

PATRÍCIA DA SILVA MACHADO

ERRADICAÇÃO DE INÓCULO DE FITOPATÓGENOS NA ÁGUA DE
IRRIGAÇÃO PARA VIVEIROS FLORESTAIS

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011



**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M149e
2011

Machado, Patrícia da Silva, 1985-
Erradicação de inóculo de fitopatógenos na água de
irrigação para viveiros florestais / Patrícia da Silva
Machado. – Viçosa, MG, 2011.
viii, 27f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Acelino Couto Alfenas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 23-27

1. Microorganismos fitopatogênicos. 2. Água de irrigação.
3. Bactérias fitopatogênicas. 4. Fungos fitopatogênicos.
5. Eucalipto. 6. Ultrafiltração. 7. Físico - química.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 632.3

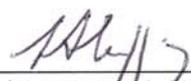
PATRÍCIA DA SILVA MACHADO

Erradicação de inóculo de fitopatógenos na água de irrigação para viveiros florestais

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de fevereiro de 2011.


Cláudio Mudado Silva
(Co-orientador)


Luiz Antonio Maffia
(Co-orientador)


Fernando Palha Leite


Gleiber Quintão Furtado


Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

“Seja bom com os outros. A distância que você caminha na vida vai depender da sua ternura com os jovens, da sua compaixão com os idosos, sua compreensão com aqueles que lutam, da sua tolerância com os fracos e os fortes. Porque algum dia na vida você poderá ser um deles.”

George Washington Carver

Dedico

Aos meus pais por todo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e ao meu irmão por todo o amor, incentivo e por sempre acreditarem em mim.

A toda minha família que mesmo distante sempre me incentivou.

Ao Prof. Acelino pela orientação, conselhos, amizade e por todas as oportunidades desde a iniciação científica.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realizar o curso de graduação em Engenharia Florestal e mestrado em Fitopatologia.

Ao Departamento de Fitopatologia pela estrutura que possibilitou a realização do curso de mestrado.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, em especial ao Prof. José Rogério e Olinto Pereira pelos ensinamentos, amizade e pelos inúmeros conselhos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio e incentivo ao desenvolvimento científico.

Ao meu co-orientador, Prof. Cláudio Mudado pela colaboração, pelos conselhos e por disponibilizar equipamentos, laboratório e até mesmo funcionários e estudantes para a execução dos experimentos no Laboratório de Papel e Celulose do DEF/UFV.

Ao meu co-orientador Prof. Luis Antônio Maffia pelos conselhos, colaboração e disponibilidade.

As empresas Cenibra, Klabin, Plantar, Santos & Dias, Suzano Papel e Celulose, Veracel e Vallourec & Mannesmann por toda contribuição com este trabalho.

A todos os funcionários e estudantes do Laboratório de Papel e Celulose do DEF/UFV em especial ao Ismarley, Zé, André e Valéria, obrigada por toda ajuda.

Ao Luís Eduardo da Estação de Tratamento de Água (ETA) da UFV por todas as informações e colaboração.

Ao Sérgio Ribeiro da Koch Membrane Systems por fornecer as membranas de ultrafiltração utilizadas neste trabalho.

A todos os estudantes e funcionários do Laboratório de Patologia Florestal pela amizade e ótima convivência durante todos esses anos.

Ao Marcelo pela amizade, conselhos e por toda contribuição em todas as fases deste trabalho.

Ao Renildo pela amizade e pelas idéias geniais.

À grande amiga Márcia pela amizade e por sempre estar disposta a ajudar.

Aos amigos Talyta e Lúcio pela amizade e pelos conselhos.

A todas amigas de república, atuais ou não, pela ótima convivência e boas risadas.

A todos os amigos que estão sempre por perto e aos amigos do curso de Engenharia Florestal pelos ótimos momentos.

Aos amigos do mestrado, em especial ao Dú, Dalila (Fofs), Michelle e a doutoranda Érica por todo o carinho, amizade e pelos ótimos momentos.

Ao Helton por toda amizade, carinho e pelas inúmeras vezes que me ajudou.

À Jana, Maíra, Liginha e a todos os amigos que mesmo longe eu nunca me esqueço.

Ao Teodoro, Laura e Karine por todo apoio, carinho e atenção.

Ao Rodrigo e a Camila por todo o carinho, dedicação e responsabilidade na execução de todos os experimentos, vocês foram fundamentais.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

PATRÍCIA DA SILVA MACHADO, filha de Baltazar Machado e Ilza da Silva Machado, nasceu em 13 de fevereiro de 1985 em Formiga, Minas Gerais.

Em março de 2004, ingressou no curso de Engenharia Florestal na Universidade Federal de Viçosa. De Julho de 2005 a dezembro de 2008, manteve suas atividades ligadas à pesquisa como estudante de Iniciação Científica no Laboratório de Patologia Florestal/Bioagro do Departamento de Fitopatologia da UFV, sob orientação do Professor Acelino Couto Alfenas.

Em março de 2009, iniciou o curso de mestrado em Fitopatologia na mesma instituição.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	viii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	3
2.1 - Microrganismos fitopatogênicos testados	3
2.2 - Tratamento da água contaminada por ultrafiltração	5
2.3 - Tratamento físico-químico convencional da água contaminada	6
2.3.1 – Determinação da concentração mínima de cloro residual para erradicação de inóculo de fitopatógenos	7
2.3.2 – Fitotoxicidade do cloro residual na água de irrigação a mudas de eucalipto	8
2.4 - Constatação de inóculo nas amostras de água infestada não tratada e infestada tratada.....	9
2.5 – Intensidade de doença em mudas de eucalipto e tomateiro atomizadas com água infestada não tratada e infestada tratada.....	10
2.6 – Análises estatísticas	11
3 - RESULTADOS	12
3.1 - Tratamento da água contaminada por ultrafiltração	12
3.2 - Tratamento físico-químico da água contaminada.....	14
3.2.1 - Determinação da concentração mínima de cloro residual para erradicação de inóculo de fitopatógenos	14
3.2.2 - Fitotoxicidade do cloro residual na água de irrigação de mudas de eucalipto	16
3.2.3 – Eficiência do tratamento físico-químico da água contaminada.....	17
4 – DISCUSSÃO	19
5– CONCLUSÕES	23
6– REFERÊNCIAS.....	23

RESUMO

MACHADO, Patrícia da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Erradicação de inóculo de fitopatógenos na água de irrigação para viveiros florestais**. Orientador: Acelino Couto Alfenas. Co-orientadores: Cláudio Mudado Silva e Luiz Antônio Maffia.

No passado, não havia conscientização em minimizar o consumo de água em virtude de sua abundância e facilidade de obtenção. Entretanto, atualmente tem aumentado o interesse pelo uso racional da água e sua reutilização, especialmente em viveiros florestais. Porém, antes de sua reutilização, a água tem que ser devidamente tratada visando à erradicação de inóculo fitopatogênico a fim de minimizar os riscos de dispersão de patógenos e mitigar as perdas causadas por doenças. No presente trabalho, avaliou-se a eficiência do tratamento da água por ultrafiltração e pelo método físico-químico convencional visando à erradicação de inóculo de *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis*, *Botrytis cinerea* e *Cylindrocladium candelabrum*, principais patógenos, comumente encontrados em viveiros florestais. A ultrafiltração permitiu erradicar acima de 99% de inóculo de *R. solanacearum*, *X. axonopodis* e *B. cinerea* e 100% de *C. candelabrum*. A baixa quantidade de inóculo remanescente dos três primeiros patógenos não induziu doenças nas mudas inoculadas. A floculação e filtração rápida em filtro de areia empregadas no método físico-químico permitiram erradicação completa de inóculo de *C. candelabrum*, mas para os demais patógenos obteve-se a erradicação total somente após cloração da água filtrada com cloro residual a partir de 1,74 mg/L. Mudas de três clones de eucalipto irrigadas por 45 dias com água contendo cloro residual a 1,74 mg/L não apresentaram sintomas de fitotoxicidade. Ambos os métodos testados são práticos, viáveis e principalmente seguros visando à eliminação de inóculo de fitopatógenos da água de irrigação.

ABSTRACT

MACHADO, Patrícia da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Eradication of phytopathogens inoculum to forest nurseries irrigation water.** Adviser: Acelino Couto Alfenas. Co-advisers: Cláudio Mudado Silva e Luiz Antônio Maffia.

In the past, there was no preoccupation in minimizing water consumption which was probably due the belief of its abundance and easy access. Nowadays, the interest in water conservation and reuse has increased especially in forest nurseries. However, before water is reused it must be treated in order to minimize the risk of spread inocula of pathogens and to reduce losses caused by diseases. In this study, water treatment processes of ultrafiltration and conventional physical-chemical treatment were evaluated regarding the eradication inocula of *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis*, *Botrytis cinerea* and *Cylindrocladium candelabrum*, the most common nursery pathogens in Brazil. The ultrafiltration eradicated over 99% inocula of *R. solanacearum*, *X. axonopodis* and *B. cinerea* and 100% of inoculum of *C. candelabrum*. The treated water was tested for irrigation and yielded no infected eucalyptus rooted cuttings. Sand filtration used in the physical-chemical treatment system allowed complete eradication of *C. candelabrum* inoculum, but complete inoculum eradication of the other pathogens was only achieved after chlorination of the filtered water with residual chlorine from 1.74 mg/L. No symptoms of phytotoxicity were found on *Eucalyptus* rooted cuttings irrigated with water containing residual chlorine at 1.74 mg/L. Both methods tested are practical, viable and safe to eradicate phytopathogens inoculum from irrigation water

1 - INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural limitado e cada vez mais escasso. Na maioria dos países, 60 a 90% do consumo da água é destinado à agricultura (ORON *et al.*, 2008), e no Brasil a estimativa é de 70% (MANCUSO & SANTOS, 2003). A disponibilidade de água de boa qualidade e em quantidade suficiente é essencial em todas as fases de produção de mudas de eucalipto. A água utilizada em viveiros pode originar-se de reservatórios de água de chuva, mananciais superficiais (rios, riachos, lagoas e represas) e poços artesianos.

