



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

**BIOFERTILIZANTE COMO CONTROLE ALTERNATIVO DA MANCHA MARROM DE
ALTERNARIA**

Jéssica Lírith **Camargo**^{1a}; Katia Cristina **Kupper**^{2b}.

Nº 13114

RESUMO - O presente trabalho teve por objetivo estudar a produção de biofertilizantes, a partir da digestão anaeróbica e aeróbica de esterco bovino, no controle da mancha marrom de alternaria. Avaliou-se o efeito dos biofertilizantes no crescimento micelial de *A. alternata*, ao longo do tempo, de maneira que amostras dos compostos foram coletadas a cada cinco dias, a partir da data de preparo dos compostos até o 60º dia (12 coletas). As amostras foram filtradas em membrana millipore (0,22µm) e distribuídas em meio de cultura BDA fundente nas concentrações 0; 10,0 e 20,0% do biofertilizante. Fez-se, ainda, uma última coleta quando os compostos estavam com 83 dias de produção, avaliando-se os metabólitos termoestáveis e livres de células sobre o desenvolvimento do fungo. Com 103 dias de produção, amostras dos biofertilizantes foram coletadas, sendo que, uma parte foi filtrada em membrana millipore (0,22 µm) e outra parte foi submetida à autoclavagem a 120°C, por 20 minutos. Os compostos foram testados nas concentrações 0; 10; 15; 20; 25 e 30% quanto à capacidade de inibirem a germinação de conídios do fitopatógeno. Na avaliação ao longo do tempo, verificou-se que o biofertilizante anaeróbio (20%) aos 20, 30 e 55 dias de idade, proporcionou inibições da colônia do patógeno acima de 45 %. Para o ensaio de avaliação dos biofertilizantes aos 83 dias de maturação e submetidos à autoclavagem, constatou-se que o biofertilizante anaeróbio, em concentrações acima de 25%, apresentou inibições das colônias próximo a 30%. Quando se avaliou os biofertilizantes livres de células de microrganismos constatou-se que os mesmos inibiram o crescimento micelial do fungo em concentrações acima de 10% do composto. Os biofertilizantes: anaeróbio e aeróbio, em todas as concentrações, proporcionaram inibições na germinação dos conídios.

Palavras-chaves: *Alternaria alternata*, esterco bovino, metabólitos

^a Bolsista CNPq: Graduação em Agroecologia, jessica_lirith@hotmail.com, ^bOrientadora: Kátia Cristhina Kupper.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

ABSTRACT- The present work aimed to study the production of biofertilizers from the aerobic and anaerobic digestion of manure in the control of *Alternaria* brown spot. We evaluated the effect of biofertilizers on mycelial growth of *A. alternata*, over time, so that the composite samples were collected every five days from the date of preparation of the compounds until the 60th day. The samples were filtered through Millipore membrane (0.22 μm) and distributed in PDA at concentrations of 0, 10.0 and 20.0% of biofertilizer. When the compounds were with 83 days of production, it was evaluated the thermostable metabolites and free cells metabolites on the development of the fungus. Biofertilizers samples with 103 days of production were collected, and a portion was filtered through a Millipore membrane (0,22 μm) and another part was subjected to autoclaving at 120° C for 20 minutes. The compounds were tested at concentrations of 0, 10, 15, 20, 25 and 30% for the ability to inhibit the germination of conidia of pathogen. In the assessment over time, it was found that the anaerobic biofertilizer (20%) at 20, 30 and 55 days provided the colony inhibition of the pathogen over 45%. For the test evaluation of biofertilizers (83 days of production) subjected to autoclaving, it was found that the anaerobic biofertilizer in concentrations above 25%, showed inhibition of colony about 30%. When assessing the cell-free biofertilizer microorganisms was found that they inhibited mycelial growth at concentrations above 10% of the compound. Biofertilizers: anaerobic and aerobic, at all concentrations, resulted in inhibition of spore germination.

Key-words: *Alternaria alternata*, manure, metabolite

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados do AGRIANUAL (2011), a produção brasileira de tangerinas apresentou 1,07 milhões em 2008, com uma área colhida de 53 mil hectares, sendo uma das principais variedades cítricas para consumo in natura. Não obstante a importância que a atividade citrícola tem para a economia nacional, os pomares de tangerinas são acometidos por uma série de doenças que são responsáveis por reduções consideráveis na produtividade e na qualidade das frutas, tornando-se, em muitos casos, fatores limitantes de produção. Dentre tais doenças, encontra-se a mancha marrom de alternaria (MMA) causada pelo fungo *Alternaria alternata*.

