

# Efeito do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade *in vitro* a *Phytophthora nicotianae*\*

Carolina Leoni<sup>1\*\*\*</sup> & Raquel Ghini<sup>2\*\*\*</sup>

<sup>1</sup>Sección Protección Vegetal, Estación Experimental Las Brujas, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, CEP 90200, Rincón del Colorado, Canelones, Uruguay, fax: 5982 3677609, e-mail: cleoni@inia.org.uy; <sup>2</sup>Embrapa Meio Ambiente, Cx. Postal 69, CEP 13.820-000, Jaguariúna, SP, e-mail: raquel@cnpma.embrapa.br

(Aceito para publicação em 26/09/2002)

Autor para correspondência: Carolina Leoni

LEONI, C. & GHINI, R. Efeito do lodo de esgoto na indução de supressividade *in vitro* a *Phytophthora nicotianae*. Fitopatologia Brasileira 28:067-075. 2003.

## RESUMO

Uma alternativa de manejo das doenças causadas por *Phytophthora* spp. é o uso de matéria orgânica. No presente trabalho foi avaliada a potencialidade do lodo de esgoto na indução de supressividade *in vitro* a *P. nicotianae*. O efeito do lodo de esgoto incorporado ao solo na sobrevivência de *P. nicotianae* foi avaliado mediante um experimento fatorial com dois fatores: doses de lodo de esgoto (0, 10, 20 e 40% p/p) e concentrações de inóculo [0, 10 ou 20 g de grãos de trigo (*Triticum aestivum*) colonizados kg<sup>-1</sup>]. Aos 21 dias, quando aumentaram as doses de lodo de esgoto, a sobrevivência de *P. nicotianae* e os pHs das misturas diminuíram, e as condutividades elétricas (CE) aumentaram. As correlações entre a CE e a sobrevivência do patógeno foram negativas e significativas (P>0,05). Para estudar o efeito dos compostos químicos envolvidos na supressividade,

foram obtidos extratos em água, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e KOH 0,4N de misturas de areia – lodo de esgoto (20% p/p), e foram acrescentados ao meio de cultura e seu efeito avaliado no crescimento das colônias de *P. nicotianae*. O extrato ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) do tratamento com 20% de lodo de esgoto inibiu significativamente (P>0,05) o crescimento da colônia do patógeno. O efeito biológico foi estudado mediante isolamento de microrganismos em meio de cultura e seleção por antagonismo. No bioensaio com plântulas de alfafa (*Medicago sativa*) destacaram-se os isolados F9.1 (*Aspergillus* sp.) e A12.1 (actinomiceto, não identificado); e no teste de culturas pareadas destacou-se um *Trichoderma* sp. e dois actinomicetos por antibiose, e um *Trichoderma* sp. e três *Aspergillus* sp. por hiperparasitismo.

**Palavras-chave adicionais:** matéria orgânica, bio sólidos.

## ABSTRACT

### Effect of sewage sludge *in vitro* to suppress *Phytophthora nicotianae*

Soil organic matter amendments may provide an alternative management practice for soil diseases caused by *Phytophthora* spp. In this paper we have evaluated the effectiveness of residential sewage sludge to suppress *P. nicotianae* under laboratory conditions. The effect of sewage sludge on *P. nicotianae* survival was evaluated by two experimental factors: sewage sludge doses (0, 10, 20 and 40% w/w) and inoculum level [0, 10 and 20 g infested wheat (*Triticum aestivum*) seeds per kg of soil]. After maintaining the mixtures (soil – sewage sludge – inoculum) at room temperature for 21 days, treatments with higher organic matter had lower *P. nicotianae* survival, pH of the mixture, and higher electric conductivity (EC). Correlations

between pathogen survival and EC were negative and significant (P>0,05). In order to evaluate the chemical effects of the sewage sludge on *P. nicotianae*, water, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N and KOH 0,4N extracts were obtained from sand - sewage sludge (20% w/w) mixtures and each one of them was added to culture medium. The H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N extract significantly (P>0,05) inhibited colony growth. The biological effect of the sewage sludge was evaluated by isolating microbial antagonists and testing them against *P. nicotianae* by bioassay and plate techniques. The bioassay technique selected one fungus (isolate F9.1, identified as *Aspergillus* sp.) and one actinomycete (isolate A12.1, not identified). The plate technique selected one *Trichoderma* sp. and two actinomycetes for their antibiosis to *P. nicotianae*, and one *Trichoderma* sp. and three *Aspergillus* sp. for their hyper-parasitism to the pathogen.

## INTRODUÇÃO

Entre as doenças fúngicas que afetam os citros (*Citrus* spp.), o tombamento, a gomose e a podridão do pé e raízes causadas por *Phytophthora* spp. estão dentre as de maior

importância econômica ocorrendo em todas as regiões produtoras. No Brasil, as espécies de *Phytophthora* predominantes são *P. nicotianae* Breda de Haan (1896) (sin. *P. parasitica* Dastur (1913)) e *P. citrophthora* (R. E. Smith and E. H. Smith) Leonian (1925) (Feichtenberger, 2001).

