

# 16

## Efeitos do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade de Solos a *Phytophthora nicotianae* em Citros

Carolina Leoni e Raquel Ghini

### Introdução

Entre as doenças fúngicas que afetam os citros, o tombamento, a gomose e a podridão do pé e raízes causadas por *Phytophthora* spp. estão entre as de maior importância econômica. A gomose ocorre em todas as regiões produtoras de citros e as principais espécies de *Phytophthora* predominantes no Brasil são *P. nicotianae* (sin. = *P. parasitica*) e *P. citrophthora* (Feichtenberger et al., 1997).

Atualmente, o manejo das doenças causadas por *Phytophthora* é baseado na integração de várias medidas de controle, que podem variar dependendo da idade da planta e da manifestação da doença (Erwin & Ribeiro, 1996; Wilcox et al., 1999). As medidas preventivas nos viveiros para obtenção de mudas sadias são extremamente importantes para evitar a disseminação do patógeno para áreas não infestadas. O uso de porta-enxertos resistentes constitui uma das principais medidas de controle, porém, nem sempre existe boa correlação entre a resistência de uma cultivar à infecção de tronco e sua tolerância às podridões de raízes. No Brasil, a incidência dessas doenças aumentou após o aparecimento da tristeza e o declínio dos citros, pois a maioria dos porta-enxertos empregados é suscetível ao gênero *Phytophthora* (Feichtenberger, 1989; 1990). Também são importantes as medidas de controle da doença nos pomares, como a escolha de áreas desfavoráveis à doença, adoção de práticas de conservação de solo, uso de adubos orgânicos que favoreçam uma microbiota antagônica ao patógeno, manejo da irrigação e

drenagem, monitoramentos freqüentes e controle químico (Erwin & Ribeiro, 1996; Feichtenberger et al., 1997).

O controle químico pode ser muito eficiente, como relatado por vários autores (Feichtenberger, 1990; Matheron & Matejka, 1991). Porém, apesar da dificuldade de desenvolvimento de resistência de fitopatógenos do solo a fungicidas, há relatos de resistência de *P. parasitica* a metalaxyl (Ferrin & Kabashima, 1991; Timmer et al., 1998). Esse problema, associado aos possíveis impactos no agroecossistema, tem levado à busca de alternativas ao controle químico.

Uma das alternativas para o manejo de patógenos veiculados pelo solo é o uso de diversas fontes de matéria orgânica, tanto incorporadas ao solo, quanto empregadas como cobertura e como veículo de agentes de biocontrole. A matéria orgânica contribui para um controle mais efetivo dos patógenos do solo devido ao aumento da atividade microbiana (mecanismos de antibiose, competição por nutrientes, oxigênio e/ou CO<sub>2</sub>, parasitismo, lise de hifas ou esporos, indução de resistência e outros) e à melhoria das características físicas e químicas do solo (Baker & Cook, 1974; Casale et al., 1995; Chung et al., 1988; Hoitink & Boehm, 1999).

A matéria orgânica incorporada ao solo pode induzir a supressividade a determinados patógenos, entre eles *Phytophthora* spp. (Casale et al., 1995; Costa et al., 1996; Erwin & Ribeiro, 1996; Hoitink & Boehm, 1999). Segundo Baker & Cook (1974), um solo supressivo é aquele no qual o patógeno não se estabelece ou se estabelece mas não produz a doença, ou se estabelece, produz doença por algum tempo e depois a doença torna-se pouco importante. Os processos envolvidos na supressividade do solo são complexos e incluem fatores bióticos e abióticos.

Casale et al. (1995) sugerem que a matéria orgânica induz a supressividade a *Phytophthora* pela alta competição microbiana por nutrientes; pela inibição direta; pela liberação de substâncias tóxicas a *Phytophthora*, como dióxido de carbono, amônia, nitritos e saponinas; pela função de armadilha da matéria orgânica (zoosporos de *Phytophthora* são atraídos e induzidos a encistar); pela indução de resistência nas plantas; e finalmente

Efeitos do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade de Solos a *Phytophthora nicotianae* em Citros

criando um ambiente favorável ao desenvolvimento das raízes, mas não à *Phytophthora* sp.

Um dos exemplos mais conhecidos de controle integrado de uma doença causada por *Phytophthora* é "The Ashburner system" na Austrália, onde as árvores de abacate crescem e produzem na presença de *P. cinnamomi*. O sistema de manejo da doença baseia-se na incorporação de grandes volumes de matéria orgânica, correção do pH do solo e manutenção de uma cobertura que assegure uma boa quantidade de matéria orgânica na superfície do solo. Esse sistema é eficiente no controle da doença, pois mantém uma intensa atividade biológica no solo, o pH favorece o desenvolvimento de bactérias envolvidas na supressividade de *P. cinnamomi*, os altos teores de matéria orgânica e cálcio melhoram a estrutura e a drenagem do solo, o cálcio favorece a resistência do hospedeiro (plantas de abacate) e, além disso, as plantas saudáveis têm melhor sistema radicular, extraem maiores quantidades de água e reduzem a possibilidade de saturação do solo por excessos de água (Baker 1978, citado por Erwin & Ribeiro, 1996).

Além de melhorar as propriedades físicas e químicas dos solos, o emprego de matéria orgânica no manejo de doenças causadas por espécies de *Phytophthora* baseia-se na baixa capacidade saprofítica e competitiva do patógeno em relação a outros microrganismos no solo. A partir de estudos em solos supressivos a *Phytophthora*, diversos microrganismos têm sido reportados como parcialmente responsáveis por tal propriedade. Entre eles, vale citar fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Myrothecium* e *Penicillium*; bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*; e actinomicetos do gênero *Streptomyces* (Erwin & Ribeiro, 1996).

Atualmente, o lodo de esgoto constitui uma das fontes de matéria orgânica disponível em quantidades crescentes, além de ser rico em nutrientes para as plantas. Apesar disso, poucas informações estão disponíveis sobre seus efeitos na indução de supressividade de solos a fitopatógenos. Lumsden et al. (1983) estudaram o efeito do lodo de esgoto no controle de diversos patógenos veiculados pelo solo sob condições de casa de vegetação. Eles avaliaram doses (0, 10, 20 e 30% v/v, em base seca) e épocas de incorporação

do lodo de esgoto ao solo visando ao controle de diversos fitopatógenos em várias culturas. Os autores observaram que a adição de 10% (v/v) de lodo de esgoto teve um efeito variável dependendo do patossistema avaliado: aumento, diminuição ou sem efeito no desenvolvimento da doença. Verificaram redução na incidência de podridões de raízes causadas por *Aphanomyces solani* em ervilhas, por *Rhizoctonia solani* em feijão e algodão; do tombamento causado por *R. solani* em rabanete e por *Pythium myorityum* em feijão; por *Sclerotinia minor* em alface; da murcha causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* em melão e a podridão da coroa em pimenta causada por *Phytophthora capsici*. Observaram ainda que o lodo não apresentou efeito sobre as podridões de raízes causadas por *Thielaviopsis basicola* em feijão cv. Blue Lake e algodão, e no tombamento causado por *Pythium aphanidermatum* em feijão. O incremento na incidência da doença foi verificado nos patossistemas *Pythium ultimum* – ervilha, *Fusarium solani* f. sp. *pisi* – ervilha e *Thielaviopsis basicola* – feijão cv. Tendercrop.

Millner et al. (1982) estudaram o efeito do lodo de esgoto incorporado ao solo em parcelas no campo para diferentes patossistemas. No caso da alface - tombamento (*Sclerotinia minor*), nos três anos avaliados, a incidência da doença foi menor nos tratamentos com lodo, embora os níveis de propágulos se mantivessem semelhantes. No segundo patossistema, ervilhas - tombamento (*Pythium* sp. e *Rhizoctonia solani*), os efeitos do lodo de esgoto no controle da doença foram observados no segundo e terceiro anos. No terceiro patossistema avaliado, algodão – tombamento, os tratamentos com lodo não controlaram a doença em nenhum dos anos avaliados. Esses resultados estariam indicando uma forte interação da cultura (ervilha, algodão) com os patógenos (*Pythium* sp. e *R. solani*).

Lewis et al. (1992) reportaram uma redução na incidência de tombamento causado por *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum* em ervilhas e em algodão, cultivados no campo em solo previamente tratado com 7 a 10 Mg ha<sup>-1</sup> de lodo de esgoto, sendo o efeito atribuído à indução de supressividade do solo aos patógenos. Embora a incidência de tombamento em plântulas de ervilha tenha diminuído após a aplicação do lodo de esgoto, o mesmo não ocorreu com

Efeitos do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade de Solos a *Phytophthora nicotianae* em Citros

a densidade de inóculo de *Pythium ultimum*.

No Brasil, Bettioli & Krügner (1984) verificaram que o lodo de esgoto, especialmente em altas concentrações, reduziu a severidade da podridão de raízes de plantas de sorgo, causada por *Pythium arrhenomanes*, além de estimular o crescimento das plantas, tanto na ausência, como na presença do patógeno. Santos & Bettioli (2003) estudaram o efeito de concentrações crescentes de lodo de esgoto na ocorrência de *Sclerotium rolfsii*, na cultura de feijão, em ensaio conduzido em campo. A aplicação de lodo reduziu a incidência e a severidade das doenças em três cultivos sucessivos de feijão, além de aumentar a emergência e o estande final da cultura.

Kim et al. (1997), avaliando os efeitos de diferentes fontes de matéria orgânica no controle de *Phytophthora capsici* em pimentão em experimentos no campo, observaram que os tratamentos nos quais o lodo de esgoto compostado com resíduo de jardinagem foi empregado, a incidência e a severidade da doença foram semelhantes às obtidas com as outras fontes de matéria orgânica avaliadas, embora os níveis de doença fossem altos em todos os tratamentos e nem sempre diferenciaram-se da testemunha.

Widmer et al. (1998) encontraram que composto de lixo urbano aplicado a solos arenosos aumentou a supressividade a *Phytophthora parasitica* em testes realizados com citros cultivados em casa de vegetação. Houve efeito fitotóxico devido ao teor de sais solúveis e ácido acético do composto, na concentração de 20 % (v/v), porém a incidência da doença foi reduzida, em alguns casos, de 95 % para 5 %. O composto fresco reduziu o diâmetro das colônias do patógeno, sendo que após períodos de armazenamento, não houve a redução. Os mecanismos de ação do material no controle do patógeno foram atribuídos às espécies de *Acremonium* antagônicas a *Phytophthora parasitica* isoladas e também aos altos teores de ácido acético.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da incorporação do lodo de esgoto ao solo na indução de supressividade a *Phytophthora nicotianae*, em plântulas e mudas de limão cravo (*Citrus limonia* (L.) Osbeck), em condições de laboratório, casa de vegetação e campo.

## Metodologia

### **Isolado de *Phytophthora nicotianae* e produção de inóculo**

O isolado IAC 01/95 de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (1896) (sin. *P. parasitica* Dastur, 1913) empregado nos experimentos foi fornecido pelo Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” – Instituto Agrônômico de Campinas (CCSM – IAC).

O inóculo para os experimentos foi produzido em grãos de trigo autoclavados, acrescidos com o patógeno, e incubados por um mês, segundo o método de McGovern et al. (2000) modificado.

