

## ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *LACTOBACILLUS* SP. ENDOFÍTICOS PRESENTES NA FOLHA DE COUVE MANGEIGA (*BRASSICA OLERACEA* L VAR. *ACEPHALA*)

Gabriela Roberto Silva (IC) e José Luiz Caldas Wolff (Orientador)

**Apoio: PIBIC Mackpesquisa**

### RESUMO

A couve manteiga (*Brassica oleracea*) é uma hortaliça que faz parte do grupo dos alimentos denominado funcionais e dentre as propriedades dos alimentos funcionais está o papel probiótico, mas pouco se sabe sobre a microbiota da couve, por isso a identificação de *Lactobacillus* endofíticos pode indicar um possível papel probiótico à couve, já que os endofíticos vivem no interior do tecido vegetal sem causar danos à planta hospedeira. Portanto, este estudo teve como objetivo identificar e caracterizar a diversidade de espécies de *Lactobacillus* endofíticos presente na couve e, dessa forma, identificar um possível papel probiótico no consumo dessa hortaliça. A investigação foi feita a partir de folhas de couve de origem comercial e plantadas tanto em condições naturais, como em plantas com o solo suplementado com *Lactobacillus fermentum*. As folhas foram desinfetadas, evitando qualquer bactéria que possa viver na superfície da folha, e em seguida o extrato obtido foi inoculado em meio MRS, que propicia o crescimento de bactérias do ácido láctico. Entretanto, em nenhum dos testes foi identificado à presença de *Lactobacillus* endofíticos. Portanto, novos testes devem ser realizados. Uma possibilidade para novos experimentos seria a inoculação das bactérias de espécies variadas pertencentes ao gênero *Lactobacillus* diretamente nas sementes para analisar a colonização e a movimentação das bactérias para os tecidos foliares.

**Palavras-chave:** Couve manteiga, Probióticos, Endofíticos.

### ABSTRACT

The kale (*Brassica oleracea*) is a vegetable that belongs to the group of foods called functional and from the properties of functional foods is the role probiotics, but little is known about kale microbiota. So, the identification of endophytics *Lactobacillus* may indicate a possible probiotic role in kale, since the endophytics lives inside plant tissues without damaging the host plant. Therefore, the objective of this study was to identify and characterize the diversity of endophytic *Lactobacillus* species present in kale and, in this way, identify a possible probiotic role in the consumption of this vegetable. The study was made from kale leaves of commercial origin and planted both under natural conditions and in plants with soil supplemented with *Lactobacillus fermentum*. Then, the leaves were disinfected avoiding any bacteria that could live on the surface of the leaf, and then the

obtained extract was inoculated in MRS medium, that propitiates the growth of lactic acid bacteria. However, *Lactobacillus* growth was not observed in none of the nine samples analyzed. One possibility for new experiments would be the inoculation of the bacteria of different species belonging to the genus *Lactobacillus* directly into the seeds to analyze the colonization and the movement of the bacteria to the foliar tissues.

**Keywords:** Kale, endophytics, *Lactobacillus*.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Problema de pesquisa

As bactérias apresentam enorme diversidade e grande plasticidade genômica e por isso conseguem se adaptar e viver em diversos ambientes, desde fontes termais até o interior de folhas vegetais. Os *Lactobacillus* vivem principalmente no trato intestinal de mamíferos (MORAIS; JACOB, 2006), em produtos vegetais, em produtos lácteos, na boca humana e nas fezes de crianças (BERGEY, 1948), mas também, podem ser encontrados no interior das folhas dos vegetais, estes são denominados *Lactobacillus* endofíticos. Já foram encontradas diversas espécies de *Lactobacillus* no interior da folha de feijão, *Phaseolus vulgaris*, (COSTA et al., 2012) e de milho, *Zea mays*, (SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2014), mas pouco se sabe sobre a variedade de espécies presentes no interior das folhas de couve.

