

Isolamento e quantificação de *Pectobacterium* spp. em água de irrigação utilizando meio cristal violeta pectato

Isolation and quantification of Pectobacterium spp. in irrigation water using crystal violet pectate medium

Aline Aparecida dos **SANTOS**^{1, 2}; Jorge Luiz Moretti de **SOUZA**¹; Tiago Miguel **JARECK**¹ & Mariana Vasconcelos **BARROCA**¹

RESUMO

Testou-se o meio cristal violeta pectato (CVP) para isolar e quantificar bactérias do gênero *Pectobacterium* na água de irrigação de hortaliças, em três locais de Colônia Murici, Paraná. Amostras de água foram coletadas ao longo de um ano, em dois reservatórios (“B” e “C”) e uma nascente. Preparou-se o meio CVP adaptado (pectina cítrica no lugar de pectina de sódio), que foi testado com isolado padrão de *Pectobacterium carotovorum*. As amostras foram inoculadas, com 15 repetições, e incubadas a 28°C por 10 dias; posteriormente se realizaram a contagem das colônias e repicagem. A concentração (UFC ml⁻¹) nas amostras foi calculada com a média obtida de 15 microgotas. Obtiveram-se 83 isolados de bactérias pectolíticas, e 21 foram testados quanto à patogenicidade em frutos de pimentão; nenhum apresentou sintoma de podridão mole. O fator de maior influência na quantidade de bactérias foi a precipitação acumulada sete dias antes da coleta, sendo o reservatório “B” o que evidenciou maior correlação. O meio CVP adaptado permitiu isolar e quantificar *Pectobacterium* spp. em água de irrigação de hortaliças, ao nível de detecção de 5.10⁻¹. As amostras e o período analisados apresentaram baixo risco de contaminação das hortaliças pela água de irrigação.

Palavras-chave: bactérias pectolíticas; canela preta; meio de cultura; qualidade da água; talo oco.

ABSTRACT

The crystal violet pectate medium (CVP) was tested to isolate and quantify bacteria of the genus *Pectobacterium* in the irrigation water of vegetables, in three locations of the Colony Murici, Paraná. Water samples were collected over a year, in two reservoirs (“B” and “C”) and one spring of river. An adapted CVP medium (citric pectin in place of sodium pectin) was prepared, and was tested with standard *Pectobacterium carotovorum* isolate. The samples were inoculated, with 15 repetitions, and incubated at 28°C for 10 days and, afterwards, colony counting and subculturing was performed. The concentration (CFU ml⁻¹) in the samples was calculated with an obtained average of 15 micro-drops. 83 pectolytic bacteria isolates were obtained, 21 of which were tested for pathogenicity in sweet pepper fruits, and none showed symptoms of soft rot. The factor with the greatest influence on the amount of bacteria was the accumulated precipitation seven days before collection, with Reservoir “B” showing the greatest correlation. The adapted CVP medium allowed to isolate and quantify *Pectobacterium* spp. in irrigation water of vegetables, at the detection level of 5.10⁻¹. The analyzed samples and period presented a low risk of contamination of the vegetables by irrigation water.

Keywords: black cinnamon; culture medium; hollow stem; pectolytic bacteria; water quality.

Recebido em: 5 jun. 2019

Aceito em: 19 jul. 2020

¹ Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua XV de Novembro, n. 1.299, Centro – CEP 80060-000, Curitiba, PR, Brasil.

² Autor para correspondência: aline.santos.trabalhos@gmail.com.

INTRODUÇÃO

Podridão mole, canela preta e talo oco são doenças que incidem em brássicas, batata e tomate, tendo ampla distribuição geográfica e importância econômica, podendo resultar em perdas de produção acima de 50% em diversas famílias botânicas (MANSFIELD *et al.*, 2012). São doenças que têm como agente etiológico a bactéria *Pectobacterium carotovorum*, e sua presença nas águas de irrigação é considerada uma das principais fontes de inóculo de doenças (EL TASSA & DUARTE 2004; CZAJKOWSKI *et al.*, 2015; KWAMBOKA *et al.*, 2017).

