.3. Ensaio <i>in vivo</i> .....	22
3.3.1 Bioensaio com plântulas de alfafa .....	22
3.3.2. Preparo de inóculo .....	23
3.3.3. Testes <i>in vivo</i> com plantas jovens de limão Cravo, sob condições controladas. ....	24
3.3.4. Germinação de sementes de porta-enxerto de citros plantadas em substrato tratado com biofertilizantes .....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
4.1. Ensaio <i>in vitro</i> .....	29
4.1.1. Efeito da fração filtrada dos biofertilizantes sobre o crescimento micelial de <i>P. nicotianae</i> .....	29
4.1.2. Efeito dos microrganismos presentes em biofertilizantes sobre <i>P. nicotianae</i> .....	34
4.2. Ensaio <i>in vivo</i> .....	39
4.2.1. Ensaio com plantas jovens de limão Cravo .....	39
4.2.2. Germinação de sementes de porta-enxerto de citros, plantadas em substrato tratado com biofertilizantes e inoculado com <i>P. nicotianae</i> .....	42
5 CONCLUSÕES .....	46
6 LITERATURA CITADA .....	47

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição de alguns dos biofertilizantes difundidos para uso agrícola no Brasil. ....	17
<b>Tabela 2.</b> Análise química das cinzas de plantas cítricas, presentes na composição dos biofertilizantes utilizados no presente trabalho.....	29
<b>Tabela 3.</b> Composição química final dos dois biofertilizantes (Ban e Box) com 105 e 120 dias de preparo, respectivamente. ....	32
<b>Tabela 4.</b> Efeitos do filtrado livre de células (FLC) e dos compostos termotolerantes (CT), presentes nos biofertilizantes sobre o crescimento micelial de <i>P. nicotianae</i> .....	33
<b>Tabela 5.</b> Seleção de isolados que apresentaram antagonismo à <i>Phytophthora nicotianae</i> .....	36
<b>Tabela 6.</b> Número de raízes de limão Cravo infectadas com <i>Phytophthora nicotianae</i> e densidade populacional do patógeno em substrato tratado com diferentes doses dos biofertilizantes .....	39
<b>Tabela 7.</b> Número de sementes germinadas de dois porta-enxertos de citros, <b>semeadas</b> em substrato inoculado com <i>Phytophthora nicotianae</i> , tratado com diferentes doses dos biofertilizantes .....	43

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Estruturas reprodutivas de <i>Phytophthora nicotianae</i> obtidas por microscopia óptica. ....	7
<b>Figura 2.</b> Ilustração do método de produção dos biofertilizantes aeróbico e anaeróbico .....	19
<b>Figura 3.</b> Microscopia óptica de duas radículas de brotos de alfafa.....	23
<b>Figura 4.</b> Fragmentos de raízes de limão Cravo plaqueados em meio seletivo. ....	25
<b>Figura 5.</b> Discos de folha de lima ácida Tahiti, não infectados e infectados com <i>P. nicotianae</i> . ....	26
<b>Figura 6.</b> Germinação de plântulas de tangerina Sunki.....	28
<b>Figura 7.</b> Flutuações da temperatura, pH e efeito dos compostos livres de células, presentes em biofertilizante anaeróbico, sobre o crescimento micelial de <i>P. nicotianae</i> ao longo do tempo.....	30
<b>Figura 8.</b> Flutuações da temperatura, pH e efeito dos compostos livres de células, presentes em biofertilizante aeróbico, sobre o crescimento micelial de <i>P. nicotianae</i> ao longo do tempo.....	31
<b>Figura 9.</b> Populações de grupos microbianos presentes em Ban e Box, ao longo do tempo.. ....	34
<b>Figura 10.</b> Fotos obtidas por meio de microscopia óptica de isolados contidos nos biofertilizantes.. ....	38
<b>Figura 11.</b> Sintoma de fitotoxicidade observado em folhas de limão Cravo, causados pelos biofertilizantes anaeróbico e aeróbico, aplicados no substrato em diferentes doses.....	42

## **BIOFERTILIZANTES, A BASE DE ESTERCO BOVINO, NO CONTROLE DE *Phytophthora nicotianae* EM CITROS**

**Autor: PITT PAUL WEHR**

**Orientador: Prof. Dr. KATIA CRISTINA KUPPER**

### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de um biofertilizante feito à base de esterco bovino, produzido sob digestão anaeróbica ou oxigenação forçada, no controle de *Phytophthora nicotianae*, mediante técnicas de avaliação *in vitro* e *in vivo*. Além disso, buscou-se investigar separadamente o efeito dos componentes presentes nestes produtos sobre o patógeno. Para tal, testou-se o efeito de microrganismos cultiváveis e da fração filtrada, visando identificar o papel dos fatores responsáveis pelo controle da doença. Verificou-se que os biofertilizantes possuem substâncias e microrganismos presentes em sua composição capazes de atuar no patossistema em questão, havendo destaque para bactérias baciliformes termorresistentes. Observou-se que, o efeito da fração filtrada do biofertilizante anaeróbico foi efetivo sobre o crescimento micelial do patógeno e significativamente superior à fração filtrada do biofertilizante aeróbico, este, apresentou teores mais elevados de alguns nutrientes minerais, com destaque para cálcio, cobre e ferro. Já o biofertilizante aeróbico apresentou maior quantidade e diversidade de microrganismos antagonistas à *P. nicotianae*. A aplicação de ambos os biofertilizantes reduziu o número de raízes de porta-enxerto de citros (*Citrus limonia* e *Citrus sunki*) infectadas, assim como, a quantidade de inóculo do patógeno no substrato de plantio utilizado. Em concentrações elevadas os biofertilizantes causaram fitotoxicidade em plantas jovens de citros, mas em concentrações moderadas, os biofertilizantes elevaram o número de sementes germinadas de limão Cravo e tangerina Sunki, semeadas em substrato inoculado com o fitopatógeno. Isso faz do uso de biofertilizantes, uma opção para o manejo de *P. nicotianae* em citros, contudo novas pesquisas são necessárias para elucidar questões referentes ao seu uso prático e riscos referentes à sua aplicação.

Termos para indexação: Fração filtrada, microrganismos antagonistas

## BIOFERTILIZERS, MADE OF CATTLE MANURE SLUDGE, IN THE CONTROL OF *Phytophthora nicotianae* IN CITRUS

**Author: PITT PAUL WEHR**

**Adviser: Prof. Dr. KATIA CRISTINA KUPPER**

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of two organic liquid fertilizers made from fresh cattle manure, produced under anaerobic digestion or forced oxygenation, for the control of *Phytophthora nicotianae*. Furthermore, we aimed to investigate separately the effect of the components in these products over the pathogen. For so, we tested the effect of cultivable microorganisms and the filtered fraction over the pathogen, targeting to identify the role of these factors in the disease control. It was found that biofertilizers have substances and microorganisms present in its composition capable of operating in the pathosystem in question, highlighting the role of bacilliform heat resistant bacteria. It was observed that the effect of the filtered fraction of the anaerobic biofertilizer was effective on the mycelial growth of the pathogen and significantly higher than the filtered fraction of the aerobic biofertilizer, and had higher levels of some nutrients, especially calcium, copper and iron. The aerobic biofertilizer showed greater quantity and diversity of microorganisms antagonistic to *P. nicotianae*. The application of both biofertilizers reduced the number of infected roots of two citrus rootstocks (*Citrus limonia* and *Citrus sunki*). Both biofertilizers also reduced the amount of pathogen inoculum in the soil. In high concentrations biofertilizers cause phytotoxicity on young citrus plants, but in moderate concentrations, the products increased the number of germinated seeds of Rangpur lime and mandarin Sunki sown on soil inoculated with the pathogen. This makes the use of biofertilizers an option to be integrated in the disease management of *P. nicotianae* in citrus, however, more studies are required to investigate other issues, such as the risks related to the application of these products.

Index terms: Filtered fraction, antagonistic microorganisms

## 1 INTRODUÇÃO

A citricultura detém grande importância socioeconômica para o Brasil. Só nas últimas cinco safras, a produção média foi de aproximadamente 19 milhões de toneladas em uma área cultivada de aproximadamente 814 mil hectares. (AGRIANUAL, 2013).

A simplificação ecológica presente em sistemas agrícolas, decorrente da monocultura extensiva, pode favorecer a ocorrência de pragas e doenças, gerando problemas epidemiológicos (GLIESSMAN, 2007; ALTIERI, 2009). A citricultura não é exceção frente a este modelo, e como agravante, as espécies e variedades atualmente cultivadas são acometidas por um grande número de problemas fitossanitários. Em relação às doenças, embora o destaque atual seja o huanglongbing (HLB), outras doenças como o cancro cítrico, a queda prematura dos frutos cítricos, mancha preta e a gomose de *Phytophthora*, também possuem importância econômica para o cultivo dos citros.

Essas doenças são responsáveis por grandes perdas de produtividade e podem afetar significativamente a produção de alimentos e o rendimento econômico da cultura. Assim, frequentemente, adotam-se medidas de controle, com o objetivo de manter essas doenças em níveis aceitáveis economicamente. Contudo, o elevado uso de insumos químicos pode gerar contaminações ambientais, riscos à população e consumo intensivo dos recursos naturais, o que distancia a citricultura da agricultura sustentável (LICHTFOUSE et al., 2009).

Atualmente, os citros se destacam não só pela grande produção de frutas, o que é um ponto positivo, mas, também, pelo elevado uso de agrotóxicos. Segundo dados de literatura, dentre as principais culturas com destaque econômico no Brasil, a citricultura ocupa o quinto lugar no consumo destes produtos desde o início dos anos 2000. Anualmente, o país utiliza mais de um milhão de toneladas de agrotóxicos, o que o torna o maior consumidor mundial dessas substâncias (BUENO et al., 2014).

Sobretudo, o uso intensivo de insumos agrícolas pode ser oneroso, o que viabiliza a utilização de métodos alternativos de controle fitossanitário.

Frente a este cenário, o uso de biofertilizantes, produzidos a partir de resíduos orgânicos, mostra-se promissor.

Os biofertilizantes e alguns outros resíduos e compostos orgânicos, além de conterem nutrientes minerais e microrganismos benéficos em sua composição, podem ainda, controlar e suprimir diversos fitopatógenos (BETTIOL et al., 1998; LEONI & GHINI, 2002; MEDEIROS et al., 2003; LITTERICK et al., 2004; KUPPER et al., 2006; BETTIOL & MORANDI, 2009). No entanto, a ampla variação na composição destes produtos e nos modos de preparo geram resultados inconstantes em patossistemas distintos (HOITINK et al., 1997; BONANOMI et al., 2010). Como exemplo, BONANOMI et al. (2010) apontam para a escassez de relatos positivos com a utilização de resíduos orgânicos no controle de fitopatógenos saprófitas facultativos, como oomicetos dos gêneros *Pythium* e *Phytophthora*.

*Phytophthora nicotianae* (Breda de Haan) (*P. parasitica* Dastur) é um fitopatógeno de grande importância mundial. Em citros, esse oomiceto pode causar “damping-off” de pré e pós-emergência, lesões em folhas, brotos e hastes, podridão do pé e podridão de raízes e radículas (FEICHTENBERGER, 2001). Parte de sua importância deve-se ao amplo uso de limão Cravo, *Citrus limonia* (moderadamente suscetível) como porta-enxerto, além da limitada gama de opções de controle, em que, a aplicação de fosfitos (GRAHAM, 2011) e principalmente, o fosetyl-Al são os métodos mais empregados (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Apesar dos resultados variáveis descritos na literatura, a aplicação de resíduos orgânicos pode ser uma das possíveis alternativas de controle. Existem relatos do surgimento de solos supressivos à *P. nicotianae*, quando tratados com lodo de esgoto (LEONI & GHINI, 2002; WIDMER et al., 1998). Faldoni (2011) verificou que biofertilizantes à base de esterco bovino são promissores no controle do patógeno e que estes compostos podem ativar genes relacionados à resistência sistêmica em plantas de citros. Sang et al. (2010) obtiveram resultados similares para *P. capsisi* em pimenta. Sobretudo, os estudos recentes têm convergido para elucidação de quais são as

características presentes nos biofertilizantes responsáveis pelos efeitos de controle e supressividade a estes fitopatógenos.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de biofertilizantes, produzidos pela digestão de esterco bovino sob condições aeróbica e anaeróbica, no controle de *P. nicotianae* em citros, bem como, verificar a ação antagônica dos microrganismos, do filtrado livre de células e compostos termoestáveis presentes nos biofertilizantes sobre o fitopatógeno.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Agente causal

#### 2.1.1. Importância

O gênero *Phytophthora*, do grego "destruidor de plantas", foi primeiramente descrito por Anton de Bary em 1876 após a grande fome irlandesa de 1845 causada por *Phytophthora infestans* nos cultivos de batata. Com o passar dos anos novas espécies foram descritas, geralmente associadas à doenças altamente destrutivas (DICK, 1990). Atualmente, mais de oitenta espécies de *Phytophthora* já estão descritas na literatura, dentre elas *P. nicotianae* que é o epíteto mais antigo e que prevaleceu sobre as sinonímias *P. nicotianae* var. *nicotianae*, *P. nicotianae* var. *parasitica*, *P. parasitica* var. *nicotianae* e *P. parasitica* var. *parasitica*. No Brasil, este fitopatógeno é causador de doenças em mais de 20 espécies hospedeiras já assinaladas, muitas delas de importância econômica, tais como: fumo (*Nicotiana tabacum*), guaraná (*Paullinia cupana*), gengibre (*Zingiber aromaticum*), figo (*Ficus carica*), abacaxi (*Ananas comosus*), mamão (*Carica papaya*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), mandioca (*Manihot esculenta*), ervilha (*Pisum sativa*) e cebola (*Allium cepa*), dentre diversas outras espécies ornamentais e cítricas (LUZ et al., 2001).

Várias espécies de *Phytophthora* já foram descritas como capazes de incitar doenças em plantas cítricas, porém, algumas delas apenas sob inoculação artificial. De todas as espécies relatadas, atribui-se maior importância apenas a três: *P. palmivora*, *P. citrophthora* e *P. nicotianae* Breda de Haan (*P. parasitica* Dastur). Dessas, *P. nicotianae* destaca-se por ser a mais frequente no Brasil, por possuir uma ampla gama de hospedeiros e elevada capacidade de sobrevivência em áreas de cultivo (FEICHTENBERGER, 2001). Ainda segundo este autor, dentre os principais sintomas e manifestações de *P. nicotianae* em plantas cítricas, estão:

- **Gomose de *Phytophthora***: ocorre em todas as regiões produtoras de citros do mundo. No Brasil, constitui-se de uma doença de grande importância para a cultura, manifestando-se como podridão do pé e das raízes, podendo ainda

ocorrer no tronco e em ramos. É frequentemente caracterizada pela exsudação de goma, que também, pode ocorrer em decorrência de outros fatores.

- **Tombamento, mela ou "damping-off"**: ocorre devido à infestação de *Phytophthora* em sementeiras. Sob temperatura e umidade elevadas a doença desenvolve-se rapidamente, ocasionando morte das plântulas recém emergidas. Outros oomicetos do gênero *Phythium* e o fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, também podem causar sintomas e problemas similares.

Frequentemente, nos viveiros são observadas lesões em folhas e brotos, devido aos tratos culturais e processo de enxertia. Folhas e frutos podem ser afetados em plantas no pomar devido ao impacto causado pelas gotas de chuva sobre o solo, que atingem a parte baixa da planta. Os sintomas são mais comuns e severos em variedades suscetíveis ao patógeno.

Em citros, os danos provocados por *Phytophthora* spp. são estimados em 10 a 30% da produção mundial, uma vez que esses patógenos afetam todas as fases de desenvolvimento das culturas (TIMMER & MENGE, 2000).

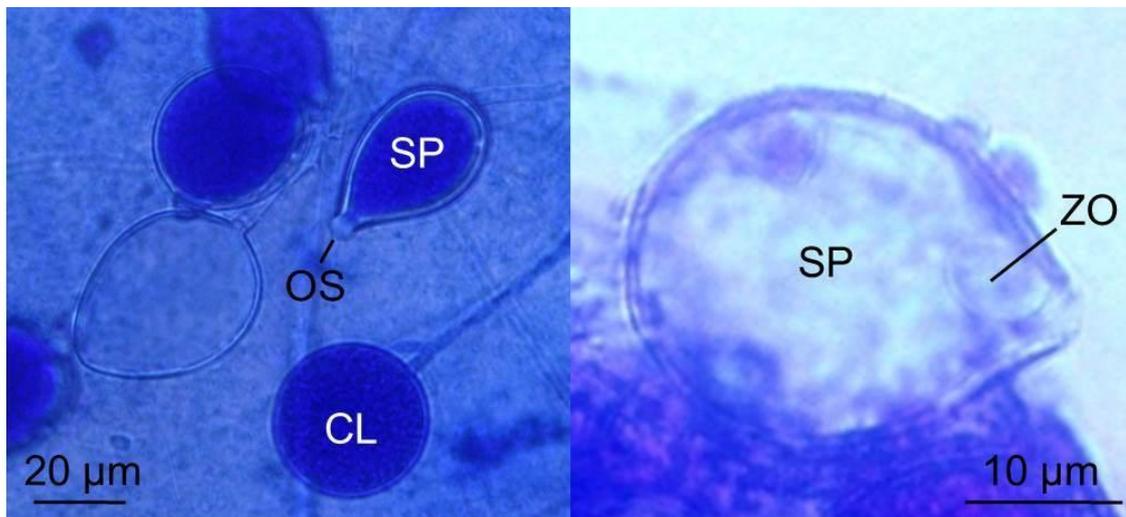
### 2.1.2. Biologia

Devido à suas características bioquímicas e moleculares, microrganismos do gênero *Phytophthora*, pertencentes ao filo dos Oomicetos, estão atualmente agrupados no reino Stramenopila (ALEXOPOULOS et al., 1996). Possuem hifas cenocíticas com parede celular constituída de  $\beta$ -glucanas, mas diferentemente da maioria dos fungos, também são compostas de celulose. Algumas características morfológicas, fisiológicas e moleculares são utilizadas para classificação das espécies de *Phytophthora*.