A couve é um alimento muito rico nutricionalmente (KAPUSTA-DUCH, 2012) que também possuem um papel funcional no organismo (KIM et al., 2008). Estudos preliminares realizados no nosso laboratório indicaram que a folha da couve é um habitat de *Lactobacillus* endofíticos (resultados não publicados). A presença de *Lactobacillus* na couve pode conferir a ela uma propriedade probiótica o que seria mais um benefício à saúde humana pelo consumo desta hortaliça. No entanto, para que essa propriedade seja confirmada, é necessário, inicialmente, que seja feita a identificação das espécies de *Lactobacillus* presentes nas folhas de couve. Esse estudo poderá revelar se as espécies de *Lactobacillus* presentes na couve estão entre aquelas consideradas probióticas e dessa forma abrir o caminho para análises posteriores nas quais o potencial probiótico do consumo da couve poderá ser avaliado com maior profundidade.

### 1.2. Justificativa

Atualmente, uma das principais áreas da microbiologia é o estudo do microbioma humano, o conjunto de bactérias que hospeda o nosso organismo (KASPER; FAUCI, 2015). Esses trabalhos têm mostrado a grande relevância da microbiota intestinal e tornado cada vez mais importante à investigação de microrganismos que podem se estabelecer no sistema digestório. Dentre esse grupo de microrganismos estão as bactérias probióticas que são capazes de exercer efeitos benéficos aos seres humanos, como a regulação da flora intestinal e proteção contra a entrada de microrganismos patogênicos (MACPHERSON; HARRIS, 2004). Os *Lactobacillus* são muito utilizados na indústria de laticínios na produção de iogurtes e queijos e é um dos principais gêneros de bactérias consideradas probióticas.

Devido à preocupação crescente para se obter uma dieta saudável, é indicado o consumo de alimentos, tais como, frutas e hortaliças ricos em antioxidantes e vitaminas.

Dentre esses alimentos, destaca-se a couve (*Brassica oleracea*) já que esta hortaliça é uma fonte importante desses nutrientes (OLIVEIRA et al., 2009).

Não é do nosso conhecimento que existam estudos específicos sobre bactérias endofíticas presentes na folha da couve, já que não encontramos artigos sobre esse tema em pesquisas no Pubmed e no Google acadêmico. No entanto, vale ressaltar que, mesmo que esse tipo de estudo já tenha sido realizado, a população endofítica pode variar muito dependendo da variedade da planta e das condições de cultivo, principalmente do solo.

### 1.3. Objetivo

Este estudo tem como objetivo identificar e caracterizar a diversidade de espécies de *Lactobacillus* endofíticos presente na couve e, dessa forma, identificar um possível papel probiótico no consumo dessa hortaliça.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

Nos vegetais, as bactérias, podem estar na superfície das folhas, as chamadas epifíticas. Elas aparecem nesses lugares devido a fatores externos como a saliva de animais (JACQUES; MORRIS, 1995 apud BORGES, 2006) ou podem estar no interior do tecido das folhas, em uma relação mutualística com a planta, ou seja, sem causar danos à hospedeira, as chamadas endofíticas, que adentram os tecidos pela raiz (AZEVEDO, 1998).

Diversos gêneros bacterianos podem ser encontrados vivendo no interior de folhas. Os endofíticos podem ser definidos como bactérias que podem ser isoladas de tecidos vegetais saudáveis superficialmente desinfetados e não causam nenhum dano à planta hospedeira. A interação entre bactérias endofíticas e suas plantas hospedeiras não é completamente compreendida. No entanto, muitos isolados parecem ter efeitos benéficos sobre os hospedeiros. Estes efeitos benéficos incluem promover o crescimento do hospedeiro e o controle biológico de fitopatógenos (COSTA et al., 2012).

As bactérias do gênero *Lactobacillus* são ácido-láticas, do tipo bastonetes, Gram-positivos, não esporulados (AXELSSON, 2004 apud FREITAS et al., 2012 ) que produzem ácido láctico como produto final da fermentação (FELIS; DELLAGLIO, 2007) e podem ser encontradas principalmente no trato intestinal de mamíferos (MORAIS, JACOB, 2006), em produtos vegetais, em produtos lácteos, na boca humana e nas fezes de crianças e podem também ser encontrados no interior dos tecidos vegetais (BERGEY, 1948).