O manejo das doenças causadas por *Phytophthora* spp. inclui um conjunto de medidas preventivas e curativas. Dentre elas destacam-se as medidas preventivas nos viveiros para obtenção de mudas sadias; uso de porta-enxertos resistentes;

\* Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, a ser apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Apoio FAPESP

\*\* Bolsista do CNPq

e medidas de controle 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 antagonista ao patógeno, manejo da irrigação e drenagem, monitoramentos frequentes e controle químico (Erwin & Ribeiro, 1996; Feichtenberger, 2001). O controle químico pode ser muito eficiente, porém, apesar da dificuldade de desenvolvimento de resistência de fitopatógenos infectantes de raízes a fungicidas, há relatos de resistência de *P. parasitica* a metalaxil (Ferrin & Kabashima, 1991). Esse problema, associado aos possíveis impactos no agroecossistema, tem levado à busca de alternativas ao controle químico.

Uma alternativa é o uso de matéria orgânica tanto incorporada ao solo, quanto empregada como cobertura e como veículo de agentes de biocontrole, a qual contribui no controle dos patógenos pelo estímulo da atividade microbiana e melhora das características físicas e químicas do solo (Casale *et al.*, 1995; Erwin & Ribeiro, 1996; Hoitink & Bohem, 1999). Diversos estudos têm sido realizados para o manejo de *Phytophthora* spp. com a aplicação ao solo de inúmeras fontes de matéria orgânica (Lumsden *et al.*, 1983; Casale *et al.*, 1995; Erwin & Ribeiro, 1996; Widmer *et al.*, 1998; Hoitink & Boehm, 1999).

Atualmente, uma das fontes de matéria orgânica disponível em quantidades crescentes, é o lodo de esgoto proveniente das Estações de Tratamento de Esgotos – ETEs. O lodo constitui um insumo de valor para a agricultura, pois fornece ao solo matéria orgânica, macro e micronutrientes para as plantas, atua como condicionador de solo e fertilizante, e dessa forma, pode contribuir para a obtenção de uma agricultura mais sustentável (Andreoli & Pegorini, 2000).

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos da incorporação do lodo de esgoto ao solo na indução de supressividade a *P. nicotianae* em condições de laboratório.

## MATERIAL E MÉTODOS

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

O isolado IAC 01/95 de *P. nicotianae* utilizado foi fornecido pelo Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” – Instituto Agrônomo de Campinas (CCSM – IAC). O isolado foi mantido em água destilada esterilizada em temperatura ambiente e ausência de luz até sua utilização.

O inóculo foi produzido em grãos de trigo (*Triticum aestivum* L.) autoclavados em sacos de polipropileno acrescidos com o patógeno. No primeiro dia, sacos de polipropileno de 30 x 40 cm com 350 g de grãos de trigo e 200 ml de água destilada foram autoclavados a 121 °C, por 40 min. No segundo dia, foram acrescentados aos sacos mais 150 ml de água destilada e, foram fechados hermeticamente e autoclavados por mais 20 min a 121 °C. No terceiro dia, sob condições de assepsia, cada saco recebeu 40 discos de 5 mm de diâmetro de meio de cultura [50 g cenoura (*Daucus carotae* L.) cozida e triturada no liquidificador; 10 g de dextrose; 16 g de ágar; água destilada até completar 1 litro) contendo micélio do patógeno das bordas de uma colônia com sete dias de idade.

Finalmente, os sacos foram incubados por quatro ou cinco semanas, em temperatura ambiente, sendo feitas agitações quando necessárias para homogeneizar a colonização dos grãos.

### Lodo de esgoto e solo

O lodo de esgoto foi obtido da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de Franca, SP. Esse lodo é o produto final do tratamento biológico dos esgotos residenciais, e tem baixos teores de metais pesados (Tabela 1).

O Latossolo vermelho amarelo fase argilosa foi obtido no campo experimental da Embrapa Meio Ambiente (Jaguarúna, 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 *P. 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 min), 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 *P. nicotianae* kg<sup>-1</sup>. As misturas foram colocadas em sacos plásticos de 30 x 40 cm e 100 µm de espessura, fechados (mas não hermeticamente) e mantidos a 27 °C ±2. Após 21 dias, os sacos foram abertos e a sobrevivência de *P. nicotianae* foi avaliada mediante o teste de iscas de folhas de citros, determinando-se a recuperação do patógeno (porcentagem

**TABELA 1 - Análise química do lodo de esgoto empregado nos diferentes experimentos**

Atributo	Valores
pH em água	6,4
Umidade (65 °C)	52,1
C (g kg <sup>-1</sup> )	374,4
N Kjeldal (g kg <sup>-1</sup> )	50,8
N-amoniacoal (µg g <sup>-1</sup> )	119,5
N –Nitrito-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
B (mg kg <sup>-1</sup> )	7,1
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	359,2
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	31706
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	267,4
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	1590
Mo (mg kg <sup>-1</sup> )	<1
Al (mg kg <sup>-1</sup> )	33550
Na (g kg <sup>-1</sup> )	0,6
Ar (mg kg <sup>-1</sup> )	<1
Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	2
Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	1325
Hg (mg kg <sup>-1</sup> )	<1
Ni (mg kg <sup>-1</sup> )	74,7
Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	118,8
Se (mg kg <sup>-1</sup> )	0

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. O experimento foi repetido duas vezes.