Dentre os critérios morfológicos, diversas estruturas são analisadas. Os esporângios, corpos de frutificação, variam entre as espécies quanto às dimensões, formas e a caducidade. Os clamidósporos, esporos de resistência, geralmente são esféricos possuindo variações quanto à espessura da parede, a inserção na hifa e há espécies que não os produzem. Quanto à reprodução sexual, espécies de *Phytophthora* são classificadas em homotáticas, podendo se auto-fecundar, ou heterotáticas, neste caso são necessárias hifas compatíveis para que haja a formação de oósporos, esporos sexuais cujas

dimensões variam, assim como, a espessura da parede e a presença ou não de ornamentação (SANTOS, 2010). Os anterídeos (gametângios masculinos) diferenciam-se pela forma e dimensões, sendo paráginos e anfígenos e podem conter uma ou duas células. Os oogônios (gametângios femininos) apresentam formas e dimensões variadas entre as diferentes espécies e possuem ou não ornamentação na parede (LUZ et al., 2001). Atualmente, a caracterização molecular com base nas diferenças das sequências do DNA ribossomal é bastante utilizada na classificação e identificação de espécies de *Phytophthora* (LUZ et al., 2008).

As temperaturas mínima, ótima e máxima para crescimento e esporulação em meio de cultivo e a liberação de zoósporos, que pode ser abundante ou esparsa, são algumas das características fisiológicas avaliadas nas espécies de *Phytophthora*. Em *P. nicotianae*, a formação de esporângios é mais frequente nos períodos quentes e chuvosos do ano, condições que também favorecem o seu crescimento micelial, cuja temperatura ótima está entre 30 e 32 °C, sendo que nessas condições os esporângios podem germinar diretamente, dando origem à novas hifas e micélio. Os esporângios de *P. nicotianae* apresentam forma ovóide ou piriforme com comprimento variando de 27 a 60 µm e largura de 3,1 a 10,4 µm (FEICHTENBERGER, 2001). Os esporângios podem ainda formar zoósporos, estimulados por quedas bruscas na temperatura, os quais são liberados pelo ostíolo, um orifício situado na extremidade mais afilada dos esporângios (Fig.1).



**Figura 1.** Estruturas reprodutivas de *Phytophthora nicotianae* vistas sob microscopia óptica. (SP) - esporângio; (CL) - clamidósporo; (ZO) - zoósporo; (OS) - Ostíolo.

Zoósporos são esporos assexuais desprovidos de parede celular, flagelados e capazes de nadar livremente na presença de água (WALKER & WEST, 2007). Os zoósporos possuem dois flagelos, sendo um deles liso anterior, provavelmente utilizado na propulsão do esporo e, o outro ciliado posterior, possivelmente utilizado para orientação do nado (JUDELSON & BLANCO, 2005). Comumente, os zoósporos têm formato de "feijão" devido à presença de um sulco ventral onde os flagelos estão inseridos.

Em cada esporângio podem ser formados até 50 zoósporos. Uma vez liberados são capazes de nadar em direção a um hospedeiro alvo, para isso, utilizam apenas sua reserva energética interna (CARLILE, 1986). Atualmente já se conhecem genes relacionados à essa movimentação (LATIJNHOUWERS et al., 2004). Canais de cálcio também estão envolvidos nesta motilidade (van WEST et al., 2003) e o potássio tem um papel importante no processo. Appiah et al. (2005) demonstraram que concentrações elevadas de íons  $K^+$  reduzem a velocidade de nado de zoósporos de *P. palmivora*. Quando os autores trataram essas células com ionóforos de potássio, ambos velocidade e orientação do nado foram afetados. O movimento dos zoósporos é orientado em direção ao hospedeiro utilizando mecanismos de quimiotaxia e eletrotaxia, assim, nadam guiados por diferenças nos gradientes químicos (nutricionais e iônicos) e

elétricos (MORRIS & GOW, 1993; WALKER & WEST, 2007). Diversas espécies de *Phytophthora* exibem autotaxia, um fenômeno em que zoósporos nadam em grupos de centenas e milhares em direção à um hospedeiro (van WEST et al., 2003).

### 2.1.3 Controle

Os patógenos do gênero *Phytophthora* são endêmicos, ocorrendo nos solos em pomares de citros do mundo. O manejo integrado dessas doenças envolve o uso conjunto de diversas medidas de controle, incluindo químicas, biológicas, culturais, físicas e genéticas. O uso de mudas sadias e a escolha de porta-enxertos tolerantes a esses fitopatógenos constituem medidas eficientes de controle, no entanto, a maioria das variedades de porta-enxertos utilizada atualmente é suscetível (MEDINA FILHO et al., 2004).

Medidas preventivas como plantar em solos bem drenados, evitar o plantio profundo das mudas, evitar acúmulo de água no solo, excesso de adubação nitrogenada, assim como, promover boa aeração do solo são de fundamental importância para o manejo de doenças causadas por *Phytophthora* (FEICHTENBERGER, 2001). Recomenda-se que o controle químico de *Phytophthora* em viveiros seja feito com produtos de contato, à base de cobre, evitando produtos sistêmicos como o Fosetyl-Al, uma vez que sua ação é somente inibitória, o que pode mascarar os sintomas em mudas infectadas e acarretar na disseminação da doença. Já no campo, o uso de produtos cúpricos, aplicados após cirurgia de remoção dos tecidos infectados, inviabilizou-se pelo alto custo e baixa eficiência, dando lugar à aplicações de Fosetyl-Al, via foliar e no tronco. Tratando-se de um produto sistêmico também pode reduzir os níveis de infestação no sistema radicular, cuja eficiência depende de fornecimento hídrico satisfatório às plantas (FEICHTENBERGER, 2001). Contudo, a baixa diversidade de moléculas químicas para controle pode levar ao desenvolvimento de linhagens resistentes do patógeno (GEORGOPOULOS, 2012). Ferrin & Kabashima (1991) já relataram resistências de linhagens de *Phytophthora* ao produto Metalaxyl, no passado.

Outra possibilidade para o manejo dessas doenças seria o desenvolvimento de solos supressivos à fitopatógenos, que pode ocorrer mediante aplicação de compostos orgânicos (LAZAROVITS, 2001; NOBLE & COVENTRY, 2005; ZHANG et al., 2008; QIU et al., 2012; PANE et al., 2013). Este efeito já foi observado sobre *P. nicotianae* (FEICHTENBERGER, 2001; SZCZECH & SMOLIŃSKA, 2001) e, também já foi observado com outros aditivos orgânicos, como lodo de esgoto (WIDMER et al., 1998; LEONI & GHINI, 2002). Contudo, a adição de matéria orgânica pode ter um efeito variável, podendo ainda favorecer o desenvolvimento de oomicetos, a depender da quantidade e da fonte do resíduo (BONANOMI et al., 2010).

## **2.2. Uso de biofertilizantes no controle fitossanitário**

Os biofertilizantes são produtos resultantes da digestão de compostos orgânicos e, em seu conteúdo são encontradas células vivas e latentes de diferentes grupos de microrganismos. Estes fertilizantes líquidos e semissólidos são preparados a partir da digestão anaeróbia (sistema fechado) ou aeróbia (sistema aberto) de materiais orgânicos e minerais (MEDEIROS et al., 2003). Segundo Bettiol et al. (1998), os biofertilizantes apresentam potencial para o controle de doenças de plantas podendo agir através de: antibiose (presença de antibióticos em sua composição); competição (presença da comunidade microbiana); indução de resistência (tanto microbiana como pelos compostos presentes) e ação direta e/ou indireta no fornecimento de nutrientes às plantas.

O uso de biofertilizantes tem sido recomendado em cultivos orgânicos como forma de manter o equilíbrio nutricional de plantas, tornando-as menos predispostas à ocorrência de pragas e doenças (BETTIOL, 2001; SANTOS, 2001; MEDEIROS et al., 2011; SOARES et al., 2013). Nos anos 30, Jean Dufrenoy começou a estudar a relação entre o estado nutricional das plantas e sua resistência às pragas e doenças, o autor constatou que condições desfavoráveis ao desenvolvimento celular tendiam a provocar acúmulo de metabólitos solúveis não utilizados, como açúcares e aminoácidos, fenômeno que parecia favorecer o ataque de pragas e doenças. No final da década de 60

Francis Chaboussou apresentou sua tese sobre a teoria da trofobiose, nesta, ele evidenciou que as plantas tornavam-se mais suscetíveis à pragas e doenças, decorrente do acúmulo de açúcares e aminoácidos livres nos tecidos vegetais. Chaboussou observou ainda, que esses metabólitos provinham de distúrbios na síntese proteica, o que por sua vez, pode ser desencadeada pelo fornecimento desequilibrado de nutrientes minerais (como o excesso de nitrogênio, proveniente de fontes muito solúveis), e também, pela exposição das plantas à substâncias tóxicas, como moléculas componentes de agrotóxicos, tais como o diclorodifeniltricloroetano, oxicarboxin e triforine, produtos usados na época em que começou seus estudos (CHABOUSSOU, 2006).

Scarlett et al. (2013) verificaram que doses elevadas de fontes inorgânicas de nitrogênio podem aumentar a severidade de *P. cinnamomi* em diversas espécies de árvores nativas da Austrália. Desde a segunda metade do século passado, muitos foram os estudos referentes à relação entre adubação nitrogenada e a ocorrência de pragas e doenças e, ao que tudo indica, a fonte de nitrogênio tem maior influência neste processo do que a quantidade fornecida, contudo, a relação patógeno hospedeiro ainda tem papel central neste fenômeno (HUBER & WATSON, 1974). Segundo Cao et al. (2013), em biofertilizantes, produzidos sob digestão anaeróbica, frequentemente observa-se um incremento nos teores de nitrogênio amoniacal. Apesar do efeito direto da amônia sobre alguns oomicetos, como *P. capsici*, seu fornecimento, em comparação ao nitrato, pode afetar negativamente a resposta de defesa da planta à fitopatógenos (GUPTA et al., 2013). Sobretudo, em biofertilizantes o fornecimento de nutrientes é bem mais complexo e variável que em fontes exclusivamente minerais.

Segundo MEDEIROS et al. (2003), na composição inicial dos biofertilizantes predominam metabólitos primários, geralmente aminoácidos, açúcares, ácidos graxos, proteínas, lipídeos e bases nitrogenadas. Contudo, o teor destes compostos torna-se reduzido após as fases iniciais de maturação do biofertilizante, remanescendo principalmente, os nutrientes minerais. A composição química do biofertilizante varia conforme o método de preparo, o

tempo de decomposição (SANTOS et al., 1992), a população microbiana, temperatura e o pH do composto, mas principalmente, o material que o origina (MEDEIROS & LOPES, 2006).

Outra questão a ser considerada sobre o uso de biofertilizantes no controle de doenças é a possibilidade de estes veicularem agentes de controle biológico. Já foram isolados fungos, actinobactérias e diversas espécies de bactérias de biofertilizantes (CASTRO et al., 1992; BETTIOL et al., 1998; MARROCOS et al., 2012). Ahring et al. (2001) apontam que a maior parte dos microrganismos presentes na digestão anaeróbica de esterco bovino é composta de bactérias (entre 60% e 80%), sendo a maioria dessas identificada como pertencente ao gênero *Bacillus*. *Bacillus subtilis* é frequentemente isolado de biofertilizantes, e caracteriza-se por ser uma espécie com grande potencial para o controle biológico de diversas doenças (KUPPER et al., 2003; KUPPER et al., 2009; KIM et al., 2012; MO et al., 2013), incluindo espécies de *Phytophthora* (DINH et al., 2014) dentre elas *P. nicotianae* (JIN et al., 2011).

Amorim & Melo (2002) isolaram *B. subtilis* da rizosfera de plantas de citros e observaram que algumas estirpes causaram inibição do crescimento micelial de *P. nicotianae* e *P. citrophthora* *in vitro*. Jiang et al (2006) observaram biocontrole de *P. capsici* usando estirpes de *Bacillus* spp.; a redução nos índices da doença variaram de 40 a 60% nos ensaios em campo e casa de vegetação, todavia, os ganhos de produtividade chegaram a atingir 200% para os melhores tratamentos. Swain & Ray (2009) aplicaram estirpes de *B. subtilis* isoladas de esterco bovino e observaram diversos benefícios provenientes de seu uso, tais como: biocontrole de *Fusarium oxysporum* (25-34%) e de *Botryodiplodia theobromae* (100%), além de oxidação do enxofre, solubilização de fósforo e promoção de crescimento de plantas.

Além de bactérias, Tratch & Bettiol (1997) também apontam para a presença de diferentes espécies de fungos filamentosos e leveduriformes presentes em biofertilizantes. Existem relatos de controle de fitopatógenos com o uso de leveduras e hoje já estão disponíveis alguns produtos comerciais contendo esses microrganismos, principalmente para pós-colheita (BONATERRA et al., 2012). Contudo, até o momento pouco se sabe sobre

leveduras como antagonistas à *P. nicotianae* e outros patógenos de solo (EL-TARABILY & SIVASITHAMPARAM, 2006). Dentre os fungos filamentosos, descritos como antagonistas à *P. nicotianae*, destacam-se os dos gêneros *Penicillium* (FEICHTENBERGER, 2001) e *Trichoderma* (SAWANT et al., 1995; SINGH et al., 2011). Fang & Tsao (1995) concluíram que três isolados de *Penicillium funiculosum* apresentaram habilidade de suprimir *P. citrophthora* e *P. parasitica* em citros. Já a aplicação de um isolado de *Trichoderma asperellum* suprimiu *P. capsisi* em pimenta (SEGARRA et al., 2013). Sukhada et al. (2011) verificaram redução na severidade de podridão radicular causados por *P. nicotianae* ao tratar plantas de mamão preventivamente com isolados de *Glomus mosseae*, *Trichoderma harzianum* e *Pseudomonas fluorescens*.

Cao et al. (2013) observaram populações representativas de fungos, actinobactérias e *P. fluorescens* na composição de esterco de gado leiteiro, antes e após sua biodigestão anaeróbica, apesar da redução nas quantidades de propágulos dos fungos, as populações de *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. mostraram-se pouco afetadas pela biodigestão do material. Singh et al. (2011) constataram abundância de *P. fluorescens* isolados de solos de pomares cítricos, sendo que, algumas delas mostraram-se promissoras no biocontrole de *P. parasitica*. De modo geral, as bactérias antagonistas (*B. subtilis*, *P. cepacia* e *P. fluorescens*) agem ocasionalmente, por parasitismo e competição (ARRAS & ARRU, 1997), mas, principalmente por antibiose (KUPPER et al., 2009).

Além da comunidade microbiana original, é possível ainda bioativar os biofertilizantes com reconhecidos agentes de controle biológico. Segundo Hayashida et al. (1989), quando esterco suíno biodigerido foi enriquecido com *Streptomyces albidoflavus* houve um controle da sarna da batata em 93%, promovendo um aumento significativo na produção da cultura. Kupper et al. (2009) demonstraram que os biofertilizantes produzidos pela digestão anaeróbica e aeróbica de esterco bovino, em doses acima de 10%, quando em associação com isolados de *Trichoderma* spp., promoveram maiores inibições na germinação de conídios de *Colletotrichum acutatum*; os autores verificaram ainda, que quando aplicados no campo, os biofertilizantes utilizados

apresentaram potencial para controle de queda prematura dos frutos cítricos. Medeiros et al. (2000a) verificaram que a aplicação de um biofertilizante feito com o conteúdo de rúmem bovino e o composto orgânico Microgeo<sup>®</sup> reduziu a fecundidade, período de ovoposição e longevidade de fêmeas de ácaro-da-leprose dos citros (*Brevipalpus phoenicis*). Em uma publicação paralela, Medeiros et al. (2000b) mostraram ainda, que o mesmo biofertilizante agiu sinergicamente com *Bacillus thuringiensis* e o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, reduzindo a viabilidade dos ovos e a sobrevivência de larvas do bicho-furão-dos-citros (*Ecdyolopha aurantiana*).

Estudos com compostos orgânicos, sólidos e líquidos, vêm mostrando que a microbiota presente nesses aditivos possui um papel central no controle e supressividade de doenças de plantas, uma vez que na grande maioria dos casos, a esterilização dos compostos leva à perda deste efeito, mas o papel dos microrganismos e os mecanismos envolvidos neste processo ainda não estão completamente elucidados. Apesar de secundários, fatores físicos e químicos também têm uma papel significativo no controle e supressão de doenças com aditivos orgânicos (NOBLE & COVENTRY, 2005).

Marín et al. (2013) testaram o efeito da parte físico-química e microbiológica de extratos aquosos de matéria orgânica sobre diversos fitopatógenos, os extratos foram preparados na presença e ausência de oxigênio, ambos com resultados positivos de controle. Apesar do papel central da microbiota sobre patógenos, os autores verificaram, ainda, inibição no crescimento micelial de oito agentes fitopatogênicos mesmo quando o extrato filtrado foi autoclavado. Kupper et al. (2009) observaram que alguns isolados de *B. subtilis* podem produzir metabólitos termoestáveis capazes de inibir o crescimento micelial de *C. acutatum*.