Os sintomas das doenças causadas por *Pectobacterium* spp. nos hospedeiros geralmente se caracterizam pelo apodrecimento mole dos tecidos, em virtude da ação da enzima pectinase, que degrada os pectatos da lamela média, desintegrando os tecidos (HÉLIAS *et al.*, 2012). Porém há necessidade de se realizar análise quanto à presença efetiva de *Pectobacterium* spp., uma vez que a podridão mole também pode ocorrer em detrimento do ataque de *Pseudomonas* (LEITE *et al.*, 2014). Sua ocorrência mais comum é em tecidos moles, como a medula de plantas de alface, repolho e tomateiro, em frutos como tomate e pimentão, além de tubérculos de batata (MANSFIELD *et al.*, 2012).

Os sintomas podem ser observados durante e após a colheita (LEITE *et al.*, 2014). Dessa forma, a bactéria somente é detectada após o ataque, quando já houve ocorrência de danos e perdas econômicas ao produtor. A realização de análises quanto à presença da bactéria em águas destinadas a irrigação pode prever a manifestação da bactéria e, previamente, planejar adequadas práticas fitossanitárias de forma a reduzir perdas (CZAJKOWSKI *et al.*, 2015).

O gênero *Pectobacterium* foi inicialmente denominado de *Erwinia*, em 1917, em homenagem a um dos fundadores da fitobacteriologia, Erwin F. Smith. É uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa, que não forma endósporo e secreta grande quantidade de enzima extracelular (REZZONICO *et al.*, 2016). Em meio seletivo cristal violeta pectato (CVP), apresenta colônias côncavas graças à degradação da pectina (HÉLIAS *et al.*, 2012) e rápido crescimento (24 h) em meio de cultura não seletivo, como o 523 de Kado & Heskett (1970) (ROMEIRO, 2001).

A bactéria *Pectobacterium carotovorum* pode permanecer durante longo período no solo, em restos culturais, e de forma saprófita, sobrevivendo até mesmo na água, podendo também estar presente em reservatórios de água para irrigação, sendo esse um eficiente mecanismo de dispersão da bactéria. O patógeno infecta a planta nos seus ferimentos e aberturas naturais, durante a estação quente e úmida, podendo levar as plantas à morte dentro de poucos dias (CHARKOWSKI, 2015).

A dispersão de microrganismos fitopatogênicos pela água já é conhecida para *Phytophthora*, na análise de reação da polimerase em cadeia (PCR) espécie-específico (REESER *et al.*, 2011). Contudo a técnica nem sempre é capaz de quantificar a bactéria e possui custo elevado para incorporação em análises de rotina de qualidade de água.

O meio cristal violeta pectato (CVP) é um meio de cultura seletivo que permite o crescimento de bactérias pectolíticas (MARIANO *et al.*, 2005). Os meios de cultura consistem na associação qualitativa e quantitativa de substâncias que fornecem os nutrientes necessários ao desenvolvimento (cultivo) de microrganismos fora do seu meio natural (SAGRILLO, 2015). Tendo em vista a ampla diversidade metabólica dos microrganismos, existem vários tipos de meios de cultura para satisfazer as diversas exigências nutricionais. Além dos nutrientes, também é preciso fornecer condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento dos microrganismos, tais como pH, pressão osmótica, umidade, temperatura, atmosfera (aeróbia, microaeróbia ou anaeróbia), entre outras (VANDERZANT & SPLTTSTOESSER, 1992).

O meio CVP apresenta como principal fonte de carbono o polipectato de sódio; assim, apenas microrganismos que possuem a enzima pectinase poderão se desenvolver no meio. Além disso, o cristal violeta tem efeito de inibição sobre o crescimento de bactérias gram-positivas (HÉLIAS *et al.*, 2012).