### **Lodo de esgoto e solo**

O lodo de esgoto empregado foi obtido da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de Franca, SP. Esse lodo é de origem residencial, com baixos teores de metais pesados (Tabela 1).

O Latossolo vermelho amarelo fase argilosa, utilizado nos diferentes experimentos, foi obtido no campo experimental da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, SP), com 25 g dm<sup>-2</sup> de matéria orgânica e pH em CaCl<sub>2</sub> de 5,1.

### **Efeito do lodo de esgoto na sobrevivência *in vitro* de *Phytophthora nicotianae***

O lodo de esgoto foi misturado ao solo úmido previamente desinfestado em forno de microondas de 900 W de potência (600 g de solo por 6 minutos), nas proporções de 0, 10, 20 e 40% p/p. Cada uma das misturas de solo - lodo de esgoto recebeu o equivalente a 0, 10 ou 20 g de inóculo de *Phytophthora* kg<sup>-1</sup>. As misturas foram colocadas em sacos plásticos de 30 x 40 cm e 100 µm de espessura, fechados e mantidos a 27°C ± 2. Após 21 dias, os sacos foram abertos e a sobrevivência de *Phytophthora*

Efeitos do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade de Solos a *Phytophthora nicotianae* em Citros

*nicotianae* foi avaliada mediante o teste de iscas de folhas de citros descrito por Grimm & Alexander (1973) e modificado, determinando-se a recuperação do patógeno (porcentagem de iscas com zoosporângios nas bordas) e o número de zoosporângios formados nas bordas das iscas. A condutividade elétrica e o pH das misturas foram também determinados.

**Tabela 1.** Análise química do lodo de esgoto da ETE- Franca, empregado nos diferentes experimentos.

Atributo	
pH em água	6,4
% Umidade (65 °C)	83,3
C (g kg <sup>-1</sup> )	374,4
N Kjeldal (g kg <sup>-1</sup> )	50,8
N-amoniacal (μg g <sup>-1</sup> )	119,5
N -Nitrato -Nitrito (μg g <sup>-1</sup> )	54,8
P (g kg <sup>-1</sup> )	21,3
K (g kg <sup>-1</sup> )	0,99
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	16,8
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	2,5
S (g kg <sup>-1</sup> )	13,3
Mo (mg kg <sup>-1</sup> )	< 1
B (mg kg <sup>-1</sup> )	7,1
Na (g kg <sup>-1</sup> )	0,6
Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	1325
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	267,4
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	31706
Ni (mg kg <sup>-1</sup> )	74,7
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	359,2
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	1590
Al (mg kg <sup>-1</sup> )	33550
Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	2
Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	118,8
Ar (mg kg <sup>-1</sup> )	< 1
Se (mg kg <sup>-1</sup> )	0
Hg (mg kg <sup>-1</sup> )	< 1

**Efeito do lodo de esgoto na indução de supressividade a *Phytophthora nicotianae* em plântulas de limão cravo, sob telado.**

Sementes pré-germinadas de limão cravo foram semeadas em substrato comercial (Plantmax®) tratado com lodo de esgoto nas proporções de 0, 5, 10, 15, 20 e 30% volume/volume (v/v) e infestado com 0; 1,5 ou 3 g de inóculo por tubete de 45 mL de capacidade. As plântulas foram mantidas sob condições de telado e irrigadas regularmente. No terceiro mês, foram determinados a massa da matéria fresca da parte aérea das plântulas, a massa da matéria fresca das raízes, a altura das plântulas, a presença do patógeno no substrato e nas raízes mediante o teste de iscas de folhas de citros (avaliados por meio da porcentagem de recuperação), e o pH e a condutividade elétrica das diferentes misturas de substrato – lodo de esgoto. Durante o experimento, as plântulas mortas foram avaliadas quanto à recuperação ou não de *P. nicotianae* em raízes (sistema radicular completo em uma placa) e no substrato (5 g por placa, duas placas por tubete), pelo teste de iscas de folhas de citros, descrito por Grimm & Alexander (1973). Dois experimentos foram realizados, sendo que no primeiro experimento, além do tratamento sem lodo, foi utilizado como testemunha um tratamento sem lodo e com adubação mineral semanal (adubo foliar completo, Ajifol; 2,5 mL L<sup>-1</sup>). O delineamento experimental foi de blocos casualizados, com quatro repetições.

**Efeito do lodo de esgoto na indução de supressividade do solo à *Phytophthora nicotianae* em mudas de limão cravo, sob telado.**

No primeiro experimento realizado (experimento 1), mudas comerciais de limão cravo de três meses de idade foram transplantadas para vasos contendo misturas de solo – lodo de esgoto nas proporções de 0, 5, 10, 15, 20 e 30% volume/volume (v/v) e infestadas com 0, 8 ou 15 g de inóculo por vaso de 4,5 L de capacidade. Como testemunhas foram transplantadas mudas para vasos contendo solo sem lodo de esgoto, que foram adubadas



Efeitos do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade de Solos a *Phytophthora nicotianae* em Citros

semanalmente com adubo foliar completo (Ajifol; 2,5 mL L<sup>-1</sup>), e infestadas com 0; 8 ou 15 g de inóculo por vaso. As mudas foram mantidas sob condições de telado e irrigadas regularmente. O delineamento experimental foi de blocos casualizados, com quatro repetições.

No segundo experimento (experimento 2), foram utilizadas mudas comerciais de limão cravo com quatro meses de idade, o lodo de esgoto foi aplicado nas proporções de 0; 5; 7,5; 10; 15; 20 e 30% v/v e o solo infestado com 30 g de inóculo por vaso de 4,5 L de capacidade. Como testemunha foram transplantadas mudas para vasos sem inóculo e sem lodo de esgoto. O delineamento experimental foi de parcelas inteiramente casualizadas, com quatro repetições.

Nos dois ensaios foram realizadas avaliações quanto à altura e à produção de matéria fresca da parte aérea, o comprimento e a produção de matéria fresca das raízes de duas mudas por parcela, a presença do patógeno no solo e nas raízes mediante o teste de iscas de folhas de citros, o pH e a condutividade elétrica das diferentes misturas de solo - lodo de esgoto. A atividade microbiana do solo dos tratamentos com 15 g de inóculo foi avaliada pela hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) utilizando a metodologia descrita por Boehm & Hoitink (1992) e respiração microbiana medida pelo desprendimento de CO<sub>2</sub>, segundo o método descrito por Grisi (1978).

No experimento 1, aos 150 dias após o transplante (dat), foram coletadas amostras de folhas (100 folhas) dos tratamentos para determinação do estado nutricional mediante análise de tecido foliar. Os resultados dos macronutrientes (N, P e K) foram analisados com os índices DRIS ("Diagnosis and Recommendation Integrated System"). A análise se baseia na associação entre os valores médios de análise foliar, expressos em porcentagem de matéria seca, e a probabilidade de obtenção de maior produção. Essa probabilidade possui um desvio padrão em relação à média para cada relação de nutrientes (Sumner, 1986). Para citros, foi utilizado um coeficiente de variação de 20 % para as relações entre N, P e K. Os valores padrões estabelecidos, segundo Embleton (1973) citado por Marchal (1984), foram: K/N = 0,358; P/N = 0,056 e K/P = 6,3929. Com esses valores foram calculados os índices que expressam o balanço entre os

elementos, em relação aos padrões. O índice é maior com valores positivos quando o elemento apresenta-se em excesso relativo, e vice-versa quando é negativo. O valor zero indica que a relação de nutrientes se encontra próxima ao padrão, a uma distância inferior ao desvio padrão. Ou seja, do ponto de vista prático, a cultura tem boas chances de obter rendimentos altos com tal composição foliar. A soma algébrica dos índices deve ser zero. A somatória do valor absoluto dos índices é uma medida do balanço global da composição foliar estudada.

**Efeito do lodo de esgoto na indução de supressividade a *Phytophthora nicotianae* em mudas de limão cravo no campo.**

Mudas de limão cravo de três meses de idade, obtidas de um viveiro comercial, foram transplantadas para parcelas de 9 m<sup>2</sup> (3 x 3 m) tratadas com lodo de esgoto nas proporções de 0; 5; 7,5; 10 ou 15 % v/v e infestadas com 0 ou 1250 g de inóculo por parcela (19 a 20 g de inóculo por muda). Como testemunhas, foram instaladas parcelas infestadas ou não, com adubação com uréia (85 g de N por parcela por mês, 510 g no total do experimento) e adubo foliar completo (Ajifol 2,5 mL L<sup>-1</sup>) (Platt & Opitz, 1973). As quantidades de lodo de esgoto fresco incorporadas ao solo a 20 cm de profundidade nos diferentes tratamentos foram de 0; 81; 121,5; 162 e 243 kg por parcela (0; 5; 7,5; 10 e 15 % v/v, respectivamente), e equivalem a 0, 372, 558, 744 e 1116 g de N, respectivamente. As mudas foram irrigadas por aspersão durante o experimento.

Aos 5, 15, 29, 43, 82, 118, 147 e 182 dias após incorporação do lodo de esgoto ao solo, foi determinada a atividade microbiana do solo pela hidrólise de FDA e desprendimento de CO<sub>2</sub>. Aos 29, 82, 118, 147 e 182 dias foram determinados a altura e a produção de matéria fresca da parte aérea das mudas, a produção de matéria fresca das raízes (exceto aos 182 dias), a presença do patógeno no solo e nas raízes, o pH e a condutividade elétrica da solução do solo. Ao final do experimento (182 dat), foi coletada uma amostra composta de folhas das mudas para determinar o estado nutricional mediante análise de tecido, e os resultados foram analisados com os índices DRIS para N, P e K. O delineamento experimental foi de blocos casualizados, com quatro repetições.

### **Efeito dos extratos do lodo de esgoto no crescimento *in vitro* de *Phytophthora nicotianae***

Os extratos foram obtidos segundo o método de Widmer *et al.* (1998) modificado. Foram feitas misturas de 100 g de areia (lavada, esterilizada e seca) e 20 g de lodo de esgoto (proporção de 20% p/p), com 100 mL de  $H_2SO_4$  1 mol L<sup>-1</sup>, KOH 0,4 mol L<sup>-1</sup> ou água bidestilada esterilizada. Como testemunha foi empregada areia (120 g) com 100 mL de cada uma das soluções. Os Erlenmeyers contendo as misturas areia - lodo com as soluções foram agitados manualmente, e a seguir, deixou-se à temperatura ambiente. Após 6 h, filtraram-se as misturas em algodão, seguido de filtragem a vácuo com papel de filtro Whatman 41 e membrana Millipore 0,22  $\mu$ m de porosidade. O pH de cada um dos extratos obtidos foi ajustado para valores entre 5,5 – 6,0 com soluções de KOH 10 mol L<sup>-1</sup> ou  $H_2SO_4$  12 mol L<sup>-1</sup>. Finalmente, preparou-se meio de cultura de cenoura contendo os diferentes extratos na proporção 9:1, 50 mg L<sup>-1</sup> de rifampicina e 50 mg L<sup>-1</sup> de ampicilina, e 15 mL do meio foram vertidos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Discos de 5 mm de diâmetro de meio de cultura, contendo micélio do patógeno com sete dias de idade, foram transferidos para as placas que foram mantidas a 27°C  $\pm$  2 e luz fluorescente contínua. Como testemunha utilizaram-se placas contendo meio de cultura com antibióticos e sem extratos. O efeito dos extratos foi avaliado medindo-se dois diâmetros perpendiculares das colônias. Após nove dias de incubação, a área abaixo da curva do crescimento da colônias (AACC) foi calculada. O delineamento experimental foi de parcelas inteiramente casualizadas, com oito repetições.