Dependendo do manejo adotado, o consumo de água em um viveiro florestal pode variar de 35 a 49 L/dia por milheiro de mudas, sendo que 70% do consumo total é destinado às áreas de crescimento e rustificação (RODRIGUES, 2007). Porém, em um estudo preliminar (dados não publicados) sobre o consumo de água, realizado em oito viveiros clonais de eucalipto do país, foi constatada uma maior variação entre 9 a 38L/ dia por milheiros de mudas. Nesse mesmo estudo, constatou-se que apenas dois viveiros coletam água exclusivamente de poços artesianos e os demais possuem duas ou mais fontes de captação como lagoas, represas ou córregos. Além disso, a maioria dos viveiros coletam água da chuva mas essa é descartada juntamente com o efluente.

Atualmente, tem aumentado o interesse pela minimização do consumo e reutilização da água de irrigação, sobretudo devido à sua escassez, ao aumento da demanda e às pressões da sociedade. A irrigação em um circuito fechado possui concentrações significativas de nutrientes (TOZE, 2006), o que pode reduzir em mais de 50% o consumo de fertilizantes e aproximadamente 30% o consumo de água (VERNOOIJ, 1992). Porém, a água reutilizada pode estar contaminada por fungos (SHOKES *et al.*, 1979), oomicetos (WERRES *et al.*, 2007, MacDONALD, *et al.*, 1994), bactérias (NORMAN *et al.*, 2003, GENT *et al.*, 2005) e nematóides (FAULKNER & BOLANDER, 1970) e deste modo, constituir fonte de inóculo e via de dispersão de patógenos, o que pode causar doenças e perdas significativas na produção de mudas (NEHER & DUNIWAY, 1992, SANOGO & MOORMAN, 1993).

Análises da água não tratada, oriunda das diferentes fases da propagação clonal de eucalipto, mostraram que esporos de *Botrytis cinerea* Pers. e *Cylindrocladium candelabrum* Viégas são frequentemente encontrados, constituindo

uma importante fonte de inóculo (MAFIA *et al.*, 2008). Outros organismos comumente associados a infecções de mudas de eucalipto e que se dispersam rapidamente em viveiros, em virtude das altas temperaturas e da abundante disponibilidade de água e nutrientes, são *Xanthomonas* spp., e principalmente *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* 1995 (ALFENAS *et al.*, 2009).

Dessa forma, o tratamento prévio da água de irrigação e do efluente do viveiro constitui uma alternativa viável a fim de minimizar o consumo de água e os riscos de incidência de doenças. Há vários métodos disponíveis para o tratamento da água como a radiação ultravioleta, ozonização, pasteurização, filtração lenta em areia, filtração por membranas e o tratamento físico-químico convencional. A escolha do método varia de acordo com a qualidade da água, o destino final e a disponibilidade de recursos financeiros.

A filtração por membranas dependendo do tamanho do poro pode ser classificada em micro (0,1 – 10 µm), ultra (0,02 – 0,1µm) e nanofiltração (500-20.000 Da) (EHRET *et al.*, 2001). Esse método tem sido utilizado com sucesso na remoção de resíduos e até mesmo de fitopatógenos da água de irrigação e solução hidropônica (GOLDBERG *et al.*, 1992, HONG *et al.*, 2003, SPOTTS & CERVANTES, 1993, OHTANI *et al.*, 2000, SCHUERGER & HAMMER, 2009). Além da elevada eficiência desse método, não se utilizam produtos químicos e conseqüentemente não há alteração da composição química da solução nutritiva (SCHUERGER & HAMMER, 2009, OHTANI *et al.*, 2000).

O tratamento físico-químico é o mais empregado atualmente nas estações convencionais de tratamento de água para o consumo humano (LIBÂNIO, 2005). Nesse método, adiciona-se um coagulante na água bruta, geralmente um sal de alumínio ou de ferro, para que ocorra a formação de precipitados onde se aprisionam as impurezas. A floculação ocorre na unidade de mistura rápida, a qual pode ser hidráulica ou mecânica. Em seguida, a água é submetida à agitação lenta até que os flocos alcancem tamanhos e massas específicas suficientes para serem sedimentados (DI BERNARDO & DANTAS, 2005). A água clarificada é filtrada em leito de areia e finalmente clorada para a inativação de microrganismos patogênicos (MUJERIEGO & ASANO, 1999). O cloro pode ser utilizado na forma de gás (Cl₂), hipoclorito de sódio (NaOCl) ou de cálcio Ca(OCl)₂. Na água, o cloro se dissocia em ácido hipocloroso (Cl_{2(g)} + H₂O → HOCl + Cl⁻ + H⁺) e íon hipoclorito

($\text{HOCl} \rightarrow \text{OCI}^- + \text{H}^+$), e o somatório das duas formas é denominado cloro residual livre, sendo o ácido hipocloroso (HOCl) o oxidante mais eficiente. A oxidação causada pelo cloro danifica os componentes da parede celular dos microrganismos, permitindo sua difusão no interior da célula e alteração das funções vitais (LIBÂNIO, 2005). No entanto, concentrações elevadas de cloro na água de irrigação podem induzir fitotoxicidade e reduzir o crescimento e o desenvolvimento das mudas.

Diante da importância de diversas doenças que incidem em mudas de eucalipto e da necessidade de implantação de práticas que permitem a reutilização da água, o presente trabalho objetivou: (i) avaliar a eficiência da ultrafiltração e do tratamento físico-químico convencional para a erradicação de inóculo de patógenos fúngicos e bacterianos em água de irrigação; (ii) determinar os efeitos do cloro na erradicação de patógenos fúngicos e bacterianos na água de irrigação e (iii) determinar o efeito fitotóxico do cloro presente na água de irrigação em mudas de eucalipto.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Microrganismos fitopatogênicos testados

Avaliou-se a eficiência do tratamento de água para a erradicação de inóculo de *Ralstonia solanacearum* (UFV 34), *Xanthomonas axonopodis* (BSC 475), *Botrytis cinerea* (BC 01) e *Cylindrocladium candelabrum* (CyC 01). Esses microrganismos foram escolhidos por induzirem frequentemente doenças e perdas de mudas em viveiros clonais de eucalipto no Brasil (ALFENAS *et al.*, 2009). Todos os isolados utilizados pertencem ao Laboratório de Patologia Florestal do Departamento de Fitopatologia/ Bioagro da UFV.

Selecionaram-se isolados de *R. solanacearum* (UFV 34) e *X. axonopodis* (BSC 475) resistentes a rifamicina (10 mg/mL) para facilitar seu reisolamento após a infestação da água. Para isso, os isolados bacterianos foram multiplicados por 48 h a 28°C, em meio 523 (KADO & HESKETT, 1970) sólido, acrescido de rifamicina a 0,2 mg/mL do ingrediente ativo (i.a.) para *R. solanacearum* e a 0,1 mg/mL do i.a. para *X. axonopodis*.

Para identificar isolados potencialmente patogênicos e resistentes a rifamicina, realizaram-se testes de reação de hipersensibilidade (HR) em fumo (*Nicotiana tabacum* cv Havana 425) para *R. solanacearum* e tomate (*Solanum lycopersicum* cv Santa Clara) para *X. axonopodis*. Além do teste de HR, o isolado de *R. solanacearum* foi submetido à técnica de PCR para confirmar a identidade da espécie. Para isso, o DNA genômico extraído (GRAVES & SWAMINATHAN, 1993) foi submetido à PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos PS1 e PS2 que amplificam um produto de 553 pb a partir do gene 16S RNA (PS1/ 5'-agtcgaacggcagcggggg-3' e PS2/ 5'-ggggatttcacatcggtcttgca-3') (PASTRICK & MAISS, 2000). A reação foi realizada em solução contendo 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada um dos deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,4 μM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase e água esterilizada (Milli-Q) para completar o volume final de 15 μL. As amplificações foram realizadas em termocicladores PTC – 100™ (MJ. Research, INC.), seguindo as condições da PCR previamente descritas (PASTRICK & MAISS, 2000). O produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 1,6% em Tris Acetato EDTA (TAE), corado com brometo de etídeo (0,5 μg/ mL) e fotodocumentado. Como controles da especificidade da reação foram utilizados o isolado autêntico de *R. solanacearum* (UFV 34) da bacterioteca do Laboratório de Patologia Florestal (UFV), como controle positivo e água como negativo.

Para a produção de inóculo, os isolados bacterianos foram semeados, em meio 523 (KADO & HESKETT, 1970) sólido, acrescido de rifamicina a 0,2 mg/mL do i.a. para *R. solanacearum* e a 0,1 mg/mL do i.a. para *X. axonopodis*, incubando-se a 28°C, no escuro. Após 48 h, removeu-se o crescimento bacteriano por meio da adição de solução salina (0,85% de NaCl) e raspagem com alça de Drigalski. Ajustou-se a concentração do inóculo para OD_{540nm} = 0,2 e OD_{540nm} = 0,1 para *R. solanacearum* e *X. axonopodis*, respectivamente, o que equivale a concentração de aproximadamente 1x10⁸ ufc/mL.