O teste de isca de folhas de citros utilizado foi modificado a partir de Grimm & Alexander (1973). Em placas de Petri plásticas de 9 cm de diâmetro, previamente desinfestadas com álcool 70°, foram colocados 5 g da mistura solo - lodo de esgoto, 30 ml de água destilada e 20 fragmentos de folhas de citros de 3 x 3 mm desinfestados com álcool 70°. As placas foram mantidas a 27 °C ±2 e luz fluorescente contínua por 48 h, quando realizou-se a avaliação das iscas. Para avaliação, as iscas foram observadas no microscópio óptico (aumento de 100 vezes). As folhas empregadas no teste foram obtidas de plantas de laranja que não tinham recebido nenhum tratamento químico.

Para determinar o pH e a condutividade elétrica, num Erlenmeyer de 100 ml de capacidade foram colocados 10 g da mistura solo - lodo de esgoto e 25 ml de água destilada deionizada. Foi realizada agitação a 120 rpm por 15 min. Após deixar em repouso por 30 min, procedeu-se a leitura do pH e da condutividade elétrica do sobrenadante. Para cada repetição foram feitas duas réplicas e três leituras de cada.

Os tratamentos se constituíram da combinação dos fatores doses de lodo (0, 10, 20 e 40% p/p) e níveis de inóculo (0, 10 ou 20 g kg<sup>-1</sup>), com cinco repetições. Para a análise estatística, os dados de recuperação do patógeno (porcentagem de iscas com zoosporângios nas bordas) foram transformados em arco seno  $\sqrt{x/100}$ . As correlações entre as variáveis recuperação do patógeno, condutividade elétrica e pH foram estabelecidas.

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

Os extratos foram obtidos segundo o método de Widmer *et al.* (1998) modificado. Foram feitas misturas de 80 g de areia (lavada, esterilizada e seca) e 20 g de lodo de esgoto (proporção de 20% p/p), com 100 ml da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, ou KOH 0,4 N ou água bidestilada esterilizada. Como testemunha, foi empregada areia (100 g) com 100 ml de cada uma das soluções. Os Erlenmeyers de 250 ml de capacidade 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 µm de porosidade. O pH de cada um dos extratos obtidos foi ajustado para valores entre 5,5 – 6,0 com soluções de KOH 10 N ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12 M. 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 ±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, a cada dois dias. Após nove dias de incubação, a área abaixo a curva do crescimento das colônias (AACC) foi calculada. O delineamento experimental foi de parcelas inteiramente casualizadas, com oito repetições.

#### **Isolamento de antagonistas a *P. nicotianae***

O isolamento dos microrganismos do solo 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 do solo dos tratamentos com 0; 5; 7,5; 10 e 15% v/v de lodo de esgoto e das parcelas com adubação mineral, com e sem inóculo, resultando num total de 12 amostras compostas. As amostras de solo foram mantidas por dois dias a 25 °C, até sua utilização.

Para o isolamento dos microrganismos foram preparadas suspensões solo – água nas diluições 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup> e 100 µl de suspensão foram transferidos para meio de cultura. Para o isolamento de bactérias foi empregado o meio de cultura Nutriente ágar – NA (NA Oxoid, 28 g l<sup>-1</sup>) e as diluições 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup>. Para o isolamento de actinomicetos foi empregado o meio Amido caseína - AC (10 g amido; 0,3 g de caseína; 2 g KNO<sub>3</sub>; 2 g NaCl; 2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,05 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,01 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 16 g ágar e 11 água destilada) e as diluições 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup>. Para o isolamento de fungos foi empregado o Meio de Martin (1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 5 g peptona; 10 g dextrose; 0,03 g Rosa de Bengala; 16 g ágar e 11 água destilada) e as diluições 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup>. 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 dois, três ou seis 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 contendo 5 ml de meio batata dextrose ágar (BDA) e preservadas a 5 °C até avaliação do antagonismo ao patógeno.

#### **Avaliação de antagonistas: bioensaio**

Foram testados 35 isolados de bactérias, 32 de actinomicetos e 52 de fungos, segundo o bioensaio descrito por Handelsman *et al.* (1991) modificado. Sementes de alfafa (*Medicago sativa* L.) previamente desinfestadas foram colocadas para germinar em caixas contendo papel de germinação umedecido. Após quatro ou cinco dias, as plântulas foram transferidas aos compartimentos das placas de cultura de células (Corning com 24 compartimentos). Em cada compartimento foram colocados 1 ml de água destilada esterilizada, uma plântula de alfafa, um disco de 5 mm de diâmetro meio de cultura com micélio de *P. 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 *P. 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 *P. nicotianae*. Para cada isolado (fungo, bactéria ou actinomiceto) foram feitas quatro repetições.

O crescimento dos microrganismos foi obtido em placas a temperatura ambiente e com diferentes meios: as bactérias em NA e incubadas por 48 h; os fungos em BDA e incubados por uma semana e os actinomicetos em meio AC e incubados por uma semana.