### **Isolamento e seleção de antagonistas a *Phytophthora nicotianae*.**

O isolamento dos microrganismos antagônicos a *Phytophthora nicotianae* de solo tratado com lodo de esgoto, obtido das parcelas do ensaio de campo, foi feito mediante diluição seriada e plaqueamento em meios seletivos. Trinta dias após incorporado o lodo de esgoto nas parcelas no campo, foram coletadas amostras de solo.

Para o isolamento de bactérias foi empregado o meio de cultura nutriente- ágar, para o isolamento de actinomicetos foi empregado o meio amido-caseína e para o isolamento de fungos foi empregado o meio de Martin. Foram feitas três repetições para cada combinação meio - diluição, e as placas foram mantidas a 25 °C até o crescimento das colônias. Foram contadas as colônias por placa, após 2, 3 ou 6 dias para bactérias, fungos e actinomicetos, respectivamente; e foi feita uma seleção por morfologia (tamanho, cor e crescimento) das colônias a serem transferidas a tubos de ensaio com meio batata-dextrose-ágar (BDA) e preservadas a 5 °C até avaliação do antagonismo ao patógeno.

Os microrganismos isolados foram avaliados tanto em sementes de alfafa, segundo procedimento apresentado por Handelsman *et al.* (1991) com modificações, como também pelo método de culturas pareadas.

Sementes de alfafa (*Medicago sativa* L) previamente desinfestadas foram colocadas para germinar. Após quatro ou cinco dias, em placas de cultura de células (Corning de 24 compartimentos), foram colocados 1 mL de água destilada esterilizada, uma plântula de alfafa, um disco de 5 mm de diâmetro de meio de cultura com micélio de *Phytophthora nicotianae* e um disco de meio de cultura contendo inóculo do fungo, actinomiceto ou bactéria a ser testado quanto à sua potencialidade como antagonista. As testemunhas foram constituídas por plântulas de alfafa em compartimentos contendo água esterilizada, e plântulas em água esterilizada e *Phytophthora nicotianae*. As placas foram mantidas por três dias a temperatura ambiente. A avaliação foi feita sob microscópio óptico, onde as raízes das plântulas foram avaliadas pela presença ou não de micélio e zoosporângios de *Phytophthora nicotianae*. Para cada isolado (52 fungos, 35 bactérias e 32 actinomicetos) foram feitas quatro repetições.

Para determinar a potencialidade de um isolado como antagonista, foram feitas duas escalas de notas que discriminaram níveis de infestação com *Phytophthora nicotianae* das plântulas de alfafa crescendo na presença dos diferentes isolados. Para a presença de zoosporângios, as notas foram 0 = sem zoosporângios, 1 = entre 1 e 5 zoosporângios; 2 = entre 6 e 10; 3 = entre 11 e 50, e 4 = mais de 51. Para a quantidade de micélio as notas foram 0 = sem micélio, 1 = pouco, 2 = médio e 3 = muito.

## Efeitos do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade de Solos a *Phytophthora nicotianae* em Citros

Com o método de culturas pareadas, foram testados sete isolados de fungos, três de actinomicetos e dois de bactérias selecionados no bioensaio quanto ao potencial antagônico a *P. nicotianae*.

Para o teste, em placas Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio BDA foram transferidos um disco de meio de cultura de 5 mm de diâmetro com micélio de *Phytophthora nicotianae* em pleno desenvolvimento e um disco de 5 mm de diâmetro de meio de cultura com micélio do fungo ou actinomiceto, ou uma estria do crescimento da bactéria selecionada. As placas foram mantidas a temperatura ambiente até a avaliação. Foram feitas três repetições por isolado. A avaliação foi feita quanto ao hiperparasitismo (crescimento do antagonista sobre o patógeno) ou antibiose (inibição do crescimento do patógeno).

### **Análises estatísticas**

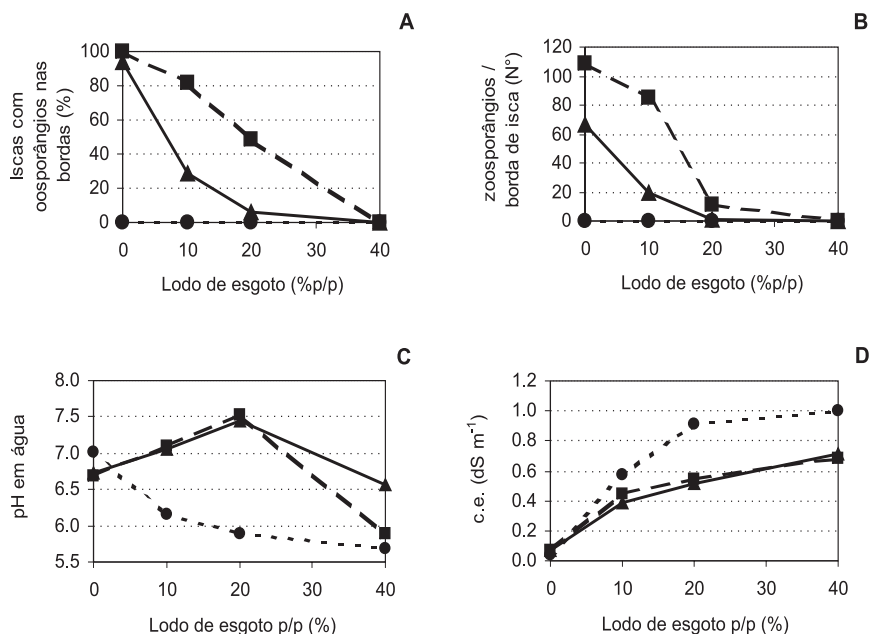
No presente trabalho, as análises estatísticas foram realizadas empregando o pacote estatístico SAS for Windows, Versão 6.12 do S.A.S Institute, Cory NC, USA.

## **Resultados**

### **Efeito do lodo de esgoto na sobrevivência *in vitro* de *Phytophthora nicotianae***

Nas condições do laboratório, a sobrevivência de *Phytophthora nicotianae* foi menor quando as doses de lodo de esgoto aumentaram nas diferentes misturas solo – lodo de esgoto avaliadas, para os diferentes níveis de inóculo empregados. Os valores de pH das misturas diminuíram quando os níveis de lodo em ausência de inóculo aumentaram; mas na presença de inóculo, aumentaram até a concentração de 20% de lodo de esgoto e após diminuíram nas concentrações de 30 e 40%. Os valores de condutividade elétrica mostraram uma resposta positiva aos incrementos nos níveis de lodo, independente da presença ou não do inóculo (Fig. 1).

A condutividade elétrica correlacionou-se negativamente com a recuperação do patógeno e o número de zoosporângios presentes nas bordas das iscas, com valores de  $r = -0,490$  e  $r = -0,487$  ( $P < 0,05$ ), respectivamente. Não foi observada tal correlação com o pH.

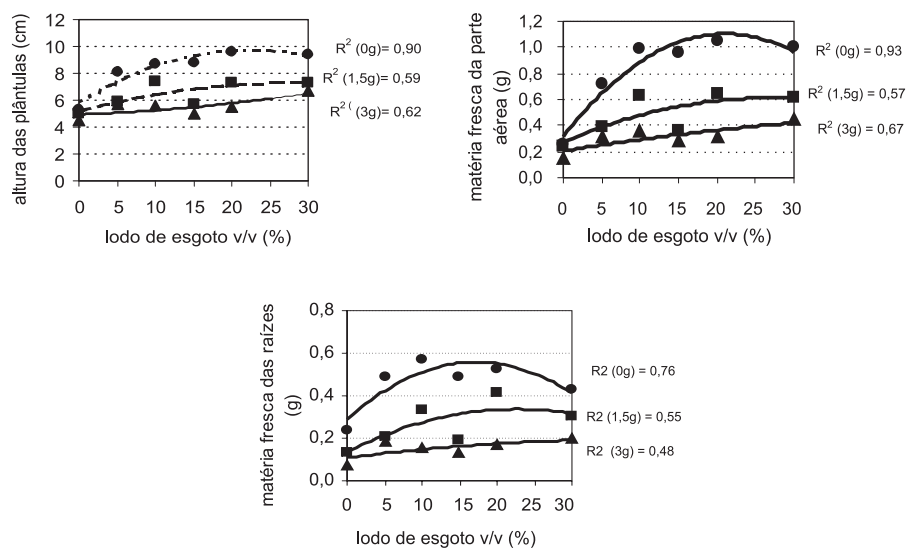


**Fig. 1.** Efeito do lodo de esgoto na sobrevivência *in vitro* de *Phytophthora nicotianae* avaliada por meio da porcentagem de recuperação em iscas de folhas de citros e número de zoosporângios por borda de isca, e no pH e na condutividade elétrica (c.e.), nas diferentes misturas solo - lodo de esgoto para as diferentes quantidades de inóculo (0 -●-, 10 -■- e 20 -△- g kg<sup>-1</sup> de mistura).

### Efeito do lodo de esgoto na indução de supressividade a *Phytophthora nicotianae* em plântulas de limão cravo, sob telado.

Para as variáveis produção de matéria fresca da parte aérea e altura das plântulas, observaram-se diferenças significativas entre tratamentos, com incrementos positivos quando os níveis de lodo de esgoto aumentaram (Fig. 2). Entretanto, para matéria fresca das raízes foram verificadas diferenças significativas só no experimento 2, e para o comprimento das raízes não foram observadas diferenças entre tratamentos.

Efeitos do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade de Solos a *Phytophthora nicotianae* em Citros

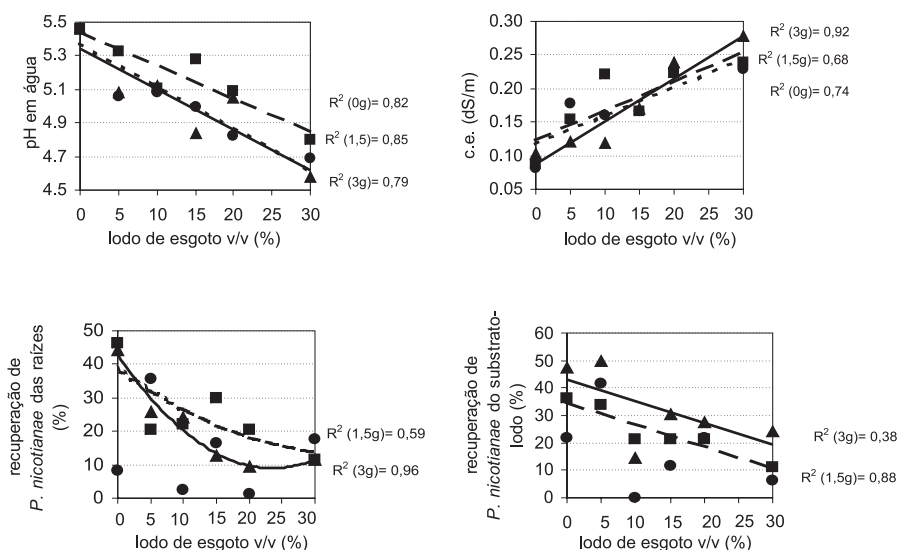


**Fig. 2.** Efeito do lodo de esgoto na altura, matéria fresca da parte aérea e das raízes das plântulas de limão cravo (*Citrus limonia*) aos 90 dias após o transplante, para os diferentes níveis de inóculo (0 -●-, 1,5 -■- e 3,0 -▲- g por tubete), em telado, no experimento 2.