Os isolados de *B. cinerea* e *C. candelabrum* foram semeados em meio de Batata-Dextrose-Agar (BDA) sólido, incubando-se por aproximadamente 20 dias, a 20 e 26°C respectivamente, no escuro. As colônias de *B. cinerea* foram raspadas com alça de Drigalski em água destilada e esterilizada + Tween 20 a 0,05%. A suspensão foi filtrada em gaze e ajustada para 1x10⁵ conídios/mL. Para indução da esporulação

de *C. candelabrum* a cultura do patógeno foi submetida a estresse físico (GRAÇA *et al.*, 2009) e a suspensão de inóculo (1×10^4 conídios/mL) preparada como descrito previamente para *B. cinerea*.

2.2 - Tratamento da água contaminada por ultrafiltração

O filtro utilizado foi constituído por um módulo de membranas poliméricas sintéticas ocas de ultrafiltração, submersas em um reservatório principal com diâmetro de 25 cm e 24 L de capacidade, onde se introduziu a suspensão de inóculo de cada fitopatógeno (Figura 1). Cada membrana possuía um diâmetro externo de 3 mm, comprimento de 25 cm e um tamanho médio dos poros de 0,05 μm de diâmetro, totalizando uma área de superfície das membranas de aproximadamente 0,5 m^2 . A operação do sistema foi realizada durante 24 h, por sete dias, com uma vazão de 40 mL/min em circuito fechado, de modo que a água filtrada era levada até um segundo reservatório (saída) e retornava ao tanque principal (entrada) contendo água não tratada, mantendo assim o volume da suspensão constante. A pressão interna das membranas foi gerada por uma bomba peristáltica, que produz um vácuo interno nas fibras e o fluxo da água do exterior para o interior das membranas. Para evitar a deposição de material ao longo da superfície das membranas e conseqüentemente entupimento, foi realizada uma turbulência na suspensão por meio da injeção de ar utilizando-se uma bomba de ar.

As suspensões com os patógenos foram testadas separadamente. Após cada teste, lavavam-se as membranas com água limpa e observava-se a possível formação de bolhas de ar decorrente da presença de furos. Para a suspensão de cada patógeno, manteve-se o filtro em funcionamento por sete dias. Com intuito de garantir a alta concentração de inóculo no tanque principal, realizaram-se duas (1° e 4° dias) e três (1°, 3° e 5° dias) infestações para os patógenos bacterianos e fúngicos, respectivamente. Amostras da água infestada não filtrada e infestada filtrada foram coletadas em tubos Falcon (50 mL) esterilizados e devidamente identificados. Efetuaram-se três coletas diárias durante 7 dias, sendo cada coleta composta por três alíquotas de 50 mL. Cada coleta foi considerada uma repetição.

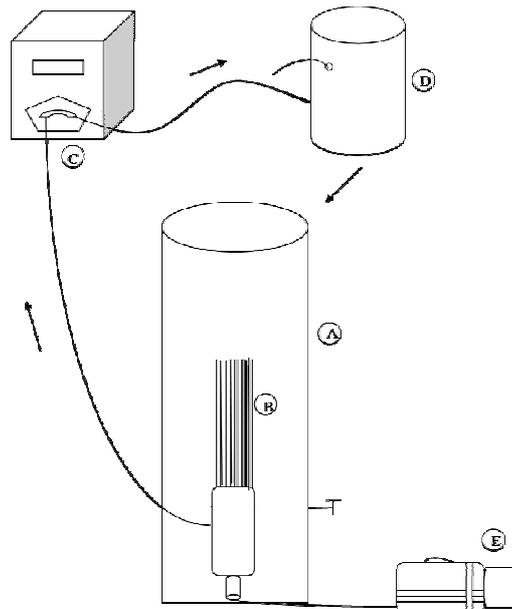


Figura 1 – Sistema de ultrafiltração: A) Reservatório principal, contendo água infestada não filtrada; B) Cartucho de membranas; C) Bomba peristáltica; D) Segundo reservatório, contendo água infestada filtrada e E) Bomba para injeção de ar. Setas indicam o fluxo da água.

2.3 - Tratamento físico-químico convencional da água contaminada

A metodologia testada baseou-se em ensaios de jarros (Jar-Test) (Figura 2) que inclui as etapas de coagulação química utilizando sulfato de alumínio $Al_2(SO_4)_3$, seguida de floculação, decantação. Posteriormente a água foi filtrada e clorada objetivando simular o tratamento de água convencional adotado na maioria das estações de tratamento de água para consumo humano. Foram efetuados ensaios preliminares para a escolha da melhor concentração de sulfato de alumínio com base no menor valor de turbidez da água após a filtração (aproximadamente 0,1 NTU). O pH foi ajustado com carbonato de cálcio ($CaCO_3$) de modo que, após a adição do coagulante, o valor fosse mantido entre 5,5 a 7,5. No ensaio de jarros, fixou-se o gradiente de velocidade para 1000/s e o tempo de mistura rápida de 10 s, o gradiente de velocidade 60/s e o tempo de floculação decaindo a 20 s durante 30 min, e o período de sedimentação de 30 min com o equipamento desligado. Posteriormente, a água foi filtrada em um filtro de areia de fluxo descendente (Tabela 1) e clorada com hipoclorito de sódio ($NaClO$) seguido de agitação por 30 min.

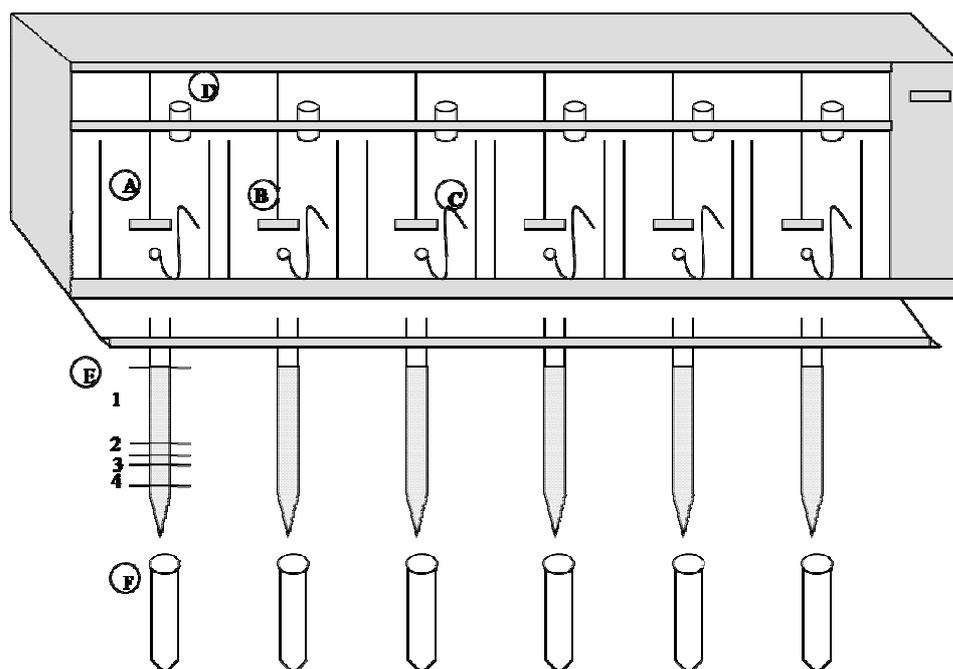


Figura 2 - Esquema do Jar-test: A) Jarro; B) Agitador; C) Dispositivo para a coleta de água; D) Cubeta para adição de sulfato de alumínio $Al_2(SO_4)_3$; E) Camadas do filtro de areia; F) Tubo Falcon para coleta da água filtrada.

Tabela 1 – Composição granular das camadas do filtro de areia com fluxo descendente

Subcamada	Tamanho (mm)	Espessura (cm)
1	0,25 a 1,0	15
2	1,0 a 2,0	2
3	2,0 a 4,76	1
4	4,76 a 9,52	4

Como no item anterior, a água foi infestada separadamente com a suspensão de cada patógeno. O experimento foi realizado duas vezes para cada patógeno. Empregaram-se seis jarros com capacidade de 2 L cada, sendo um jarro considerado uma repetição. As amostras de água foram coletadas em tubos Falcon (50 mL) esterilizados e devidamente identificados antes da adição de sulfato de alumínio, após as etapas de filtração e cloração.

2.3.1 – Determinação da concentração mínima de cloro residual para erradicação de inóculo de fitopatógenos

A concentração de cloro utilizada no tratamento físico-químico convencional foi escolhida de acordo com a menor concentração de cloro residual eficiente para a

erradicação dos quatro patógenos testados. Assim, para determinar essa concentração, os patógenos foram multiplicados e a suspensão de inóculo preparada como descrito no item 2.1. Em seguida, uma solução de hipoclorito de sódio (Vetec P.A.) a 20 mg/L (pH 6,5) foi adicionada na suspensão do inóculo em volumes suficientes para atingir as concentrações de 0, 1, 2, 4, 6 e 8 mg/L, em um volume final de 30 mL, mantido sob agitação por 30 min. Após a exposição do patógeno ao produto químico, transferiu-se uma alíquota de 1 mL da amostra para um tubo Eppendorf onde se adicionou 1 µL de tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) (3%) para neutralizar o efeito do cloro. O restante da amostra foi avaliado quanto à presença de cloro livre utilizando-se o método DPD colorimétrico proposto pelo manual Hach Pocket ColorimeterTM II. Para erradicação dos patógenos bacterianos, as amostras dos Eppendorfs foram centrifugadas a 10000 x g por 10 min. O “pellet” resultante foi ressuspenso em 1 mL de solução salina e posteriormente procedeu-se uma diluição seriada na razão 1:8. A seguir, as suspensões de inóculo nas respectivas diluições foram transferidas pela técnica da micro-gota (10 µL) (ROMEIRO, 2001) para placas de Petri (9 cm) contendo meio sólido 523 (KADO & HESKETT, 1970) acrescido de rifamicina a 0,2 mg/mL do i.a. para *R. solanacearum* e a 0,1 mg/mL do i.a. para *X. axonopodis*, seguindo-se incubação a 28°C, por 48 h, no escuro. Para erradicação dos patógenos fúngicos, alíquotas de 100 µL de cada tubo Eppendorf foram semeadas em placas de Petri (9 cm), contendo BDA e espalhadas sobre o meio com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram mantidas a 20°C para *B. cinerea* e a 26°C para *C. candelabrum*, por 48 h no escuro.