A aquisição e a utilização de polipectato de sódio adequado no Brasil têm enfrentado muitas dificuldades e problemas, mas a pectina é um produto que pode substituir o polipectato de sódio, pois apresenta composição semelhante, baixo custo e pode ser facilmente adquirida em vários locais (EL TASSA & DUARTE, 2004). Hélias *et al.* (2012) trabalharam com novas fontes de pectinas,

usadas como agentes espessantes em alimentos, na elaboração do meio CVP para isolamento da *Pectobacterium* spp., e utilizando as pectinas alternativas foi possível elaborar um meio com seletividade satisfatória, que permitiu que as cepas da bactéria fossem recuperadas e preveniu a ocorrência de bactérias não desejadas nas placas.

Para quantificar eficazmente as bactérias em um meio, pode-se recorrer à técnica da contagem em microgotas, que é usada até mesmo para determinação de curvas de crescimento (ROMEIRO, 2001). A contagem em microgotas, aliada a um meio seletivo como o CVP, permite quantificar apenas o microrganismo de interesse, excluindo seus contaminantes (LOTTO, 2008).

Teve-se como objetivo no presente trabalho testar o meio CVP para isolar e quantificar bactérias do gênero *Pectobacterium* em água utilizada para irrigação de hortaliças, em três locais de Colônia Murici, localizada no município de São José dos Pinhais, Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de água foram coletadas em Colônia Murici, município de São José dos Pinhais, Paraná (coordenadas 25° 35' de latitude sul / 49° 07' de longitude oeste e 933 m de altitude). O clima local é *Cfb*, com verões amenos e ocorrência de geada, apresentando precipitação média anual acima de 1.200 mm, sem estação seca e temperatura média anual de 17°C (ÁLVARES *et al.*, 2013). A região é caracterizada como grande produtora de hortaliças.

As amostras de água foram retiradas de dois reservatórios, sendo um com menor uso do solo (reservatório "B") e outro com maior uso (reservatório "C"), e também de uma nascente preservada como testemunha (figura 1). As sub-bacias de cada um dos pontos de coleta estão separadas pelo mesmo divisor de águas, que foi escolhido para evitar a interferência de outros fatores e para propiciar o menor intervalo de tempo possível entre a coleta de um ponto e outro. Mais detalhes referentes à caracterização da sub-bacia quanto ao uso do solo e à qualidade da água podem ser encontrados em Jarek *et al.* (2016).

- Agricultura
- Pastagem ou campo
- Mata
- Vegetação arbórea
- Reflorestamento
- Reservatórios
- Habitações

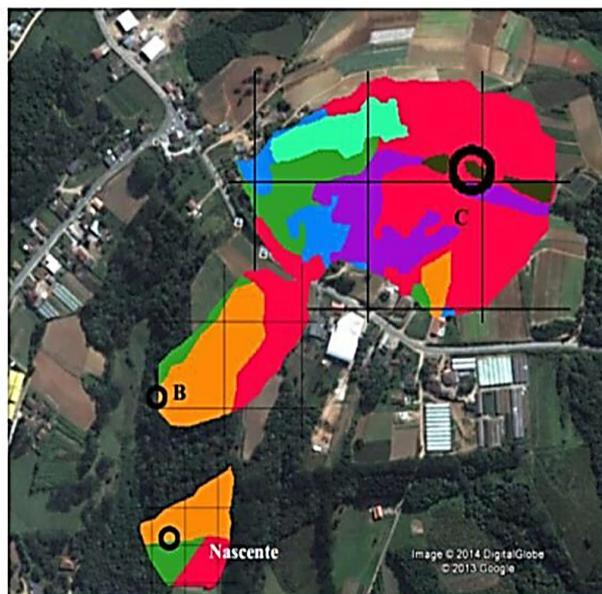


Figura 1 – Localização da nascente e dos reservatórios B e C e respectivos tipos de uso do solo nas bacias de drenagem estudadas, em São José dos Pinhais, PR, sobrepostos em imagem de satélite. Fonte: Jarek *et al.* (2016).