A condutividade elétrica aumentou quando os níveis de lodo de esgoto aumentaram, ao passo que observou-se uma diminuição do pH quando os níveis de lodo aumentaram (Fig. 3).

Quanto à recuperação de *Phytophthora nicotianae* das raízes das plântulas e das misturas substrato-lodo de esgoto, nos dois experimentos, observaram-se diferenças significativas entre tratamentos. As porcentagens de recuperação do patógeno diminuiram quando os níveis de lodo de esgoto aumentaram (Fig. 3). Os valores de recuperação do patógeno no experimento 1 para os tratamentos sem lodo e com adubo mineral foram os maiores do experimento, com valores de 46 e 55% para a recuperação das raízes, e de 38 e 50% para a recuperação do substrato, para os tratamentos com 1,5 e 3,0 g inóculo por tubete, respectivamente.

## Lodo de Esgoto: Impactos Ambientais da Agricultura



**Fig. 3.** Efeito do lodo de esgoto no pH em água, condutividade elétrica (c.e.), recuperação de *Phytophthora nicotianae* das raízes das plântulas de limão cravo (*Citrus limonia*) e das misturas substrato - lodo de esgoto, mediante o teste de iscas de folhas de citros, aos 90 dias após o transplante, para as diferentes quantidades de inóculo (0 -●-, 1,5 -■- e 3,0 -▲- g por tubete), em telado, no experimento1.

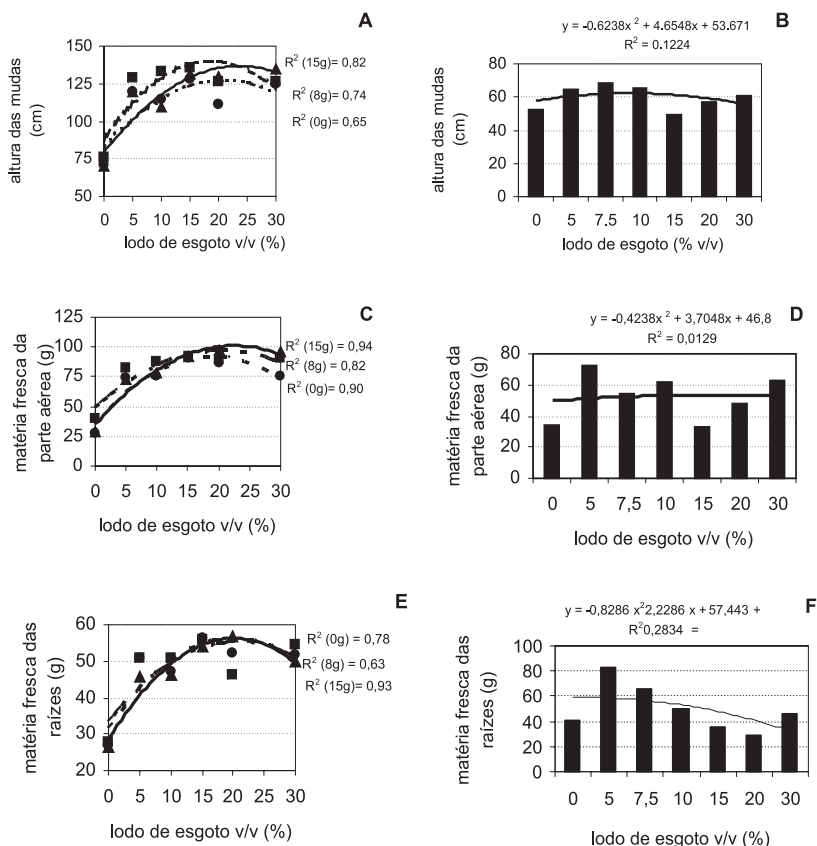
No experimento 1, os dados da recuperação do patógeno das raízes de limão cravo correlacionaram-se negativamente com os valores da condutividade elétrica ( $r = -0,49$ ;  $P = 0,024$ ) e positivamente com os do pH ( $r = 0,513$ ;  $P = 0,017$ ), e tiveram igual tendência no experimento 2, mas não foram significativos. Os dados de recuperação do patógeno do substrato tiveram igual tendência aos das raízes, mas não foram significativos para nenhum dos experimentos.

No decorrer dos experimentos, a recuperação de *Phytophthora nicotianae* das plântulas que morreram e do substrato - lodo de esgoto foi de 60% no experimento 1, e de 100% no experimento 2.



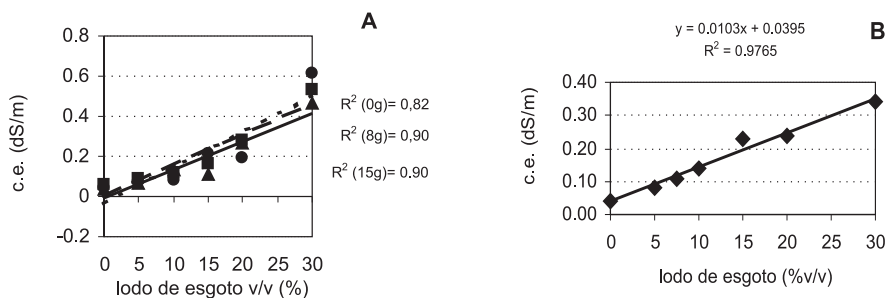
### Efeito do lodo de esgoto na indução de supressividade a *Phytophthora nicotianae* em mudas de limão cravo, sob telado.

Foram observadas diferenças significativas nas variáveis altura, matéria fresca da parte aérea e das raízes das mudas, no experimento 1 (Fig. 4). As diferenças explicaram-se pelo fator doses de lodo, e não houve efeito do fator inóculo, nem da interação dos dois fatores. Também no experimento 1, os tratamentos com adubação mineral só foram superiores aos tratamentos sem lodo aos 90 e 150 dat para as variáveis que refletem o desenvolvimento das mudas.



**Fig. 4.** Efeito do lodo de esgoto na altura, matéria fresca da parte aérea e das raízes das mudas de limão cravo (*Citrus lemonia*) nos experimentos em casa de vegetação. Os gráficos A, C e E correspondem ao experimento 1, avaliado aos 150 dias após o transplante (dat), para os diferentes níveis de inóculo (0 -●-, 8 -■- e 15 -▲- g por vaso). Os gráficos B, D e F correspondem ao experimento 2, avaliado aos 120 dat, e com 30 g de inóculo por vaso.

Os valores de condutividade elétrica da solução do solo - lodo de esgoto também apresentaram diferenças significativas entre tratamentos nos dois experimentos e nas diferentes datas de avaliação, com incrementos positivos quando os níveis de lodo de esgoto aumentaram (Fig. 5).



**Fig. 5.** Efeito do lodo de esgoto na condutividade elétrica da solução solo – lodo de esgoto, nos experimentos em casa de vegetação. O gráfico A corresponde ao experimento 1, avaliado aos 150 dias após o transplante (dat), para os diferentes níveis de inóculo (0 -○-, 8 -■- e 15 -△- g por vaso). O gráfico B corresponde ao experimento 2, avaliado aos 120 dat, e com 30 g de inóculo por vaso.

No experimento 1, o pH em água não apresentou diferenças significativas entre tratamentos. Já no experimento 2 foram verificadas diferenças significativas entre tratamentos, com uma tendência a diminuir quando aumentaram as doses de lodo, com valores de 5,94 para os tratamentos sem lodo e sem inóculo e de 5,25 para os tratamentos com 30% de lodo e 30 g de inóculo por muda.

A atividade microbiana do solo, avaliada pela hidrólise de FDA e respiração microbiana, mostrou diferenças significativas entre tratamentos e a testemunha, com incrementos positivos quando aumentaram os níveis de lodo (Tabela 2). No experimento 1, observou-se uma atividade decrescente no tempo, especialmente quando avaliada pela respiração microbiana.

A recuperação de *Phytophthora nicotianae* das raízes das mudas e das misturas solo - lodo foi baixa. No experimento 1 observou-se uma tendência a diminuir quando os níveis de lodo aumentaram, mais no experimento 2 apresentou-se uma tendência não definida. Só foram estabelecidas diferenças significativas entre tratamentos no experimento 2 para a recuperação do patógeno das misturas de solo – lodo de esgoto (Tabela 3).

Efeitos do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade de Solos a *Phytophthora nicotianae* em Citros

**Tabela 2.** Efeito do lodo de esgoto na atividade microbiana do solo, avaliada pela hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) e respiração microbiana (CO<sub>2</sub>) aos 150 e 120 dias após o transplante (dat) das mudas de limão cravo (*Citrus limonia*), nos experimentos 1 e 2, respectivamente, em casa de vegetação.

Tratamentos	Experimento 1		Experimento 2	
	FDA <sup>3</sup>	Respiração microbiana <sup>4</sup>	FDA	Respiração microbiana
0 % lodo <sup>1</sup> e sem inóculo <sup>2</sup>	----	----	1,73 b	0,27 d
0%lodo + inóculo + adubação mineral	2,76 bcd <sup>5</sup>	0,22 b	----	----
0 % lodo + inóculo	2,40 d	0,27 b	1,67 b	0,43 cd
5 % lodo + inóculo	2,50 cd	0,31 b	2,60 a	0,53 c
7,5 % lodo + inóculo	----	----	2,41 a	0,78 b
10 % lodo + inóculo	2,80 bcd	0,32 b	2,33 a	0,88 b
15 % lodo + inóculo	2,95 b	0,34 b	2,60 a	1,09 a
20 % lodo + inóculo	2,85 bc	0,49 a	2,45 a	1,20 a
30 % lodo + inóculo	3,37 a	0,54 a	2,57 a	1,09 a
C.V.(%)	8,97	23,11	8,17	19,68

<sup>1</sup> Porcentagem de lodo de esgoto na mistura solo - lodo de esgoto (% v/v)

<sup>2</sup> Inóculo de *Phytophthora nicotianae* produzido em grãos de trigo. Nos experimentos 1 e 2 usaram-se 15 g e 30 g de inóculo por vaso, respectivamente.

<sup>3</sup> Hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) expressada em µg FDA hidrolisado por grama de solo seco por minuto

<sup>4</sup> Respiração microbiana expressada em mg CO<sub>2</sub> desprendido por grama de solo seco

<sup>5</sup> Dados seguidos da mesma letra na coluna não diferem significativamente (Teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade)

**Tabela 3.** Efeito do lodo de esgoto na recuperação de *Phytophthora nicotianae* das raízes das mudas de limão cravo (*Citrus limonia*) e do solo – lodo de esgoto, mediante o teste de iscas de folhas de citros, aos 150 e 120 dias após o transplante, nos experimentos 1 e 2, respectivamente, em casa de vegetação.