Trabalhos já publicados, indicam a presença de diversas espécies de bactérias do gênero *Lactobacillus* no interior da folha de feijão, *Phaseolus vulgaris*, (COSTA et al., 2012), de milho, *Zea mays*, (SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2014) e do arroz, *Oryza sativa*,

(STOLTZFUS et al., 1997). Mas pouco se sabe sobre a variedade de espécies presentes no interior das folhas de couve.

Além disso, os *Lactobacillus* fazem parte do grupo dos probióticos que são definidos como bactérias que, ingeridas em determinada quantidade, fazem bem ao seu hospedeiro (HAVENAAR et al., 1992 apud COPOLLA; TURNES, 2004). No ser humano, os probióticos agem principalmente na flora intestinal, protegendo a mesma de diversos patógenos, além de aliviar a constipação e estimular o sistema imune (COPOLLA; TURNES, 2004).

Para que um organismo seja definido como probiótico, este deve seguir os seguintes critérios: ter origem humana, não ser patogênico, ser resistente ao processamento, ser estável e permanecer viável após a exposição aos sucos gastrointestinais, aderir-se à célula epitelial, ser capaz de persistir no trato intestinal e ser capaz de influenciar a atividade metabólica local (SZAJEWSKA et al., 2006). Dentre os diversos gêneros que integram este grupo, além dos *Lactobacillus* destaca-se também o gênero *Bifidobacterium*.

Existe uma grande utilização de *Lactobacillus* na indústria de laticínios, pois estas bactérias são também fermentadoras de lactose; Elas estão presentes também em vários produtos alimentícios fermentados tradicionais, tais como o sauerkraut, o kimchi e o kefir (BURITI; SAAD, 2007).

Os *Lactobacillus* são quase onipresentes, pois são encontrados em ambientes onde há carboidratos disponíveis, como alimentos (produtos lácteos, carnes fermentadas, massas azedas, legumes, frutas, bebidas), no sistema respiratório e no trato genital de humanos e animais, além disso, podem também estar presentes em esgotos e materiais vegetais. Até fevereiro de 2007, o gênero *Lactobacillus* incluía 106 espécies descritas, sendo assim o mais numeroso gênero da ordem (BURITI; SAAD, 2007).

O consumo desses probióticos trazem inúmeros benefícios para o trato intestinal do ser humano. Algumas espécies do gênero *Lactobacillus*, como o *Lactobacillus fermentum*, por exemplo, têm a capacidade de estimular secreção de mucina pelas células intestinais e, desta forma, espessar a barreira intestinal local contribuindo, para uma diminuição de processos alérgicos e cancerígenos, que podem ocorrer pelo contato de macromoléculas no sangue, protegendo também contra infecção (MACK et al., 2003). Tanto *Lactobacillus* como bactérias do gênero *Bifidobacterium* são, ainda, capazes de promover lise de proteínas com potencial alergênico no trato gastrointestinal. Esse processo pode contribuir para a redução da alergenicidade das proteínas, minimizando o risco de alergia alimentar (MORAIS; JACOB, 2006).

A couve é uma hortaliça do gênero *Brassica* que se encontra no grupo dos alimentos denominados funcionais, esses alimentos que além das propriedades nutricionais

conhecidas, são capazes de diminuir a chance de se obter problemas de saúde como hipertensão, diabetes, câncer, infecções dentre outros (MORAES; COLLA, 2006).

Estudos mostram que a couve é uma hortaliça rica em antioxidantes conhecidos como vitaminas C, E, carotenoides e flavonoides. A saúde humana tem sido ligada ligeiramente a estas substâncias fitoquímicas (KAPUSTA-DUCH, 2012), por isso a atenção das pessoas que querem ter uma vida saudável se volta para o consumo desta planta. Além disso, o consumo de suco de couve, suplementar a alimentação, pode reduzir as chances de adquirir doenças coronarianas devido à capacidade de aumentar o catabolismo de lipídeos no organismo (KIM et al., 2008).