Após incubação de cada patógeno, quantificou-se o número de unidades formadoras de colônias (ufc) e avaliou-se a eficiência de cada tratamento em relação à testemunha. As suspensões de inóculo mantidas em solução salina autoclavada contendo ou não tiosulfato de sódio serviram como testemunha. Utilizaram-se cinco repetições por tratamento.

2.3.2 – Fitotoxicidade do cloro residual na água de irrigação a mudas de eucalipto

Além do efeito erradicante do cloro residual sobre os patógenos, avaliou-se também o seu potencial efeito fitotóxico na água de irrigação em mudas de eucalipto. Testaram-se duas concentrações de cloro residual, a selecionada no ensaio do item

2.3.1 e o dobro da mesma, para avaliar a qualidade das mudas com cloração excessiva. Para isso, 10 mudas de cada um dos clones 2719 (*E. grandis*), 1179 (*E. urophylla*) e um híbrido 1172 (*E. urophylla* x *E. grandis*) com 60 dias, mantidas em tubetes, foram irrigadas duas vezes ao dia com água contendo hipoclorito de sódio durante 45 dias. Após esse período, avaliou-se a altura das mudas e a existência de possíveis sintomas visuais de fitotoxicidade (ALFENAS *et al.*, 2009). Mudas irrigadas com água não clorada serviram como testemunha.

2.4 - Constatação de inóculo nas amostras de água infestada não tratada e infestada tratada

Para a constatação de inóculo bacteriano de cada amostra de água retiraram-se sub-amostras de 1 mL que foram diluídas na proporção de 1:8 em tubos Eppendorf (900 µL/tubo) contendo solução salina e Tween a 0,05%. Posteriormente, as suspensões de inóculo nas respectivas diluições foram transferidas pela técnica da micro-gota (10 µL) (ROMEIRO, 2001) para placas de Petri (9 cm) contendo meio sólido 523 (KADO & HESKETT, 1970) acrescido de rifamicina a 0,2 mg/mL do i.a. para *R. solanacearum* e a 0,1 mg/mL do i.a. para *X. axonopodis*. Após incubação a 28°C, no escuro, por 48 h, quantificou-se o número de colônias nas amostras de cada tratamento.

Para a constatação de inóculo de *B. cinerea* e *C. candelabrum*, as amostras de água foram analisadas empregando-se o método de isca biológica (GONÇALVES *et al.*, 2001). Para isso, 50 mL de água de cada tratamento foram utilizados para umedecer 70 g de vermiculita de granulometria média, previamente esterilizada e acondicionada em caixas do tipo gerbox (13 x 13 x 4 cm). Após essa etapa, 30 iscas biológicas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) de 9 mm de diâmetro foram desinfestadas em etanol 50% por 30 s, NaClO a 5%, por 3 min e posteriormente submetidas a três lavagens em água esterilizada, em seguida foram inseridas na vermiculita e incubadas no escuro a 20°C para *B. cinerea* e a 26°C para *C. candelabrum*, por 48 h no escuro. A seguir, as iscas foram novamente desinfestadas, conforme previamente descrito, e semeadas em placas de Petri (9 cm) contendo BDA. Após cinco dias de incubação, avaliou-se sob microscópio estereoscópico a presença de estruturas típicas dos respectivos fitopatógenos e calculou-se o

percentual de iscas colonizadas por tratamento. Vermiculita esterilizada e umedecida com água autoclavada serviu como testemunha.

2.5 – Intensidade de doença em mudas de eucalipto e tomateiro atomizadas com água infestada não tratada e infestada tratada

Além dos testes “in vitro” para avaliação da eficiência de cada método de tratamento da água, mudas de eucalipto e de tomateiro foram atomizadas com água infestada não tratada e infestada tratada. No tratamento por ultrafiltração, utilizou-se na atomização das mudas a água infestada não filtrada e infestada filtrada do primeiro dia do período experimental de cada patógeno.

Para *R. solanacearum*, empregaram-se mudas de tomateiro com 20 dias de idade. As mudas permaneceram 24 h sem irrigação, posteriormente realizou-se o corte de um terço de seu sistema radicular seguindo-se de imersão das raízes por 20 min em água infestada não tratada e infestada tratada. Em seguida, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos (300 mL de capacidade) contendo substrato Mecplant autoclavado e transferidas para câmara de crescimento a 26°C. Aos 15 dias, todas as mudas foram submetidas ao teste de exsudação de pus para confirmar a presença da bactéria. Para *X. axonopodis*, mudas do clone A06 (*E. grandis* x *E. urophylla*) com aproximadamente 60 dias foram transplantadas para vasos com capacidade de 2L e inoculadas aos 45 dias de transplantio. Para isso, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro a 25°C por 12 h e posteriormente, atomizadas com água infestada não tratada e infestada tratada de modo a cobrir uniformemente ambas as faces das folhas sem atingir o ponto de escorrimento superficial. A seguir, as plantas foram transferidas para casa de vegetação (26°C ± 5°C) onde permaneceram por 20 dias. Avaliou-se a área foliar lesionada do terceiro par de folhas completamente expandidas de cada muda por meio de imagens digitalizadas e processadas no programa Quant (VALE *et al.*, 2003).

Para *B. cinerea*, utilizaram-se miniestacas de *E. globulus* com aproximadamente 8 cm de comprimento e dois pares de folhas cortadas em um terço da lamina foliar. Após atomização com água infestada não tratada e infestada tratada, as miniestacas foram mantidas em câmara úmida a 22°C durante 15 dias, quando se avaliou a incidência da doença pela presença de estruturas típicas do patógeno. Para *C. candelabrum*, utilizaram-se mudas do clone 9882 (*E. grandis* x *E. urophylla*) com 60 dias de idade, mantidas em tubetes. Após atomização com água infestada não

tratada e infestada tratada, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro a 25°C por 48 h e a seguir transferidas para casa-de-vegetação (26°C ± 5°C). Aos 10 dias, quantificou-se a área foliar lesionada do quarto par de folhas completamente expandidas de cada muda por meio de imagens digitalizadas e processadas no programa Quant (VALE *et al.*, 2003).

Para o método de ultrafiltração, empregaram-se 10 mudas por tratamento e para o físico-químico empregaram-se 2 mudas para cada repetição, totalizando 12 mudas por tratamento em cada experimento, para cada patógeno. Mudas atomizadas com água destilada serviram como testemunha.

2.6 – Análises estatísticas

Todos os experimentos foram repetidos duas vezes, em diferentes épocas.

Em todos os experimentos empregou-se delineamento inteiramente casualizado, com diferente número de repetições em função do ensaio.

Para as análises estatísticas utilizou-se o programa SAS (The SAS Institute Inc., Version 9.0 Cary, NC, Estados Unidos)

Para a comparação entre a eficiência da água tratada comparativamente à não tratada de cada método, calculou-se a porcentagem média de erradicação de inóculo dos respectivos patógenos. Os valores de incidência ou severidade de cada doença foram submetidos à análise de variância (ANOVA).

Nos experimentos para determinação da concentração mínima do cloro eficaz para erradicação de inóculo de todos os patógenos, transformaram-se os dados para logaritmo e compararam-se os tratamentos com base na média e no desvio padrão. Para a testemunha na presença e na ausência de tiosulfato de sódio, os resultados foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade e posteriormente comparados pelo Teste T. Os resultados do cloro aplicado, cloro residual e log ufc/mL, para cada patógeno, foram submetidos à análise de correlação de Pearson. Para o experimento de fitotoxicidade após os testes de normalidade e homogeneidade, utilizou-se análise em fatorial.

3 - RESULTADOS

3.1 - Tratamento da água contaminada por ultrafiltração

O filtro de membranas apresentou alta eficiência na remoção de patógenos bacterianos e principalmente fúngicos. Para *R. solanacearum* a retenção foi superior a 99,98% (Tabela 2). A concentração de inóculo na água infestada e não filtrada foi de 8×10^7 e 3×10^5 ufc/mL, para o primeiro e último dias de funcionamento do filtro respectivamente (Figura 3). Já a concentração de inóculo na água infestada e filtrada, no primeiro dia, foi de 44 ufc/mL, insuficiente para induzir murcha ou exsudação de pus bacteriano. Por outro lado, 90% das plantas tratadas com água infestada e não filtrada apresentaram exsudação de pus bacteriano (Tabela 2). Para *X. axonopodis* a retenção foi superior a 99,37% (Tabela 2) e assim como para *R. solanacearum*, a concentração de inóculo da água infestada e não filtrada manteve-se alta durante todo o período experimental, com $1,5 \times 10^8$ e 7×10^5 ufc/mL para o primeiro e último dias de funcionamento, respectivamente (Figura 3). A patogenicidade de *X. axonopodis* foi confirmada por meio de testes de HR em mudas de tomateiro, porém mudas de eucalipto inoculadas não reproduziram sintomas típicos da doença.

Durante todo o período experimental, a quantidade de iscas colonizadas tratadas com a água infestada e não filtrada ficou acima de 65 e 54% para *B. cinerea* e *C. candelabrum*, respectivamente (Figura 3). Para *B. cinerea*, exceto no quinto dia, houve retenção total de inóculo e não houve incidência da doença em miniestacas atomizadas com a água infestada e filtrada (Tabela 2). A retenção de inóculo de *C. candelabrum* foi 100%. A área lesionada das mudas de eucalipto atomizadas com água infestada e não filtrada foi maior que nas mudas atomizadas com água infestada e filtrada e com água destilada (testemunha) (Tabela 2). Algumas plantas pulverizadas com água infestada e filtrada e com água destilada (testemunha) apresentaram sintomas da doença, provavelmente por contaminação de inóculo existente no ambiente.