A. alternata afeta folhas, ramos e frutos de tangerinas, tangores e tangelos, podendo ocasionar a queda de folhas, seca de ramos e queda prematura de frutos. As medidas de controle da doença baseiam-se, principalmente, no uso de fungicidas. Os problemas advindos do uso intensivo de fungicidas têm aumentado o interesse em desenvolver técnicas alternativas, dentre essas o uso de extratos aquosos de matéria orgânica e biofertilizantes que possuem uma

^a Bolsista CNPq: Graduação em Agroecologia, jessica_lirith@hotmail.com, ^bOrientadora: Kátia Cristhina Kupper.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

complexa e elevada comunidade microbiana (KUPPER et al., 2006), os quais podem ser introduzidos nos agroecossistemas por meio de pulverizações foliares, fertirrigação ou, aplicados diretamente ao solo. Trabalhos na literatura têm recomendado o uso de biofertilizante produzido pela digestão anaeróbica de esterco bovino no controle de doenças (KUPPER et al. (2006 e 2009).

O presente trabalho teve por objetivo estudar a produção de biofertilizantes, a partir da digestão anaeróbica e aeróbica de esterco bovino, no controle da mancha marrom de alternaria.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Produção dos Biofertilizantes

Duas diferentes receitas de biofertilizantes à base de esterco bovino foram utilizadas nos ensaios, uma produzida em condições anaeróbicas, em balde fechado com tampa vedante, conectada à uma mangueira imersa em água, permitindo a saída do metano e outro foi produzido em condições aeróbicas.

2.2. Produção de inóculo de *Alternaria alternata*

Para a realização de todos os ensaios, foi utilizado um isolado de *Alternaria alternata* denominado A1-3, pertencente à micoteca do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis/SP. Conídios do fitopatógeno foram produzidos em meio de cultura, seguindo a metodologia adotada por CANIHOS et al. (1999).

2.3. Efeito dos biofertilizantes no crescimento micelial de *Alternaria alternata*

Para avaliar o efeito dos biofertilizantes sobre o crescimento micelial de *A. alternata*, ao longo do tempo, amostras dos compostos foram coletadas a cada cinco dias, a partir da data de preparo dos compostos até o 60º dia (12 coletas). As amostras foram filtradas em membrana millipore (0,22µm) e distribuídas em meio de cultura BDA fundente com diferentes concentrações (0; 10,0 e 20,0%) de cada biofertilizante. Quando os biofertilizantes estavam com 83 dias de produção foram retiradas novas amostras as quais foram avaliadas quanto à produção de metabólitos termoestáveis que foram produzidos durante a produção do composto, nas concentrações de 0,0; 5,0; 10,0; 20,0; 25,0 e 30,0%, assim como, os compostos livres de células de microrganismos, porém para esses ensaios os biofertilizantes foram testados nas concentrações de 0,10,0, 20,0 e 30,0%. Como testemunha, utilizaram-se os meios com BDA diluídos em água nas mesmas concentrações. Após a solidificação dos meios em placas de Petri, discos de 5 mm de diâmetro contendo colônias *A. alternata* foram transferidos para o centro das mesmas, os quais foram incubados em estufa para B.O.D a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12/12h, durante oito dias. As avaliações do crescimento micelial do fitopatógeno foi realizada por meio de medições do diâmetro

^a Bolsista CNPq: Graduação em Agroecologia, jessica_lirith@hotmail.com, ^bOrientadora: Kátia Cristhina Kupper.



das colônias, em dois sentidos perpendiculares. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições. Para comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

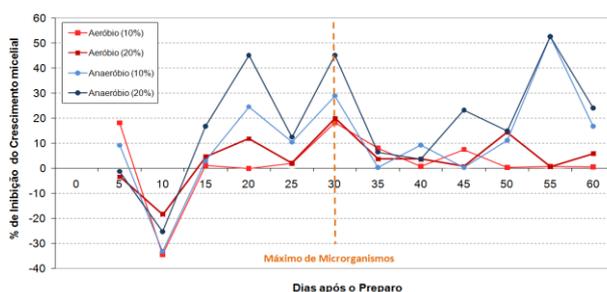
2.4. Efeito do biofertilizante na germinação de conídios de *Alternaria alternata*