A coleta das amostras e as análises da água foram feitas mensalmente no período de um ano, com intervalo de 25 minutos entre os reservatórios (nascente preservada e reservatórios B e C), sempre no mesmo horário. O período de coleta e análise ocorreu mensalmente durante todo o ano

de 2013. A água foi coletada sempre no mesmo ponto, com garrafas de vidro esterilizadas (121°C, 1 atm, 20 minutos), com volume de 250 ml. Durante o transporte, os frascos foram refrigerados com gelo retornável. A temperatura do ambiente e da água foram medidas no momento da coleta das amostras, utilizando termo-higrômetro digital e termômetro de bulbo (Incoterm®), respectivamente. O pH foi medido com pHmetro (Lutron PH-206®).

As precipitações pluviométricas foram medidas com pluviômetro tipo cunha, instalado a 1,5 m de altura, próximo aos locais de coleta das amostras de água. As leituras diárias de precipitação foram agrupadas em períodos mensais e em sete dias.

Efetuarão-se as análises de *Pectobacterium* utilizando o meio CVP, adaptado para substituição do polipectato de sódio por pectina cítrica (tabela 1); o meio foi testado previamente quanto à seletividade, comparativamente ao meio não seletivo 523 de Kado & Heskett (1970), e ao crescimento de um isolado padrão de *Pectobacterium*. Optou-se pela substituição do polipectato pela pectina cítrica em função do custo e da facilidade de obter o produto. A pectina cítrica é um material facilmente encontrado no comércio, geralmente empregada em produtos com baixo teor de açúcar, geleias, na formação de gel, entre outros.

Tabela 1 – Composição do meio cristal violeta pectato.

Ingredientes	Quantidade (g L ⁻¹)
Violeta cristal	0,0015
Lauril sulfato de sódio	0,10
Hidróxido de sódio	0,36
Nitrato de sódio	2,00
Pectina	18,00
Ágar	10,00
Água	1.000 ml

Fonte: Adaptado de Schaad (2001).

Para a quantificação usou-se a técnica da contagem em microgotas (ROMEIRO, 2001). As placas foram incubadas a 28°C, durante 10 dias, e cada colônia foi contabilizada, identificada e isolada para testes posteriores.

Após seleção prévia por intermédio do método com meio CVP, os isolados obtidos nas amostras de água dos reservatórios foram codificados e armazenados. Ao final, realizou-se o teste de patogenicidade em aproximadamente 25% dos isolados obtidos, com o uso de frutos de pimentão com quatro repetições. Os frutos foram desinfetados e feridos com palitos de madeira esterilizados e inoculados em colônias com três dias de crescimento em meio 523 de Kado & Heskett (1970). Os frutos foram incubados a 28°C e avaliados a cada 24 horas quanto ao aparecimento de sintomas até o quarto dia.

A Anova e o teste de Tukey (5% de significância) foram realizados no *software* estatístico Assistat 7.7, para analisar a seletividade do meio, considerando as variáveis bactérias pectolíticas e os dados entre reservatórios. Análises de regressão linear e seus respectivos coeficientes de correção também foram determinados em planilha eletrônica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 2 encontram-se as medidas de tendência e de dispersão da temperatura e da umidade relativa do ar, precipitação e vazão nos três locais de coleta analisados. A temperatura

média e a umidade relativa do ar não apresentaram diferenças estatísticas nos locais avaliados. Mediu-se a precipitação em um único posto, intermediário aos locais estudados. As vazões médias obtidas no período analisado foram diferentes nas três áreas, sendo 1,15; 0,9 e 12,1 m³ h⁻¹ na nascente e reservatórios B e C, respectivamente.

Tabela 2 – Medidas de tendência e de dispersão das variáveis analisadas nos três locais de coleta estudados.