Os dados de incidência e porcentagem de área lesionada não apresentaram normalidade e homogeneidade na distribuição dos erros, o que não atendeu as pressuposições para realizar a análise de variância.

Tabela 2- Erradicação de inóculo (%) de *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis*, *Botrytis cinerea* e *Cylindrocladium candelabrum* e intensidade de doença (%), causada pelos respectivos patógenos, em mudas irrigadas com água infestada e não filtrada e infestada e filtrada por ultrafiltração

	Dia	<i>R. solanacearum</i> ^c	<i>X. axonopodis</i>	<i>B. cinerea</i> ^d	<i>C. candelabrum</i> ^e
% de erradicação ^a	1°	99,99	99,99	100	100
	2°	99,99	99,99	100	100
	3°	99,99	99,99	100	100
	4°	99,98	99,98	100	100
	5°	99,99	99,37	99,06	100
	6°	99,99	99,58	100	100
	7°	99,99	99,81	100	100
Intensidade da doença ^b	Água infestada e não filtrada	90	na	70	2,98
	Água infestada e filtrada	0	na	0	0,18
	Água destilada (Testemunha)	0	na	0	0,19

a - Média de seis repetições.

b - Média de doze repetições.

c - Incidência (%) de mudas de tomateiro, com exsudação de pus bacteriano.

d - Incidência (%) de *B. cinerea* em miniestacas de eucalipto.

e - Área foliar lesionada (%) de mudas de eucalipto.

na - Não avaliado.

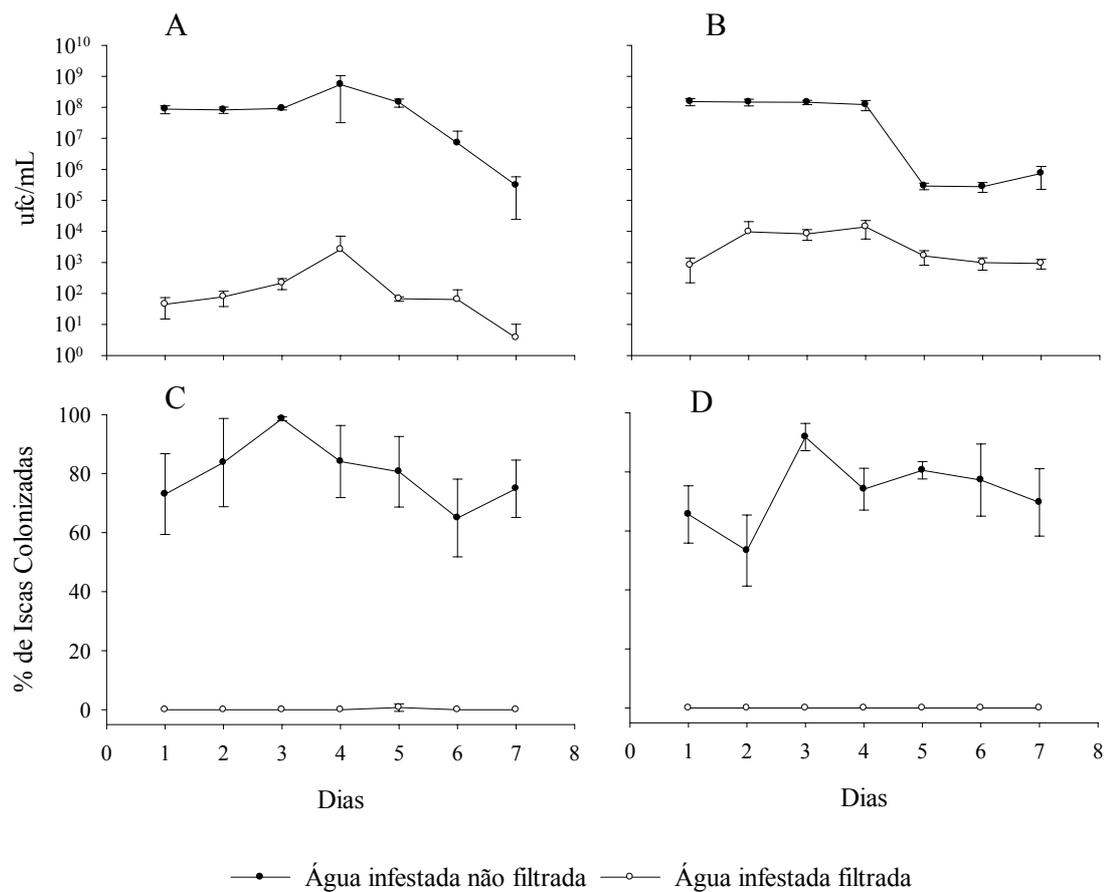


Figura 3 - Flutuação de inóculo na água infestada e não filtrada e infestada filtrada durante o período experimental do sistema de ultrafiltração - A) *Ralstonia solanacearum*; B) *Xanthomonas axonopodis*; C) *Botrytis cinerea* e D) *Cylindrocladium candelabrum*.

3.2 - Tratamento físico-químico da água contaminada

3.2.1 - Determinação da concentração mínima de cloro residual para erradicação de inóculo de fitopatógenos

Para todos os patógenos testados, nos experimentos 1 e 2, houve correlação positiva entre os valores de cloro aplicado e cloro residual. A correlação foi negativa para cloro aplicado e log (ufc/mL), bem como para cloro residual e log (ufc/mL) (Tabela 3), o que demonstra a eficiência erradicante do produto. No experimento 1, as concentrações mínimas de cloro residual eficientes para erradicar inóculo de *R. solanacearum*, *X. axonopodis*, *B. cinerea* e *C. candelabrum* foi de 1,17; 1,6; 0,4 e 0,31 mg/L, respectivamente. No experimento 2, as concentrações foram de 1,7; 1,74; 0,63 e 0,52 mg/L para a erradicação de *R. solanacearum*, *X. axonopodis*, *B. cinerea* e *C. candelabrum*, respectivamente (Figura 4). Portanto para erradicar inóculo de todos os patógenos a concentração mínima de cloro residual foi de 1,6 e 1,74 mg/L, nos

experimentos 1 e 2, respectivamente. Dessa forma, a concentração mínima de cloro residual utilizada na cloração da água no tratamento físico-químico foi de 1,74 mg/L. Em todos os ensaios não houve diferença significativa ($p > 0,32$) quanto ao crescimento das testemunhas contendo ou não tiosulfato de sódio (dados não mostrados) comprovando a não interferência do produto.

Tabela 3 – Valores do coeficiente de Correlação de Person (R) entre cloro aplicado, cloro residual e logaritmo (log) do número de unidades formadoras de colônias (ufc) para *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis*, *Botrytis cinerea* e *Cylindrocladium candelabrum*, em dois experimentos (E1 e E2)

		Cloro aplicado (mg/L)	Cloro residual (mg/L)	Log (ufc/mL)	
<i>R. solanacearum</i>		1	0,96	- 0,76	
	E1	Cloro residual (mg/L)	0,96	1	- 0,79
		Log (ufc/mL)	-0,76	- 0,79	1
		Cloro aplicado (mg/L)	1	0,93	- 0,89
	E2	Cloro residual (mg/L)	0,93	1	- 0,86
		Log (ufc/mL)	- 0,89	- 0,86	1
Cloro aplicado (mg/L)		1	0,96	- 0,88	
<i>X. axonopodis</i>		1	0,96	- 0,88	
	E1	Cloro residual (mg/L)	0,96	1	- 0,87
		Log (ufc/mL)	- 0,88	- 0,87	1
		Cloro aplicado (mg/L)	1	0,98	- 0,82
	E2	Cloro residual (mg/L)	0,98	1	- 0,81
		Log (ufc/mL)	- 0,82	- 0,81	1
Cloro aplicado (mg/L)		1	0,95	- 0,66	
<i>B. cinerea</i>		1	0,95	- 0,66	
	E1	Cloro residual (mg/L)	0,95	1	- 0,55*
		Log (ufc/mL)	- 0,66	- 0,55*	1
		Cloro aplicado (mg/L)	1	0,97	- 0,76
	E2	Cloro residual (mg/L)	0,97	1	- 0,66
		Log (ufc/mL)	- 0,76	-0,66	1
Cloro aplicado (mg/L)		1	0,87	- 0,48**	
<i>C. candelabrum</i>		1	0,87	- 0,48**	
	E1	Cloro residual (mg/L)	0,87	1	- 0,50***
		Log (ufc/mL)	- 0,48**	- 0,50***	1
		Cloro aplicado (mg/L)	1	0,92	- 0,89
	E2	Cloro residual (mg/L)	0,92	1	- 0,72
		Log (ufc/mL)	- 0,89	- 0,72	1
Cloro aplicado (mg/L)		1	0,92	- 0,89	

* $p = 0,0016$, ** $p = 0,0074$, *** $p = 0,0052$. Para os demais valores de R, $p < 0,0001$