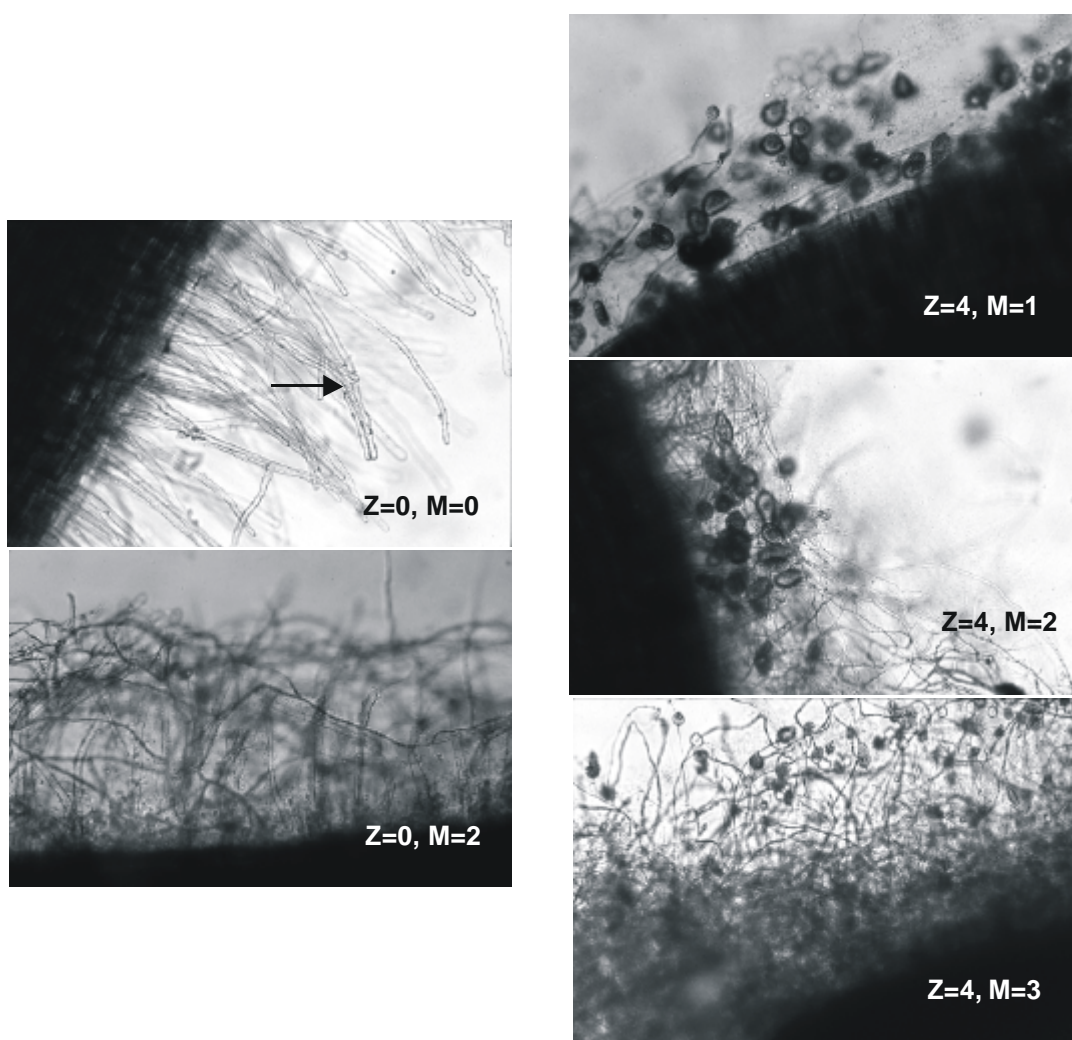
Para determinar a potencialidade de um isolado como antagonista, foram feitas duas escalas de notas que discriminaram níveis de infestação com *P. nicotianae* das plântulas de alfafa crescendo na presença dos diferentes isolados. Para a presença de zoosporângios as notas foram 0

= sem zoosporângios, 1 = entre 1 e 5, 2 = entre 6 e 10; 3 = entre 11 e 50, e 4 = mais de 51. Para a presença de micélio as notas foram 0 = sem micélio, 1 = pouco, 2 = médio, 3 = muito (Figura 1).

#### Avaliação de antagonistas: teste de culturas pareadas

Foram testados sete isolados de fungos, três de actinomicetos e dois de bactérias selecionados no bioensaio quanto ao potencial antagonístico a *P. nicotianae*. As condições de crescimento dos microrganismos foram iguais as empregadas no item anterior.