Medida	Temperatura (°C)		Umidade relativa (%)	Precipitação (mm)		Vazão (m ³ h ⁻¹)
	Água	Ambiente		Mensal	Sete dias**	
----- Nascente -----						
Menor valor	11,6	4,3	64	–	–	0,84
Maior valor	19,2	25	82	–	–	1,73
Média *	16,0 a	16,68 a	73,7 a	115,2	75,6	1,15
----- Reservatório B -----						
Menor valor	11,4	8,8	65	–	–	0,2
Maior valor	24,8	28,2	82	–	–	1,7
Média *	17,0 a	19,0 a	72,3 a	115,2	75,6	0,9
----- Reservatório C -----						
Menor valor	11,3	4,6	55	–	–	0
Maior valor	28,4	29,3	86	–	–	24,87
Média *	19,0 a	18,0 a	75,6 a	115,2	75,6	12,1
C.V.%	27,1	36,36	18,53			

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey;

** precipitação acumulada de sete dias antes da coleta.

O menor nível de detecção chegou a $5 \cdot 10^{-1}$ unidades formadoras de colônia por ml (UFC ml⁻¹) na microgota de 20 µL da amostra (tabela 3). Níveis de detecção de até $1 \cdot 10^2$ UFC ml⁻¹ são encontrados comumente com metodologias de biologia molecular para as bactérias *Pectobacterium carotovorum* e *Ralstonia solanacearum*, em tubérculos de batata (CARVALHO, 2010). Dessa forma, verificou-se que o valor encontrado na alíquota está abaixo dos valores críticos determinados em literatura. Carvalho (2010) ressalta que o método reação em cadeia da polimerase (PCR) apresenta dificuldade na detecção dos fitopatógenos (bactérias no caso do presente estudo) em estado latente (em baixo nível no tecido vegetal), sendo ainda um método laborioso. Logo, os resultados obtidos na presente pesquisa indicam que o método proposto pode ser adequado para a detecção de valores baixos para a presença de *Pectobacterium carotovorum*. Por tratar-se de método simples e de baixo custo, indicou também ser uma alternativa promissora para a realização de análises rotineiras quanto à qualidade da água.

Obtiveram-se 83 isolados ao longo do ano. Entretanto, após a caracterização dos isolados, verificou-se não serem positivos para nenhuma amostra dos reservatórios, por causa das suas características bioquímicas. A cor das colônias foi comparada com a cor característica de *Pectobacterium*. Colônias contendo cor característica, crescimento negativo a 40°C e anaerobiose facultativa foram identificadas como *Pectobacterium* positivo na amostra (tabela 3).

Tabela 3 – Teste de seletividade do meio cristal violeta pectato para os três locais analisados.

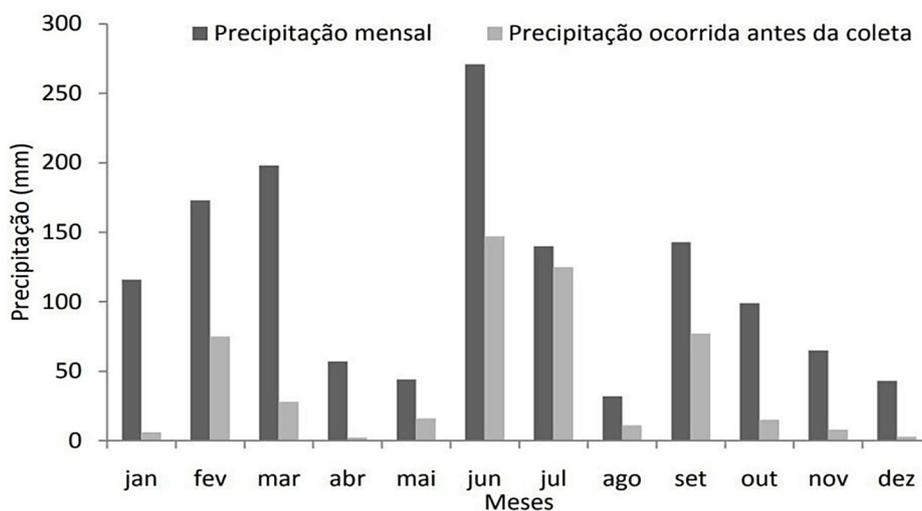
Amostras	Número de colônias por microgota		Nível de detecção	
	Meio CVP	Meio 523 (padrão)	Meio CVP	Meio 523
Nascente	1	363	$5 \cdot 10^{-1}$	$1,8 \cdot 10^{-4}$
Reservatório B	3	95	$1,5 \cdot 10^{-2}$	$4,75 \cdot 10^{-3}$
Reservatório C	2	139	$1 \cdot 10^{-2}$	$6,95 \cdot 10^{-3}$