Medeiros et al. (2003) relataram que na dinâmica produtiva de biofertilizantes, a presença de metabólitos secundários e metabólitos de biodegradação, dentre eles: toxinas, antibióticos, fitorreguladores, ácidos graxos de cadeia longa, polissacarídeos, terpenos, fenóis e citoquinina, apresentaram teores que variam ao longo do tempo de produção. De acordo com os autores, tais metabólitos têm seus teores elevados após o declínio das

concentrações dos metabólitos primários. Cao et al. (2013) verificaram que dentre os compostos contidos em esterco bovino biodigerido anaerobicamente, substâncias húmicas e amônia têm efeito inibitório sobre o crescimento micelial e germinação de zoósporos de *P. capsici*.

Bettiol et al. (1998) apontam que além do efeito direto da composição química, bioquímica e microbiológica contida nos biofertilizantes, sobre fitopatógenos, esses componentes podem ainda desencadear indução de resistência em certas espécies de plantas. Ao aplicar um biofertilizante aeróbico produzido a partir de esterco bovino, Faldoni (2011) observou a ativação de genes relacionados à resistência sistêmica em plantas de citros. Sang et al. (2010) observaram resultados similares com extratos aquosos de fertilizantes orgânicos em pimenta, para o controle de *P. capsici*.

O conjunto de estratégias de controle contido nos biofertilizantes fazem destes produtos uma opção importante no manejo fitossanitário de diversas culturas, dentre elas os citros. Mas, devido às amplas fontes de variação dos componentes usados nas receitas, assim como dos processos de produção, seus resultados são inconstantes (BONANOMI et al., 2010). Desta forma, estudos recentes têm objetivado elucidar quais são os fatores responsáveis pelos efeitos de controle e/ou supressividade desses resíduos.

### **2.3. Importância do uso de resíduos na agricultura**

As principais fontes emergentes de contaminação de reservatórios e corpos d'água são provenientes de tratamento de esgoto e outros resíduos urbanos, efluentes de fábricas de produtos químicos e águas residuárias provenientes da agropecuária. Os rios dispersam essas fontes de contaminação por outros corpos d'água, incluindo aquíferos, estuários e sistemas marinhos, e apesar da concentração desses poluentes diminuir ao longo dos cursos d'água, são necessárias apenas pequenas concentrações dessas substâncias para que ocorra a contaminação de grandes volumes de água (PAL et al., 2010).

Este quadro aponta para problemas ambientais de ampla magnitude, sobretudo, deve-se considerar que o elevado incremento de insumos agrícolas

demandado pela agricultura moderna, também gera contaminações no solo e causa impactos irreversíveis na biodiversidade dos agroecossistemas (CONWAY & PRETTY, 2013; TSCHARNTKE et al., 2012). Assim, a busca de alternativas para adubação e controle fitossanitário, especialmente através do uso de resíduos, compõem medidas integradas e essenciais para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável (FOLEY et al., 2011).

Ao utilizarmos resíduos orgânicos como fertilizantes, transformamos potenciais fontes de contaminação ambiental em alternativas de adubação, minimizando a insustentabilidade do quadro agrícola vigente (FOLEY et al., 2011). Com a aplicação de efluentes, águas residuárias e dejetos da produção animal em áreas de cultivo, não apenas se fornece um destino mais apropriado para esses resíduos, mas também se reduz a demanda por fertilizantes químicos, que são produzidos à partir de fontes não renováveis. O mesmo ocorre para pesticidas, uma vez que a utilização de resíduos pode compor o manejo integrado de pragas e doenças (BETTIOL et al., 1998; MEDEIROS et al., 2003).

Contudo, é necessário que se faça uma ressalva quanto à utilização de águas residuárias na agricultura, pratica que já é adotada em diversas áreas de cultivo no mundo. Existem relatos de sobrevivência de patógenos de solo nesses efluentes, dentre eles, os dos gêneros *Phytium* e *Phytophthora*. Assim, a reutilização de águas residuárias sem tratamento pode causar a disseminação dos mesmos em pomares e em viveiros (THOMSON & ALLEN, 1976; WERRES & WAGNER, 2007).

Uma forma de processar resíduos para sua posterior utilização agrícola pode ser feita através da compostagem e da biodigestão, estes processos podem reduzir a quantidade de alguns fitopatógenos e microrganismos patogênicos à seres humanos (TERMORSHUIZEN et al., 2003), porém não necessariamente eliminá-los, uma vez que certos fitopatógenos formadores de estruturas de resistência, como *Sclerotium cepivorum* podem sobreviver. O mesmo ocorre para microrganismos patogênicos à humanos (SAHLSTRÖM, 2003), e segundo Khouja et al. (2010) também para helmintos e parasitas, que

só são eliminados com longos períodos sob anaerobiose, durante a biodigestão.

Bagge et al. (2005) apontam que até o momento, o tratamento térmico de resíduos se apresenta como uma das melhores soluções para eliminação de organismos indesejáveis. Este tipo de tratamento pode reduzir os riscos de veicular patógenos, quando há falhas no processamento dos ingredientes utilizados (NOBLE et al., 2009; NOBLE, 2011). Contudo, temperaturas acima de 70 °C também podem eliminar alguns microrganismos desejáveis. Originalmente, os biofertilizantes podem conter diversos microrganismos, como bactérias, leveduras, algas, protozoários e fungos filamentosos (D'ANDRÉA & MEDERIOS, 2004). Contudo, existe a possibilidade de recolonizar os resíduos tratados com microrganismos de efeitos conhecidos, mas estes precisam ser capazes de sobreviver às condições de preparo existentes nos fertilizantes orgânicos em questão. Assim, conhecer a microbiota presente nos biofertilizantes possibilita um manejo mais adequado desses produtos, permitindo não apenas a eliminação de microrganismos indesejáveis, mas também, o favorecimento de organismos desejáveis.

O uso de biofertilizantes na agricultura cresceu nos últimos anos e foi impulsionado pelo reconhecimento no MAPA como insumo agrícola através do decreto nº 4.954 de 14 de janeiro de 2004, onde biofertilizante é definido como “um produto que contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre todo ou parte das plantas cultivadas, elevando sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante” (MAPA, 2004). A multifuncionalidade dos biofertilizantes, que vai da suplementação nutricional à proteção fitossanitária, aliado à importância do uso de resíduos orgânicos na agricultura, tornam estes produtos alvos de pesquisa de grande relevância.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Preparo dos biofertilizantes

O biofertilizante utilizado no presente trabalho baseou-se na composição de receitas já existentes para uso agrícola (BETTIOL et al., 1998; FERNANDES, 2000; DELEITO et al., 2005; TESSEROLI, 2006; SILVA et al., 2007). Considerou-se também, a disponibilidade local de ingredientes componentes da mistura, as receitas estão apresentadas na tabela 1.

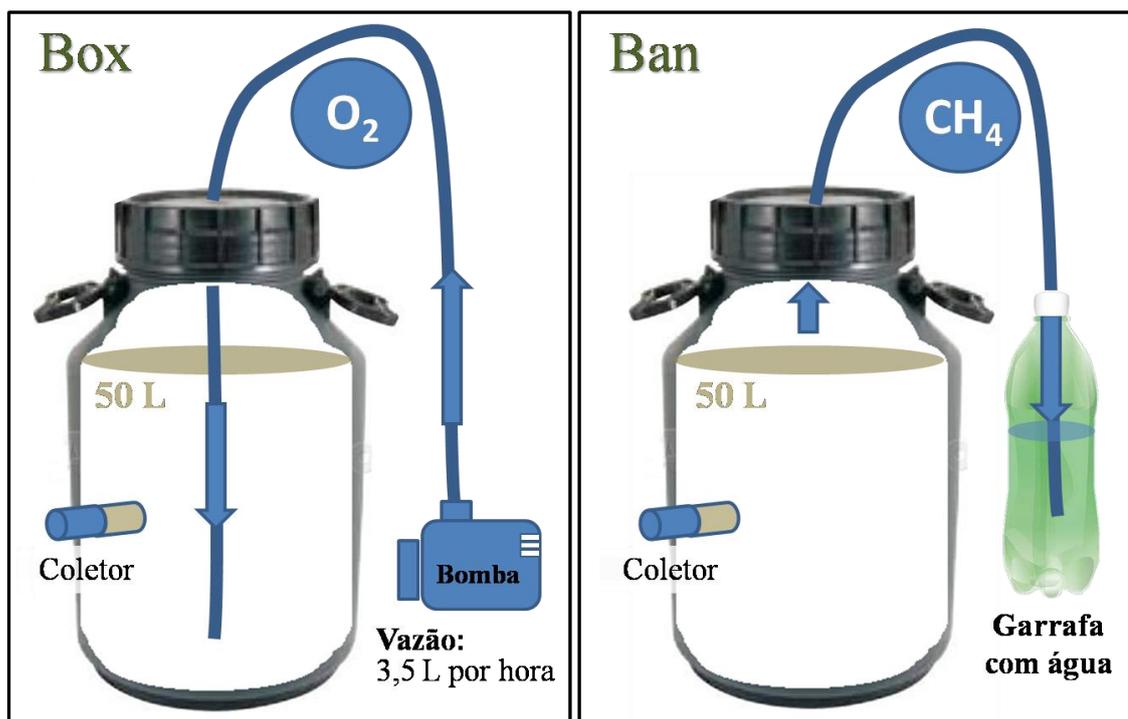
**Tabela 1.** Composição de alguns dos biofertilizantes difundidos para uso agrícola no Brasil.

INGREDIENTES	AGROBIO <sup>(1)</sup>	Super Magro <sup>(2)</sup>	IAPAR <sup>(3)</sup>	VAIRO <sup>(4)</sup>	IAC <sup>(5)</sup>
Sulfato de cálcio		10 g			
Sulfato ferroso	0,6 g				
Sulfato de cobre	0,6 g	1,5 g	1,0 g		1,0
Sulfato de magnésio	2,0 g	1,5 g	5,0 g		
Sulfato de zinco	0,8 g	15 g	10,0 g		1,0 g
Sulfato de manganês	1,2 g		1,5 g		
Cloreto de cálcio	11,9 g				
Molibdato de sódio	0,4 g				
Sulfato de cobalto	0,4 g				
Bórax	6,0 g	5,0 g	7,5 g		5,0 g
Termofosfato magnésiano	2,0 g		15,0 g	0,5 g	5,0 g
Farinha de osso	0,8 g	1,0 g	15,0 g	0,5 g	
Farinha de carne	0,8 g	4,0 g			
Torta de mamona	0,4 g				
Cinzas	8,0 g			0,5 g	10 g
Restos animais		5,6 g			
Frutas			20 g		
Melaço cana	6,0 mL	40 mL			10 mL
Leite	4,0 mL	40 mL	10 mL		10 mL
Esterco bovino	200 mL	220 mL	350 mL	500 mL	300 mL

**Fontes:** <sup>(1)</sup> Fernandes (2000); <sup>(2)</sup> Bettiol et al. (1998); <sup>(3)</sup> Tesseroli (2006); <sup>(4)</sup> Silva et al. (2007); <sup>(5)</sup> receita utilizada no presente trabalho. Valores apresentados em gramas ou mililitros por litro de biofertilizante.

Os biofertilizantes utilizados neste trabalho foram produzidos em tambores com capacidade para 50 L, onde foram adicionados: 15L de esterco de gado leiteiro, proveniente do Grupo de Estudos e Trabalhos Agropecuários (GETAP), da Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, também foram adicionados 500 mL de leite cru, 1L de caldo-de-cana, 500 g de cinzas de citros, 250 g de bórax, 250 g de termofosfato magnesiano, 50 g de sulfato de zinco, 50 g de sulfato de cobre e o volume final (50 L) foi completado com água.

Com esta receita foram produzidos dois tipos de biofertilizantes. Um conduzido sob digestão anaeróbica (Ban), em que os galões foram hermeticamente fechados e receberam um tubo acoplado à tampa imerso em água, permitido assim a saída dos gases provenientes da biodigestão, como o metano, sem que houvesse entrada de oxigênio. O outro biofertilizante foi produzido sob oxigenação forçada (Box), sendo produzido com auxílio de um aerador (Compressor de ar ATMAN - A420), trabalhando na vazão de 3,5 L/min. A tampa de Box não foi hermeticamente fechada, possibilitando assim a saída de ar. Um coletor de amostras foi introduzido na parte central dos galões e através de uma seringa, as amostras eram obtidas de forma a não expor o conteúdo interno. Os coletores também foram usados para monitorar a temperatura e o pH (Figura 2).



**Figura 2.** Ilustração do método de produção dos biofertilizantes aeróbico (Box) e anaeróbico (Ban)

### 3.2. Ensaios *in vitro*

#### 3.2.1 Efeito do filtrado livre de células e substâncias termoestáveis presentes nos biofertilizantes, sobre o crescimento micelial de *P. nicotianae*.

Para avaliar o efeito da fração filtrada dos biofertilizantes, sobre o crescimento micelial do patógeno, foram realizados três ensaios, baseados na metodologia de Cao et al. (2013).

**Ensaio 1** - No primeiro ensaio, os biofertilizantes foram mantidos à temperatura ambiente e as amostras de Ban e Box foram coletadas a cada cinco dias, do primeiro até o 60º dia. Essas amostras passaram duas vezes por filtro de papel ( $84 \text{ g.m}^{-2}$ ), sendo a seguir centrifugadas a  $2500 \text{ g}$  e, então, filtradas em membrana Millipore® ( $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ ). Em seguida, esse filtrado foi transferido, nas concentrações de 10 e 20%, para Erlenmeyers contendo meio cenoura-água (CA) fundente (KAOSIRI et al., 1978). Os controles foram preparados com a adição de 10 e 20% de água destilada esterilizada (ADE).

Foram preparadas ainda, placas contendo CA original, utilizadas como indicador do crescimento regular do patógeno. Em seguida, discos de 5 mm de meio CA contendo colônias com 7 dias de idade de *P. nicotianae* foram transferidos para o centro das placas. As culturas foram então incubadas a 25°C, sob luz fluorescente em fotoperíodo de 12/12h.

A avaliação do crescimento micelial de *P. nicotianae* foi realizada quando as colônias do tratamento referência (CA integral, sem adição dos biofertilizantes ou ADE) atingiram as extremidades da placa, medindo-se o diâmetro médio das colônias em dois sentidos perpendiculares. Para as doses de 10 e 20% de biofertilizante, a porcentagem de inibição foi calculada com base nos controles acrescidos de ADE, nas concentrações correspondentes. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas, onde se considerou o tempo como subparcela.

**Ensaio 2** - A fim de tentar reproduzir o observado no ensaio 1, um segundo ensaio foi realizado com Ban e Box produzidos sob temperatura controlada de 25 °C ± 3 (média observada no ensaio 1). No ensaio 2, Ban e Box foram utilizados com 35 e 50 dias de maturação, respectivamente. Essas foram as datas em que se observou os maiores efeitos inibitórios da fração filtrada sobre o patógeno no ensaio 1. Contudo, no segundo ensaio, além de verificarmos o efeito do filtrado livre de células no crescimento micelial de *P. nicotianae*, testou-se também, a termoestabilidade dos compostos presentes nos biofertilizantes. Para tal, seguiu-se a mesma metodologia descrita para o ensaio 1. Contudo, além de submeter as amostras à filtração em membrana Millipore® 0,20 µm, procedeu-se a autoclavagem por 40 minutos à 120 °C das amostras, sendo que as doses trabalhadas no ensaio 2 foram 5, 10, 15, 20, 25 e 30%. Os critérios adotados para a avaliação dos tratamentos e a porcentagem de inibição calculada com base nas diluições com ADE, foram os mesmos utilizados no ensaio 1. Contudo, o delineamento no segundo ensaio foi inteiramente casualizado.

**Ensaio 3** - Um terceiro ensaio foi conduzido, com a finalidade de testar a hipótese de que a diluição do meio CA (pelo acréscimo dos filtrados), somada ao efeito do seu pH, pudessem ser conjuntamente responsáveis pela inibição

do crescimento micelial do patógeno. Assim, no ensaio 3 comparou-se o crescimento da colônia de *P. nicotianae* em meio CA diluído com 25% de ADE ajustada em diferentes pHs (5, 6, 7, 8 e 9). Os tratamentos foram ajustados com HCl e NaOH. Estes valores testados de pH, incluíram as faixas observadas durante todo tempo de coleta de Ban e Box no ensaio 1. O delineamento adotado no terceiro ensaio também foi o inteiramente casualizado.

Os três ensaios foram conduzidos com cinco repetições, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **3.2.2. Efeito dos microrganismos presentes nos biofertilizantes sobre *P. nicotianae*.**

Concomitantemente ao teste de metabólitos do ensaio 1, as amostras coletadas a cada cinco dias também foram plaqueadas para a determinação das populações de microrganismos presentes em Ban e Box. Para isso, foi utilizado o método de diluição seriada, com subsequente plaqueamento em diferentes meios de cultivo seletivos: meio de Martin (MARTIN, 1950) modificado por Liu & Baker (1980) para fungos; meio nutriente ágar (NA) (ROMEIRO, 2001) para quantificação bacteriana; e para a determinação de *Bacillus* spp., uma alíquota de biofertilizante foi tratada termicamente (80 °C por 10 minutos) em banho maria e, em seguida, plaqueada em meio batata dextrose ágar (BDA), conforme metodologia descrita por Bettiol et al. (1995). Após o plaqueamento de 200 µL das diluições trabalhadas (que variaram de  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$  ao longo das coletas), as culturas foram incubadas a 25 °C, sob luz fluorescente com fotoperíodo de 12/12 h. Sob avaliações diárias, foi realizada a contagem e o isolamento de microrganismos morfológicamente distintos entre si. Os isolados foram purificados e compuseram uma coleção de 314 estirpes, utilizadas posteriormente em testes de prospecção de potenciais antagonistas à *P. nicotianae*.