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 *P. nicotianae* em pleno desenvolvimento e um disco de 5 mm de diâmetro de meio de cultura com micélio do fungo ou actinomiceto, ou



**FIG. 1** - Escala de notas empregada na avaliação da potencialidade dos isolados de fungos, actinomicetos e bactérias quanto ao antagonismo a *Phytophthora nicotianae*, pelo método de infestação de plântulas de alfafa (*Medicago sativa*). Para a presença de zoosporângios (Z) as notas foram 0= sem zoosporângios, 1= entre 1 e 5, 2= entre 6 e 10, 3= entre 11 e 50, 4= mais de 50. Para a presença de micélio (M) as notas foram 0= sem micélio, 1= pouco, 2= médio, 3= muito. A seta indica os pelos absorventes das raízes das plântulas de alfafa.

uma estria do crescimento da bactéria selecionada. As placas foram mantidas a temperatura ambiente até sua avaliação. Foram feitas três repetições por isolado. A avaliação foi feita quanto ao hiperparasitismo (crescimento do antagonista sobre o micélio do 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 *P. nicotianae*

Nas condições do laboratório, a sobrevivência de *P. 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, indicando um possível efeito supressivo do lodo (Figura 2 e Tabela 2). Os valores de pH das misturas diminuíram quando os níveis de lodo em ausência de inóculo aumentaram; mas na presença de inóculo, primeiro aumentaram e depois diminuíram. Os valores de condutividade elétrica mostraram uma resposta positiva aos incrementos nos níveis de lodo, independente da presença ou não do inóculo (Figura 3 e Tabela 2).

Os coeficientes de correlação ( $r$ ) da recuperação do patógeno e o número de zoosporângios presentes nas bordas das iscas foram significativos ao 5% para a condutividade elétrica, mas não para o pH. Os valores de  $r$  foram de  $-0,490$  para a porcentagem de recuperação e de  $-0,487$  para o número de zoosporângios por borda de isca.

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

Dos extratos avaliados, o extrato ácido do tratamento com 20% de lodo de esgoto apresentou uma redução significativa no crescimento da colônia de *P. nicotianae* (Tabela 3).

### Isolamento de antagonistas a *P. nicotianae*.

O número médio de colônias isoladas do solo das parcelas do campo foi da ordem de  $10^6$ ,  $10^5$  e  $10^4$  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 (Tabela 4).

### Avaliação de antagonistas a *P. nicotianae*.

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

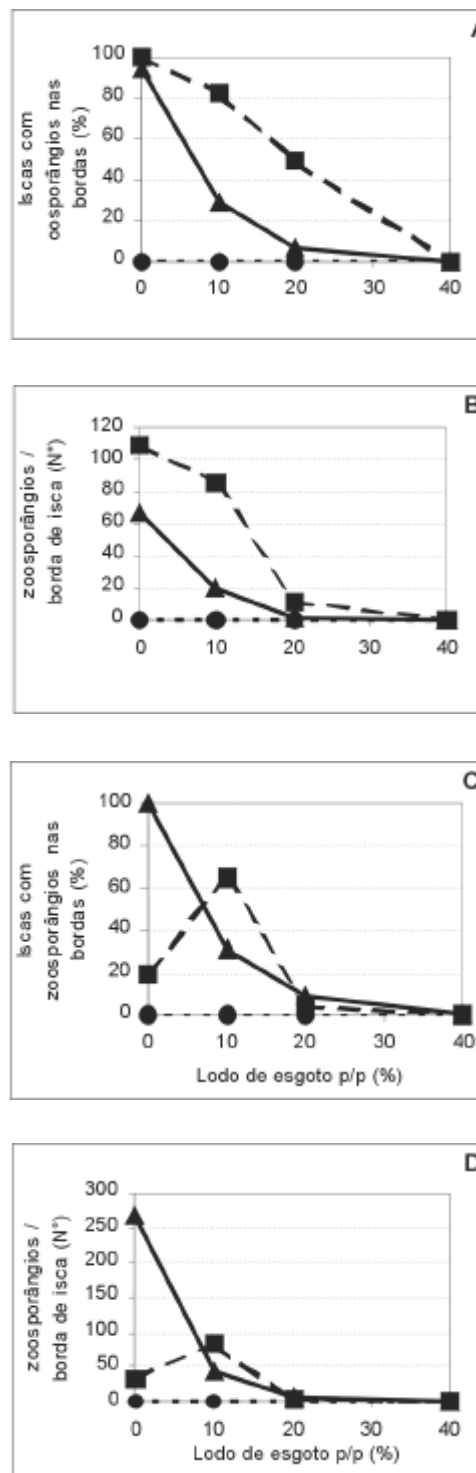


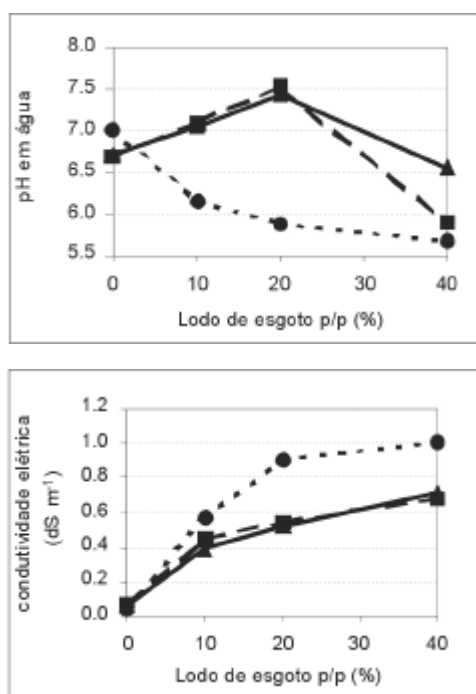
FIG. 2 - Sobrevivência de *Phytophthora nicotianae* avaliada por meio da porcentagem de recuperação em iscas de folhas de citros (*Citrus* spp.) e número de zoosporângios por borda de isca, nas diferentes misturas solo - lodo de esgoto, para os diferentes níveis de inóculo (0 -- -, 10 -■- e 20 -▲- g kg<sup>-1</sup> de mistura), sob condições de laboratório em dois experimentos (gráficos A e B, experimento 1; gráficos C e D, experimento 2).