Os resultados indicaram flutuação sazonal para a concentração de bactérias pectolíticas obtidas com o meio CVP nos três locais de coleta (tabela 4). Dos 83 isolados obtidos ao longo do ano, mais da metade (45) foi obtida apenas nos meses de junho e julho, período em que ocorreram as maiores precipitações antes da coleta, 147 e 125 mm, respectivamente (figura 2). Verificou-se o mesmo efeito para outros grupos de bactérias, como, por exemplo, coliformes e bacterioplâncton (AMORIM & ARAÚJO, 2012; JAREK *et al.*, 2016).

Tabela 4 – Concentração de bactérias obtidas com o meio CVP, ao longo do período de um ano (janeiro a dezembro), nos três locais analisados.

Local/ Reservatório	Concentração de bactérias UFC ml ⁻¹												Média
	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.	
Nascente	46,7	0,0	3,3	10,0	0,0	0,0	3,3	6,7	10,0	6,7	0,0	3,3	7,5
B	3,3	6,7	10,0	0,0	0,0	26,7	16,7	3,3	3,3	0,0	0,0	0,0	5,8
C	6,7	0,0	6,7	0,0	0,0	30,0	73,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,7

As variações verificadas podem ser explicadas principalmente pelo regime de precipitação, em que chuvas de maior volume, próximo à data de coleta, contribuíram para o aumento de UFC ml⁻¹ obtidas no meio CVP (figuras 2 e 3; AMORIM & ARAÚJO, 2012).


Figura 2 – Precipitação mensal e precipitação ocorrida uma semana antes de cada amostragem, entre janeiro e dezembro.

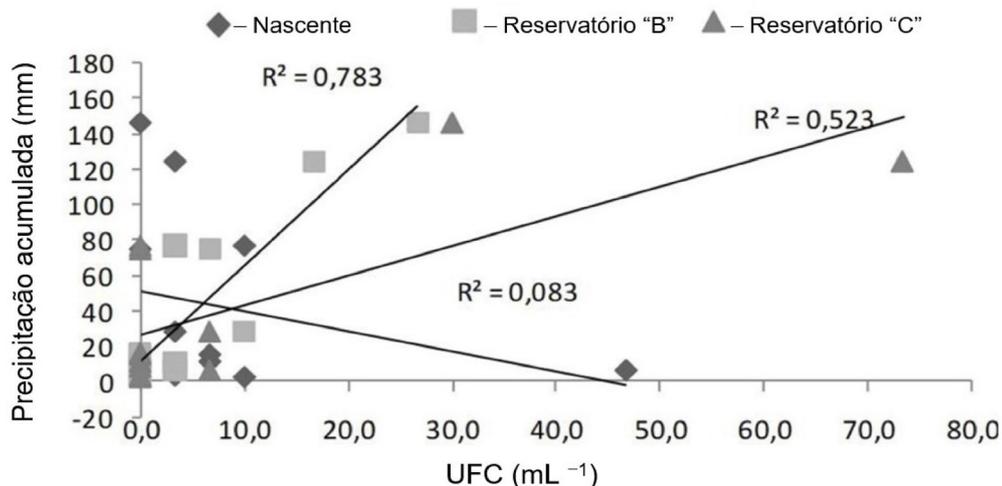


Figura 3 – Correlação entre número de UFC ml⁻¹ de bactérias pectolíticas obtidas em meio CVP com a precipitação acumulada sete dias antes da coleta, nos três locais estudados.