Com os isolados obtidos realizou-se um *screening* visando identificar possíveis agentes de controle biológico presentes em Ban e Box, para isso,

utilizou-se a metodologia adaptada de Rajkumar et al. (2005), através técnica de cultivo aos pares. Um disco (5 mm) de *P. nicotianae* (proveniente de cultivo em meio CA, com seis dias de idade) foi transferido para o centro de placas contendo meio cenoura batata ágar (CBA) descrito por Atlas & Parks (1993). Em seguida, quatro discos de BDA (5 mm) contendo diferentes isolados (dos 314 isolados obtidos), foram colocados em quatro pontos equidistantes na extremidade da placa de Petri. As culturas foram incubadas à 25 °C sob fotoperíodo de 12/12 h, durante seis dias. O tamanho da colônia de *P. nicotianae* foi avaliado no sentido oposto a cada um dos isolados, medindo-se também, o tamanho do halo de inibição (quando presente). Os isolados foram então classificados pela escala de Rajkumar et al. (2005).

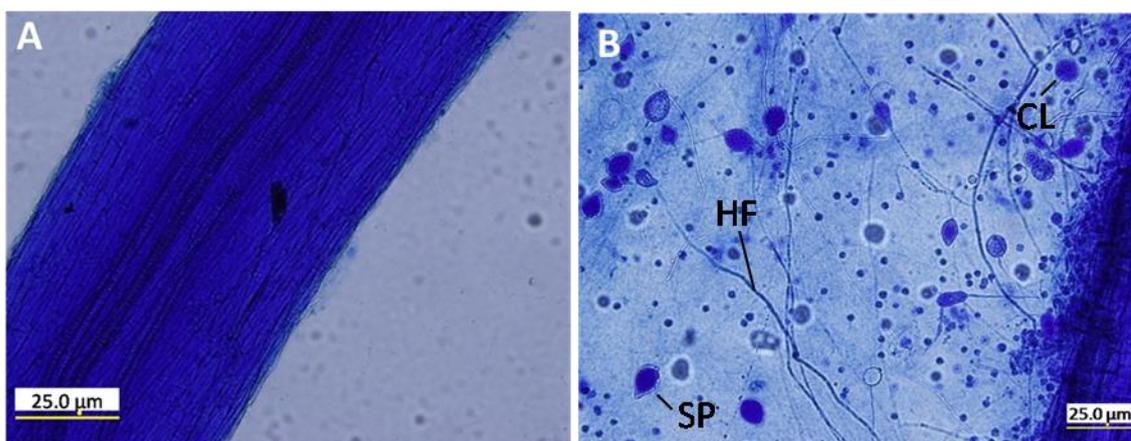
### **3.3. Ensaio *in vivo***

#### **3.3.1 Bioensaio com plântulas de alfafa**

Os melhores isolados classificados no *screening in vitro* (item 3.2.2) foram utilizados em um bioensaio de prospecção (LEONI & GHINI, 2002), com objetivo de identificar os isolados mais promissores para o biocontrole de *P. nicotianae*. Neste ensaio, sementes de alfafa (*Medicago sativa*) previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio (2% v/v) foram colocadas para germinar. Após sete dias, as plântulas foram transferidas para bandejas de polietileno contendo 20 poços com capacidade para 5 mL cada. Em cada poço foram adicionados: 2 mL de ADE, um disco de 5 mm de diâmetro de meio CA contendo *P. nicotianae* (7 dias de idade) e um disco de 5 mm de BDA contendo o potencial antagonista. Os tratamentos controle foram constituídos por plântulas de alfafa em compartimentos contendo apenas ADE. Também foram testadas diferentes concentrações de Ban e Box (5, 10 e 20%), para o qual se adicionou 2 mL das diferentes diluições diretamente aos poços, também acrescidos de uma plântula de alfafa e um disco de meio contendo o patógeno por poço. Manteve-se ainda um controle inoculado (ADE + disco de 5 mm de *P. nicotianae*). As bandejas foram mantidas à temperatura ambiente, com fotoperíodo 12/12 h, e após quatro dias, um fragmento de 20 mm da

extremidade inferior da radícula foi cortado, corado em azul láctico e levado para avaliação em microscópio óptico de luz.

Neste bioensaio, para determinar o potencial de um isolado como antagonista, foram utilizadas duas escalas de notas, que classificaram os níveis de infecção de *P. nicotianae* nas plântulas de alfafa. Para a presença de esporângios (Z) as notas foram 0 = sem esporângios; 1 = entre 1 e 5; 2 = entre 6 e 10; 3 = entre 11 e 50 e 4 = mais de 51 esporângios (Figura 3). Para a presença de micélio (M) as notas foram 0 = sem micélio; 1 = pouco; 2 = médio e 3 = muito micélio. O ensaio foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



**Figura 3.** Imagens obtidas por microscopia de luz de duas radículas de brotos de alfafa. (A) não infectado com *P. nicotianae*, notas: Z = 0, M = 0 e (B) altamente infestado com o patógeno, notas: Z = 4, M = 3. Estruturas: (HF) - hifa; (CL) - clamidósporo; (SP) - esporângio de *P. nicotianae*. Foto tirada 106 horas após a inoculação.

### 3.3.2. Preparo de inóculo

Para os ensaios conduzidos *in vivo*, utilizou-se o isolado IAC-01/95 de *P. nicotianae*, pertencente à coleção de isolados da Clínica Fitopatológica do Centro APTA Citros "Sylvio Moreira". O inóculo foi preparado segundo a metodologia de Medina Filho et al. (2004). Discos de 5 mm contendo micélio do patógeno foram transferidos para placas de Petri, com 15 mL de meio CA. As

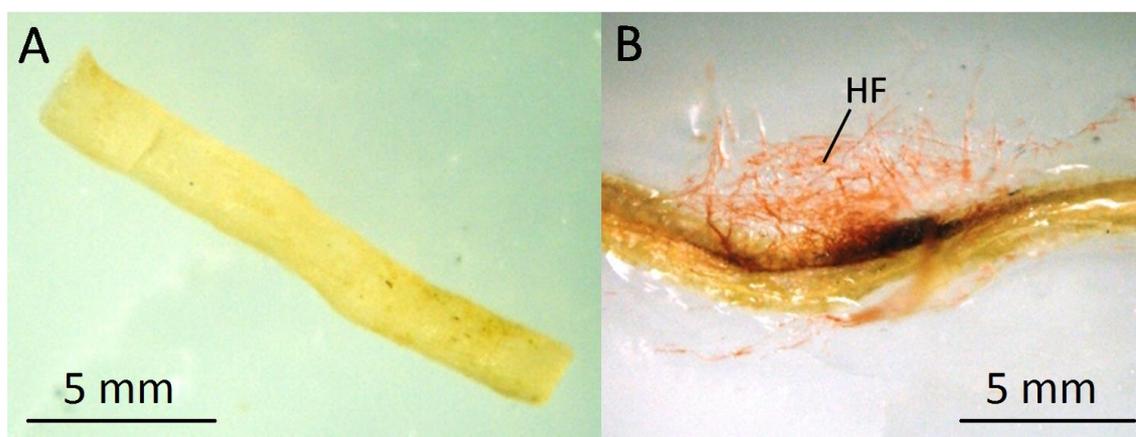
culturas foram incubadas no escuro a 25 °C durante seis dias, até o crescimento do micélio sobre toda a superfície do meio. Em seguida, metade das placas foi mantida sob luz fluorescente contínua durante cinco dias, visando promover o desenvolvimento de esporângios, enquanto a outra metade permaneceu no escuro. Posteriormente, todas as culturas foram mantidas no escuro por mais três dias, antes da sua utilização nos ensaios *in vivo*. O conteúdo de todas as placas (com diferentes propágulos do patógeno, incluindo micélio, esporângios e clamidósporos) foi homogeneizado com ADE em liquidificador por 60 s, na proporção de 5 placas por litro de suspensão.

### **3.3.3. Testes *in vivo* com plantas jovens de limão Cravo, sob condições controladas.**

Sementes de limão Cravo (*Citrus limonia*) foram higienizadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 2% v/v por 60 s e semeadas em tubetes contendo substrato comercial Plantmax<sup>®</sup> para mudas de citros. Depois de germinadas, procedeu-se o desbaste, visando a condução de uma única muda por tubete. Cento e quarenta e cinco dias após o plantio, as plantas foram transplantadas para sacos de polietileno (15 x 25 cm) contendo substrato comercial, cuja capacidade de campo foi pré-determinada para aplicação dos tratamentos e da suspensão de inóculo. Então, 66 mL dos biofertilizantes (Ban ou Box) foram adicionados ao substrato através da mistura com ADE, resultando em diferentes concentrações dos biofertilizantes: 0, 10, 20 e 50%. Em seguida, foram adicionados 66 mL da suspensão de inóculo (item 3.3.2). Para o tratamento controle, as plantas receberam 132 mL de ADE ao invés dos tratamentos + inóculo. Os biofertilizantes Ban e Box foram utilizados com 35 e 55 dias de maturação, respectivamente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições. Este ensaio foi repetido com os biofertilizantes a 103 dias de maturação, e também com plantas de apenas 60 dias de idade, visando avaliar o efeito do tempo de maturação e a fitotoxicidade dos biofertilizantes.

Os níveis de colonização foram determinados através da quantificação do número de raízes infectadas com *P. nicotianae*. Para isso, utilizou-se a

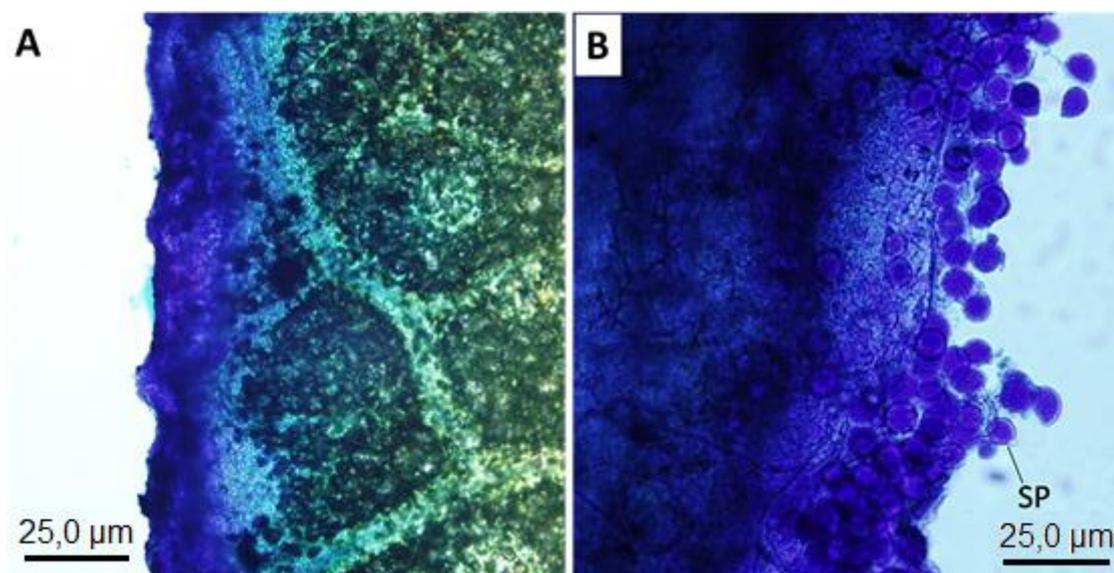
metodologia de Trotta et al. (1996). Após 60 dias da inoculação, as plantas foram cuidadosamente retiradas do substrato e abundantemente lavadas em ADE. Em seguida, fragmentos de raízes de 10 mm de comprimento foram cortados a partir das extremidades radiculares. Os fragmentos foram então submersos em álcool 70% por 30s, seguido de hipoclorito de sódio a 2% (v/v) por 60s, e por fim, lavados em ADE. Para cada repetição, 20 fragmentos foram plaqueados em meio seletivo para *Phytophthora*, adaptado de Masago et al. (1977) e Jeffers e Martin, (1986). Em meio fundente de fubá-ágar (infusão de 50 g.L<sup>-1</sup> de fubá + 18g de ágar) foram adicionados: Pimaricina 10 mg.L<sup>-1</sup>; Ampicila 250 mg.L<sup>-1</sup>; Rifampicina 10 mg.L<sup>-1</sup>; Pentacloronitrobenzeno 25mg.L<sup>-1</sup> e Benomyl 10 mg.L<sup>-1</sup>. As avaliações foram realizadas a cada 2 dias, durante 12 dias, para identificação e contagem das colônias provenientes dos fragmentos de raízes infectados (Figura 4).



**Figura 4.** Fragmentos de raízes de limão Cravo plaqueados em meio seletivo. (A) fragmento não infectado; (B) fragmento infectado com *P. nicotianae*; (HF) hifas do fitopatógeno coradas com vermelho congo, corante com afinidade à celulose, por 10 minutos.

Para quantificação dos propágulos de *P. nicotianae* na rizosfera (MASAGO et al., 1977), 75 cm<sup>3</sup> do substrato foram adicionados à Erlenmeyers de 250 mL contendo 160 mL de ADE, e em seguida, mantidos sob agitação constante (150 rpm por 5 minutos). Uma alíquota de 1 mL dessa suspensão foi adicionada à placas de Petri contendo o meio seletivo descrito acima. A suspensão foi então espalhada com auxílio de uma alça de Drigalski sobre a

superfície do meio, sendo em seguida incubadas a 25 °C e avaliadas a cada 2 dias. As colônias do patógeno foram identificadas e a contagem foi convertida em unidades formadoras de colônia (UFC) de *Phytophthora* por cm<sup>3</sup> de substrato. Em paralelo, foi conduzido um teste com iscas de folha (FEICHTENBERGER, 2001), utilizando-se o conteúdo dos Erlenmeyers descrito no ensaio acima, para tanto, água + substrato foram transferidos para copos de polietileno de 300 mL e na superfície dessa suspensão de solo foram adicionados dez discos de folha de lima ácida Tahiti (*Citrus latifolia*). Cinco desses discos foram colocados com a face abaxial virada para cima e outros cinco para baixo. Os copos foram mantidos sob luz fluorescente contínua em temperatura ambiente por quatro dias. Após esse período, os discos de folhas foram corados com azul lático e com o auxílio de um microscópio óptico de luz, foram avaliados quanto à presença de estruturas características do patógeno, tais como clamidósporos e esporângios característicos de *P. nicotianae*, presentes nas bordas dos mesmos (Figura 5). O número de discos infectados foi então convertido em porcentagem.



**Figura 5.** Discos de folha de lima ácida Tahiti. (A) não infectados; (B) infectados com *P. nicotianae*; (SP) – esporângio.