Tratamentos	Recuperação da <i>Phytophthora nicotianae</i> (%) <sup>3</sup>					
	Experimento 1				Experimento 2	
	raízes	solo - lodo	Raízes	solo -lodo	raízes	solo -lodo
	8 g	8 g	15 g	15 g	30 g	30 g
0 % lodo <sup>1</sup> e sem inóculo <sup>2</sup>	---	---	---	---	0,0 ns <sup>4</sup>	0,5 c
0%lodo + inóculo + adubação mineral	16,3 ns	0,0 ns	0,00 ns	0,0 ns	---	---
0 % lodo + inóculo	3,75 ns	0,0 ns	0,83 ns	0,0 ns	6,0 ns	4,0 abc
5 % lodo + inóculo	10,0 ns	0,0 ns	5,00 ns	0,0 ns	4,0 ns	3,5 abc
7,5 % lodo + inóculo	---	---	---	0,0 ns	0,5 ns	7,2 ab
10 % lodo + inóculo	10,97 ns	0,0 ns	3,33 ns	0,0 ns	1,0 ns	9,0 a
15 % lodo + inóculo	1,25 ns	0,0 ns	0,00 ns	0,0 ns	5,0 ns	1,5 bc
20 % lodo + inóculo	6,25 ns	7,5 ns	1,67 ns	5,0 ns	9,0 ns	7,0 ab
30 % lodo + inóculo	1,25 ns	0,0 ns	0,00 ns	0,0 ns	1,0 ns	5,6 abc

<sup>1</sup> Doses de lodo de esgoto (% v/v) na mistura solo - lodo de esgoto

<sup>2</sup> Inóculo de *Phytophthora nicotianae* produzido em grãos de trigo. No experimento 1 usaram-se 8g e 15g de inóculo por vaso e no experimento 2, 30g de inóculo por vaso.

<sup>3</sup> Para a análise estatística, os dados da porcentagem de recuperação do patógeno do solo e das raízes

foram transformados em arco seno  $\sqrt{x} / 100$ .

<sup>4</sup> Dados seguidos da mesma letra na coluna não diferem significativamente (Teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade); n.s. = não significativo.

Embora baixos, só no experimento 1, os valores da recuperação do patógeno das raízes e do solo correlacionaram-se negativa e significativamente com os valores da hidrólise de FDA ( $r = -0,94$  e  $r = -0,99$ ,  $P < 0,01$ ) e da respiração microbiana ( $r = -0,82$ ,  $r = -0,90$ ,  $P < 0,01$ ), positiva e significativamente com os valores do pH ( $r = 0,74$ ,  $r = 0,60$ ,  $P < 0,01$ ), mas não correlacionaram-se com os valores da condutividade elétrica.

Dos resultados da análise do tecido foliar e dos índices DRIS para o nitrogênio (N), o fósforo (P) e o potássio (K), observa-se que os tratamentos sem adubação foram os que tiveram os desbalanços maiores com deficiências relativas de N e P e excesso relativo de K. Já aqueles com adubação mineral apresentaram um ótimo estado nutricional (valores próximos aos de referência), com valores de zero para cada um dos índices DRIS dos nutrientes. Foi observado excesso relativo

#### Efeitos do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade de Solos a *Phytophthora nicotianae* em Citros

de N nos tratamentos com mais de 15% de lodo, déficit relativo de P nos tratamentos com 30% de lodo e deficiência relativa de K na maioria dos tratamentos com incorporação de lodo, pois o lodo de esgoto em geral é deficiente para este nutriente. Por último, os valores obtidos na análise dos micronutrientes indicam que todos os tratamentos apresentaram níveis de cobre (Cu) e ferro (Fe) em excesso, mas nos tratamentos sem lodo os valores de Cu foram maiores (Tabela 4).

#### **Efeito do lodo de esgoto na indução de supressividade a *Phytophthora nicotianae* em mudas de limão cravo no campo**

Para as variáveis altura, peso da matéria fresca da parte aérea e das raízes da mudas foram observadas diferenças entre os tratamentos nas diferentes datas de avaliação. Essas diferenças foram devido aos fatores lodo e blocos para as variáveis altura e peso da matéria fresca das mudas. Entretanto, para o peso da matéria fresca das raízes só houve efeito do fator blocos. Embora nem sempre fossem observadas diferenças estatisticamente significativas nas diferentes datas de avaliação, as tendências das variáveis mostraram uma resposta positiva ao incremento dos níveis de lodo de esgoto. Como não houve efeito significativo do fator níveis de inóculo, foram obtidas médias dos tratamentos com e sem inóculo, apresentadas na Figura 6.

Os valores de condutividade elétrica e pH em água da solução do solo – lodo de esgoto apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, explicadas pelo fator lodo para a condutividade elétrica, e pelos fatores lodo e blocos para o pH, nas diferentes datas de avaliação. Como não houve efeito significativo do fator níveis de inóculo, foram obtidas médias dos tratamentos com e sem inóculo (Fig. 7).

Os valores da condutividade elétrica aumentaram até os 43 dat (ou 45 dias após incorporação do lodo de esgoto ao solo), e logo após decresceram, com uma tendência a se estabilizar a partir dos 118 dat, mas sempre com valores superiores aos iniciais. Pode-se observar que em geral, os valores da condutividade elétrica aumentaram com o incremento dos níveis de lodo de esgoto, e só os tratamentos com adubação mineral superaram os com lodo a partir dos 118 dat.

**Tabela 4.** Efeito do lodo de esgoto na composição do tecido foliar das mudas de limão cravo (*Citrus lemonia*) aos 150 dias após transplante, no experimento 1, em casa de vegetação.

Trat.	N g kg <sup>-1</sup>	K g kg <sup>-1</sup>	P g kg <sup>-1</sup>	Ca g kg <sup>-1</sup>	Mg g kg <sup>-1</sup>	B mg kg <sup>-1</sup>	Cu mg kg <sup>-1</sup>	Fe mg kg <sup>-1</sup>	Mn mg kg <sup>-1</sup>	Zn mg kg <sup>-1</sup>	N	Índice DRIS P	K	Soma do valor absoluto
0% lodo <sup>1</sup>	21,8 <sup>3</sup>	21,0	1,2	29,6	3,0	63,0	699	200	31	30,2	-42,27	-43,43	85,70	171,41
0% + A <sup>2</sup>	29,5	12,2	1,9	34,9	3,0	68,3	103	205	26	26,2	0	0	0	0
5% lodo	23,7	8,8	1,8	37,2	2,6	42,6	105	165	40	33,5	-8,91	16,60	-7,69	33,19
10% lodo	27,2	9,3	1,9	43,0	2,8	47,6	207	193	61	48,3	-6,18	13,84	-7,65	27,67
15% lodo	28,2	7,8	1,6	40,6	2,5	49,6	145	186	51	43,1	7,36	7,78	-15,14	30,28
20% lodo	32,0	8,3	1,5	41,1	2,6	51,1	150	201	60	46,0	9,51	0	-9,51	19,01
30% lodo	33,7	8,8	1,3	42,2	2,8	49,7	175	229	85	57,0	20,57	-11,29	-9,27	41,13
0% lodo	21,8	18,5	1,4	33,7	3,4	43,6	693	221	32	31,2	-34,26	-26,68	60,94	121,87
0% + A	29,8	11,7	1,9	33,7	2,9	68,9	143	195	30	27,8	0	0	0	0
5% lodo	23,5	9,8	1,8	38,6	3,0	42	120	135	48	36,6	-9,19	9,19	0	18,39
10% lodo	27,8	8,3	1,8	40,4	2,6	43,5	193	210	59	45,2	0	9,66	-9,66	19,32
15% lodo	31,1	8,8	1,8	43,7	2,7	50,3	218	229	72	54,7	6,63	7,69	-14,32	28,64
20% lodo	31,5	8,8	1,5	39,3	2,7	52,6	135	169	75	49,8	7,04	0	-7,04	14,07
30% lodo	34,5	8,3	1,5	41,5	2,9	53,0	194	222	99	59,4	19,40	-7,20	-12,20	38,80
0% lodo	22,7	17,6	1,4	33,1	3,3	49,6	535	225	33	31,0	-29,14	-24,16	53,30	106,61
0% + A	28,3	9,8	1,3	35,7	3,1	72,8	114	186	36	25,3	0	0	0	0
5% lodo	24,1	8,8	1,9	36,7	2,7	40,9	160	189	46	34,7	-10,20	19,70	-9,51	39,41
10% lodo	27,3	9,3	1,7	39,8	2,5	47,4	180	216	64	47,6	0	0	0	0
15% lodo	28,3	8,3	1,9	44,0	2,6	50,8	157	168	61	45,8	0	11,59	-11,59	23,17
20% lodo	32,0	8,8	1,4	38,3	2,6	51,5	159	151	77	50,1	14,55	7,00	-7,55	29,09
30% lodo	35,9	8,3	1,4	43,4	2,9	51,8	166	216	100	63,3	24,61	-10,90	-13,71	49,22
BAIXO <sup>4</sup>	<23,9	<6,9	<1,1	<29	<1,9	<30	<5	<59	<24	<24				
ÓTIMO	24 - 26	7 - 10,9	1,2 - 1,6	30-55	2 - 3	31-100	6-16	60-120	25-200	25-100				
ALTO	>27	>11	>1,7	>56	>4	>101	>17	>121	>300	>110				

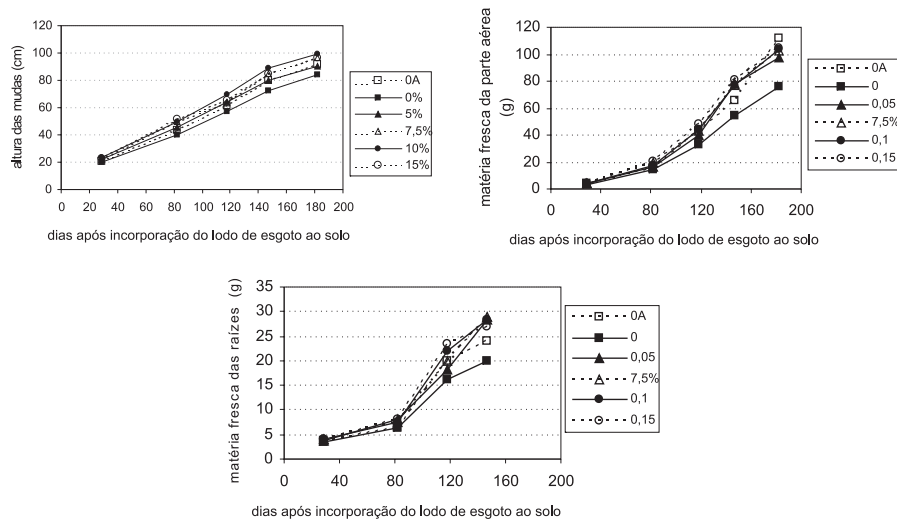
<sup>1</sup> Doses de lodo de esgoto incorporadas ao solo (% v/v).