Uma das propriedades dos alimentos funcionais está o papel probiótico (MORAES; COLLA, 2006), já que não se sabe muito sobre a microbiota da couve, a identificação de *Lactobacillus* endofíticos pode indicar um possível papel probiótico à couve, atribuindo mais um motivo para complementar à alimentação com essa hortaliça. .

Essa ausência de estudos chama a atenção já que, nos últimos anos, nota-se um grande interesse nessa hortaliça devido às propriedades nutricionais e funcionais da couve o que provavelmente justifica o aumento no seu consumo no Brasil e no exterior. Nos Estados Unidos, o número de fazendas que investiram em couve mais do que dobrou de 954 em 2007 para 2.500 em 2012, de acordo com dados do Departamento de Agricultura, que foi relatado pela primeira vez pela Businessweek. (PETERSON, 2014); Já no Brasil, especificamente no Estado de São Paulo em 2006, a área plantada de couve era de 1200 ha, aumentando para 1424 ha em 2007, com produtividades de 26,7 e 28,8 toneladas por hectare, respectivamente. (CAMARGO FILHO; CAMARGO, 2009).

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Cultivo das mudas**

As sementes foram plantadas em nove copos de plástico e cultivadas no laboratório em uma pequena estufa até atingirem um crescimento adequado para ser transferido para um vaso. Após a transferência, as mudas foram levadas para o viveiro da Universidade Presbiteriana Mackenzie no Centro de Ciências Biológica da Saúde, utilizando o solo denominado “terra preta”. As mudas foram mantidas em um local com sombra parcial e boa luminosidade e foram regadas todos os dias para manter o solo úmido e favorecer o crescimento das folhas.

Além das sementes, foram compradas duas mudas em um estágio de crescimento mais avançado que foram cultivadas junto com as sementes no viveiro, nas mesmas condições.

Depois da germinação da semente, durante o cultivo, o solo de 4 das 9 amostras foi suplementado com culturas de *Lactobacillus fermentum* a cada 2 semanas, em um total de 5 inoculações nas sementes e 4 em uma das mudas já que estas foram compradas depois.

### **3.2. Tratamento da couve e isolamento dos endofíticos**

As folhas foram coletadas e lavadas com água corrente e foram retirados todos os danos visíveis a olho nu. O tratamento foi feito de acordo com ARAUJO et al. (2002), através do seguinte procedimento: imersão em uma solução de álcool 70% durante 1 min, seguida de imersão em solução de Hipoclorito de sódio durante 1 min, imersão em etanol durante 30s e finalmente 2 lavagens em água destilada esterilizada.

Para o isolamento dos *Lactobacillus* endofíticos, uma quantidade de 10g de folhas foi triturada em 90 mL de água peptonada em um pilão estéril, posteriormente, o extrato de tecido foi diluído numa solução salina peptonada (0,8% de NaCl e 0,1% peptona) e, em seguida, realizada uma diluição seriada até  $10^{-6}$ , colocando 900 $\mu$ L de água peptonada em cinco microtubos, no primeiro será colocada 100  $\mu$ L de extrato de folhas, 100  $\mu$ L dessa solução foi retirada e colocada no outro tubo e assim sucessivamente até o sexto tubo. Um volume de 50 $\mu$ L das diluições foram semeados de forma homogênea em cinco placas de ágar MRS com o antifúngico cicloheximida (50 mg/mL de cada) para suprimir o crescimento de fungos (ARAÚJO et al., 1999). Após isso, as placas foram colocadas em uma jarra de anaerobiose e incubadas a 37°C em uma estufa bacteriológica por até 48 horas.

O tratamento e o isolamento foi realizado após 1 semana de cada inoculação no solo para avaliar a presença dos endofíticos. Durante o período em que as plantas se desenvolviam, foram realizados 4 testes de isolamento de couve de origens comerciais diferentes para avaliar a presença dos *Lactobacillus* endofíticos.