Para os testes *in vivo* com plantas jovens de limão Cravo, o delineamento foi inteiramente casualizado com 5 repetições. Para todos os

parâmetros analisados os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### **3.3.4. Germinação de sementes de porta-enxerto de citros plantadas em substrato tratado com biofertilizantes**

A metodologia utilizada para este ensaio foi adaptada de Widmer et al. (1998). Sementes de limão Cravo (*Citrus limonia*) e tangerina Sunki (*Citrus sunki*) foram higienizadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 2% v/v, por 60 s. Depois de secas foram armazenadas a 10 °C para uso posterior. Então, foram plantadas três sementes, a 15 mm de profundidade, em tubetes contendo substrato comercial Plantmax<sup>®</sup> autoclavado (120 °C por 60 minutos). Em seguida, foram adicionados 3 mL dos biofertilizantes, em diferentes concentrações. As diluições foram adicionadas diretamente sobre o conteúdo dos tubetes (substrato + sementes). Vinte e quatro horas depois, os tubetes receberam mais 3 mL da suspensão de inóculo (item 3.3.2). Após a germinação, contou-se o número de plântulas saudias por tubete (Figura 6). Para tangerina Sunki, a avaliação foi realizada 40 dias após o plantio e 10 dias depois, fez-se uma recontagem das plântulas saudias. Para limão Cravo, a primeira avaliação foi feita 50 dias após o plantio e a recontagem realizada com 60 dias. O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 x 6, cujos fatores foram: variedade do porta-enxerto, tipo de biofertilizante (Ban e Box) e concentrações aplicadas (0, 5, 10, 15, 20 e 25%), além do controle (não inoculado). Este ensaio foi conduzido com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 6.** Germinação de plântulas de tangerina Sunki. (A) Ocorrência de *damping-off* de pré-emergência e pós-emergência em substrato inoculado com *P. nicotianae*. (B) Germinação e crescimento de plântulas saudáveis. Foto tirada 52 dias após o plantio.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na receita conduzida no presente trabalho, optou-se pelo uso de cinzas considerando-se sua disponibilidade regional, que é abundante, devido à presença da agroindústria canvieira. Também foram levadas em consideração suas qualidades químicas. As cinzas utilizadas no trabalho foram obtidas da queima de plantas cítricas e sua composição foi analisada e está apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Análise química<sup>w</sup> das cinzas de plantas cítricas, presentes na composição dos biofertilizantes utilizados no presente trabalho.

pH	C	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	CaO	MgO	SO <sub>4</sub>	Si	Cu	Fe	Mn	Zn
Gramas por quilograma								Miligramas por quilograma				
130	34	2,5	54	98,7	318	25	20,1	0,2	99,0	7790,0	172,0	360,0

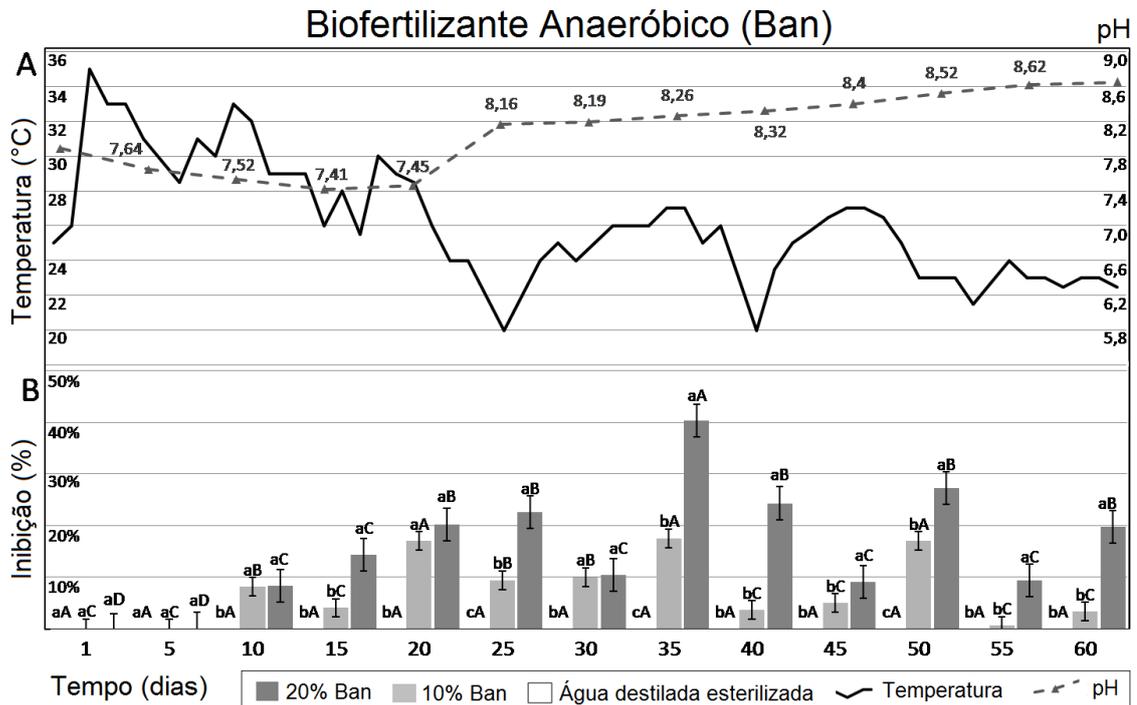
<sup>w</sup> As amostras foram encaminhadas ao laboratório de solos da Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, Araras/SP.

Os teores elevados de cálcio (318 g/Kg), potássio (98,7 g/Kg), fósforo (54 g/Kg) e ferro (7790 mg/Kg) possibilitaram reduzir a demanda de sais minerais, grande parte deles, de difícil obtenção em lojas de insumos da região. A simplificação da receita torna os biofertilizantes mais acessíveis aos produtores e facilita sua execução. Sobretudo, a justificativa para o uso de cinzas também pode se justificar no fato de que, caldas à base desses materiais já foram utilizadas na agricultura tradicional para controle de pragas e manchas foliares, tema que recebe pouca atenção da comunidade científica.

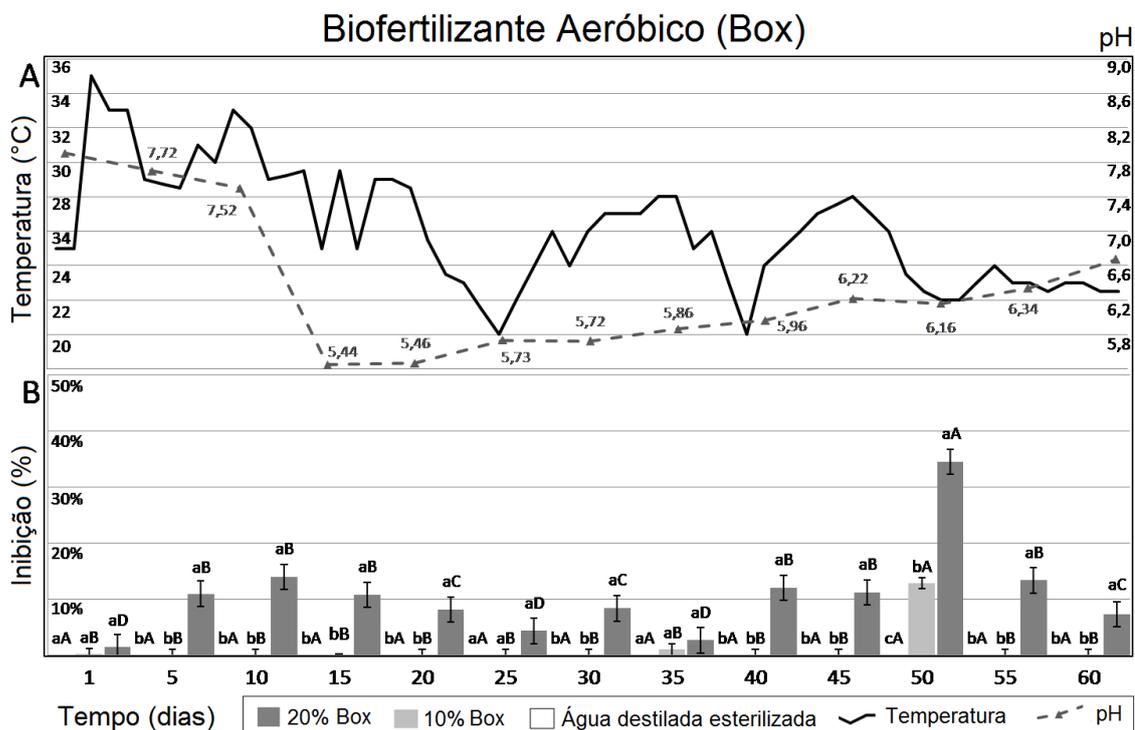
### 4.1. Ensaios *in vitro*

#### 4.1.1. Efeito da fração filtrada dos biofertilizantes sobre o crescimento micelial de *P. nicotianae*

Verificou-se no ensaio 1, que o efeito dos filtrados livres de células presentes nos biofertilizantes, sobre o crescimento micelial de *P. nicotianae*, variou significativamente ao longo do tempo, sendo mais acentuado com 35 dias de maturação para o Ban e 50 dias para o Box, respectivamente (Figuras 7 e 8).



**Figura 7.** Flutuações da temperatura, pH e efeito dos compostos livres de células, presentes em biofertilizante anaeróbico, sobre o crescimento micelial de *P. nicotianae* ao longo do tempo. (A) - temperatura e pH. (B) - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *P. nicotianae* ao longo do tempo. Comparação entre as doses em cada tempo de coleta (letras minúsculas) e entre cada tempo dentro da mesma dose (letras maiúsculas). Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



**Figura 8.** Flutuações da temperatura, pH e efeito dos compostos livres de células, presentes em biofertilizante aeróbico, sobre o crescimento micelial de *P. nicotianae* ao longo do tempo. (A) - temperatura e pH. (B) - Inibição do crescimento micelial de *P. nicotianae* (em porcentagem), sob o efeito do filtrado livre de células. Comparação entre as doses em cada tempo de coleta (letras minúsculas) e entre cada tempo dentro da mesma dose (letras maiúsculas). Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Observou-se que no decorrer do tempo, a variação da temperatura pode ter influenciado no efeito dos compostos presentes nos biofertilizantes que afetaram o crescimento micelial do patógeno, já o pH não parece ter exercido a mesma influência. De acordo com Santos (1992), a temperatura influencia diretamente o tempo de preparo e a composição de biofertilizantes provenientes da digestão de esterco bovino. Segundo Medeiros et al. (2003), a temperatura influencia o metabolismo da microbiota presente no material a ser decomposto e, conseqüentemente, os teores de metabólitos primários, secundários e de elementos minerais solúveis, também vão sofrer tais influências. Atualmente, sabe-se que, em esterco biodigerido, os teores de amônia aumentam proporcionalmente com o aumento da temperatura (WANG et al., 2014). Segundo Cao et al. (2013), a amônia encontrada no resíduo de

biodigestores é responsável pela supressão de *Phytophthora capsisi*, afetando diretamente o seu crescimento micelial e a germinação de zoósporos.

Os teores de íons presentes em Ban e Box são outro fator que pode explicar, em parte, o efeito inibitório da fração filtrada dos biofertilizantes sobre o patógeno. Já é conhecido que o cobre tem ação inibitória sobre espécies de *Phytophthora* (HALSALL, 1977; SLADE & PEGG, 1993; TOPPE & THINGGAARD, 2000; FEICHTENBERGER, 2001), fator este, que provavelmente explica a possibilidade de controle de fitopatógenos do gênero, com alquicidas à base cobre (COLBURN & JEFFERS, 2008; GRANKE & HAUSBECK, 2010). Em Ban, as concentrações finais deste íon metálico mostraram-se maiores que em Box (Tab.3). Isso pode explicar, em parte, porque o efeito da fração filtrada de Ban resultou em maior inibição que o filtrado de Box, resultado que se acentuou no ensaio 2. Toppe & Thinggaard (1998), verificaram que 0,28 ppm de cobre em solução hidropônica foram capazes de reduzir a incidência de *Phytophthora cryptogea* em *Gerbera jamesonii* comparado ao fornecimento de apenas 0,07 ppm. Com base na tabela 3, estima-se que para Ban, a 20%, a concentração de cobre foi de aproximadamente 350 ppm e de 175 ppm para 10%. Já para Box essas concentrações foram, aproximadamente 208 ppm (20%) e 104 ppm (10%).

**Tabela 3.** Composição química<sup>w</sup> final dos dois biofertilizantes (Ban e Box) com 105 e 120 dias de preparo, respectivamente.

	pH	C	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	CaO	MgO	SO <sub>4</sub>	Cu	Fe	Mn	Zn
	gramas por quilogramas								miligramas por quilogramas			
Ban	67	121	9	18,6	9,5	54	17	11	1768	5184	212	397,64
Box	74	52	8	6,4	11	18	14	5,6	1041	2074	106	227,2

<sup>w</sup> As amostras foram coletadas da região central dos tambores, e, após homogeneização encaminhadas ao laboratório de solos da Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, Araras/SP.

No segundo ensaio, este teste foi repetido com os biofertilizantes produzidos sob temperatura constante (25 ± 3 °C). Neste, Ban e Box foram utilizados com tempos de preparos, onde se observaram as maiores porcentagens de inibição das colônias do fitopatógeno (Figuras 7 e 8). Na Tabela 4 é possível observar que, quando o filtrado livre de células proveniente

do Ban foi adicionado em concentrações acima de 15%, as porcentagens de inibição do crescimento micelial do patógeno foram superiores a 96,1%. Apesar do efeito expressivo da fração filtrada de Ban sobre o fitopatógeno, quando o produto foi submetido à autoclavagem, observou-se uma redução do seu efeito inibitório, o que indica que parte deste efeito pode ser decorrente de metabólitos extracelulares termossensíveis.

**Tabela 4.** Efeitos do filtrado livre de células (FLC) e dos compostos termotolerantes (CT), presentes nos biofertilizantes sobre o crescimento micelial de *P. nicotianae*

Dose	Anaeróbico (Ban)		Aeróbico (Box)	
	FLC	CT	FLC	CT
Controle	0,0% <sup>a</sup> aA	0,0% aA	0,0% aA	0,0% aA
5%	3,7% aA	13,3% bB	0,0% aA	1,3% aA
10%	18,2% bA	17,0% bcA	0,5% aA	10,4% aB
15%	96,1% cA	12,3% bcB	0,0% aA	17,8% aB
20%	98,6% cA	17,1% bcB	0,0% aA	42,2% bB
25%	99,5% cA	20,0% cB	0,0% aA	52,2% bB
30%	100,0% cA	28,5% dB	33,3% bA	75,7% cB

<sup>a</sup> Porcentagem de inibição do crescimento micelial do patógeno. Comparação entre as diferentes doses de cada um dos dois biofertilizantes (Ban e Box) e entre o tipo de tratamento (FLC e CT). Valores médios dentro da mesma coluna, seguidos da mesma letra minúscula, ou dentro da mesma linha, seguidos da mesma letra maiúscula, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Ban e Box foram utilizados com 35 e 50 dias respectivamente.

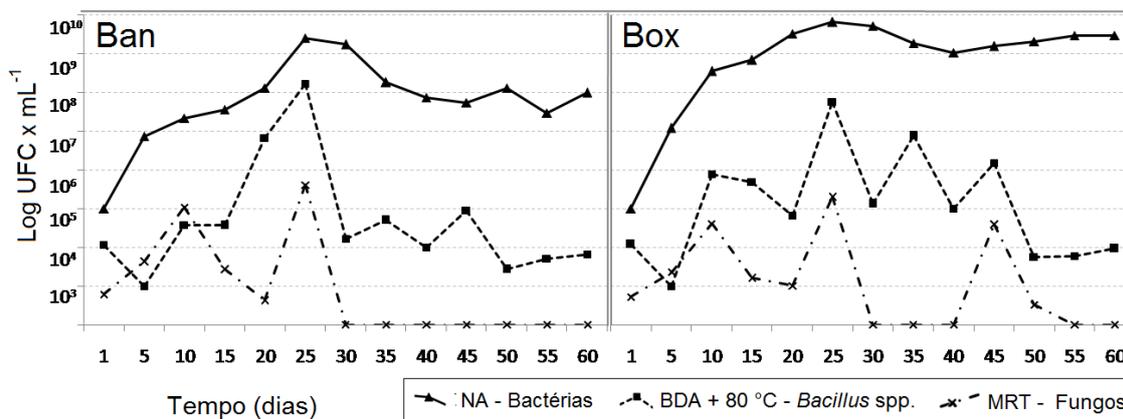
Os dados do presente trabalho corroboram com os resultados obtidos por Sang et al. (2010), os quais verificaram que extratos aquosos de compostos orgânicos inibiram a germinação de zoósporos de *P. capsici*, mas este efeito variou entre diferentes compostos, e não permaneceu quando os extratos foram filtrados ou autoclavados.

Essa termossensibilidade não foi observada para os compostos presentes em Box, cuja fração filtrada mostrou-se menos efetiva sobre o patógeno. Para Box, os resultados do filtrado livre de células foram inferiores, limitando-se à 33,3% de inibição apenas para a concentração de 30%. Contudo, os resultados foram superiores quando Box foi autoclavado.

Ao avaliar o efeito do pH sobre o crescimento micelial de *P. nicotianae* (terceiro ensaio), não se verificou diferença significativa para as faixas testadas (de 5 a 9), indicando que os resultados observados nos demais ensaios são provavelmente decorrentes do efeito de substâncias e íons presentes na fração filtrada, e não do pH. Outra evidência que reforça essa afirmação apresenta-se nos resultados do primeiro ensaio, onde as flutuações do pH de ambos os biofertilizantes não demonstrou influência no crescimento micelial do patógeno (Fig. 7 e 8).

#### 4.1.2. Efeito dos microrganismos presentes em biofertilizantes sobre *P. nicotianae*

As curvas do crescimento populacional de microrganismos cultiváveis nos três meios de cultura estão apresentadas na Figura 9.



**Figura 9.** Populações de grupos microbianos presente em Ban e Box, ao longo do tempo. Determinação das populações através do plaqueamento das diluições em três diferentes meios de cultivo: nutriente ágar (NA), batata dextrose ágar, após tratamento térmico das amostras a 80 °C por 10 min. (BDA + 80 °C) e meio de Martin (MRT).

Das populações de microrganismos presentes nos biofertilizantes, verificou-se predominância de bactérias em ambos Ban e Box, sendo grande parte composta de bactérias baciliformes termotolerantes. Cao et al. (2013) também observaram predominância de bactérias sob condições de anaerobiose, sendo na maioria *Bacillus* spp. As populações de fungos filamentosos e leveduriformes mantiveram-se em menor número e variaram

amplamente ao longo do tempo. Em Ban, nenhum eucarioto foi encontrado após 30 dias de preparo.

Ao todo, 314 isolados com características morfológicas distintas foram selecionados de Ban e Box. Na Tabela 5, verifica-se que 30 isolados apresentaram mais que 50% de inibição no crescimento micelial de *P. nicotianae*, sendo que, apenas 7 não formaram halo de inibição. Dentre os 30 isolados selecionados, 70% foram obtidos por plaqueamento em BDA após tratamento térmico. Todos os isolados selecionados de Ban foram obtidos por essa metodologia, assim como, 50% dos isolados do Box.

Ao compararmos Ban e Box, constatou-se que a condição de aerobiose resultou em maior número e diversidade de isolados promissores para controle do patógeno (dentro do método de prospecção utilizado). Fato que provavelmente explica porque Box exibiu melhor resultado sob concentrações mais baixas nos ensaios *in vivo*. Grosch et al. (2012) verificaram que a combinação de diferentes agentes de controle biológico aplicados ao solo, tem maior eficácia quando comparado à aplicação individual. Além disso, a diversidade nos modos de ação pode ampliar o espectro de controle de patógenos.