Os biofertilizantes (103 dias de idade) foram testados nas concentrações de 0; 10; 15; 20; 25 e 30%, diluídos em água destilada e esterilizada, quanto à capacidade de inibir a germinação de conídios do patógeno. Após as respectivas diluições dos biofertilizantes, duas amostras de cada tratamento foram retiradas, sendo que, uma delas foi filtrada em papel de filtro e, em seguida, submetida a filtração em membrana millipore (0,22 μm), obtendo assim um filtrado livre de células de microrganismos e a outra amostra foi submetida à autoclavagem a 120°C, por 20 minutos a 1 atm de pressão. Sobre lâminas de microscopia contendo ágar-água, foi depositada uma gota de 10 μL do biofertilizante e uma gota de 10 μL da suspensão de conídios do patógeno (1×10^4 conídios/mL). Para os tratamentos testemunhas foram colocadas gotas de água no lugar dos biofertilizantes. As lâminas foram colocadas em caixas de Gerbox fechadas, contendo um chumaço de algodão umedecido e as culturas foram incubadas em B.O.D a 27°C, com fotoperíodo (12/12h) por 14 horas. A avaliação foi realizada através da contagem do número de conídios germinados e não germinados, em um total de 100 conídios, efetuando-se o cálculo da porcentagem de germinação. Foi utilizado um DIC, sendo cada tratamento composto por 10 repetições. Para comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito do tempo de coleta dos biofertilizantes, sobre a ação dos metabólitos no crescimento micelial de *A. alternata*

Foram constatadas amplas variações do efeito de metabólitos sobre o crescimento micelial do patógeno em intervalos de tempo. Para o biofertilizante anaeróbico (a 20%), foi observado aos 20, 30 e 55 dias, níveis de inibições da colônia do patógeno acima de 45 % (Figura 2).





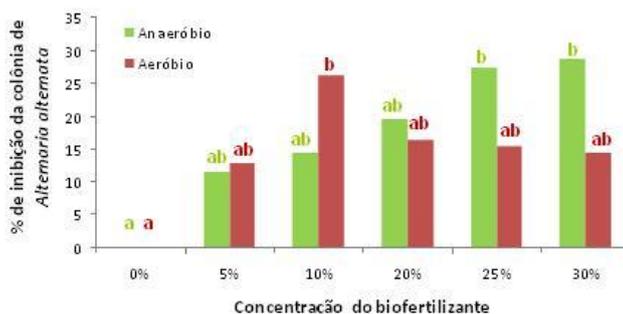
VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Figura 2. Efeito dos metabólitos livres de células a 10% e 20%, no crescimento micelial de *A. alternata* ao longo do tempo.

Uma hipótese para este comportamento em biofertilizantes líquidos pode ser formulada com base na produção de diferentes tipos de metabólitos ao longo do tempo, conforme descrito por Medeiros et al., 2003. Um dos picos de inibição no crescimento micelial, coincide com o máximo de unidades formadoras de colônias (UFC) (dados não publicados) presentes no tambor, o que pode estar correlacionado com o máximo teor de metabólitos secundários. Outro pico de inibição ocorre conjuntamente ao decréscimo acentuado no número de UFCs, que por sua vez, corresponde ao máximo de metabólitos associados à fase de biodegradação ou morte celular. Estes metabólitos provavelmente possuem compostos antifúngicos, antibióticos e toxinas em maior quantidade (Medeiros et al., 2003). Quanto ao favorecimento do crescimento micelial do patógeno, observado aos 10 dias de preparo dos biofertilizantes, considera-se a possibilidade de produção de metabólitos primários, que em tese, converteram ingredientes brutos acrescentados na receita, em formas nutricionais assimiláveis, tais como a glicose, disponibilizada após hidrólise das cadeias de celulose. (Rashamuse, 2013).

3.2 Efeito de diferentes concentrações dos biofertilizantes sobre o crescimento micelial de *A. alternata*

O biofertilizante anaeróbio, em concentrações acima de 25% apresentou diferença significativa no crescimento micelial do patógeno, com níveis de inibição da colônia do fungo próximos à 30% (Figura 3). Silva et al (2013) observaram resultados similares sob o crescimento micelial de *P. nicotianae* utilizando-se a mesma receita de biofertilizante e tempo de preparo sob digestão anaeróbia, porém, os autores observaram 100% de inibição quando aplicadas concentrações acima de 25%. Tratch & Bettiol (1997), também observaram inibição total no crescimento micelial de *A. solani* com a aplicação de um biofertilizante anaeróbico à base de esterco bovino, em concentrações acima de 20%.