## **4. RESULTADO E DISCUSSÃO**

### **4.1. Cultivo das mudas**

Nas primeiras semanas de cultivo no laboratório, as sementes tiveram um bom desenvolvimento, apenas a semente do copo 9 não se desenvolveu. Quando foi realizada a troca do copo plástico para o vaso, o copo 9 foi levado junto com as outras mudas para o viveiro e mesmo assim, não se desenvolveu, como mostrado na figura 1.

Considerando que o copo 9 foi submetido as mesmas condições das outras sementes que germinaram, pode-se dizer que houve erro no plantio, já que a semente deve ser plantada a uma profundidade de 0,5 cm para germinar (MATHIAS, 2005).

Figura 1: Mudas e plantas jovens após a transferência.



Fonte: Elaborado pela autora.

Após 7 dias de adaptação 3 plantas jovens começaram a morrer e, como mostra a figura 2, das 3 plantas jovens 2 estavam com o solo suplementado com as culturas bacterianas. Em um total de 11 dias de adaptação, 4 plantas jovens dentre elas 3 com um solo suplementado com bactérias não sobreviveram. A semente do copo 9, não tinha o solo suplementado e não se desenvolveu restando apenas 4 plantas jovens, 1 com o solo suplementado com bactérias e as duas mudas, como pode ser visto na figura 2.

A couve é uma planta que se desenvolve melhor em regiões com climas amenos e boa luminosidade e, além disso, o transplante das sementes germinadas para o vaso deve ser feito quando as mudas atingirem de quatro a seis folhas (MATHIAS, 2005). Durante todo o cultivo, houve altas temperaturas e dias com chuvas muito intensas, e também, devido ao pouco espaço no laboratório o transplante das mudas foi feito antes do recomendado o que pode explicar a morte das mudas durante a adaptação no viveiro. Já que a presença de *Lactobacillus* no solo não atrapalha o crescimento da planta, pois esta é uma bactéria que existe naturalmente no solo (BERGEY, 1948).

Figura 2: Mudas após a primeira semana de adaptação.



Fonte: Elaborado pela autora.

As coletas para o isolamento foram realizadas após 40 dias de adaptação, quando as sementes mais jovens estavam com as folhas maiores e as mudas bem desenvolvidas, como mostra figura 3.

Figura 3: Mudas após 40 dias de cultivo.



Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.2. Isolamento dos endofíticos

Foram realizadas 4 coletas no total entre as suplementações no solo, tanto das plantas com *Lactobacillus* no solo como nas plantas sem. Após o tratamento e a inoculação em meio MRS em nenhuma das amostras foi possível detectar a presença de *Lactobacillus*. Foi realizado um teste de isolamento sem o tratamento com álcool e mesmo assim não houve crescimento. Em relação a couve comercial, foram realizados testes com amostras de 4 estabelecimentos diferentes, dentre eles uma couve de origem orgânica e não houve a presença de *Lactobacillus* endofíticos

Segundo Azevedo (1998), os endofíticos chegam as folhas por meio das raízes ou aberturas da própria planta; Lamb et al. (1996), realizou o mesmo procedimento de suplementação do solo com bactéria, porém, diretamente na semente, concluiu que as bactérias podem se movimentar para a parte aérea de duas formas: primeiro, de forma natural, colonizando o solo e adentrando pela raiz e segundo, pode contaminar a parte aérea em desenvolvimento. Neste estudo, fizemos a inoculação após a germinação da semente e em uma muda em um estágio avançado o que provavelmente impediu a chegada dos *Lactobacillus* até as folhas.

Além disso, foi realizado a suplementação apenas com o *Lactobacillus fermentum*, ou seja, a suplementação do solo foi restrita a esta espécie, possivelmente a ausência de colônias nos testes se deve a problemas com a própria colônia, já que para chegar as folhas é necessário a colonização do solo (LAMB et al.,1996). Deveria ser utilizados outras espécies de *Lactobacillus* na suplementação do solo e realizar novos testes.