Segundo Feichtenberger (2001), isolados de *Bacillus* spp. e de *Penicillium* spp. já foram descritos como antagonistas à *P. nicotianae*. Dentre os microrganismos obtidos neste trabalho com melhor desempenho (Tabela 5), alguns foram morfológicamente classificados nestes dois gêneros (Figura 10), porém, são necessários estudos moleculares para posterior confirmação. Um fato interessante, observado neste estudo, foi a seleção do isolado 3Box9 como potencial antagonista, onde suas características morfológicas apontam para um fungo leveduriforme (Figura 10), e até o momento, pouco se sabe sobre leveduras como antagonistas à *P. nicotianae* e, de um modo geral a patógenos de solo (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006).

**Tabela 5.** Seleção de isolados que apresentaram antagonismo à *Phytophthora nicotianae*

	Isolado	MI <sup>x</sup>	Inibição da colônia de <i>P. nicotianae</i> (%)	Halo de inibição (milímetros)	Nota <sup>y</sup>	Bioensaio <sup>z</sup>	
						M	Z
Mistura inicial	2Bov1	A	76,8	1,5	+	1,00 b	2,75 c
	3Bov1	A	63,2	12	+++	2,50 d	3,00 c
	6Bov1	A	71,4	2,5	+	1,83 c	3,75 c
	7Bov1	A	59,1	18,5	+++	0,83 b	1,75 b
	13Bov1	A	76,8	2,5	+	1,83 c	3,25 c
	17Bov1	C	72,8	1,5	+	0,92 b	2,25 c
	22Bov1	B	64,6	11	+++	1,08 b	3,00 c
Anaeróbico	4Ban2	A	76,8	0		1,00 b	3,00 c
	11Ban4	A	76,8	0		1,33 c	2,75 c
	5Ban7	A	72,8	1,5	+	1,42 c	3,75 c
	28Ban11	A	57,8	4,5	+	2,16 d	3,00 c
	7Ban12	A	78,2	0		1,67 c	2,75 c
	9Ban13	A	51,0	6	++	1,92 c	3,00 c
	19Ban13	A	74,1	2,5	+	1,50 c	3,25 c
	21Ban13	A	71,4	13,5	+++	1,75 c	3,00 c
	8Ban13	A	79,6	0		1,50 c	3,00 c
Aeróbico	15Box2	B	59,1	5	+	1,50 c	3,00 c
	28Box4	C	76,8	0		0,33 a	2,00 b
	39Box5	A	53,7	2,5	+	2,58 d	3,50 c
	12Box5	B	76,8	0		2,16 d	3,25 c
	8Box7	A	68,7	2,5	+	1,17 b	1,50 b
	12Box7	B	56,4	9,5	++	2,08 d	3,00 c
	14Box7	A	74,1	1,5	+	0,67 b	1,25 b
	3Box9	B	63,2	5,5	+	2,16 d	3,00 c
	16Box9	C	53,7	6	++	1,34 c	2,00 b
	36Box11	B	71,4	15	+++	1,66 c	3,25 c
	46Box11	C	77,5	0		1,75 c	3,75 c
	1Box12	A	63,2	3,5	+	0,58 b	2,25 c
	2Box12	A	82,3	0		0,17 a	0,50 a
3Box13	A	63,2	12,5	+++	1,51 c	3,00 c	

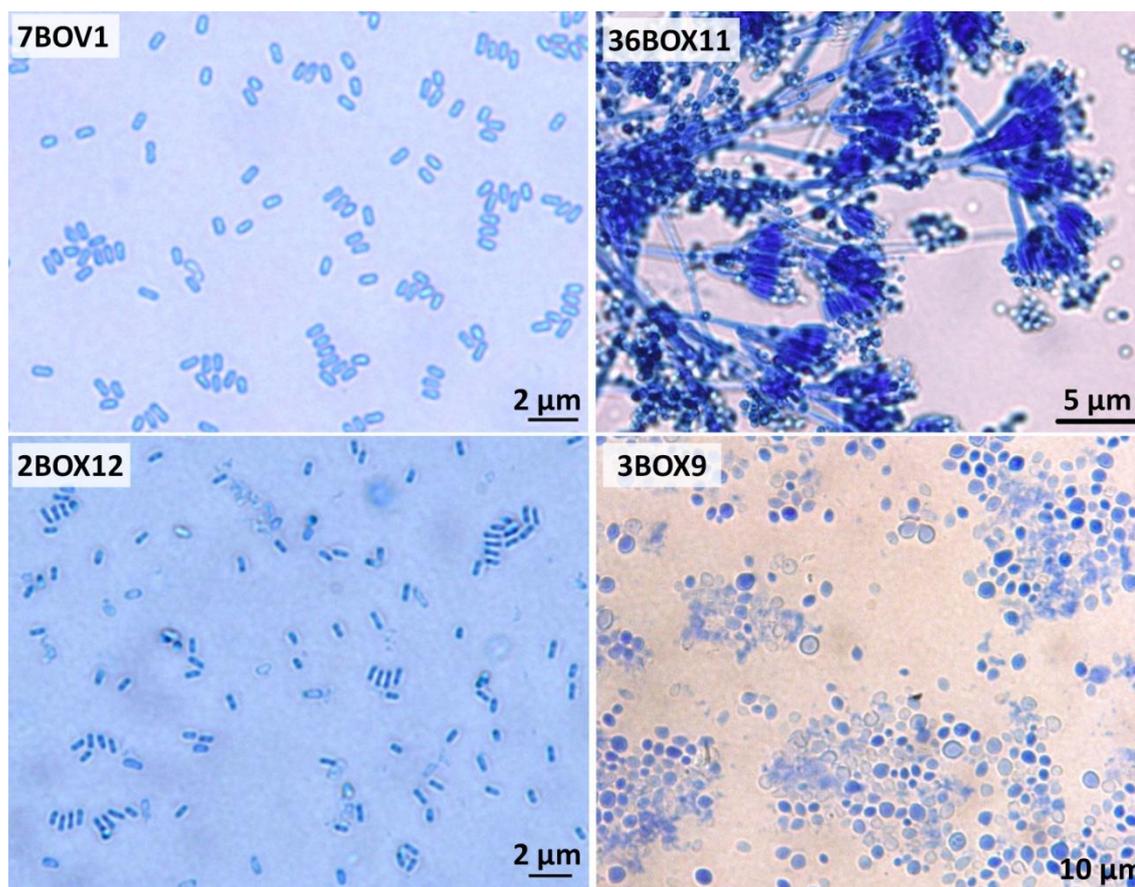
<sup>x</sup>MI = Meios de Isolamento: (A) BDA, após tratamento térmico dos biofertilizantes (80 °C/ 10 min) – *Bacillus* spp.; (B) plaqueamento direto em meio de Martin - Fungos; (C) plaqueamento direto em meio nutriente ágar - Bactérias.

<sup>y</sup>Escala de notas dadas para classificação dos isolados no ensaio *in vitro*, onde: +++ = halo de inibição maior que 11 mm; ++ = halo entre 6 - 10 mm; + = halo entre 1 - 5 mm; = sem halo.

<sup>z</sup>Bioensaio com brotos de Alfafa. Escala de notas para: M = quantidade de micélio, onde: 0 = sem micélio; 1 = pouco; 2 = médio e 3 = muito micélio e escala de nota Z = número de esporângios, em que: 0 = sem esporângios; 1 = entre 1 e 5; 2 = entre 6 e 10; 3 = entre 11 e 50 e 4 = mais de 51 esporângios. Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Contudo, sob condições de anaerobiose, cria-se um ambiente restritivo ao desenvolvimento microbiológico dentro de Ban. Ahring et al. (2001) apontam que a maior parte dos microrganismos presentes na digestão anaeróbica de esterco bovino é composta de bactérias (entre 60% e 80%) e quase não ocorre a presença de eucariotos. Isso reforça porque no Ban, dentre os potenciais antagonistas obtidos, só foram encontradas bactérias baciliformes termotolerantes. Sobretudo, em ambos os biofertilizantes, a maior parte dos isolados que demonstrou antagonismo à *P. nicotianae* foi de bactérias baciliformes isoladas após tratamento térmico dos biofertilizantes (provavelmente, *Bacillus* spp). Se por um lado a condição de anaerobiose é restritiva para eucariotos, por outro, pode favorecer o desenvolvimento de alguns antagonistas desejáveis (WANG et al., 2014a).

Dentre os isolados com melhor nota classificatória no *screening in vitro* o 7Bov1 gerou halo de inibição médio de 18,5 mm, destacando-se também pelos resultados promissores no bioensaio com brotos de alfafa (Tabela 5). Apesar do isolado 2Box12 ter apresentado 82,3% de inibição no crescimento micelial do patógeno, não foi observada a presença de halo de inibição, que provavelmente foi omitido, devido ao seu rápido crescimento sobre a placa, ocupando toda zona de antagonismo. Dentre todos os isolados, o 2Box12 foi ainda o que apresentou os melhores resultados no bioensaio com brotos de alfafa.



**Figura 10.** Fotos obtidas por meio de microscopia óptica de luz de isolados contidos nos biofertilizantes. (7BOV1) e (2BOX12) - bactérias baciliformes termotolerantes; (36BOX11) - fungo filamentosos; (3BOX9) - fungo leveduriforme.

Outros 4 isolados (17Bov1, 1Box12, 28Box4 e 8Box7) também apresentaram desempenho satisfatório e mostraram-se promissores como agentes de controle de *P. nicotianae*. Quando os biofertilizantes foram testados em sua composição integral, no bioensaio com brotos de alfafa, as concentrações de 10% e 20% não diferiram do tratamento controle (não inoculado), resultado que chamou a atenção, mas que não se manteve com Ban e Box a 5%.

## 4.2. Ensaios *in vivo*

### 4.2.1. Ensaio com plantas jovens de limão Cravo

Os resultados da avaliação do efeito dos biofertilizantes sobre o sistema radicular e sobre a rizosfera e as raízes de plantas jovens de limão Cravo inoculadas com *P. nicotianae*, por inundação do substrato, estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Número de raízes de limão Cravo infectadas com *Phytophthora nicotianae* e densidade populacional do patógeno em substrato tratado com diferentes doses dos biofertilizantes<sup>w</sup>

Tratamento (dose)	Anaeróbico (Ban)			Aeróbico (Box)		
	Nº Raízes Infectadas <sup>x</sup>	<i>P. nicotianae</i> no substrato		Nº Raízes Infectadas	<i>P. nicotianae</i> no substrato	
		UFC/cm <sup>3</sup> <sup>y</sup>	Isclas Infectadas <sup>z</sup>		UFC/cm <sup>3</sup>	Isclas Infectadas
0%	11,2 a	20,1 a	98% a	7,6 a	42,4 a	100% a
10%	6,2 a	14,5 a	58% b	0,8 b	20,8 b	90% ab
20%	0,8 b	3,84 b	24% c	0,4 b	8,0 c	80% ab
50%	0,6 b	2,56 b	10% cd	0,0 b	4,8 c	74% b
Não Inoc.	0,0 b	0,0 b	0% d	0,0 b	0,0 c	0% c

<sup>w</sup> Biofertilizantes anaeróbico e aeróbico aplicados, respectivamente, com 35 e 55 dias de maturação.

<sup>x</sup> Número de fragmentos de raízes infectados com *P. nicotianae*.

<sup>y</sup> Propágulos de *P. nicotianae* no substrato, em UFC/cm<sup>3</sup>.

<sup>z</sup> Percentual de discos de folha infectados pelo método da iscla, cada repetição foi composta por 10 discos. Valores seguidos da mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para as concentrações de 20% e 50% do Ban houve redução significativa no número de raízes infectadas, assim como, na densidade populacional de *P. nicotianae* na rizosfera, mensurada por plaqueamento direto e, também, pelo teste de isclas de folha. O mesmo resultado não foi observado para 10% de Ban, que não diferiu do controle inoculado. Entretanto, apesar de 10% de Ban não ter reduzido o número de raízes infectadas ou o número de propágulos no substrato (UFC/cm<sup>3</sup>), observou-se uma redução significativa no número de isclas de folhas infectadas. Isso aponta para um possível efeito do Ban sobre os zoósporos ou sobre a zoosporogênese, logo que neste teste, o solo é completamente inundado (WALKER & WEST, 2007). Considerando a pouca influência do pH nos resultados observados *in vitro*, somado ao fato de

que a concentração de potássio existente nos dois biofertilizantes foi a mesma (Tabela 3), elemento este importante na motilidade dos zoósporos (APPIAH et al., 2005), é mais provável que os teores de cobre existente em maior quantidade em Ban tenham exercido maior influência neste resultado, considerando que esse elemento químico em elevadas concentrações afeta negativamente a zoosporogênese e a germinação dos zoósporos (HALSALL & FORRESTER, 1977). Segundo os autores, o ferro é outro íon que em concentrações elevadas (como observado em Ban) pode inibir a produção de zoosporângios em algumas espécies de *Phytophthora*. De maneira similar, concentrações elevadas de cálcio no solo podem causar supressão à *Phytophthora* spp., ao que tudo indica, este efeito está mais associado à inibição na produção de esporângios, zoósporos e clamidósporos, do que sobre o crescimento micelial (SERRANO et al., 2012). Outros elementos podem ainda ter influenciado nos resultados observados, porém, sabe-se que boro, zinco, manganês, molibdênio e níquel apresentam menor influência sobre algumas espécies de *Phytophthora* (HALSALL & FORRESTER, 1977; SLADE & PEGG, 1993).

Devem-se considerar ainda os resultados do efeito dos microrganismos presentes nos biofertilizantes sobre *P. nicotianae* (item 4.1.2.), uma vez que estes e seus metabólitos exerceram grande influência sobre o patógeno. É ainda possível que outras substâncias provenientes da biodigestão (presentes em Ban), tenham um papel significativo no ocorrido. Cao et al. (2013) observaram aumento nos teores de amônia e substâncias húmicas presentes em esterco bovino sob digestão anaeróbica, apontando-os como possíveis responsáveis pela supressão de *Phytophthora capsici*. Esses autores verificaram ainda, que a amônia reduziu tanto o crescimento micelial quanto a germinação de zoósporos do patógeno.

Para Box, todas as concentrações testadas (10, 20 e 50%) reduziram o número de raízes infectadas, e também a quantidade de propágulos do patógeno no substrato (UFC/cm<sup>3</sup>), sendo que, em doses acima de 20% essa redução foi mais acentuada. Isso reforça o papel da microbiota presente nos biofertilizantes, considerando os resultados apresentados no item 4.1.2.

Resultados confluentes foram observados com aplicação de lodo de esgoto, onde este reduziu a quantidade de propágulos de *P. nicotianae* no solo (LEONI & GHINI, 2002). Contudo, no teste de isca, Box não demonstrou uma redução tão acentuada no número de raízes infectadas, tendo se limitado à apenas 26% na dose mais alta de biofertilizante (50%). Ban exibiu melhores resultados no teste de iscas, provavelmente devido ao efeito de sua fração filtrada sobre o patógeno. Em Box, os teores de cobre, ferro e cálcio foram significativamente menores do que em Ban, além disso na presença de oxigênio, a amônia pode sofrer nitrificação e sua disponibilidade é reduzida em pH abaixo de 6,5 (LEHTOVIRTA-MORLEY et al., 2011), condições presentes no Box (Figura 8) e que provavelmente explica seu resultado inferior à Ban. O efeito do Box integral, observado nos ensaios *in vivo*, provavelmente está mais relacionado com o papel de sua microbiota.

No geral, vale ressaltar que tanto o Ban quanto o Box demonstraram resultados satisfatórios nos ensaios *in vivo*. Isso corrobora com os resultados obtidos por Faldoni (2011), que também verificou controle de *P. nicotianae* com aplicação de um biofertilizante à base de esterco bovino, além de observar a ativação de genes relacionados à resistência sistêmica em plantas de citros. Resultados similares foram observados por Sang et al. (2010) para *P. capsisi*, em pimenta, tanto no controle direto, quanto na indução de resistência.

Apesar dos resultados satisfatórios no controle do fitopatógeno, quando as plantas foram tratadas nas concentrações entre 20% e 50% de Ban ou Box, foram observados sintomas de fitotoxicidade nas folhas (Figura 11). Outros autores já relataram riscos de fitotoxicidade com o uso de biofertilizantes, especialmente sob doses elevadas (BETTIOL et al. 1998; MEDEIROS et al., 2003). O presente trabalho constatou que mesmo aplicado diretamente no solo, em concentrações acima de 20% houve estresse e danos fisiológicos, evidenciados pelos sintomas de epinastia e necrose nas bordas das folhas. Widmer et al. (1998) também relataram fitotoxicidade em mudas de citros sob essas concentrações com lodo de esgoto.



**Figura 11.** Sintomas de fitotoxicidade observado em folhas de limão Cravo, causados pelos biofertilizantes anaeróbico (Ban) e aeróbico (Box), aplicados no substrato em diferentes doses: 0% (A), 10% (B), 20% (C) e 50% (D).