^a Bolsista CNPq: Graduação em Agroecologia, jessica_lirith@hotmail.com, ^bOrientadora: Kátia Cristhina Kupper.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Figura 3: Efeito de biofertilizantes, com 83 dias de produção e autoclavagem a 120°C por 20 minutos a 1 atm de pressão, na porcentagem de inibição da colônia de *Alternaria alternata*.

No ensaio de aplicação dos biofertilizantes filtrados em membrana Millipore, ambos biofertilizantes inibiram o crescimento micelial do fungo em concentrações acima de 10%. Destes, o biofertilizante anaeróbico proporcionou porcentagem de inibições da colônia de *Alternaria* que variaram de 32 e 39%, e foi significativamente melhor (a 20%) que o aeróbico, que se manteve entre 15,8 e 34,9% de inibições (Figura 4).

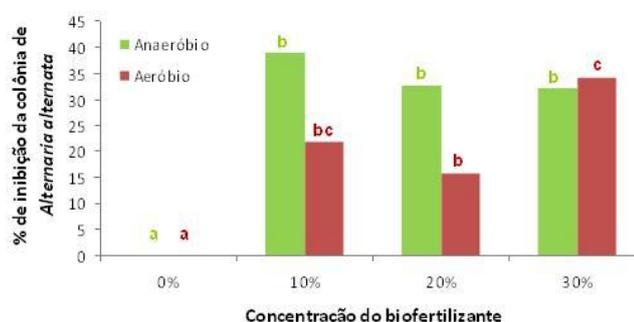


Figura 4: Efeito de biofertilizantes com 83 dias de produção e filtragem em membrana millipore (0,22 μ m), na porcentagem de inibição da colônia de *Alternaria alternata*.

3.3 Efeito de diferentes concentrações dos biofertilizantes sobre a germinação de conídios de *A. alternata*

A germinação dos conídios de *Alternaria* foi inibida pelos biofertilizantes anaeróbico e aeróbico em todas as concentrações dos compostos testados, tanto para metabólitos termoestáveis quanto para os livres de células de microrganismos. Sobretudo, o efeito dos metabólitos livres de células foi significativamente superior ao dos metabólitos termoestáveis, evidenciando importante papel dos compostos extracelulares, termossensíveis, dentro deste processo. Quando autoclavados, os dois biofertilizantes apresentaram níveis crescentes de inibições na germinação do fungo, correspondentes às concentrações aplicadas (Figura 5). Os melhores resultados para o biofertilizante anaeróbico foram observados em concentrações acima de 20%, atingido níveis de 51,4 a 70% de inibição. Já para o aeróbico, concentrações acima de 25% apresentaram níveis de inibições entre 54,4 e 55,7%. Para os metabólitos livres de células, o efeito do biofertilizante anaeróbico na germinação de conídios, resultou em níveis de inibição superiores a 57%, quando aplicado em concentrações acima de 20% e alcançou o melhor resultado na concentração de 30% com 82% de inibição na germinação de conídios (Figura 6). Já os melhores resultados para o biofertilizante aeróbico variaram de 60 a 68% de inibição, sendo que as concentrações 15%, 20%, 25% e 30% não diferiram estatisticamente.

^a Bolsista CNPq: Graduação em Agroecologia, jessica_lirith@hotmail.com, ^bOrientadora: Kátia Cristhina Kupper.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

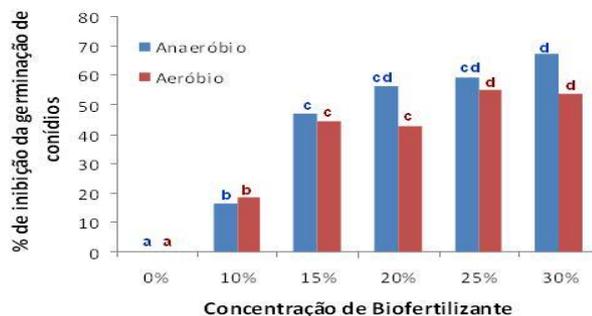


Figura 5: Efeito dos biofertilizantes, após autoclavagem a 120°C por 20 minutos a 1 atm de pressão, na porcentagem de inibição da germinação de conídios de *Alternaria alternata*.