**TABELA 2 - Análise de variância e teste F para as variáveis sobrevivência de *Phytophthora nicotianae* avaliada por meio da porcentagem de recuperação em iscas de folhas de citros (*Citrus* spp.) e número de zoosporângios por borda de isca, pH e condutividade elétrica (CE) nas diferentes misturas solo - lodo de esgoto (0, 10, 20 e 40% p/p), para os diferentes níveis de inóculo (0, 10 e 20 g kg<sup>-1</sup> de mistura), sob condições de laboratório em dois experimentos**

Causa da variação	GL	QM					
		Recuperação (%)		Zoosporângios por borda (N°)		Experimento 2	
		Exp. 1	Exp.2	Exp. 1	Exp.2	pH	CE
Lodo	3	8749,8 *	4058,5 *	120,8 *	143,4 *	1,49 *	927405,4 *
Inóculo	2	13061,5 *	4933,6 *	154,6 *	151,3 *	1,95 *	168352,0 *
Lodo x inóculo	6	2675,0 *	2400,8 *	38,9 *	69,5 *	0,72 *	32558,5 *
Resíduo	36	224,7	67,3	1,9	1,7	0,0001	18,3
CV (%)		56,1	42,8	48,8	39,7	0,65	0,86
R <sup>2</sup>		0,86	0,94	0,91	0,95	0,99	0,99

\* significativo pelo teste de F, ao nível de 1% de probabilidade.



**FIG. 3 - Efeito do lodo de esgoto no pH em água e na condutividade elétrica (CE) da solução das misturas solo - lodo de esgoto, nas diferentes misturas solo - lodo de esgoto, para os diferentes níveis de inóculo (0 - - , 10 -■- e 20 -▲- g kg<sup>-1</sup> de mistura), sob condições de laboratório, no experimento 2.**

destilada esterilizada, onde as plântulas de alfafa não apresentaram nem zoosporângios nem micélio. Sete isolados de fungos, três de actinomicetes e dois de bactérias permitiram o desenvolvimento de micélio, mas não dos zoosporângios. Alguns isolados tiveram um comportamento semelhante à testemunha com água e *P. nicotianae* (Tabela 5).

Dos isolados avaliados mediante o teste de pareamento de colônias, destacaram-se cinco fungos e dois actinomicetes. 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* sp. (isolado F12.3; obtido das parcelas com 15% de lodo e inoculada) e três *Aspergillus* spp. (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 *P. nicotianae* foram as bactérias (isolados B10.6 e B11.1), um actinomiceto (isolado A9.7) e dois fungos (F10.4 e F10.8).

## DISCUSSÃO

A supressividade a *P. nicotianae* foi diretamente proporcional à concentração de lodo de esgoto incorporado no solo (Figura 2). Esses resultados são coincidentes com os obtidos por outros autores, tanto para o manejo das doenças causadas por *Phytophthora* spp. Como por outros patógenos, em diversas culturas (Lumsden *et al.*, 1983; Bettiol & Krugner, 1984; Lewis *et al.*, 1992; Casale *et al.*, 1995; Widmer *et al.*, 1998; Hoitink & Boehm, 1999).

Dentre os fatores que podem explicar a supressividade a *P. nicotianae*, a presença de compostos tóxicos devido aos processos de decomposição da matéria orgânica adicionada ao solo é uma delas. Esses efeitos têm sido reportados por vários autores para diversos patógenos, usando diferentes fontes de matéria orgânica (Hoitink *et al.*, 1977; Casale *et al.*, 1995; Blok *et al.*, 2000). No presente trabalho, foram obtidas inibições do crescimento *in vitro* de colônias do patógeno quando colocado a crescer em meio de cultura acrescentado com extratos ácidos (Tabela 3), coincidente com os resultados obtidos por Widmer *et al.* (1998), sugerindo um possível efeito químico na indução de supressividade.

Nos experimentos realizados, quando se usaram as doses de inóculo maiores, os valores de recuperação da *P.*

**TABELA 3 - 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 (*Daucus carota*) (MC) contendo extratos aquosos, ácidos (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ou básicos (KOH) de lodo de esgoto (LE) em areia**

Tratamento	Dias após repicagem		AACC
	4	9	
Testemunha (MC)	5,43 <sup>1</sup> ab <sup>2</sup>	9,00 <sup>1</sup> a	52,56 a
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).

*nicotianae* foram menores, contrariamente ao esperado (Figura 2). Isto poderia ser explicado pelo tipo de inóculo empregado, grãos de trigo colonizados, os quais ao serem incorporados ao solo também são degradados e podem liberar substâncias tóxicas à *P. nicotianae*, incidindo negativamente em sua sobrevivência.