<sup>2</sup> Tratamento sem incorporação de lodo de esgoto ao solo e com adubação mineral

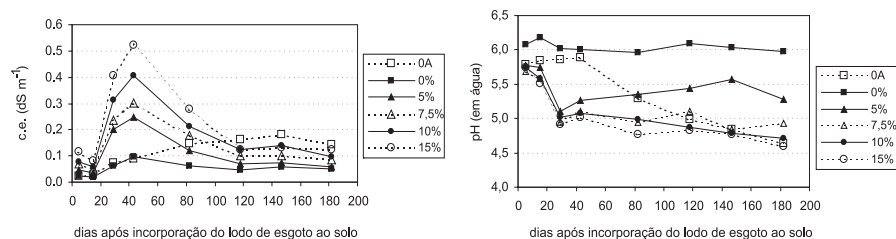
<sup>3</sup> Os dados foram obtidos de uma amostra composta (100 folhas totalmente desenvolvidas e sadias) por tratamento.

<sup>4</sup> Os valores de referência foram obtidos de Embleton, 1973 (citado por Marchal, 1984), para folhas de ramos não frutíferos.

Efeitos do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade de Solos a *Phytophthora nicotianae* em Citros



**Fig. 6.** Altura, matéria fresca da parte aérea e das raízes das mudas de limão cravo (*Citrus lemonia*), nos diferentes tratamentos de solo sem lodo e com adubo mineral (OA) ou com incorporação de lodo nas proporções de 0; 5; 7,5; 10 e 15 % v/v, no experimento de campo (média dos tratamentos com e sem inóculo).



**Fig. 7.** Condutividade elétrica (c.e.) e pH em água da solução do solo, nos diferentes tratamentos de solo sem lodo e com adubo mineral (OA) ou com incorporação de lodo nas proporções de 0; 5; 7,5; 10 e 15 % v/v, no experimento de campo (média dos tratamentos com e sem inóculo).

Para o pH, os tratamentos sem lodo e sem adubo mineral apresentaram os maiores valores e com uma tendência estável ao longo do experimento. Os tratamentos sem lodo e com adubo foram estáveis até 43 dat, e daí decresceram até os 182 dat, atingindo junto aos tratamentos com 15% de lodo, os menores valores do experimento. De modo geral, houve uma tendência de redução do pH com o aumento dos níveis de lodo no solo (Fig. 7).

No geral, os resultados da análise do tecido foliar das mudas mostraram que as diferenças entre os tratamentos com e sem lodo são pequenas. Os melhores estados nutricionais foram obtidos nos tratamentos com adubação mineral e com 5% de lodo de esgoto, inoculados ou não, e nos tratamentos sem inóculo e com 10% de lodo de esgoto. Para o P, observa-se um excesso relativo desse nutriente quando as doses de lodo são iguais ou maiores a 7,5%, geralmente associado a deficiências de N. Para o K, o índice DRIS nos tratamentos com incorporação de lodo indica um balanço deste nutriente com o N e P, e ocorrem deficiências relativas nos tratamentos com 10 e 15 % de lodo, com e sem inóculo, respectivamente. Para os outros nutrientes, todos os tratamentos apresentaram valores de magnésio (Mg) e ferro (Fe) considerados ótimos; e de cálcio (Ca), boro (B), cobre (Cu) e zinco (Zn), baixos (Tabela 5).

A atividade microbiana do solo, avaliada pela hidrólise de FDA e respiração microbiana (desprendimento de  $\text{CO}_2$ ), mostrou diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos nas diferentes datas de avaliação. Essas diferenças foram devidas aos fatores lodo e bloco para a variável hidrólise de FDA, e lodo para a respiração, com respostas positivas ao incremento dos níveis de lodo de esgoto. Como ocorreu com as outras variáveis, o fator inóculo não foi significativo para nenhuma das datas de avaliação. A evolução da atividade microbiana no tempo apresentou máximos de atividade aos 5 e 15 dias para desprendimento de  $\text{CO}_2$  e hidrólise de FDA, respectivamente (Fig. 8).



Efeitos do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade de Solos a *Phytophthora nicotianae* em Citros

**Tabela 5.** Efeito do lodo de esgoto na composição do tecido foliar das mudas de limão cravo (*Citrus lemonia*) aos 182 dias após o transplante, do experimento no campo.

Tratamento	N g kg <sup>-1</sup>	K g kg <sup>-1</sup>	P g kg <sup>-1</sup>	Ca g kg <sup>-1</sup>	Mg g kg <sup>-1</sup>	B mg kg <sup>-1</sup>	Cu mg g <sup>-1</sup>	Fe mg kg <sup>-1</sup>	Mn mg kg <sup>-1</sup>	Zn mg kg <sup>-1</sup>	Índice DRIS			Soma do valor absoluto
											N	P	K	
Tratamentos sem inoculação com <i>Phytophthora nicotianae</i>														
0% lodo <sup>1</sup>	25,5 <sup>3</sup>	12,4	1,7	20,9	2,1	18,6	3,6	96	24	15,4	-8,96	0	8,96	17,92
0% + A <sup>2</sup>	27,6	9,4	1,6	20,0	2,4	16,4	4,1	85	22	15,2	0	0	0	0
5% lodo	27,0	9,9	1,7	20,2	2,3	15,4	4,9	86	22	16,8	0	0	0	0
7,5% lodo	26,5	9,4	1,8	21,9	2,3	18,2	4,9	88	34	16,5	-5,32	5,32	0	10,65
10% lodo	27,2	9,9	1,7	19,8	2,2	15,3	4,9	76	29	16,1	0	0	0	0
15% lodo	27,5	9,4	2,0	28,2	2,7	16,0	4,8	83	27	16	-7,47	16,47	-9,00	32,94
Tratamentos com inoculação com <i>Phytophthora nicotianae</i>														
0% lodo	25,2	9,9	1,7	20,4	2,3	18,9	3,2	87	17	15,1	-5,12	5,12	0	10,23
0% + A	27,7	10,4	1,5	18,2	2,3	13,9	5,2	74	20	16,7	0	0	0	0
5% lodo	25,5	9,9	1,7	22,3	2,3	15,3	4,9	96	23	17,7	0	0	0	0
7,5% lodo	26,5	9,9	1,8	19,3	2,1	18,7	4,9	79	23	16,9	-5,32	5,32	0	10,65
10% lodo	27,2	9,4	1,9	23,0	2,3	18,5	5,4	81	23	16,8	-6,18	13,49	-7,30	26,98
15% lodo	27,4	10,4	2,0	24,3	2,2	17,9	5,4	95	29	20,7	-7,59	7,59	0	15,17
Valores de referência														
BAIXO <sup>4</sup>	<23,9	<6,9	<1,1	<29	<1,9	<30	<5	<59	<24	<24				
ÓTIMO	24 - 26	7 - 10,9	1,2-1,6	30-55	2 - 3	31-100	6-16	60-120	25-200	25-100				
ALTO	>27	>11	>1,7	>56	>4	>101	>17	>121	>300	>110				

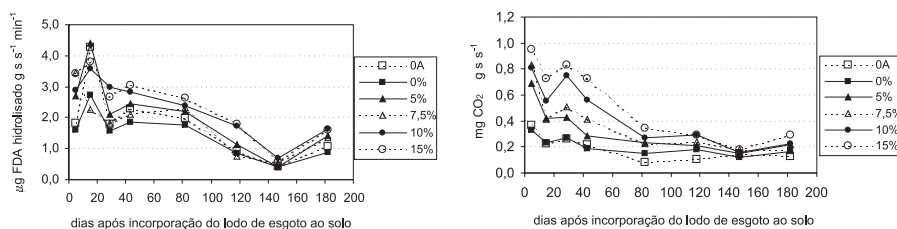
<sup>1</sup> Doses de lodo de esgoto incorporadas ao solo (% v/v).

<sup>2</sup> Tratamento sem incorporação de lodo de esgoto ao solo e com adubação mineral

<sup>3</sup> Os dados foram obtidos de uma amostra composta (100 folhas totalmente desenvolvidas e sadias) por tratamento.

<sup>4</sup> Os valores de referência foram obtidos de Embleton, 1973 (citado por Marchal, 1984), para folhas de ramos não frutíferos.

## Lodo de Esgoto: Impactos Ambientais da Agricultura



**Fig. 8.** Atividade microbiana do solo avaliada pela hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) e respiração microbiana (desprendimento de CO<sub>2</sub>), nos diferentes tratamentos de solo sem lodo e com adubo mineral (OA) ou com incorporação de lodo nas proporções de 0; 5; 7,5; 10 e 15 % v/v, no experimento de campo (média dos tratamentos com e sem inóculo).

A recuperação de *Phytophthora nicotianae* do solo só foi possível aos 82 dias após transplante das mudas, com valores baixos, mas que mostraram uma tendência a diminuir quando os valores de lodo de esgoto aumentaram (Tabela 6). Nas outras datas, não houve recuperação do patógeno, tanto das raízes quanto do solo. Os valores de recuperação do patógeno do solo correlacionaram-se com os valores da hidrólise de FDA ( $r = -0,2819$ ;  $P = 0,052$ ), mas não com os da respiração microbiana, nem com a condutividade elétrica e pH do solo.

**Tabela 6.** Efeito do inóculo e do lodo de esgoto na recuperação de *Phytophthora nicotianae* do solo mediante teste de isca de folhas de citros aos 82 dias após o transplante, nas parcelas do experimento no campo.

Fator	médias
<u>níveis de inóculo</u>	
0 g	0,00 b <sup>2,3</sup>
20 g	2,56 a
<u>doses de lodo</u>	
0% lodo <sup>1</sup> + adubo mineral	2,19 n.s
0% de lodo	4,19 n.s
5% de lodo	0,69 n.s
7,5% de lodo	0,31 n.s
10% de lodo	0,31 n.s
15% de lodo	0,00 n.s

<sup>1</sup> Porcentagens de lodo incorporadas ao solo (v/v %).

<sup>2</sup> Para a análise estatística, os dados da porcentagem de recuperação do patógeno do solo foram transformados em arco seno  $\sqrt{x} / 100$ .

<sup>3</sup> Dados seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade.

### Efeito dos extratos do lodo de esgoto no crescimento *in vitro* de *Phytophthora nicotianae*

Dos extratos avaliados, o extrato ácido do tratamento com 20% de lodo de esgoto apresentou uma redução significativa no crescimento da colônia de *Phytophthora nicotianae* (Tabela 7).

**Tabela 7.** Diâmetros médios das colônias de *Phytophthora nicotianae* isolado IAC 01/95, aos quatro e nove dias após repicagem, e área abaixo da curva de crescimento das colônias aos nove dias (AACC), crescendo em meio de cenoura (MC) contendo extratos aquosos, ácidos (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ou básicos (KOH) de lodo de esgoto (LE) e areia.

Tratamentos	Dias após repicagem		AACC
	4	9	
Testemunha (MC)	5,43 <sup>1</sup> ab <sup>2</sup>	9,00 <sup>1</sup> a <sup>2</sup>	52,56 a <sup>2</sup>
Areia + água	5,40 ab	9,00 a	52,18 a
Areia + KOH	4,41 c	8,82 a	44,61 b
Areia + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,63 c	8,65 a	45,52 b
Areia + LE + água	4,89 bc	8,73 a	47,86 b
Areia + LE + KOH	5,68 a	9,00 a	53,44 a
Areia + LE + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,05 d	2,27 b	17,28 c

<sup>1</sup> Diâmetro médio das colônias em cm.

<sup>2</sup> Dados seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente (Teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade).