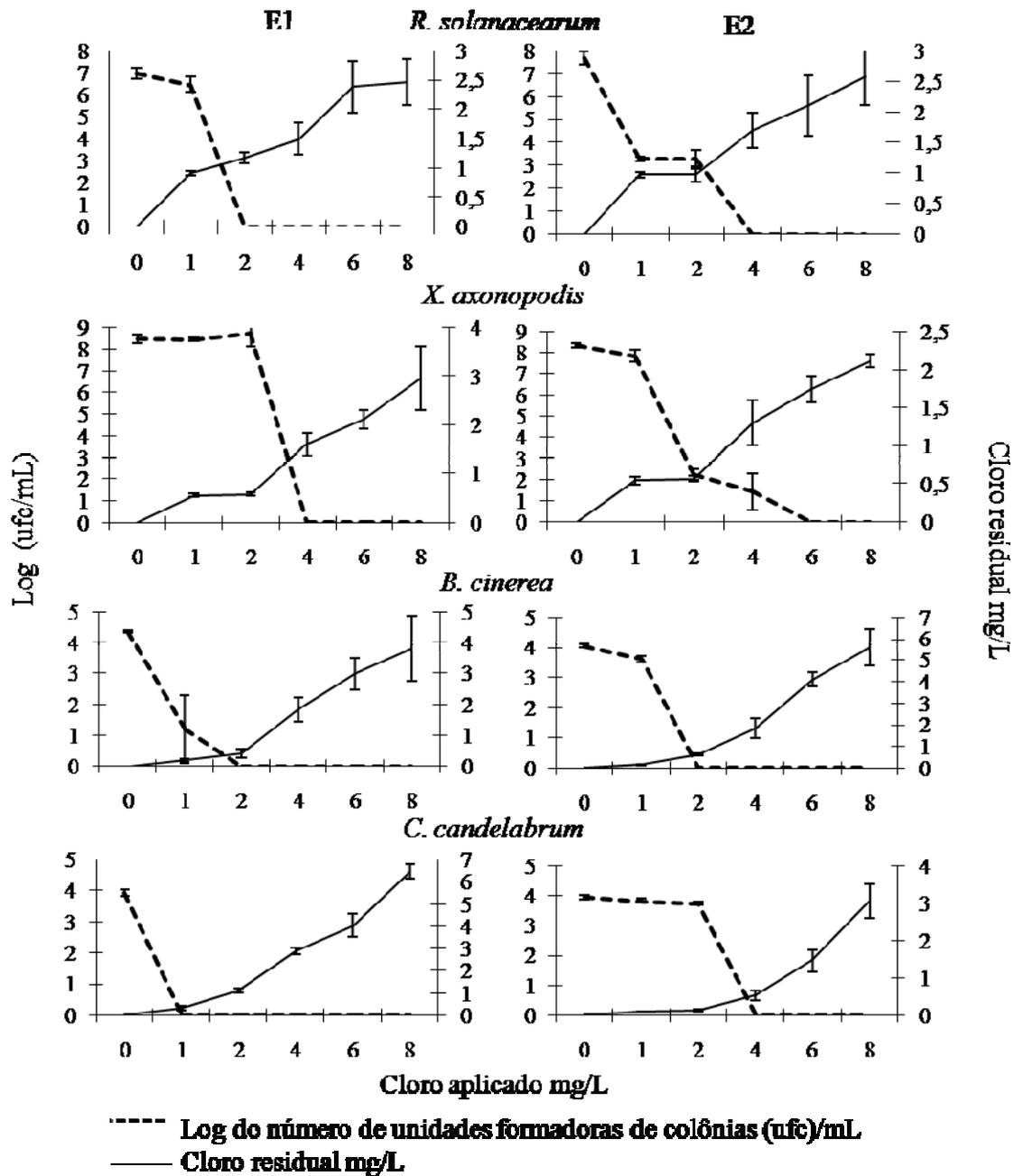


Figura 4 - Efeito erradicante do cloro residual para *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis*, *Botrytis cinerea* e *Cylindrocladium candelabrum* sob diferentes concentrações de cloro aplicado, em dois experimentos (E1 e E2). Cada ponto representa a média de cinco repetições e as barras verticais o desvio padrão.

3.2.2 - Fitotoxicidade do cloro residual na água de irrigação de mudas de eucalipto

Segundo os resultados dos experimentos 1 e 2 do item anterior, deve-se manter uma concentração mínima de cloro residual de 1,74 mg/L. Dessa forma, para avaliar o efeito fitotóxico nas mudas de eucalipto, testaram-se dois intervalos de

concentração de cloro residual de 1,74 a 2,0 mg/L e o dobro desse intervalo de 3,4 a 4,0 mg/L.

Não houve efeito da interação entre clone x concentração de cloro residual ($p = 0,8$). O efeito das concentrações de cloro residual testadas não foi significativo ($p = 0,77$) e não induziu quaisquer sintomas de fitotoxicidade ou redução no crescimento das mudas de eucalipto dos três clones testados (Figura 5). A altura média dos clones 1179, 2719 e 1172 foi, respectivamente, 19,75; 19,86 e 22,42 cm.



Figura 5 – Mudanças clonais de eucalipto irrigadas com água contendo diferentes concentrações de cloro residual - A) Clone 1179 (*E. urophylla*); B) Clone 1172 (*E. urophylla* x *E. grandis*) e C) Clone 2719 (*E. grandis*). Fileiras da esquerda para direita em cada bandeja correspondem a 3,4 - 4,0 mg/L; 1,7 - 2,0 mg/L e testemunha, respectivamente.

3.2.3 – Eficiência do tratamento físico-químico da água contaminada

Observou-se uma alta eficiência do tratamento físico-químico da água, porém a erradicação completa do inóculo dos patógenos só foi obtida após a cloração, exceto para *C. candelabrum*, para o qual apenas a filtração foi suficiente (Tabela 4). O número de células de *R. solanacearum* observadas após a filtração nos experimentos 1 e 2, respectivamente, foi de 5×10^5 e 2×10^5 ufc/mL, suficiente para induzir exsudação de pus bacteriano em mudas inoculadas de tomateiro (Tabela 4). A filtração foi menos eficiente para *X. axonopodis* que para *R. solanacearum*, resultando na concentração de inóculo de 2×10^6 ufc/mL nos experimentos 1 e 2. A patogenicidade de *X. axonopodis* foi confirmado por meio de testes de HR em mudas de tomateiro, porém inoculação em mudas de eucalipto não reproduziram sintomas típicos da doença.

A eficiência da filtração para *B. cinerea* foi menor no experimento 1 (Tabela 4) devido ao baixo nível de floculação da suspensão de inóculo em um dos jarros, o

que consequentemente resultou em uma menor erradicação de inóculo e uma maior incidência de mudas infectadas (Tabela 4). Assim como para os patógenos bacterianos, para *B. cinerea* o tratamento físico-químico só foi eficiente após a cloração. Por outro lado, a filtração foi suficiente para a completa remoção de inóculo de *C. candelabrum*, eficiência comprovada também por inoculação em mudas de eucalipto, onde a área foliar lesionada das mudas inoculadas foi muito menor após o tratamento da água (Tabela 4). A baixa intensidade de doença em mudas pulverizadas com a água tratada e com água destilada (testemunha) foi atribuída a inóculo existente no ambiente.

Os dados de incidência e porcentagem de área lesionada não apresentaram normalidade e homogeneidade na distribuição dos erros, o que não atendeu as pressuposições para realizar a análise de variância.

Tabela 4 - Erradicação de inóculo (%) de *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis*, *Botrytis cinerea* e *Cylindrocladium candelabrum* e intensidade de doença (%), causados pelos respectivos patógenos, em mudas irrigadas com água tratada pelo método físico-químico, em dois experimentos (E1 e E2)

		Erradicação (%) ^a		Intensidade de doença (%) ^b			
		Água infestada e filtrada	Água infestada filtrada e clorada	Água infestada e não filtrada	Água infestada e filtrada	Água c infestada filtrada e clorada	Água destilada (Testemunha)
<i>R.solanacearum</i> ^c	E1	99,30	100	83,33	50	0	0
	E2	99,68	100	75	41,67	0	0
<i>X. axonopodis</i>	E1	98,39	100	na	na	na	na
	E2	97,23	100	na	na	na	na
<i>B. cinerea</i> ^d	E1	90,57	100	100	33,33	0	0
	E2	94,97	100	75	8,33	0	0
<i>C. candelabrum</i> ^e	E1	100	100	13,76	0,05	0,06	0,04
	E2	100	100	9,88	0,11	0,06	0,19

a - Média de seis repetições.

b - Média de doze repetições.

c - Incidência (%) de mudas de tomateiro, com exsudação de pus bacteriano.

d - Incidência (%) de *B. cinerea* em miniestacas de eucalipto.

e - Área foliar lesionada (%) de mudas de eucalipto.

na - Não avaliado.

4 – DISCUSSÃO

A produção de mudas de eucalipto depende essencialmente da disponibilidade de água de boa qualidade e em quantidade suficiente para atender as exigências hídricas da planta em todas as fases de crescimento. No entanto, a água, elemento essencial à produção agrícola, é um recurso cada vez mais escasso. Dessa forma, é necessário adotar práticas que visam ao uso racional e à reutilização da água de irrigação. Embora seja uma alternativa viável, segundo Mafia *et al.* (2008) a reutilização da água não tratada em viveiros clonais de eucalipto pode constituir uma importante fonte de inóculo de fitopatógenos e causar perdas significativas por doenças.