Ainda assim, as plantas tratadas até 20% demonstraram posterior recuperação, apresentando folhas novas assintomáticas. Já as plantas que receberam a dose de 50% foram severamente afetadas e demonstraram recuperação lenta. Quando este ensaio foi repetido com plantas de 60 dias, os sintomas de fitotoxicidade mostraram-se mais severos, ocorrendo a morte de algumas plantas. Porém, quando o ensaio foi repetido, utilizando-se os biofertilizantes com maior tempo de maturação (103 dias, sob  $25^{\circ}\text{C} \pm 5$ ), tanto Ban quanto Box, aplicados nas concentrações de 20%, não ocasionaram os mesmos sintomas de fitotoxicidade, mesmo em plantas jovens.

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

Quando os biofertilizantes foram aplicados de forma preventiva, em tubetes semeados com tangerina Sunki e limão Cravo, observou-se que, assim como no teste com plantas jovens de limão Cravo, Box promoveu controle em concentrações mais baixas: 5% (Cravo) e 15% (Sunki) enquanto que o Ban apresentou controle apenas quando utilizado nas concentrações de 10% (Cravo) e 20% (Sunki) (Tabela7).

**Tabela 7.** Número de sementes germinadas de dois porta-enxertos de citros, semeadas em substrato inoculado com *Phytophthora nicotianae*, tratado com diferentes doses dos biofertilizantes<sup>a</sup>

Tratamento	Anaeróbico		Aeróbico	
	Sunki	Cravo	Sunki	Cravo
0%	0,6 aA <sup>b,c</sup>	0,8 aA	0,4 aA	0,6 aA
5%	0,4 aA	1,6 aB	0,6 aA	2,6 bcB
10%	0,6 aA	3,0 bcB	0,8 aA	1,6 abB
15%	1,2 abA	1,0 aA	2,0 bA	1,6 abA
20%	2,8 bcA	1,8 abA	1,8 abA	1,2 abA
25%	1,4 abcA	1,0 aA	1,6 abA	1,6 abA
Não Inoc.	3,4 cA	3,6 cA	3,2 bA	3,4 cA

<sup>a</sup> Biofertilizantes utilizados com 103 dias de maturação, aplicados preventivamente (24 horas antes) no substrato.

<sup>b</sup> Valores em número médio de plântulas emergidas por tubete.

<sup>c</sup> Os valores médios dentro da mesma coluna, seguidos da mesma letra minúscula, ou a comparação entre variedades (linhas), seguidos da mesma letra maiúscula, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao compararmos as duas espécies de porta-enxerto de citros, é possível verificar que em limão Cravo o controle foi observado em concentrações menores, 5% (Box) e 10% (Ban), enquanto para tangerina Sunki, o controle ocorreu a 15% (Box) e 20% (Ban). Entretanto, sob concentrações elevadas de biofertilizante, os índices de germinação foram baixos, indicando possível fitotoxicidade em ambas as variedades, sendo o efeito mais intenso sobre limão Cravo. Houve interação entre os fatores variedade do porta-enxerto e concentração de biofertilizante aplicado (Tabela 8). A diferença entre a dose mínima aplicada (para um controle satisfatório) e a dose máxima (para que não ocorra fitotoxicidade) é tênue e varia conforme a suscetibilidade e sensibilidade do porta-enxerto.

Resultados confluentes foram observados com aplicação de lodo de esgoto, que reduziu os índices de *damping-off*, causado por *Phytophthora* em mudas de citros (WIDMER et al., 1998). Apesar dos resultados promissores, Widmer et al. (1998) também observaram sintomas de fitotoxicidade em plântulas recém emergidas, quando o resíduo foi aplicado em concentrações elevadas.

Outro risco que não pode ser negligenciado sobre os biofertilizantes é a presença de helmintos e parasitas (KHOUJA et al., 2010), além de outros

microrganismos patogênicos a humanos (SAHLSTRÖM, 2003). Estes autores apontam o tratamento térmico como uma das melhores soluções até o momento. Bagge et al. (2005) demonstraram a possibilidade de redução desses patógenos sob higienização do resíduo de biodigestor a 70 °C/60 min. Tratar estes resíduos termicamente, pode ainda reduzir os riscos de veicular pragas e fitopatógenos quando há falhas no processamento dos ingredientes utilizados (NOBLE et al., 2009; NOBLE, 2011). Contudo, o tratamento térmico não reduziu a quantidade de bactérias formadoras de endósporo, como *Bacillus* spp, logo que estas apresentam vida latente durável, por sua resistência à altas temperaturas e capacidade de formar estruturas de resistência e sobrevivência (endósporo) (HU et al., 2013). Grande parte dos isolados selecionados como potenciais antagonistas à *P. nicotianae* foram obtidos após tratamento dos biofertilizantes a 80 °C/ 10min, assim o tratamento não elimina microrganismos desejáveis, como algumas bactérias do gênero *Bacillus*.

Após um pré-tratamento, os biofertilizantes podem ainda ser enriquecidos com microrganismos de interesse, para fins específicos (KIM et al., 2003; HACHICHA et al., 2012). Com isso, surge a possibilidade de uso agrícola desses resíduos com menores riscos, havendo ainda, potencial para a melhoria desses produtos, através do seu enriquecimento com agentes de controle biológico (KUPPER et al., 2006; KUPPER et al., 2009), desde que, esses isolados sejam capazes de se desenvolver nas condições presentes nos biofertilizantes, assim como os isolados obtidos neste trabalho.

Com os resultados desta pesquisa, verificou-se que os biofertilizantes, produzidos anaeróbica e aerobicamente, têm potencial para o controle de *P. nicotianae*, pois possuem compostos e microrganismos capazes de afetar o desenvolvimento deste fitopatógeno, sendo também capazes de reduzir a quantidade de seus propágulos no solo. Verificou-se que, a diversidade de microrganismos antagonistas presentes em Box pode ser uma característica desejável em biofertilizantes preparados na presença de oxigênio, sendo este provavelmente o fator que explica os resultados positivos nos ensaios *in vivo* em doses mais baixas, o que permite minimizar os riscos de fitotoxicidade.

Sobretudo, a maior parte dos antagonistas isolados eram bactérias baciliformes termotolerantes, assim, criar condições que favoreçam o desenvolvimento dessas bactérias também é desejável, e por suportarem altas temperaturas, o tratamento térmico não as elimina dos biofertilizantes.

Existe um grande potencial para uso agrícola dos biofertilizantes, que se destacam pela multifuncionalidade. Sua aplicação como adubo orgânico justifica-se por seu fornecimento nutricional às plantas (Tabela 3.). O fato de também apresentarem potencial no controle fitossanitário (BETTIOL et al., 1998; MEDEIROS et al., 2003; LITTERICK et al., 2004; KUPPER et al., 2006) eleva sua viabilidade prática, uma vez que, essas duas características podem ser alcançadas conjuntamente. Considerando-se ainda, que os biofertilizantes possam, também, contribuir para a destinação de resíduos agrícolas, fica evidente a importância e o papel destes compostos dentro de uma agricultura sustentável (BURTON & TURNER, 2003). Contudo, são necessários mais estudos que elucidem questões referentes à composição e uso destes produtos no manejo fitossanitário, visando segurança para o consumidor e para o ambiente.

## 5 CONCLUSÕES

1. Os biofertilizantes produzidos a partir de esterco bovino sobre digestão anaeróbica (Ban) e oxigenação forçada (Box) apresentaram resultados promissores no controle de *P. nicotianae* em citros e foram capazes de reduzir a quantidade de propágulos na rizosfera;
2. Dos microrganismos cultiváveis obtidos nos biofertilizantes, menos de 10% se mostraram promissores ao controle de *P. nicotianae* e, destes a maioria era de bactérias baciliformes termotolerantes;
3. O biofertilizante produzido aeróbicamente apresentou maior quantidade e diversidade de organismos antagônicos à *P. nicotianae*;
4. As frações filtradas dos biofertilizantes afetaram o crescimento micelial de *P. nicotianae* e variaram ao longo do tempo, estes resultados foram mais acentuados em Ban do que em Box;
5. Apesar de a receita inicial ter sido a mesma para os dois biofertilizantes, os teores finais de carbono, fósforo, cálcio, enxofre, cobre, ferro, manganês e zinco foram maiores em Ban do que em Box;

## 6 LITERATURA CITADA

AGRIBUS. Anuário da agricultura brasileira. **Informe econômico/FNP**. São Paulo, SP.p. 256-258, 2013.

AHRING, B.K., IBRAHIM, A.A., MLADENOVSKA, Z. Effect of temperature increase from 55 to 65° C on performance and microbial population dynamics of an anaerobic reactor treating cattle manure. **Water Res.** v. 35, p. 2446–2452. 2001.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C.W.; BLACK WELL, M. **Introductory Mycology**. New York, John Wiley & Sons, Inc., 4<sup>a</sup>ed., 1996. 869p.

ALTIERI, M. **Agroecologia**: a dinâmica produtiva da agricultura sustentável. UFRG. 5 ed. Porto Alegre. 2009.

AMORIM, E. P. da R.; MELO, I. S. de. Ação antagonista de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 565-568, 2002.

APPIAH, A.A; van WEST, P.; OSBORNE, M. C.; GOW, N.A. Potassium homeostasis influences the locomotion and encystment of zoospores of plant pathogenic oomycetes. **Fungal Genetics and Biology**. v. 42, p. 213–223. 2005.

ARRAS, G., ARRU, S. Mechanism of action of some microbial antagonists against fungal pathogens. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, Milan, v.47, p.97-120, 1997.

ATLAS, R.M., PARKS, L.C. (Ed.). **Handbook of Microbiological Media**. CRC Press, Boca Raton/London. 1993.

BAGGE, E., SAHLSTRÖM, L., ALBIN, A. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. **Water Res.** v. 39, p. 4879 - 4886. 2005.

BETTIOL, W. **Resultados de pesquisa com métodos alternativos para o controle de doenças de plantas.** In: HEIN, M. (org.) *Resumos do 1º Encontro de Processos de Proteção de Plantas: controle ecológico de pragas e doenças.* Botucatu, Agroecológica.p.125-135, 2001.

BETTIOL, W. Isolamento seletivo de Bacillus. In: Melo, I. S.; Sanhueza, R.M.V. (Eds.), **Métodos de Seleção de Microrganismos Antagônicos a Fitopatógenos.** Manual Técnico, EMBRAPA-CNPMA, Jaguariúna, São Paulo, pp. 35 -36. 1995.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas:** uso e perspectivas. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, SP. 2009. 341p.

BETTIOL, W.; TRATCH, R.; GALVÃO J.A.H. **Controle de doenças de plantas com biofertilizantes.** 1. ed. Jaguariúna, SP. EMBRAPA-CNPMA, 1998. 22 p.

BONANOMI, G.; ANTIGNANI, V.; CAPODILUPO, M.; SCALA, F. Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. **Soil Biology & Biochemistry.** v.42, p. 136–144. 2010.

BONATERRA, A.; BADOSA, E.; CABREFIGA, J.; FRANCÉS, J. MONTESINOS. Prospects and limitations of microbial pesticides for control of bacterial and fungal pomelo tree diseases. **Trees,** v. 26, n. 1, p. 215-226, 2012.

BUENO, T.; SOUZA, M. M. O. D. O veneno nosso de cada dia: breves considerações sobre o uso de agrotóxicos no brasil. **Anais do Encontro Dia do Geógrafo**, 2014. p. 108-112.

BURTON, C.H.; TURNER, C. **Manure Management Treatment Strategies for Sustainable Agriculture**, second ed. Soilse Research Institute. Editions Quae. 2003.

CAO, Y., CHANG, Z., WANG, J., MA, Y., FU, G. The fate of antagonistic microorganisms and antimicrobial substances during anaerobic digestion of pig and dairy manure, **Bioresource Technology**.v. 136, p. 664-671. 2013.

CARLILE, M. J. The zoospore and its problems. In: Ayres, P. G.; Boddy, L. (eds), **Water, Fungi and Plants** (11th Symposium of the British Mycological Society). Cambridge University Press, Cambridge, p. 105–118. 1986.

CASTRO, C. M. de; SANTOS, A. C. V. dos; AKIBA, F. *Bacillus subtilis* isolado do biofertilizante “Vairo” com ação fungistática e bacteriostática em alguns fitopatógenos. In: Simpósio de Controle Biológico, 3. Águas de Lindóia, 1992. *Anais*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1992. p.291.

CHABOUSSOU, F. **Plantas doentes pelo uso de agrotóxicos**. São Paulo: Expressão Popular, 2006. 323 p.

COLBURN, G. C.; JEFFERS, S. N. Toxicity of commercial algacides to *Phytophthora ramorum*. (Abstr.) **Phytopathology**. 98:S40. 2008.

CONWAY, G. R.; PRETTY, J. N. **Unwelcome harvest: agriculture and pollution**. Routledge: Londres, 2013.

D'ANDRÉA, P. A.; MEDERIOS, M.B. Biofertilizantes biodinâmicos na nutrição e proteção de hortaliças. In: Hortibio: **1º Congresso Brasileiro de Horticultura Orgânica, Natural, Ecológica e Biodinâmica**. Resumos. Botucatu-SP. Agroecologia, p. 225-232. 2001.

DELEITO, C.S.R.; CARMO, M.G.F.; FERNANDES, M.C.A.; ABBOUD, A.C.S. Ação bacteriostática do biofertilizante Agrobio *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.2, p.281-284, 2005.

DICK, M. W. Phylum Oomycota. In: Margulis, L.; Corliss, J. O.; Melkonian, M.; Chapman, D. (eds). **Handbook of Protoctista**. Jones and Bartlett, Boston, U.S.A., p. 661 - 685. 1990.

DINH, T. T. M.; HIEN, D. L. M.. Screening *Bacillus* strains for antagonistic activity against *Fusarium* sp. and *Phytophthora palmivora* causing diseases in corn (*Zea mays* L.). **Tạp chí Khoa học**, n. 51, p. 29, 2014.

EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Mycoscience**. v.47, p. 25–35.2006.

FALDONI, L. **Efeito do biofertilizante no desenvolvimento de porta-enxertos de citros e na indução de resistência à gomose de *Phytophthora***. Araras,2011. 50p. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e desenvolvimento Rural), Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias,2011.

FANG, J. G.; TSAO, P. H. Efficacy of *Penicillium funiculosum* as a biological control agent against *Phytophthora* root rots of azalea and citrus. **Phytopathology**, v. 85, n. 8, p. 871-878, 1995.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: Luz, E. D. M. N.; Matsuoka, K.; Santos, A. F.; Bezerra, J. L. (Eds.). **Doenças**

**causadas por *Phytophthora* no Brasil.** Campinas,SP: Livraria Rural. 2001. p. 283-342.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE J. R. J. Doenças dos Citros. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J. A. M. Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**, vol.2. São Paulo: Editora Ceres, p. 239-269. 2005.

FERNANDES, M. C. A. O biofertilizante Agrobio. **A Lavoura** v. 103, p. 42-43. 2000.

FERRIN, D. M.; KABASHIMA, J. N. *In vitro* insensitivity to metalaxyl of isolates of *Phytophthora citricola* and *P. parasitica* from ornamental hosts in southern California. **Plant Disease** v. 75 p.1041-1044, 1991.

FOLEY, J. A.; RAMANKUTTY N.; BRAUMAN, K. A.; CASSIDY, E. S.; GERBER, J. S.; JOHNSTON, M.; MUELLER, N. D.; O'CONNELL, C.; RAY, D. K.; WEST, P. C.; BALZER, C.; BENNETT, E. M.; CARPENTER, S. R.; HILL, J.; MONFREDA, C.; POLASKY, S.; ROCKSTRÖM, J.; SHEEHAN, J.; SIEBERT, S.; TILMAN, D.;ZAKS, D. P. M. Solutions for a cultivated planet. **Nature** v. 478, p.337 - 342. 2011.

GEORGOPOULOS, S. G. Pathogens become resistant to chemicals. **Plant Disease: An Advanced Treatise**. v. 1, How Disease Is Managed, 2012. 327 p.

GLIESSMAN, S.R. **Agroecology**: The ecology of sustainable food systems (2<sup>a</sup>ed.). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA, 2007. 384p.

GRAHAM, J.H. Phosphite for control of *Phytophthora* diseases in citrus: model for management of *Phytophthora* species on forest trees? **New Zealand Journal of Forestry Science**. v. 41, p. 49-56. 2011.

GRANKE, L. L.; HAUSBECK, M. K. Effects of temperature, concentration, age, and algecides on *Phytophthora capsici* zoospore infectivity. **Plant Dis.** v. 94 p. 54-60. 2010.

GROSCH, R., DEALTRY, S., SCHREITER, S., BERG, G., MENDONÇA-HAGLER, L., SMALLA, K. 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.**v.361, p. 343–357.2012.

GUPTA, K. J.; BROTMAN, Y.; SEGU, S.; ZEIER, T.; ZEIER, J.; PERSIJN, S. T.; MUR, L. A. The form of nitrogen nutrition affects resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in tobacco. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 2, p. 553-568, 2013.

HACHICHA, R., REKIK, O., HACHICHA, S., FERCHICHI, M., WOODWARD, S., MONCEF, N., CEGARRA, J., MECHICHI, T. Co-composting of spent coffee ground with olive mill wastewater sludge and poultry manure and effect of *Trametes versicolor* inoculation on the compost maturity. **Chemosphere.** v. 88, p. 677-682. 2012.

HALSALL, D. M. Effects of certain cations on the formation and infectivity of *Phytophthora* zoospores. 2. Effects of copper, boron, manganese, molybdenum, and zinc ions. **Canadian journal of microbiology.** v. 23, p.1002-1010. 1977.