Um segundo fator que pode explicar a supressividade a *P. nicotianae* são os valores de condutividade elétrica obtidos quando o lodo de esgoto foi incorporado ao solo ou substrato (Figura 2). Lapeña *et al.* (2000) observaram que sob condutividade elétrica de até 5 dS m<sup>-1</sup> por 24 h, a viabilidade, e consequentemente a capacidade de infectar, dos zoosporângios de *P. citrophthora* diminuiu. Semelhantemente ao presente trabalho, Workneh *et al.* (1993) estabeleceram correlações negativas entre condutividade elétrica e presença de *P. parasitica* ou incidência da doença em plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

Um terceiro fator que pode explicar a supressividade a *P. nicotianae*, é o aumento da atividade microbiana do solo, onde as populações microbianas estabeleceriam um controle biológico mediante os mecanismos de competição, antibiose, parasitismo e indução de resistência (Hoitink & Boehm, 1999).

Malaczuk (1983) sugere que os principais mecanismos envolvidos no controle de *Phytophthora* spp. são competição por nutrientes e antibiose. Downer *et al.* (2001) sugerem que a produção de celulase e laminarinase é o principal mecanismo envolvido na supressividade a *P. cinnamomi* Rands. no sistema Ashburner, destruindo zoósporos e outros propágulos do patógeno; e afirmam que as enzimas são produzidas pela comunidade de fungos, entre eles *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., e que essa atividade enzimática é favorecida por valores de pH baixos.

A incorporação do lodo de esgoto ao solo não alterou as comunidades de fungos, actinomicetos e bactérias do solo, quando avaliada mediante a contagem de colônias em placas (Tabela 4), resultado coincidente com Lewis *et al.* (1992). Entretanto, Millner *et al.* (1981) constataram o aumento das comunidades de bactérias e actinomicetos como resposta à incorporação de lodo de esgoto, e Pascual *et al.* (2000) das comunidades de bactérias e fungos quando incorporaram composto de lixo urbano, com aumento das populações de pseudomonas fluorescentes e *Trichoderma* spp. Downer *et al.* (2001) obtiveram uma resposta variável dependendo do meio de cultura empregado para avaliar as comunidades microbianas dos solos com e sem cobertura, constatando mudanças nas populações de fungos saprófitas quando avaliadas em meio com Rosa de Bengala, e identificaram basidiomicetos crescendo sobre a cobertura que não foram isolados em nenhum dos meios de cultura. Os solos com cobertura tiveram uma maior diversidade de gêneros de fungos, dentre eles *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* (o qual não foi isolado dos solos sem cobertura).

Diversas espécies do gênero *Trichoderma* são bem conhecidas como agentes de controle biológico de doenças causadas por *Phytophthora* spp. (Malaczuk, 1983; Casale *et al.*, 1995; Costa *et al.*, 1996; Ahmed *et al.*, 1999), mas também fungos do gênero *Aspergillus* (Szejnberg & Tsao, 1986 citado por Fang & Tsao, 1995) e actinomicetos possuem capacidade de produção de antibióticos (Malaczuk, 1983; You *et al.*, 1996).

Devido à complexidade dos processos envolvidos, para determinar o impacto potencial do agregado 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. Embora o

**TABELA 4 - Comunidades de fungos, actinomicetos e bactérias (unidades formadoras de colônias – ufc) isoladas do solo das parcelas do campo com e sem inóculo de *Phytophthora nicotianae* isolado IAC 01/95, aos 28 dias após inoculação, nos diferentes tratamentos de solo sem lodo e com adubo mineral (0+A), ou com incorporação de lodo de esgoto nas proporções 0; 7,5; 10 e 15% v/v**

Organismo	Tipo de solo	Tratamentos do solo (% lodo v/v)					
		0+A	0	5	7,5	10	15
Fungos (ufc . g solo <sup>-1</sup> )	Sem inóculo	4,17	4,94	4,57	4,67	4,42	4,01
	Com inóculo	4,75	4,97	4,43	4,62	4,49	4,49
Actinomicetos (ufc . g solo <sup>-1</sup> )	Sem inóculo	5,27	5,60	5,41	5,43	5,31	5,39
	Com inóculo	5,47	4,11	5,42	5,17	5,26	5,44
Bactérias (ufc . g solo <sup>-1</sup> )	Sem inóculo	6,35	7,21	7,24	7,17	7,67	7,31
	Com inóculo	6,84	7,32	6,82	6,89	6,98	7,44

**TABELA 5 - Potencialidade de alguns isolados de fungos, actinomicetos e bactérias quanto ao antagonismo a *Phytophthora nicotianae*, pelo método de infestação de plântulas de alfafa (*Medicago sativa*)**

Nível de infestação com <i>P. nicotianae</i> das plântulas de alfafa	Isolados		
	Fungos	Actinomicetos	Bactérias
Z=0 e M=0 <sup>1,2</sup>	F9.1 <sup>3</sup>	A12.1	-----
Z=0	F9.1, F11.1, F10.4, F10.8, F8.3/4, F12.3, F8.10	A12.1, A9.7, A2.1	B11.1, B10.6
Z<0,75 e M<1,0	F9.1, F10.4, F4.1, F2.1, F8.10, F7.1, F10.1, F8.3/2	A12.1, A3.2, A4.2, A6.6, A4.1b, A6.1, A9.7, A2.1, A6.5, A6.4	B11.5, B11.1, B11.3, B10.10
Z > 3,0	F5.3, F2.2, F3.5, F10.5, F4.7, F10.9, F4.4, F10.3	A3.1, A9.6	B10.2, B10.3, B11.2, B1.6, B10.11, B11.4, B11.8, B11.6, B1.10, B1.1, B1.13, B10.4, B10.1, B10.12, B1.8, B1.5, B10.9