Em viveiros florestais, o consumo de água é alto e muito variável. Em um levantamento preliminar (dados não publicados) o consumo da água de irrigação variou de 9 a 38 L/dia por milheiro de mudas, valor inferior ao encontrado por Rodrigues (2007) que foi de 35 a 49 L/dia por milheiro de mudas. Essa variação ocorre em função do manejo adotado, da localização geográfica, de acordo com a estação do ano e a fase de produção de mudas, sendo maior na fase de crescimento e rustificação. Nesta fase, as mudas demandam maior quantidade de água, pois encontram-se expostas a céu aberto e em franco crescimento e conseqüentemente apresentam maior área foliar. Uma prática importante que visa minimizar o consumo de água é a utilização da água pluvial, pois em regiões de elevado índice pluviométrico pode reduzir o consumo da água de poços artesianos ou de outros mananciais deixando essa água para áreas mais vulneráveis a doenças como minijardim clonal e casa de vegetação. A água da chuva possui macro e micronutrientes, além de íons NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} (RANZINI & LIMA, 2002, HONÓRIO *et al.*, 2010), embora a composição e a concentração dos nutrientes possa variar de acordo com a região (EATON *et al.*, 1973). Apesar da água de chuva ser de boa qualidade é necessário seu tratamento prévio antes da utilização, pois durante sua coleta e armazenamento há o risco de contaminação por inóculo fitopatogênico existentes na poeira ou nos telhados (RUNIA, 1995).

Ambos os métodos de tratamento da água de irrigação testados neste trabalho foram eficientes para erradicação de inóculo fitopatogênico. A ultrafiltração erradicou completamente conídios fúngicos, exceto no quinto dia do período experimental para *B. cinerea*. Esse resultado encontrado em um único dia pode ser

em consequência da contaminação durante a manipulação das iscas empregadas para a detecção do patógeno. Para patógenos bacterianos houve quase 100% de erradicação e a baixa quantidade de inóculo remanescente não induziu quaisquer sintomas de doença nas plantas inoculadas. Acredita-se que a alta concentração de inóculo utilizada neste trabalho reduziu a eficiência do tratamento, uma vez que a concentração empregada não deve ser comumente encontrada em situações naturais.

Na ultrafiltração, a água passa através dos poros (diâmetro médio de 0,02 a 0,1 μ m) de membranas sintéticas que retêm componentes de dimensões maiores. Neste estudo, utilizou-se um filtro com poros de 0,05 μ m e esperava-se completa erradicação de inóculo bacteriano, pois o diâmetro dos poros é menor que o tamanho médio das bactérias fitopatogênicas (aproximadamente 1 μ de diâmetro x 3 μ de comprimento). Resultados similares foram observados para zoósporos encistados de *Pythium myriotylum* (8-10 μ m de diâmetro) em que membranas com poros de 1 e 5 μ m, usadas individualmente, e membranas com poros de 1 e 0,5 μ m, usadas em série, não permitiram erradicação total do inóculo. Zoósporos de *Pythium* e *Phytophthora* também passaram por filtros com poros de 0,4 a 0,45 μ m (HONG *et al.*, 2002). A passagem de inóculo através dos poros das membranas pode ser atribuída ao pequeno tamanho atípico de alguns esporos, à pressão exercida pela bomba forçando a passagem dos mesmos pelos poros ou pequenos defeitos na vedação ou nas próprias membranas (SCHUERGER & HAMMER, 2009). Além disso, os valores nominais de diâmetro dos poros das membranas são valores médios, o que significa que os poros das membranas não possuem exatamente o mesmo diâmetro, permitindo assim a passagem de inóculo de alguns fitopatógenos. Remoção quase completa de *R. solanacearum* (*Pseudomonas solanacearum*), foi também obtida por Ohtani *et al.* (2000), porém utilizando pré-filtro de 10 μ m e posteriormente filtros de diâmetro de poro de apenas 0,1 μ m. Melhores resultados foram encontrados quando se utilizaram duas ou mais membranas com porosidades distintas (SPOTTS & CERVANTES, 1993, GOLDBERG *et al.*, 1992, HONG *et al.*, 2002).

Apesar da eficiência da ultrafiltração, a cloração da água filtrada pode constituir uma medida complementar para garantir a isenção de inóculo, principalmente bacteriano. O cloro é o desinfetante mais utilizado no tratamento de água uma vez que possui um amplo espectro de toxidez a fitopatógenos (HONG *et al.*, 2003, COPEL *et al.*, 2004, BARTZ *et al.*, 2001, DATNOFF *et al.*, 1987, GRECH

& RIJKENBERG,1992, PONCET *et al.*, 2001), é econômico e apresenta um importante residual antimicrobiano. A concentração mínima de cloro residual para erradicar inóculo de todos os patógenos testados foi de 1,6 a 1,74 mg/L, nos experimentos 1 e 2, respectivamente. Resultados similares foram encontrados para outros patógenos (HONG *et al.*, 2003, CAYANAN *et al.*, 2009b, THOMPSON, 1965, ROBERTS & REYMOND,1994). Por outro lado, Spotts e Peters (1980) obteve erradicação total de conídios de *B. cinerea* com cloro a 50 mg/L, durante 0,5; 5 e 10 min. A eficiência da cloração depende do binômio concentração x tempo de exposição. Para menores tempos de tratamento assim como para outros propágulos como micélio e microescleródios é necessário uma maior concentração de cloro residual para sua erradicação (DATNOFF *et al.*, 1987, BARTZ *et al.*, 2001, HONG *et al.*, 2003, CAYANAN *et al.*, 2009b, SEGALL, 1968, MARI *et al.*, 1999).

A concentração mínima de cloro residual letal aos fitopatógenos não pode ser fitotóxica. No presente estudo, concluiu-se que mudas de eucalipto irrigadas com água clorada contendo 1,74 a 2,0 mg/L e 3,4 a 4,0 mg/L de cloro residual por 45 dias, não induziram quaisquer sintomas de fitotoxicidade. Valores acima de 2,0 mg/L não foram fitotóxicos quando testados em outras culturas (DATNOFF *et al.*, 1987, GRECH & RIJKENBERG,1992, PONCET *et al.*, 2001, CAYANAN, 2009a).

Amplamente utilizado nas estações convencionais de tratamento da água para o abastecimento das cidades, o tratamento físico-químico também foi eficiente para o tratamento da água de irrigação, uma vez que permitiu completa erradicação de inóculo de todos os fitopatógenos testados após a cloração. Para *C. candelabrum* devido provavelmente ao maior tamanho dos conídios (4,5 x 60µm) quando comparado a *B. cinerea* (8 x11 µm) apenas a filtração foi suficiente. Porém para os demais patógenos mesmo com eficiência acima de 90%, o inóculo remanescente após a filtração induziu doenças nas plantas inoculadas. Assim, a cloração é fundamental para a inativação de inóculo fitopatogênico. Para garantir a eficiência da cloração, a concentração do cloro residual deve ser monitorada em todos os pontos da irrigação.

As etapas que precedem a cloração também são importantes, pois além de diminuir a turbidez, eliminando parcial ou totalmente as partículas em suspensão incluindo os fitopatógenos, garantem uma melhor desinfestação. Assim, deve-se manter a turbidez da água com valores menores que 1,0 NTU e pH menor que 8

(LIBÂNIO, 2005), uma vez que estes influenciam diretamente a concentração de cloro residual.

É provável que, para estruturas de resistência de fitopatógenos, como escleródios e microescleródios, as concentrações de cloro apresentadas neste trabalho não sejam eficientes. No entanto, como ocorre em estações de tratamento de água para consumo humano, estruturas de resistência de protozoários como cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*, com dimensões de 8-15 µm e 4-6 µm, respectivamente, são eliminados pela floculação e decantação e aqueles que permanecem são removidos por filtração (HELLER *et al.*, 2004). A filtração em areia foi capaz de remover mais de 99% dos oocistos de *Cryptosporidium parvum* após uma apropriada etapa de coagulação e floculação (GITIS, 2008).

Apesar da eficiência dos métodos testados neste estudo, ambos possuem desvantagens. O tratamento físico-químico além da necessidade do emprego de produtos químicos há também a geração de lodo após o processo de sedimentação, que deverá ser descartado posteriormente. Estas desvantagens não ocorrem com a ultrafiltração, que por outro lado é uma tecnologia mais cara. Portanto o método a ser utilizado visando o tratamento e reaproveitamento da água deverá ser escolhido de acordo com a realidade e necessidade de cada viveiro florestal.

A reutilização da água de irrigação proporciona economia de água e nutrientes (BRUN *et al.*, 2000, SKIMINA, 1992), além de ser uma prática ambientalmente correta. Contudo, a água reutilizada pode estar contaminada e atuar como um importante veículo de disseminação de patógenos. No presente estudo, ambos os métodos testados para o tratamento da água de irrigação foram eficientes na remoção de quatro importantes patógenos da cultura do eucalipto presentes na água de irrigação.

Além de disponibilizar métodos práticos, viáveis e principalmente seguros visando à eliminação de inóculo de fitopatógenos da água de irrigação, este estudo esclareceu frequentes dúvidas sobre a cloração da água de irrigação de mudas de eucalipto, informações até então escassas na área florestal.

5 – CONCLUSÕES

- 1 - O tratamento da água de irrigação por ultrafiltração e por tratamento físico-químico convencional foram eficientes na erradicação de inóculo de fitopatógenos;
- 2 - Apesar da eficiência da ultrafiltração, a cloração da água pode ser uma medida complementar para garantir a isenção de inóculo, principalmente bacteriano;
- 3 - A concentração mínima de cloro residual para erradicar inóculo de todos os patógenos testados foi de 1,74 mg/L.
- 4 - Mudanças de eucalipto irrigadas com água contendo 1,74 mg/L de cloro residual não apresentaram sintomas de fitotoxicidade.