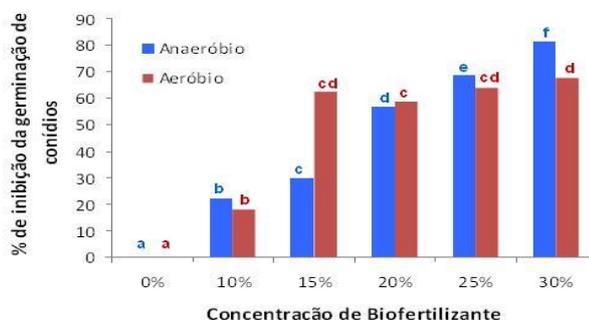


Figura 6: Efeito dos biofertilizantes, após filtragem em membrana millipore (0,22 µm), na porcentagem de inibição da germinação de conídios de *Alternaria alternata*.

Para os testes de germinação de conídios de *A. alternata*, o biofertilizante anaeróbio foi significativamente superior ao aeróbio, tanto para metabólitos termoestáveis (concentrações acima de 20%) quanto para livres de células (concentrações acima de 25%). O biofertilizante aeróbio apresentou melhores resultados já nas menores concentrações aplicadas, o que aponta para seu potencial de uso, sob menores riscos de fitotoxidez. Os melhores resultados podem estar associados ao biofertilizante anaeróbio e, pode decorrer do possível desenvolvimento de populações do gênero *Bacillus*. Por serem anaeróbias facultativas estas bactérias seriam favorecidas em tambores fechados, quando comparadas à outros microrganismos aeróbios estritos. A produção de metabólitos com atividade fungitóxica, por *B. subtilis* (Asaka & Shoda, 1996) é outro fator que corrobora com esta hipótese.

4. CONCLUSÕES

Biofertilizantes produzidos a partir da digestão anaeróbia e aeróbia de esterco bovino apresentam potencial para controle da mancha marrom de alternaria. Metabólitos extracelulares

^a Bolsista CNPq: Graduação em Agroecologia, jessica_lirith@hotmail.com, ^bOrientadora: Kátia Cristhina Kupper.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

termossensíveis possuem um papel importante no controle do patógeno e o tempo de produção dos biofertilizantes exerce grande variação na produção de metabólitos para o controle da doença.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida. Ao IAC – Centro Apta Citros Sylvio Moreira, pela oportunidade de estágio.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL 2011: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2011. p.275-277.
- ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 62, p. 4081-4085, 1996.
- CANIHOS, Y., PEEVER, T.L., TIMMER, L.W. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of *Minneola* tangelo leaves by *Alternaria* sp. *Plant Disease*, v. 83, p.429-433, 1999.
- FEICHTENBERGER, E., BASSANEZI, R.B., SPÓSITO, M.B., BELASQUE JR., J. Doenças dos Citros. In: KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A. (Eds.). *Manual de Fitopatologia*, v. 2. São Paulo: Editora Ceres, p.239-269, 2005.
- KUPPER, K. C., BELLOTTE, J. A. M., DE GOES, A. Controle Alternativo de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 31, p. 1004-1015, 2009.
- KUPPER, K.C., BETTIOL, W., GOES, A. De, SOUZA, P.S. de, BELLOTTE, J.A.M. Biofertilizer for control of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *Crop Protection*, v. 25, p.569-573, 2006.
- MEDEIROS, M.B.; WANDERLEY, P.A.; WANDERLEY, M.J.A. Biofertilizantes líquidos: Processo trofobiótico para proteção de plantas em cultivos orgânicos. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, p. 38-44. 2003.
- RASHAMUSE, K. J. et al. Characterisation of Two Bifunctional Cellulase–Xylanase Enzymes Isolated from a Bovine Rumen Metagenome Library. *Current microbiology*, v. 66, n. 2, p. 145-151, 2013.
- TRATCH, R.; BETTIOL, W. Efeito de biofertilizantes sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de alguns fungos patogênicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.32, n.11, p.1131-1139, 1997.

^a Bolsista CNPq: Graduação em Agroecologia, jessica_lirith@hotmail.com, ^bOrientadora: Kátia Cristhina Kupper.