### Isolamento e seleção de antagonistas a *Phytophthora nicotianae*

O número médio de colônias isoladas do solo das parcelas do campo foi da ordem de 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup> e 10<sup>4</sup> colônias por grama de solo para bactérias, actinomicetos e fungos, respectivamente. Os tratamentos com e sem lodo tiveram em média valores semelhantes para os diferentes grupos de microrganismos isolados.

Dos isolados testados no bioensaio, só um fungo (isolado F9.1, do gênero *Aspergillus*; obtido das parcelas com adubo mineral e inoculadas com *Phytophthora nicotianae*) e um actinomiceto (isolado A12.1, não identificado; obtido das parcelas com 15% de lodo e inoculada) apresentaram controle total

da *Phytophthora nicotianae*, semelhante à testemunha com água destilada esterilizada, onde as plântulas de alfafa não apresentaram nem zoosporângios, nem micélio. Sete isolados de fungos, três de actinomicetos e dois de bactérias permitiram o desenvolvimento de micélio, mas não dos zoosporângios. Alguns isolados tiveram um comportamento semelhante à testemunha com água e *Phytophthora nicotianae*.

No teste de pareamento de colônias, destacaram-se cinco fungos e dois actinomicetos. Um fungo do gênero *Trichoderma* (isolado F8.3/4; obtido das parcelas com adubo mineral e inoculada) destacou-se por antibiose com formação de halo de inibição de 1 cm; e os outros quatro, um *Trichoderma* (isolado F12.3; obtido das parcelas com 15% de lodo e inoculada) e três *Aspergillus* (isolado F8.10 obtido das parcelas com adubo mineral e inoculada; e isolados F9.1, F11.1; obtidos das parcelas com 5 e 10% de lodo e inoculadas, respectivamente) por hiperparasitismo, com crescimento micelial recobrando toda a placa em 72 h. Os dois actinomicetos (isolados A2.1 e A12.1; obtido das parcelas com adubo mineral e sem inóculo, e com 15% de lodo e inoculada, respectivamente) também desenvolveram halos de inibição de 1 cm. Os isolados que não interferiram nem com o crescimento nem com a esporulação de *Phytophthora nicotianae* foram as bactérias (isolados B10.6 e B11.1), um actinomiceto (isolado A9.7) e dois fungos (F10.4 e F10.8).

## Discussão

### **Sobrevivência e a recuperação de *Phytophthora nicotianae* do solo e das raízes**

Nos diferentes experimentos (*in vitro* e em casa de vegetação) observou-se que a sobrevivência e a recuperação de *Phytophthora nicotianae* do solo e das raízes, em geral, foram menores quando as doses de lodo de esgoto aumentaram nas diferentes misturas do substrato – lodo ou solo - lodo, sugerindo um efeito supressivo do lodo (Figuras 1 e 3, Tabelas 3 e 6). Esses resultados são coincidentes com os obtidos por outros autores, tanto para o

## Efeitos do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade de Solos a *Phytophthora nicotianae* em Citros

manejo das doenças causadas por *Phytophthora* como por outros patógenos, em diversas culturas (Baker & Cook, 1974; Bettiol & Krügner, 1984; Casale et al., 1995; Chung et al.; 1988; Costa et al., 1996; Erwin & Ribeiro, 1996; Feichtenberger et al., 1997; Hoitink & Boehm, 1999; Kim et al.; 1997; Lewis et al., 1992; Lumsden et al., 1983; Millner et al., 1982; Pereira et al., 1996; Widmer et al., 1998). Os processos envolvidos na supressividade do solo são complexos e incluem fatores bióticos e abióticos, alguns deles evidenciados no presente trabalho como a presença de compostos tóxicos, alterações nas propriedades químicas do solo (condutividade elétrica e pH), melhora nas condições para o desenvolvimento das mudas e aumento da atividade microbiana.

### **Compostos tóxicos**

A presença de compostos tóxicos devido aos processos de decomposição da matéria orgânica adicionada ao solo tem sido reportada por vários autores para diversos patógenos, usando diferentes fontes de matéria orgânica (Blok et al., 2000; Casale et al., 1995; Gamliel et al., 2000; Hoitink et al., 1977; Pereira et al., 1996).

As inibições do crescimento *in vitro* de colônias de *Phytophthora nicotianae* quando colocadas para crescer em meio de cultura acrescentado com extratos ácidos (Tabela 7) também foram obtidas por Widmer et al. (1998), sugerindo um possível efeito químico na indução de supressividade.

### **Condutividade elétrica e pH do solo**

As alterações nas propriedades químicas do solo (condutividade elétrica e pH) constituem um outro fator que pode explicar a supressividade a *Phytophthora nicotianae*.

Nos diferentes experimentos realizados, a condutividade elétrica aumentou como resposta ao incremento nas quantidades de lodo incorporadas tanto ao substrato quanto ao solo (Figuras 1, 3, 5 e 7). Lapeña *et al.* (2000) observaram que com valores de condutividade elétrica até 5 dS m<sup>-1</sup> por 24 h, a viabilidade e a capacidade de infectar dos zoosporângios de *Phytophthora*

*citrophthora* diminuam. Semelhantemente ao presente trabalho, Workneh *et al.* (1993) estabeleceram correlações negativas entre condutividade elétrica e presença de *Phytophthora parasitica* ou incidência da doença em plantas de tomateiro.

Tanto nos experimentos *in vitro*, como em casa de vegetação e campo, os valores de pH mostraram uma tendência de diminuir quando os níveis de lodo de esgoto aumentaram (Figuras 1, 3 e 7). Segundo Carmo (2001), a diminuição dos valores de pH na solução do solo deve-se à liberação de  $\text{N-NH}_4^+$  durante o processo de mineralização do lodo no solo, e os altos teores de  $\text{NH}_4^+$  podem indicar uma maior liberação de  $\text{H}^+$  para o meio promovendo acidificação. Tsao (1959) achou que baixos teores de pH diminuiriam a incidência da podridão de raízes em citros causadas por *Phytophthora nicotiana*. Downer *et al.* (2001) sugerem que a supressividade a *Phytophthora cinnamomi* é favorecida por pH baixo, o qual favorece a ação de enzimas produzidas por antagonistas ao patógeno.

### **Desenvolvimento das plântulas e mudas**

A melhora das condições para o desenvolvimento das plântulas e mudas constitui um outro fator que pode explicar a supressividade a *Phytophthora nicotianae*. Nos experimentos realizados, o lodo apresentou um efeito significativo e positivo no desenvolvimento das mudas (Figuras 2, 4 e 6). Esses resultados estão de acordo com diversos trabalhos que sugerem melhor desenvolvimento das plantas crescendo em solos com incorporação de matéria orgânica de diversas origens (Bettiol & Krügner, 1984; Kim *et al.*, 1997; Pascual *et al.*, 2000). Entre os fatores envolvidos, estão a melhoria da infiltração e drenagem do solo, favorecendo o desenvolvimento radicular e limitando a possibilidade de saturação do solo por excessos de água, e a uma nutrição mais equilibrada das plantas compensando desbalanços.

Com a incorporação de lodo de esgoto em concentrações de 30% v/v em base fresca, observou-se uma tendência de decréscimo na altura e produção de matéria fresca da parte aérea e raízes (Figuras 2 e 4), sugerindo um possível efeito de fitotoxidez como reportado por outros autores quando grandes volumes de matéria orgânica são incorporados ao solo e/ou quando

#### Efeitos do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade de Solos a *Phytophthora nicotianae* em Citros

estes não estão bem compostados (Aryantha et al., 2000; Casale et al., 1995; De Vleeschauwer et al., 1981; Widmer et al., 1998). Segundo Widmer et al. (1998), esse efeito negativo pode desaparecer com o passar do tempo, e num prazo maior estimular o desenvolvimento da cultura. De Vleeschauwer et al. (1981) estudaram os componentes fitotóxicos de compostos de lixo urbano fresco e determinaram que a principal substância fitotóxica foi o ácido acético, seguido de ácidos orgânicos (propiónico, isobutírico, butírico e isovalérico), os quais atingiram níveis não tóxicos às plantas após 5 meses de compostagem.

#### **Atividade microbiana do solo**

O aumento da atividade microbiana do solo é citado por vários autores como um dos principais fatores que podem explicar a supressividade a *Phytophthora nicotianae*, onde as populações microbianas estabeleceriam um controle biológico mediante os mecanismos clássicos descritos por Baker & Cook (1974): competição, antibiose, parasitismo e indução de resistência. O sucesso do controle da *Phytophthora* pela comunidade microbiana baseia-se, entre outros, em sua baixa capacidade saprofítica e competitiva (Erwin & Ribeiro, 1996). Malaczuck (1983) sugere que os principais mecanismos envolvidos no controle de *Phytophthora* são competição por nutrientes e antibiose, entretanto Downer et al (2001) sugerem que a produção de celulase e laminarinase é o principal mecanismo envolvido na supressividade a *Phytophthora cinnamomi* no sistema Ashburner, destruindo zoósporos e outros propágulos do patógeno; e afirmam que as enzimas são produzidas pela comunidade de fungos, entre eles *Penicillium* e *Aspergillus*.

O aumento da atividade microbiana do solo foi constatado no presente trabalho, com respostas positivas da hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) e respiração microbiana à incorporação de lodo de esgoto ao solo (Tabela 2 e Figura 8). Esses dados são coincidentes com os resultados de vários autores que reportaram correlações significativas entre incidência da doença ou presença dos patógenos e aumento nos valores de FDA (Aryantha et al., 2000; Boehm & Hoitink, 1992; Costa et al., 1996; Ghini et al., 1998; Kim et al., 1997; Workneh et al., 1993). Outras medidas da atividade microbiana e sua relação com a

supressividade aos patógenos foram demonstradas por diversos autores: desprendimento de CO<sub>2</sub> (Costa et al., 1996; Ghini et al., 1998); atividade da desidrogenase (Lewis et al., 1992) e outras enzimas como fosfatase, urease,  $\alpha$ -glucosidase, galactosidase, N-acetil-glucosa-aminidase (Pascual et al., 2000); e tamanho da biomassa microbiana (Hoitink & Boehm, 1999). Hoitink & Boehm (1999) sugerem que o nível de hidrólise de FDA é um bom indicador da supressividade dos solos, mas consideram que o sucesso do controle biológico de *Pythium* e *Phytophthora* também depende da quantidade e qualidade da matéria orgânica que ofereça energia aos microrganismos envolvidos no controle biológico.

No bioensaio, dentre os isolados testados como antagonistas a *Phytophthora nicotianae*, destacaram-se sete fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus*, três actinomicetos e duas bactérias. Diversas espécies do gênero *Trichoderma* são bem conhecidas como agentes de controle biológico de doenças causadas por *Phytophthora* spp. (Ahmed et al., 1999; Amorim & Melo, 1999; Casale et al., 1995; Costa et al., 1996; Malajczuk, 1983; May, 1994; Smith et al., 1990). Mas também fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Gliocladium*, *Myrothecium* e *Penicillium*; actinomicetos (*Streptomyces* spp.) e bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* possuem capacidade de produção de antibióticos e, assim, potencialidade no controle de *Phytophthora* spp. (Malajczuk, 1983; Erwin & Ribeiro, 1996; Fang & Tsao, 1995; You et al., 1996).