As correlações entre o número de bactérias pectolíticas obtidas em meio CVP e a precipitação acumulada sete dias antes da coleta (figura 3) podem ser consideradas estreitas e positivas para os reservatórios B ($R^2 = 0,78$) e C ($R^2 = 0,52$). Os resultados indicaram que, quanto maior a precipitação, maior será a contaminação dos reservatórios com o grupo de bactérias averiguado. Para a nascente, o mesmo efeito não foi verificado, uma vez que ela se encontra protegida pela vegetação ripária, a qual impede o transporte de sedimentos e atua como filtro (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Como estratégia de sobrevivência, muitas bactérias formam biofilmes, os quais normalmente estão aderidos a substratos, coloides ou material particulado (ARAÚJO *et al.*, 2010). Portanto, chuvas mais intensas provocam maior transporte de sedimentos com a erosão e aumentam a possibilidade da formação de biofilmes e, conseqüentemente, o número de bactérias (PASTERNAK, 2009).

Dos 83 isolados obtidos, 21 foram testados no tocante à patogenicidade em frutos de pimentão. O pimentão, quando infectado pela bactéria, rapidamente apresenta podridão mole, com desintegração dos tecidos em virtude da ação das enzimas pectinases, sendo comumente utilizado para testes de patogenicidade e isolamento (EL TASSA & DUARTE, 2004). Nenhum dos 21 isolados testados apresentou sintoma de podridão mole, ou seja, todos evidenciaram resultado negativo de patogenicidade. Nenhum dos frutos exibiu sintomas típicos após a inoculação quando incubados a 28°C por um período de quatro dias, indicando que a disseminação da bactéria nos reservatórios estudados foi muito baixa ou nula. Os resultados encontrados nas análises ao nível de detecção $5 \cdot 10^{-1}$ indicaram boa qualidade da água, visto que não houve resultado positivo para patogenicidade. Contudo, para novos estudos, considera-se que seria importante a realização de análises diárias dessa concentração de bactérias, principalmente nos períodos de maior volume de precipitação, pois, conforme verificado na figura 3, com exceção da nascente, os reservatórios B e C apresentaram correlação positiva entre as variáveis UFC e precipitação acumulada.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados alcançados, conclui-se que o meio cristal violeta pectato adaptado permitiu isolar e quantificar a bactéria *Pectobacterium* spp. em água de irrigação de hortaliças, ao nível de detecção de $5 \cdot 10^{-1}$ unidades formadoras de colônia por ml (UFC ml⁻¹). A precipitação acumulada sete dias antes da coleta de amostras foi o fator que mais influenciou a quantidade de bactérias presente nas amostras. O reservatório B teve maior correlação positiva entre a concentração de bactérias e a precipitação antes da coleta, indicando que, quanto maior a precipitação, maior será a quantidade de bactérias do gênero estudado, nessas águas. E os isolados de bactérias pectolíticas testados não apresentaram patogenicidade em frutos de pimentão.