<sup>1</sup>Z = N° de zoosporângios por plântula, 0= sem zoosporângios, 1 = 1 a 5; 2= 6 a 10; 3 = 11 a 50, 4 = >51; M = presença de micélio de *Phytophthora nicotianae* nas plântulas, 0 = sem micélio, 1 = pouco, 2 = médio, 3 = muito.

<sup>2</sup>médias de quatro repetições

<sup>3</sup> A primeira letra do nome do isolado corresponde ao grupo de microrganismo (F: fungos, A: actinomicetos e B: bactérias). O primeiro número do nome do isolado corresponde ao tratamento: 1= parcelas sem lodo e sem inóculo de *Phytophthora nicotianae*, 2= com adubo mineral e sem inóculo, 3= com 5% de lodo e sem inóculo, 4= com 7,5% de lodo e sem inóculo, 5= com 10% de lodo e sem inóculo, 6= com 15% de lodo e sem inóculo, 7= sem lodo e com inóculo, 8= com adubo mineral e com inóculo, 9= com 5% de lodo e com inóculo, 10= com 7,5% de lodo e com inóculo, 11= com 10% de lodo e com inóculo, 12= com 15% de lodo e com inóculo.

bioensaio empregado no presente trabalho tenha mostrado capacidade na seleção de isolados, não se deve esquecer a necessidade de testar estes isolados em planta e sob diferentes condições de crescimento das mesmas, assim como a sua sobrevivência no solo.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A.S., PEREZ-SANCHEZ, C., EGEEA, C. & CANDELA, M.E. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant Pathology* 48:58-65. 1998.

ANDREOLI, C.V. & PEGORINI, E.S. Gestão pública do uso agrícola do lodo de esgoto. In: Bettiol, W. & Camargo, O. A. (Eds). Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2000. pp: 281-312.

BETTIOL, W. & KRUGNER, T.L. Influência do lodo de esgoto na severidade da podridão de raiz do sorgo causada por *Pythium arrhenomanes*. *Summa Phytopathologica* 10:243-251. 1984.

BLOK, W.J., LAMERS, J.G., TERMORSHUIZEN, A.J. & BOLLEN, G.J. Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. *Phytopathology* 90:253-259. 2000.

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* 70:315-352. 1995.

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

DOWNER, A.J., MENGE, J.A. & POND, E. Association of

cellulolytic enzyme activities in eucalyptus mulches with biological control of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 91:847-855. 2001.

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

FANG, J.G. & TSAO, P.H. Efficacy of *Penicillium funiculosum* as a biological control agent against phytophthora root rots of azalea and citrus. *Phytopathology* 85:871-878. 1995.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: Luz, E.D.M.N., Santos, A.F., Matsuoka, K. & Bezerra, J.L. (Eds.). Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas. Livraria Rural. 2001. pp.283-342.

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* 75:1041-1044. 1991.

GRIMM, G.R. & ALEXANDER, A.F. Citrus leaf pieces as traps for *Phytophthora parasitica* from soil slurries. *Phytopathology* 63:540-541. 1973.

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

HOITINK, H.A.J., VAN DOREN, D.M. & SCHMITTHENNER, A.F. Suppression of *Phytophthora cinnamomi* in a compostes hardwood bark potting medium. *Phytopathology* 67:561-565. 1977.

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

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 plântulas de cinco portainjertos de cítricos. Resúmenes, 10° Congreso de la Sociedad



- Española de Fitopatología, Valencia. 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* 11:260-266. 1992.
- LUMSDEN, R.D., LEWIS, J.A. & MILLNER, P.D. Effect of composted sewage sludge on several soilborne pathogens and diseases. *Phytopathology* 73:1543-1548. 1983.
- MALAJCZUK, N. Microbial antagonism to *Phytophthora*. In: Erwin, D.C., Bartnicki – Garcia, S. & Tsao, P.H. (Eds). *Phytophthora*. Its biology, taxonomy, ecology and pathology. St. Paul, APS Press. 1983. pp. 197-218.
- MILLNER, P.D., LUMSDEN, R.D. & LEWIS, J.A. Controlling plant disease with sludge compost. *BioCycle* 22:50-52. 1981
- PASCUAL, J.A., HERNANDEZ, T., GARCIA, C., DE LEIJ, F.A.A.M. & LYNCH, J.M. Long-term suppression of *Pyhium ultimum* in arid soil using fresh and composted municipal wastes. *Biology and Fertility of Soils* 30:478-484. 2000.
- WIDMER, T.L., GRAHAM, J.H. & MITCHELL, D.J. Composted municipal waste reduces infection of citrus seedlings by *Phytophthora parasitica*. *Plant Disease* 82:683-688. 1998.
- 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* 83:581-589. 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* 22:237-242. 1996.