HALSALL, D. M.; FORRESTER, R. I. Effects of certain cations on the formation and infectivity of *Phytophthora* zoospores. 1. Effects of calcium, magnesium, potassium, and iron ions. **Canadian journal of microbiology**, v. 23, n. 8, p. 994-1001, 1977.

HAYASHIDA, S. H.; CHOI, M. Y.; NANRI, N.; YOKOYAMA, M.; UEMATSU, T. Control of potato common scab with an antibiotic biofertilizer produced from swine feces containing *Streptomyces albidoflavus* CH-33. **Agric. and Biol. Chem.** v. 53 p. 349-354, 1989.

HOITINK, H.A. J.; STONE, A. G.; HAN, D. Y. Suppression of plant diseases by composts. **Hort. Science.** v. 32, p. 184 -187. 1997.

HU, X., ROBERTS, D.P., XIE, L., MAUL, J.E., YU, C., LI, Y., ZHANG, S., LIAO, X., *Bacillus megaterium* A6 suppresses *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape in the field and promotes oilseed rape growth. **Crop. Prot.** 52, 151–158. 2013.

HUBER, D. M.; WATSON, R. D. Nitrogen form and plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 12, n. 1, p. 139-165, 1974.

JEFFERS, S.N.; MARTIN, S.B. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. **Plant Disease.** v. 70, p. 1038-1043. 1986.

JIANG, Z. Q.; GUO, Y. H., LI; S. M., QI; H. Y.; GUO, J. H. Evaluation of biocontrol efficiency of different *Bacillus* preparations and field application methods against *Phytophthora* blight of bell pepper. **Biological Control**, v. 36, n. 2, p. 216-223, 2006.

JIN, F.; DING, Y.; DING, W.; REDDY, M. S.; FERNANDO, W. G.; DU, B. Genetic diversity and phylogeny of antagonistic bacteria against *Phytophthora nicotianae* isolated from tobacco rhizosphere. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 3055-3071, 2011.

JUDELSON, H. S.; BLANCO, F. A. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. **Nature Reviews Microbiology.** v. 3, p. 47–58. 2005.

KAOSIRI, T.; ZENTMYER, G.A.; ERWIN, D.C. Stalk length as a taxonomic criterion for *Phytophthora palmivora* isolates from cacao. **Canadian Journal of Botany**, 56, 1730-1738. 1978.

KHOUJA, L.B., CAMA, V., XIAO, L. Parasitic contamination in wastewater and sludge samples in Tunisia using three different detection techniques. **Parasitol. Res.v.** 107, p. 109 – 116. 2010.

KIM, J., PARK, C., KIM, T. H. L. M., KIM, S., LEE, S. W. Effects of various pretreatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge. **J. Biosci. Bioeng.** v. 95, p. 271–275. 2003.

KIM, Y. K.; HONG, S. J.; SHIM, C. K.; KIM, M. J.; CHOI, E. J.; LEE, M. H.; JEE, H. J. Functional Analysis of *Bacillus subtilis* isolates and biological control of red pepper powdery mildew using *Bacillus subtilis* R2-1. **Research in Plant Disease**, 2012.

KUPPER, K. C.; BETTIOL, W.; DE GOES, A.; SOUZA, P. S.; BELLOTTE, J.A.M. Biofertilizer for control of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **Crop Protection.** v. 25, p. 569-573. 2006.

KUPPER, K. C., BELLOTTE, J. A. M., DE GOES, A. Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum* agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura.** n. 4. p. 1004-1015. 2009.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira.** v. 28, p. 251-257. 2003.

LATIJNHOUWERS, M.; LIGTERINK, W.; VLEESHOUWERS, V. G.; VAN WEST, P.; GOVERS, F. A alpha subunit controls zoospore motility and

virulence in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. **Molecular Microbiology**. v. 51 p. 925–936. 2004.

LAZAROVITS, G.; TENUTA, M.; CONN, K. L. Organic amendments as a disease control strategy for soilborne diseases of high-value agricultural crops. **Australasian Plant Pathology**. v. 30, n. 2, p. 111-117, 2001.

LEHTOVIRTA-MORLEY L.E., STOECKER K., VILCINSKAS A., PROSSER J.I., NICOL G.W. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**. v.108, p. 15892–15897. 2011.

LEONI, C.& GHINI, R. Efeito do lodo de esgoto na indução de supressividade *in vitro* a *Phytophthora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**. v. 28, p. 67-75. 2002.

LICHTFOUSE, E., NAVARRETE, M., DEBAEKE, P., SOUCHÈRE, V., ALBEROLA, C., MÉNASSIEU, J. Agronomy for sustainable agriculture. A review. **Agron. Sustain. Dev.** v. 29, p. 1-6. 2009.

LITTERICK, A.M.; HARRIER L.; WALLACE, P.; WATSON, C.A.; WOOD, M. 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**. v. 23, p. 453-479. 2004.

LIU, S., BAKER, R. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**. v.70, p. 404-412. 1980.

LUZ, E. D. M. N. O gênero *Phytophthora* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. S80-S81, 2006.

LUZ, E. D. M. N.; MATSUOKA, K. *Phytophthora*: fungo, protista ou chromista? In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. p. 1-14.

LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S. D. V. M.; BEZERRA, J. L.; SOUZA, J. T. de; SANTOS, A. F. dos. **Glossário ilustrado de *Phytophthora*: técnicas especiais para o estudo de Oomicetos**. Itabuna: FAPESB/CEPLAC, 2008. 204 p.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto N° 4954, de 14/01/2004. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegconsulta/consultalegislacao.do?operacao=viasualizar&id=5473>.

MARÍN, F., SANTOS, M., DIÁNEZ, F., CARRETERO, F., GEA, F. J., YAU, J. A., & NAVARRO, M. J. Characters of compost teas from different sources and their suppressive effect on fungal phytopathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 1371-1382, 2013.

MARROCOS, S. D. T. P.; JÚNIOR, J. N.; GRANGEIRO, L. C.; DE QUEIROZ ANBRÓSIO, M. M.; DA CUNHA, A. P. A. Composição química e microbiológica de biofertilizantes em diferentes tempos de decomposição. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 4, p. 34-43, 2012.

MARTIN, J.P. The use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science**. v. 69, p. 215-232. 1950.

MASAGO, H., YOSHIKAWA, M., FUKADA, M., AND NAKANISHI, N. Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants. **Phytopathology**. v. 67, p. 425-428. 1977.

MEDEIROS, M. B.; ALVES, S. B.; BERZAGHI, L. M.; SINISGALLI, D. L.; GARCÍA, M. O. Effect of liquid biofertilizer on the ovoposition of *Brevipalpus phoenicis* In: *International Symposium of Undergraduated Research*, 9. São Paulo: <http://www.usp.br/siicusp/8osiicusp/resumos/ficha1902.htm>. nov. 2000a

MEDEIROS, M. B.; ALVES, S. B.; SOUZA, A. P.; REIS, R. Efecto de fertiprotectores y entomopatógenos en los estados inmaturos de *Ecdytophla aurantiana* (Lepidoptera: Tortricidae). In: *Congresso Latino Americano de Manejo Integrado de Plagas*. Ciudad de Panamá, Ministério de Agricultura y Ganadeira, 2000b.

MEDEIROS, M. B.; LOPES, J. S. Biofertilizantes líquidos e sustentabilidade agrícola. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 7, n. 3, p. 24 - 26, 2006.

MEDEIROS, M. B.; WANDERLEY, P. A.; WANDERLEY, M. J. A. Biofertilizantes líquidos. **Biotecnologia**. Ciência e Desenvolvimento. n. 31, p. 38-44. 2003.

MEDEIROS, R. F., CAVALCANTE, L. F., MESQUITA, F. O., RODRIGUES, R. M., SOUSA, G. G., DINIZ, A. A. Crescimento inicial do tomateiro-cereja sob irrigação com águas salinas em solo com biofertilizantes bovino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 15, p. 505-511, 2011.

MEDINA FILHO, H. P., BORDIGNON, R., SIQUEIRA, W. J., FEICHTENBERGER, E., CARVALHO, M. R. T. Tolerância de híbridos e clones de porta-enxertos de citros à infecção de raízes por *Phytophthora nicotianae*. **Fitopatol. Bras.** v. 28, p. 534-540. 2004.

MO, X.; FU, Y.; PATEL, J. S.; & ZHANG, S. Surfactin and biofilm production by *Bacillus subtilis* IN937b, a biological control agent for suppressing *Phytophthora* blight on squash. In: **Phytopathology**. St Paul, MN 55121 USA: Amer. Phytopathological Soc., p. 98-98. 2013.

MORRIS, B. M.; GOW, N. A. R. Mechanism of electrotaxis of zoospores of phytopathogenic fungi. **Phytopathology**. v. 8, p. 877–882. 1993.

NOBLE, R. Risks and benefits of soil amendment with composts in relation to plant pathogens. **Australasian Plant Pathology**. v. 40, p. 157-167. 2011.

NOBLE, R., ELPHINSTONE, J.G., SANSFORD, C.E., BUDGE, G.E., HENRY, C.M. Management of plant health risks associated with processing of plant-based wastes: a review. **Bioresour. Technol.** v. 100, p. 3431 – 3446. 2009.

NOBLE, R.; COVENTRY, E. Suppression of soil-borne plant diseases with composts: a review. **Biocontrol Science and Technology**, v. 15, n. 1, p. 3-20, 2005.

PAL, A.; GIN, K. Y.; LIN, A. Y.; REINHARD, M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects, **Science of The Total Environment**, v. 408 (24), p. 6062-6069. nov, 2010.

PANE, C.; PICCOLO, A.; SPACCINI, R.; CELANO, G.; VILLECCO, D.; ZACCARDELLI, M. Agricultural waste-based composts exhibiting suppressivity to diseases caused by the phytopathogenic soil-borne fungi *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor*. **Applied Soil Ecology**, v. 65, p. 43-51, 2013.

QIU, M., ZHANG, R., XUE, C., ZHANG, S., LI, S., ZHANG, N., & SHEN, Q. Application of bio-organic fertilizer can control *Fusarium* wilt of cucumber plants by regulating microbial community of rhizosphere soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 7, p. 807-816, 2012.

RAJKUMAR, M., LEE W.H., LEE, K.J. Screening of bacterial antagonists for biological control of *Phytophthora* blight of pepper. **J. Basic Microbiol.** v. 45, p. 55–63.2005.

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

SAHLSTRÖM, L. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. **Bioresour Technol.** v. 87, p. 161 – 166. 2003.

SANG, M.K., KIM, J.G., KIM, K.D. Biocontrol activity and induction of systemic resistance in pepper by compost water extracts against *Phytophthora capsici*. **Phytopathology**. v.100, p. 774-783. 2010.

SANTOS, A. C. V. **Biofertilizantes líquido**: o defensivo agrícola da natureza. 2ª ed. Niterói: EMATER – RIO, 1992. 162p.

SANTOS, A. C. V. **A ação múltipla do biofertilizante líquido como fertilizante e fitoprotetor em lavouras comerciais**. In: HEIN, M. (org.) *Resumos do 1º Encontro de Processos de Proteção de Plantas: controle ecológico de pragas e doenças*. Botucatu, Agroecológica.p.91-96, 2001.

SANTOS, M. V. O. ***Phytophthora* spp. em cultivos diversos no sul da bahia e identificação de agentes de biocontrole a estes patógenos**. Ilhéus, 2010. 105p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Estadual de Santa Cruz, 2010.

SAWANT, I. S.; SAWANT, S. D.; NANAYA, K. A. Biological control of *Phytophthora* root-rot of coorg mandarin (*Citrus reticulata*) by *Trichoderma* species grown on coffee waste. **The Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 65, n. 11,1995.

SCARLETT, K.; GUEST, D.; DANIEL, R. Elevated soil nitrogen increases the severity of dieback due to *Phytophthora cinnamomi*. **Australasian Plant Pathology**, v. 42, n. 2, p. 155-162, 2013.

SEGARRA, G.; AVILES, M.; CASANOVA, E.; BORRERO, C.; TRILLAS, I. Effectiveness of biological control of *Phytophthora capsici* in pepper by *Trichoderma asperellum* strain T34. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 52, n. 1, 2013.

SERRANO, M. S.; DE VITA, P.; FERNÁNDEZ-REBOLLO, P.; HERNÁNDEZ, M. E. S. Calcium fertilizers induce soil suppressiveness to *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Quercus ilex*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 132, n. 2, p. 271-279, 2012.

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

SINGH, N.; SINGH, R.; THIND, S. K.; SINGH, P. Sampling kinnow orchards in Punjab to estimate populations of antagonistic microflora and its screening against *Phytophthora parasitica* causing foot rot in citrus. **Plant Disease Research**, v. 26, n. 1, p. 35-39, 2011.

SLADE, S. J.; PEGG, G. F. The effect of silver and other metal ions on the *in vitro* growth of root-rotting *Phytophthora* and other fungal species. **Ann. Appl. Biol.** v.122, p. 233-251. 1993.

SUKHADA, M.; MANJULA, R.; RAWAL, R. D. Evaluation of arbuscular mycorrhiza and other biocontrol agents against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* infecting papaya (*Carica papaya* cv. Surya) and enumeration of

pathogen population using immuno techniques. **Biological Control**, v. 58, n. 1, p. 22-29, 2011.

SWAIN, M.R.; RAY, R.C. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora, **Microbiological Research**, v. 164, i. 2, p. 121-130, 2009.

SZCZECH, M.; SMOLIŃSKA, U. Comparison of suppressiveness of vermicomposts produced from animal manures and sewage sludge against *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan var. *nicotianae*. **Journal of Phytopathology**, v. 149, n. 2, p. 77-82, 2001.

TERMORSHUIZEN, A.J.; VOLKER, D.; BLOK, W.J.; TEN BRUMMELER, E.; HARTOG, B.J.; JANSE, J.D.; KNOL, W.; WENNEKER, M.; Survival of human and plant pathogens during anaerobic mesophilic digestion of vegetable, fruit, and garden waste, **European Journal of Soil Biology**, v. 39(3), p. 165-171, 2003.

TESSEROLI Neto, E. A. **Biofertilizantes: Caracterização química, qualidade sanitária e eficiência em diferentes concentrações na cultura da alface**. Curitiba, 2006. 52p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, 2006.

THOMSON, S. V.; ALLEN, R. M. Mechanisms of survival of zoospores of *Phytophthora parasitica* in irrigation water [Foot rot of citrus, fungal diseases]. **Phytopathology** (USA), 1976.

TIMMER, L. W.; MENGE, J. A.; **Phytophthora induced diseases**. In: WHITESIDE, J. O.; GARSEY, S. M.; TIMMER, L. W. (Ed.). Compendium of citrus diseases. St. Paul: APS Press, 2000, p. 22 - 24.

TOPPE, B.; THINGGAARD, K. Influence of copper ion concentration and electrical conductivity of the nutrient solution on *Phytophthora cinnamomi* in ivy grown in ebb-and-flow systems. **J. Phytopathol.** v. 148, p. 579-585. 2000.

TOPPE, B.; THINGGAARD, K. Prevention of *Phytophthora* root rot in Gerbera by increasing copper ion concentration in the nutrient solution. **Eur. J. Plant Pathol.** v. 104, p.359-366. 1998.

TRATCH, R.; BETTIOL, W. Efeito de biofertilizantes sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, n.11, p.1131-1139, 1997.

TROTTA, A., VARESE, G. C., GNAVI, E., FUSCONI, A., SAMPO, S., BERTA, G. Interactions between the soil-borne root pathogen *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plants. **Plant and Soil**.v. 185, p. 199 –209. 1996.

TSCHARNTKE, T.; CLOUGH, Y.; WANGER, T. C.; JACKSON, L.; MOTZKE, I.; PERFECTO, I.; VANDERMEER, J.; WHITBREAD, A. Global food security, biodiversity conservation and the future of agricultural intensification. **Biological Conservation**, v.151(1), p. 53-59. 2012.

van WEST, P.; APPIAH, A. A.; GOW, N. A. R. Advances in research on root pathogenic oomycetes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 62,p. 99 - 113. 2003.

WALKER, C.A., VAN WEST, P. Zoospore development in the oomycetes. **Fungal Biology Reviews**. v. 21, p. 10-18.2007.

WANG, Q., MA, Y., WANG, G., GU, Z., SUN, D., AN, X., CHANG, Z. Integration of biofumigation with antagonistic microorganism can control *Phytophthora* blight of pepper plants by regulating soil bacterial community structure.

**European Journal of Soil Biology**, Available online in 13 January, ISSN 1164-5563. 2014a.

WANG, X.; LU, X.; LI, F.; YANG, G. Effects of Temperature and Carbon-Nitrogen (C/N) ratio on the performance of anaerobic co-digestion of dairy manure, chicken manure and rice straw: focusing on ammonia inhibition. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e97265, 2014b.

WERRES, S., WAGNER, S., BRAND, T., KAMINSKI, K., AND SEIPP, D. Survival of *Phytophthora ramorum* in recirculating irrigation water and subsequent infection of Rhododendron and Viburnum. **Plant Dis.** v. 91 p.1034 - 1044. 2007.

WIDMER, T.L.; GRAHAM, J.H.; MITCHELL, D.J. Composted municipal waste reduces infection of citrus seedlings by *Phytophthora nicotianae*. **Plant. Disease.** v. 82, p. 683 – 688. 1998.

ZHANG, S.; RAZA, W.; YANG, X.; HU, J.; HUANG, Q.; XU, Y.; SHEN, Q. Control of *Fusarium* wilt disease of cucumber plants with the application of a bioorganic fertilizer. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, n. 8, p. 1073-1080, 2008.