REFERÊNCIAS

- Álvares, C. A., Stape, J. L., Sentelhas, P. J., Gonçalves, J. L. M. & Sparoveck, G. Koppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*. 2013; 22(6): 711-728.
doi: 10.1127/0941-2948/2013/0507
- Amorim, A. S. & Araújo, M. F. F. Seasonal distribution of nanoflagellates and bacterioplankton and relationship with environmental factors in a Brazilian semi-arid reservoir. *Acta Scientiarum*. 2012; 34: 399-406.
doi: <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v34i4.10832>
- Araújo, E. A., Andrade, N. J., Carvalho, A. F., Ramos, A. M., Silva, C. A. S. & Silva, L. H. M. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. *Química Nova*. 2010; 33(9): 1940-1948.
doi: <https://doi.org/10.1590/s0100-40422010000900022>
- Carvalho, J. B. Desenvolvimento e validação de qPCR para detecção de pectobactérias e *Ralstonia solanacearum* em tubérculos de batata. [Tese de Doutorado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010.
- Charkowski, A. O. Biology and control of *Pectobacterium* in potato. *American Journal Potato Research*. 2015; 92: 223-229.
doi: <https://doi.org/10.1007/s12230-015-9447-7>
- Czajkowski, R., Pérombelon, M. C. M., Jafra, S., Lojkowska, E., Potrykus, M., Van-der-Wolf, J. M. & Sledz, W. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. *Annals of Applied Biology*. 2015; 166: 18-38, 2015.
doi: 10.1111/aab.12166
- El Tassa, S. O. M. & Duarte, V. Ocorrência de pectobactérias em tubérculos de batata-semente no estado do Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira*. 2004; 29: 620-625.
doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582004000600004>
- Hélias, V., Hamon, P., Huchet, E., Wolf, J. V. D & Andrivon, D. Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Plant Pathology*. 2012; 61: 339-345.
doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02508.x>
- Jarek, T. M., Souza, J. L. M., Favaretto, N. & Ruaro, L. Water quality of the reservoirs used for irrigation in São José dos Pinhais, Paraná State, Brazil. *Ciência Rural*. 2016; 46: 1-6.
doi: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150420>
- Kado, C. I. & Heskett, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*. 1970; 60: 969-979.
doi: 10.1094/phyto-60-969
- Kwamboka, N. C., Ngwela, W. J. & Robert, G. M. Management of *Pectobacterium carotovorum* infections in potatoes (*Solanum tuberosum* L.) using *Tagetes minuta* and *Capsicum frutescens* extracts. *Journal of Agricultural and Crop Research*. 2017; 5(5): 77-84.
- Leite, L. N., Haan, E. G., Krijger, M., Kastelen, P., Zouwen, P. S. V., Bovenkamp, G. W. V., Tebaldi, N. D. & Van-der-Wolf, J. M. First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in the Netherlands. *New Disease Reports*. 2014; 29: 24.
doi: <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2014.029.02>
- Lotto, M. C. Avaliação da contaminação de alface (*Lactuca sativa*) por coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* em sistemas de cultivo orgânico e convencional [Dissertação de Mestrado]. Araras: Universidade Federal de São Carlos; 2008.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G. & Foster, G. D. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 2012; 13: 614-629.
doi: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>

Mariano, R. L. R., Silveira, E. B., Alvarado, I. D. C. M. & Silva, A. M. F. Bactérias fitopatogênicas pectinolíticas dos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica. 2005; 2: 121-153.

Oliveira, C. A., Kliemann, H. J., Correchel, V. & Santos, F. C. V. Avaliação da retenção de sedimentos pela vegetação ripária pela caracterização morfológica e físico-química do solo. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. 2010; 14(12): 1281-1287.

doi: <https://doi.org/10.1590/S1415-43662010001200005>

Pasternak, J. Biofilmes: um inimigo (in)visível. Revista SBCC – Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação. 2009; 39: 36-38.

Reeser, P. W., Sutton, W., Hansen, E. M., Remigi, P. & Adams, G. C. *Phytophthora* species in forest streams in Oregon and Alaska. Mycologia. 2011; 1: 22-35.

doi: <https://doi.org/10.3852/10-013>

Rezzonico, F., Smits, T. H. M., Born, Y., Blom, J., Frey, J. E., Goesmann, A., Cleenwerck, I., De Vos, P., Bonaterra, A., Duffy, B. & Montesinos, E. *Erwinia gerundensis* sp. nov., a cosmopolitan epiphyte originally isolated from pome fruit trees. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2016; 66: 1583-1592.

doi: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000920>

Romeiro, R. S. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV; 2001. 279 p.

Sagrillo, F. S. Processos produtivos em biotecnologia. São Paulo: Erica; 2015. 120 p.

Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chun, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3. ed. St. Paul: American Phytopathological Society; 2001. 373 p.

Vanderzant, C. & Splittstoesser, D. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3. ed. Washington: American Public Health Association; 1992. 1219 p.