Devido à complexidade dos processos envolvidos, para determinar o impacto potencial da incorporação de matéria orgânica ao solo na indução de supressividade aos diferentes patógenos, são necessários estudos locais, nos solos e com as fontes de matéria orgânica disponíveis na região. No caso da supressividade a *Phytophthora* é importante a atividade celulolítica dos microrganismos envolvidos, considerando que as paredes dos cromistas estão constituídas principalmente por celulose ( $\beta$ -1,4 glucanos) e  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 glucanos (Bartnicki – Garcia & Wang, 1983). Assim, trabalhos futuros visando estudar os fatores envolvidos na supressividade a *Phytophthora* poderiam incluir, além das técnicas acima descritas, a análise de atividade celulolítica da microbiota e outras técnicas de isolamento e detecção dos grupos de microrganismos do solo.



## Considerações Finais

Embora iniciais, os resultados obtidos no presente trabalho destacam a potencialidade do uso do lodo de esgoto proveniente das Estações de Tratamento de Esgotos – ETEs no manejo das doenças causadas por *Phytophthora nicotianae* em citros.

O lodo de esgoto proveniente das ETEs constitui uma fonte de matéria orgânica disponível em quantidades crescentes. Além de contribuir no manejo das doenças, a aplicação do lodo de esgoto como adubação orgânica pode ser altamente benéfica, face à melhoria nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, e dessa forma, pode contribuir para a obtenção de uma agricultura mais sustentável.

## Referências

- AHMED, A.S.; PEREZ-SANCHEZ, C.; EGEE, C.; CANDELA, M.E. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. **Plant Pathology**, v.48, p.58-65, 1998.
- AMORIM, E.P. da R.; MELO, I.S. Efeito da associação de antagonistas no controle de *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora* em plântulas de citros. **Summa Phytopathologica**, v.25, n. 4, p.335-338, 1999.
- ARYANTHA, I.P.; CROSS, R.; GUEST, D.I. Suppression of *Phytophthora cinnamomi* in potting mixes amended with uncomposted and composted animal manures. **Phytopathology**, v.90, n.7, p.775-782, 2000.
- BAKER, K.F.; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W.H. Freeman, 1974. 433p.
- BARTNICKI – GARCIA, S.; WANG, M. Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*. In: ERWIN, D.C.; BARTNICKI – GARCIA, S.; TSAO, P.H. (Ed.). **Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology**. St. Paul, APS Press, 1983. cap. 9, p. 121-137.
- BETTIOL, W.; KRÜGNER, T.L. Influência do lodo de esgoto na severidade da podridão de raiz do sorgo causada por *Pythium arrhenomanes*. **Summa Phytopathologica**, v.10, p.243-251, 1984.

BLOK, W.J.; LAMERS, J.G.; TERMORSHUIZEN, A.J.; BOLLEN, G.J. Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic ammendments followed by tarping. **Phytopathology**, v. 90, n.3, p. 253-259, 2000.

BOEHM, M. J.; HOITINK, H. A. J. Sustenance of microbial activity in potting mixes and its impact on severity of Pythium root rot of *Poinsettia*. **Phytopathology**, v.82, n.3, p.259-264, 1992.

CARMO, J.B. do. **Impacto da aplicação de biossólidos nas atividades microbianas do solo**. 2001. 105 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CASALE, W.L.; MINASSIAN, V.; MENGE, J.A.; LOVATT, C.J.; POND, E.; JOHNSON, E.; GUILLEMET, F. Urban and agricultural wastes for use as mulches on avocado and citrus and for delivery of microbial biocontrol agents. **Journal of Horticultural Science**, v.70, n.2, p.315-352, 1995.

CHUNG, Y. R.; HOITINK, H. A. H.; LIPPS, P. E. Interactions between organic-matter decomposition level and soilborne disease severity. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.24, p.183-193, 1988.

COSTA, J.L. da; MENGE, J.A.; CASALE, W.L. Investigations on some of the mechanisms by wich bioenhaced mulches can suppress Phytophthora root rot of avocado. **Microbiological Research**, v.151, p.183-192, 1996.

DE VLEESCHAUWER, D.; VERDONCK, O.; VAN ASSCHE, P. Phytotoxicity of refuse compost. **BioCycle**, v.22, p. 44-46, 1981.

DOWNER, A.J.; MENGE, J.A.; POND, E. Effect of cellulolytic enzymes on *Phyophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, v.91, n.9, p.839-846, 2001.

ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. **Phytophthora diseases worldwide**. St. Paul: APS Press, 1996. 562p.

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

FEICHTENBERGER, E. Doenças induzidas por fungos do gênero *Phytophthora* em citros e seu controle. **Laranja**, v.10, n.2, p.359-378, 1989.

FEICHTENBERGER, E. Control of *Phytophthora* gummosis of citrus with systemic fungicides in Brazil. **Bulletin OEPP**, v.20, p.139-148, 1990.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G. W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 261-296.

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.

Efeitos do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade de Solos a *Phytophthora nicotianae* em Citros

GAMLIEL, A.; AUSTERWEIL, M.; KRITZMAN, G. Non-chemical approach to soilborne pest management – organic amendments. **Crop Protection**, v.19, p.847- 853, 2000.

GHINI, R.; MENDES, M.D.L.; BETTIOL, W. Método de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) como indicador de atividade microbiana no solo e supressividade a *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, v.24, n.3/4, p.239-242, 1998.

GRIMM, G.R.; ALEXANDER, A.F. Citrus leaf pieces as traps for *Phytophthora parasitica* from soil slurries. **Phytopathology**, St. Paul, v.63, p. 540-541, 1973.

GRISI, B. M. Método químico de medição da respiração edáfica: alguns aspectos técnicos. **Ciência e Cultura**, v.30, n.1, p.82-88, 1978.

HANDELSMAN, J.; NESMITH, W.C.; RAFFEL, S.J. Microassay for biological control of infection of tobacco by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. **Current Microbiology**, v.22, p. 317-319, 1991.

HOITINK, H.A.J.; VAN DOREN, D.M.; SCHMITTHENNER, A.F. Suppression of *Phytophthora cinnamomi* in a composted hardwood bark potting medium. **Phytopathology**, v.67, n.4, p.561-565, 1977.

HOITINK, H.A.J.; BOEHM, M.J. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate dependent phenomenon. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 427-446, 1999.

KIM, K.D.; NEMEC, S.; MUSSON, G. Effects of composts and soil amendments on soil microflora and *Phytophthora* root and crown rot of bell pepper. **Crop Protection**, v.16, n. 2, p. 165-172, 1997.

LAPEÑA, I.; TUSET, J.J.; HINAREJOS, C.; MIRA, J.L. Interacción entre la conductividad eléctrica de la solución del suelo y la infección de *Phytophthora citrophthora* en plántulas de cinco portainjertos de cítricos. In: CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA, 10., Valencia, 2000. **Resúmenes...** Valencia: SEF, 2000. p.218.

LEWIS, J.A.; LUMSDEN, R.D.; MILLNER, P.D.; KEINATH, A.P. Suppression of damping-off of peas and cotton in the field with composted sewage sludge. **Crop Protection**, v.11, n.6, p.260-266, 1992.

LUMSDEN, R.D.; LEWIS, J.A.; MILLNER, P.D. Effect of composted sewage sludge on several soilborne pathogens and diseases. **Phytopathology**, v.73, n.11, p.1543-1548, 1983.

MALAJCZUK, N. Microbial antagonism to *Phytophthora*. In: ERWIN, D.C.; BARTNICKI – GARCIA, S.; TSAO, P.H. (Ed.). **Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology**. St. Paul: APS Press, 1983. cap.16, p.197-218.

MARCHAL, J. Agrumes. In: MARTIN - PRÉVEL, P.; GAGNARD, J.; GAUTER, P. (Ed.). **L'analyse végétale dans le contrôle de l'alimentation des plantes tempérées et tropicales**. Paris: Technique et Documentation (Lavoisier), 1984. p.361-398.

MATHERON, M.E.; MATEJKA, J.C. Effect of sodium tetrathiocarbonate, metalaxyl, and fosetyl-Al on development and control of Phytophthora root rot of citrus. **Plant Disease**, v.75, n.3, p.264-268, 1991.

MAY, L.M. **Controle biológico, físico e químico de *Phytophthora parasitica* Dastur em mudas de citros**. 1994. 89p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

McGOVERN, R. J.; McSORLEY, R.; URS, R. R. Reduction of Phytophthora blight of Madagascar periwinkle in Florida by soil solarization in autumn. **Plant Disease**, v.84, n.2, p.185-191, 2000.

MILLNER, P.D.; LUMDSEN, R.D.; LEWIS, J.A. Controlling plant disease with sludge compost. **BioCycle**, v. 22, p. 50-52, 1982.

PASCUAL, J.A.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C.; DE LEIJ, F.A.A.M.; LYNCH, J.M. Long-term suppression of *Pythium ultimum* in arid soil using fresh and composted municipal wastes. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p. 478-484, 2000.

PEREIRA, J.C.R.; ZAMBOLIM, L.; do VALE, F.X.R.; CHAVES, G.R. Compostos orgânicos no controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p.353-379, 1996.

PLATT, R.G.; OPITZ, K.W. Propagation of citrus. In: REUTHER, W. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1973. v.3. cap.1, p. 1-47.

SANTOS, I. dos; BETTIOL, W. Effect of sewage sludge on the rot and seedling damping-off of bean plants caused by *Sclerotium rolfsii*. **Crop Protection**, v.22, p.1093-1097, 2003.

SMITH, V.L.; WILCOX, W.F.; HARMAN, G.E. Potential for biological control of Phytophthora root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. **Phytopathology**, v.80, n.9, p. 880-885, 1990.

SUMNER, M.E. **Diagnosis and Recommendation Integrated System (DRIS) as a guide to orchard fertilization**: Seminar on Leaf Diagnosis as a Guide to Orchard Fertilization. Korea: Food and Fertilizer Technology Center, 1986.

TIMMER, L. W.; GRAHAM, J. H.; ZITKO, S. E. Metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora parasitica*: occurrence, sensitivity, and competitive parasitic ability on citrus. **Plant Disease**, v.82, p.254-261, 1998.

TSAO, P.H. Phytophthora fibrous root rot of citrus affected by soil factors. (Resumo) **Phytopathology**, v.49, p.553, 1959.

Efeitos do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade de Solos a *Phytophthora nicotianae* em Citros

WIDMER, T. L.; GRAHAM, J. H.; MITCHELL, D. J. Composted municipal waste reduces infection of citrus seedlings by *Phytophthora parasitica*. **Plant Disease**, v.82, n.6, p.683-688, 1998.

WILCOX, W.F.; PRITTS, M.P.; KELLY, M.J. Integrated control of Phytophthora root rot of red raspberry. **Plant Disease**, v.83, n.12, p.1149-1154, 1999.

WORKNEH, F.; VAN BRUGGEN, A.H.C.; DRINKWATER, L.E.; SHENNAN, C. Variables associates with corky root and Phytophthora root rot of tomatoes in organic and conventional farms. **Phytopathology**, v.83, n.5, p.581-589, 1993.

YOU, M.P.; SIVASITHAMPARAM, K.; KURTBÖKE. Actinomycetes in organic mulch used in avocado plantations and their ability to supress *Phytophthora cinnamomi*. **Biology and Fertility of Soils**, v.22, p.237-242, 1996.