#### 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse trabalho sugerem que espécies do gênero *Lactobacillus* não fazem parte da microbiota endofítica das folhas de couve. Também indicam que *L. fermentum* não é capaz de se estabelecer no interior das folhas de couve nas condições usadas nos experimentos que realizamos.

No entanto, esses estudos não podem ser considerados conclusivos, já que um número pequeno de amostras foi analisado. Além disso, os problemas que tivemos com relação ao cultivo da couve e a utilização de apenas uma espécie de *Lactobacillus* na inoculação também constituem limitações para nosso trabalho.

#### 6. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, W. L. et al. Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. **Piracicaba: Calq.** v. 1, p. 86p, 2002.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. **Ecologia microbiana**, p. 117-137, 1998.

BERGEY, D. H. et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 6ª ed. London: **London Baillière, Tindall & Cox**, 1948. p.1529 Also published- Baltimore: Williams & Wilkins, 1948.

BORGES, L. E. **Caracterização estrutural da associação epifítica e endofítica entre microrganismos e plantas em um ambiente agrícola tropical**. Rio de Janeiro: UENF. 2006. 104f. Dissertação (Mestrado em biociências e biotecnologia), Universidade estadual do norte fluminense, Rio de Janeiro, 2006.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 57, n. 4, p. 373, 2007.

CAMARGO, F. W. P.; CAMARGO, F. P. 2009. Análise das alterações na cadeia de produção de hortaliças em São Paulo,1995-2007. **IEA/CATI**. Anuários, banco de dados. Disponível em: [www.iea.sp.gov.br](http://www.iea.sp.gov.br). Acessado em 27 de abril de 2017.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.

COSTA, L. E. O. et al. "Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*)." **Brazilian Journal of Microbiology** v.43, n.4, p. 1562-1575, 2012.

FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. **Current issues in intestinal microbiology**, v. 8, n. 2, p. 44, 2007.

FREITAS, Z. S. et al. Identificação bioquímica e molecular de *Lactobacillus spp.* isolados do íleo de frangos de corte tratados ou não com antimicrobianos. **Ciência Rural**, v. 42, n. 9, 2012.

KAPUSTA-DUCH, J. et al. The beneficial effects of Brassica vegetables on human health. **Roczniki Państwowego Zakładu Higieny**, v. 63, n. 4, 2012.

KASPER, D.; FAUCI, A. **Doenças Infecciosas de Harrison**. 2ª. ed. São Paulo: Amgh Editora, 2015. 1168 p.

KIM, S. Y. et al. Kale Juice Improves Coronary Artery Disease Risk Factors in Hypercholesterolemic Men<sup>11</sup>This research was supported by the Brain Korea 21 Project from the Korea Research Foundation. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 21, n. 2, p. 91-97, 2008.

LAMB, T. G. et al. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 1112-1120, 1996.

MACK, D. R. et al. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. **Gut**, v. 52, n. 6, p. 827-833, 2003.

MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 6, p. 478-485, 2004.

MATHIAS, J. **Como plantar couve**. 2005. Disponível em: <<https://revistagloborural.globo.com/vida-na-fazenda/como-plantar/noticia/2015/05/como-plantar-couve.html>>. Acesso em: 27 de julho 2018.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MORAIS, M.; JACOB, C. M. A. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **Jornal de pediatria**, v. 82, n. 5, p. S189-S197, 2006.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

PETERSON, H. This One Stat Shows How Kale Has Exploded In The US. **Business Insider**. USA. Maio, 2014. Disponível em: <<http://www.businessinsider.com/kale-consumption-has-exploded-in-the-us-2014-5>>. Acesso em: 01 abr. 2017

STOLTZFUS, J. R. et al. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant and Soil**, v. 194, n. 1-2, p. 25-36, 1997.

SZAJEWSKA, H. et al. Probiotics in gastrointestinal diseases in children: hard and not-so-hard evidence of efficacy. **J. Pediatric Gastroenterol Nutr**. v.5, n. 42, p. 454-75, 2006.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J. et al. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays L.*) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 26, 2014

**Contatos:** gabrielarobertosilva@gmail.com e joseluiz.wolff@gmail.com