6 – REFERÊNCIAS

- Alfenas, A.C., Zauza, E. A.V., Mafía, R.G. and Assis, T.F. 2009. Clonagem e doenças do eucalipto. 2ª ed. UFV, Viçosa, MG.
- Bartz, J.A., Eayre, C.G., Mahovic, M.J., Concelmo, D.E., Brecht, J.K. and Sargent, S.A. 2001. Chlorine concentration and the inoculation of tomato fruit in packinghouse dump tanks. *Plant Dis.* 85: 885-889.
- Brun, R., Settembrino, A. and Couve, C. 2000. Recycling of nutrient solution for rose (*Rosa hybrid*) in soilless culture. *Acta Hort.* 554: 183-187.
- Cayanan, D.F., Dixon, M., and Zheng, Y. 2009a. Response of container-grown nursery plants to chlorine used to disinfest irrigation water. *Hortscience.* 44: 164-167.
- Cayanan, D.F., Zhang, P., Liu, W., Dixon, M., and Zheng, Y. 2009b. Efficacy of chlorine in controlling five common plant pathogens. *Hortscience* 44: 157-163.
- Copes, W.E., Chastagner, G.A. and Hummel, R.L. 2004. Activity of chlorine dioxide in a solution of ions and pH against *Thielaviopsis basicola* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Dis.* 88: 188-194.
- Datnoff, L.E., Kroll, T.K. and Lacy, G.H. 1987. Efficacy of chlorine for decontamination water infested with resting spores of *Plasmodiophora brassicae*. *Plant Dis.* 71: 734-736.

- Di Bernardo, L. and Dantas, A. Di B. 2005. Métodos e técnicas de tratamento de água. 2ª edição. RiMa, São Carlos, SP.
- Eaton, J.S.; Likens, G.E. and Burmann. H. 1973. Throughfall and stemflow chemistry in a Northern Hardwood Forest. *The Journal of Ecology*. 61:495-508.
- Ehret L.D., Alsinus B., Wohanka W., Menezies G.J. and Utkhede R. 2001. Disinfestation of recirculating nutrient solutions in greenhouse horticulture. *Agronomie*. 21: 323-339.
- Faulkner, L.R. and Bolander, W.J. 1970. Agriculturally-polluted irrigation water as a source of plant-parasitic nematode infestation. *J. Nematol.* 2:368-374.
- Gent, D.H., Lang, J.M., Bartolo, M.E. and Schwartz, H.F. 2005. Inoculum sources and survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* in Colorado. *Plant Dis.* 89:507-514.
- Gitis, V. 2008. Rapid sand filtration of *Cryptosporidium parvum*: effects of media depth and coagulation. *Water Science & Technology: Water Supply*, 8: 129-134
- Goldberg, N.P., Stanghellini, M.E. and Rasmussen, S.L. 1992. Filtration as method for controlling *Pythium* root rot of hydroponically grown cucumbers. *Plant Dis.* 76:777-779.
- Gonçalves, R.C., Alfenas, A.C., Maffia, L.A. and Crous, P.W. 2001. Evaluation of bioassays to quantify *Cylindrocladium* inocula in soil. *Mycoscience* 42: 261-264.
- Graça, R.N., Alfenas, A.C., Maffia, L.A., Titon, M., Alfenas, R.F., Lau, D. and Rocabado, J.M. A. 2009. Factors influencing infection of eucalypts by *Cylindrocladium pteridis*. *Plant Pathology*. 58: 971-981.
- Graves, L. M., and B. Swaminathan. 1993. Universal bacterial DNA isolation procedure. Pages 617-621 in: *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (eds), American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Grech, N.M. and Rijkenberg, F.H.J. 1992. Injection of electrolytically generated chlorine into citrus microirrigation systems for the control of certain waterborne root pathogens. *Plant Dis.* 76: 457-461.
- Heller, L., Bastos, R.K.X., Vieira, M.B.C.M., Bevilacqua, P.Di., Brito, L.L.A.De, Mota, S.M.M., Oliveira, A.A., Machado, P.M., Salvador D.P. and Cardoso, A.B. 2004. *Cryptosporidium* e *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 13: 79- 92.

- Hong, C., Richardson, P.A., and Kong, P. 2002. Comparison of membrane filters as a tool for isolating pythiaceous species from irrigation water. *Phytopathology*. 92: 610-616.
- Hong, C.X., Richardson, P.A., Kong, P. and Bush, E.A. 2003. Efficacy of chlorine on multiple species of *Phytophthora* in recycled nursery irrigation water. *Plant Dis.* 87: 1183-1189.
- Honório, B.A.D., Horbe, A.M.C. and Seyler, P. 2010. Chemical composition of rainwater in western Amazonia — Brazil. *Atmospheric Research*. 98: 416 – 425.
- Kado, C.I. and Heskett, M.G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-976.
- Libânio, M. 2005. *Fundamentos de Qualidade e Tratamento de Água*. Átomo, Campinas, SP.
- Macdonald, J.D., Ali-Shtayeh, M.S., Kabashima, J. and Stites, J. 1994. Occurrence of *Phytophthora* in recirculated nursery irrigation effluents. *Plant Dis.* 78: 607-611.
- Mafia, R.G., Alfenas, A.C., Ferreira, E.M., Machado, P.S., Binoti, D.H.B., Leite, F.P. and Souza, F.L. 2008. Reuse of untreated irrigation water as a vehicle of inoculum of pathogens in eucalyptus clonal nursery. *Tropical Plant Pathology*. 33: 096-102.
- Mancuso, P.C.S. and Santos, H.F. dos (editores). 2003. *Reuso de Água*. Manole. Barueri, SP.
- Mari, M., Cembali, T., Baraldi, E., and Casalini, L. 1999. Peracetic acid and chlorine dioxide for postharvest control of *Monilinia laxa* in stone fruits. *Plant Dis.* 83:773-776.
- Mujeriego, R. and Asano, T. 1999. The role of advanced treatment in wastewater reclamation and reuse. *Wat. Sci. Tech.* 40: 1-9.
- Neher, D. and Duniway, J.M. 1992. Dispersal of *Phytophthora parasitica* in tomato fields by furrow irrigation. *Plant Dis.* 76: 582-586.
- Norman, D.J., Yuen, J.M.F., Resendiz, R., and Boswell, J. 2003. Characterization of *Erwinia* populations from nursery retention ponds and lakes infecting ornamental plants in Florida. *Plant Dis.* 87: 193-196.
- Ohtani, T., Kaneko, A., Fukuda, N., Hagiwara, S. and Sase, S. 2000. Development of a membrane disinfection system for closed hydroponics in a greenhouse. *J. Agric. Engang. Res.* 77: 227-232.

- Oron, G., Gillermana, L., Buriakovskya, N., Bickd, A., Gargir, M., Dolan, Y., Manor, Y., Katze, L. and Haginc, J. 2008. Membrane technology for advanced wastewater reclamation for sustainable agriculture production. *Desalination*. 218: 170-180.
- Pastrick, K.H., and Maiss, E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *J. Phytopathology*. 148: 619 - 626.
- Poncet, C., Offroy, M., Bonnet, G., Brun, R. and Zieslin, N. 2001. Disinfection of recycling water in rose cultures. *Acta Hort.* 547: 121-126.
- Ranzini, M. and Lima, W. de P. 2002. Comportamento hidrológico, balanço de nutrientes e perdas de solo em duas microbacias reflorestadas com *Eucalyptus*, no Vale do Paraíba, SP. *Scientia Forestalis*. 61: 144-159.
- Roberts, R.G. and Reymond, S.T. 1994. Chlorine dioxide for reduction of postharvest pathogen inoculum during handling of tree fruits. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 2864-2868.
- Rodrigues, S.B.S. 2007. Análise do uso de água em unidades de produção de mudas de eucalipto. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG
- Romeiro, R. da S. 2001. Métodos em bacteriologia de plantas. UFV, Viçosa, MG
- Runia, W.T. 1995. A review of possibilities for disinfection of recirculation water from soilless cultures. *Acta Hort.* 382:221 -228.
- Sanogo, S. and Moorman, G.W. 1993. Transmission and control of *Pythium aphanidermatum* in an ebb-and flow subirrigation system. *Plant Dis*. 77:287-290.
- Schuerger, A.C. and Hammer, W. 2009. Use of cross-flow membrane filtration in a recirculating hydroponic system to suppress root disease in pepper caused by *Pythium myriotylum*. *Phytopathology*. 99: 597-607.
- Segall, R.H. 1968. Fungicidal effectiveness of chlorine as Influenced by concentration, temperature, pH, and spores time. *Phytopathology*. 58:1412-1414.
- Shokes, F.M., and Mccarter, S.M. 1979. Occurrence, dissemination, and survival of plant pathogens in surface irrigation ponds in southern Georgia. *Phytopathology*. 69: 510-516.
- Skimina, C.A. 1992. Recycling water, nutrients, ant waste in nursery industry. *Hortscience*. 27: 968 -971.
- Spotts, R.A. and Cervantes, L.A. 1993. Use of filtration for removal of conidia of *Penicillium expansum* from water in pome fruit packinghouses. *Plant Dis*. 77:828-830.

- Spotts, R.A., and Peters, B.B. 1980. Chlorine and chlorine dioxide for control of d'Anjou pear decay. *Plant Dis* 64:1095-1097.
- Thompson, D.L. 1965. Control of bacterial stalk rot of corn by chlorination of water in sprinkler irrigation. *Crop science*.5: 369-370.
- Toze, S. 2006. Reuse of effluent water-benefits and risks. *Agricultural Water Management*. 80: 147-159.
- Vale, F.X.R., Fernandes Filho, E.I. and Liberato, J.R. (2003) Quant. A software plant disease severity assessment. 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch New Zealand, p.105.
- Vernooij, C.J.M. 1992. Reduction of environmental pollution by recirculation of drain water in substrate cultures. *Acta Horticulturae*. 303: 9-13.
- Werres, S., Wagner, S., Brand, T., Kaminski, K., and Seipp, D. 2007. Survival of *Phytophthora ramorum* in recirculating irrigation water and subsequent infection of *Rhododendron* and *Viburnum*. *Plant Dis*. 91:1034-1044.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H. and Nishiuchi, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. & *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiology and Immunology*. 39:897-904.