

Artículo original

Pesquisa da existência de bactérias Gram negativas endofíticas potencialmente patogênicas para o homem em hortaliças provenientes de cultivos orgânicos

María Beatriz Riverón Acosta*, Luiz Guilherme Coimbra Duarte

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Laboratório de Microbiologia. Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo. Brasil.

Recibido 10 de marzo de 2014; aceptado 21 de julio de 2014

Resumo: Bactérias endofíticas habitam tecidos vegetais sadios colonizando-os ativamente exercendo atividades benéficas para o hospedeiro. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença de bactérias endofíticas Gram negativas potencialmente patogênicas em hortaliças oriundas de cultivos orgânicos (alface, acelga, manjeriço, espinafre, coentro e couve) adquiridas em supermercados. Após assepsia das folhas de aspecto sadio, pequenos fragmentos de aproximadamente 1 cm² foram colocados na superfície de ágar LB. As colônias bacterianas obtidas após o crescimento ao redor dos fragmentos de folhas, foram isoladas em meio McConkey. Depois, foram escolhidas várias distintas colônias fermentadoras e não fermentadoras de lactose e identificadas por provas bioquímicas. De 46 colônias identificadas, 27 (58,6%) corresponderam à família Enterobacteriaceae; 14 (30,4%), ao gênero *Acinetobacter* e 5 (10,9%) ao gênero *Pseudomonas*. Verificou-se a existência de um considerável número de bactérias endofíticas patogênicas incluindo *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* entre outras. Sabe-se dos riscos da utilização de esterco animal na adubação de solos para culturas orgânicas. Geralmente dá-se relevância à higiene de hortaliças e frutas em relação à microbiota epífita contaminante, mas raramente é considerada a população microbiana endofítica eventualmente patogênica para humanos, fato que pode explicar surtos para os quais não é possível detectar a fonte de contaminação.

Palavras chave: bactérias endofíticas Gram negativas, bactérias patogênicas, cultivos orgânicos.

Investigación de la existencia de bacterias endófitas gramnegativas potencialmente patógenas para el hombre en hortalizas provenientes de cultivos orgánicos

Resumen: Las bacterias endófitas habitan tejidos vegetales colonizándolos activamente, ejerciendo funciones beneficiosas para el huésped. El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de bacterias endófitas gramnegativas potencialmente patógenas en hortalizas provenientes de cultivos orgánicos (lechuga, acelga, espinaca, coliflor, albahaca y cilantro) adquiridas en supermercados. Después de desinfectar hojas de aspecto sano, fragmentos de aproximadamente 1 cm² fueron colocados sobre agar LB. A partir del desarrollo bacteriano alrededor de los fragmentos se procedió al aislamiento en medio McConkey. Se escogieron varias colonias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa y se identificaron mediante pruebas bioquímicas. De 46 colonias identificadas, 27 (58,6%) correspondieron a enterobacterias, 14 (30,4%) al género *Acinetobacter* y 5 (10,9%) al género *Pseudomonas*. Se verificó un relevante número de bacterias endófitas patógenas incluyendo *Salmonella*, *Yersinia*, y *Shigella* entre otras. Es conocido el riesgo del empleo de estiércol animal como abono de suelos para cultivos orgánicos. Generalmente se da importancia a la higiene de hortalizas y frutas en relación a la microbiota epífita contaminante, pero raramente es considerada la población microbiana endófitas patógena para los humanos, hecho que puede explicar brotes en los que no es posible detectar el origen de la contaminación.

Palabras clave: bacterias gramnegativas endófitas, bacterias patógenas, cultivos orgánicos.

Investigation of the existence of Gram negative endophytic bacteria potentially pathogenic for man in vegetables from organic cultures

Abstract: Endophytic bacteria live in vegetable tissues colonizing them actively and exerting beneficial functions for the host. The objective of this study was to investigate the presence of Gram negative endophytic bacteria in vegetables from organic cultures (lettuce, chard, spinach, basil, cauliflower, coriander) purchased at food markets. After disinfecting leaves with a healthy aspect, fragments of approximately 1 cm² were placed on LB agar. After the development of bacteria around the fragments, they were isolated in McConkey agar. Several lactose fermenting and non fermenting colonies were chosen and identified by biochemical assays. Of 46 identified colonies, 27 (58.6%)

corresponded to enterobacteria, 14 (30.4%) to the *Acinetobacter* genus and 5 (10.9%) to the *Pseudomonas* genus. A relevant number of endophytic pathogen bacteria, including *Salmonella*, *Yersinia* and *Shigella*, among others, was verified. The risk of using animal manure as compost for organic cultures is well known. Generally, the hygiene of vegetables and fruits is given importance in relation with contaminant epiphytic microbiota, but the endophytic microbial population pathogenic for humans is rarely considered, fact which can explain outbreaks where it is not possible to detect the origin of the contamination.

Keywords: endophytic Gram negative bacteria, pathogenic bacteria, organic cultures.

* Correspondencia:

E-mail: mariabeatriz.acosta@mackenzie.br

Introdução

A importância da existência dos microrganismos é algo indiscutível, sem estes, as formas de vida superiores não poderiam ter surgido, nem mesmo se mantido. Têm papéis fundamentais no planeta que habitamos, pois existem importantes interações entre microrganismos e animais e microrganismos e plantas, e com o homem, tanto na reciclagem de nutrientes chave como na degradação de matéria orgânica, podendo essa interação ser muito benéfica ou extremamente prejudicial para seus hospedeiros [1].

Uma parcela de microrganismos, principalmente bactérias e fungos, habita o interior das plantas. São os endofíticos, colonizando os tecidos saudáveis das partes aéreas da planta, em alguma fase do seu ciclo de vida, sem lhes causar danos aparentes. Este conceito é também estendido aos microrganismos das raízes. Os endofíticos diferem dos epífitos que vivem na superfície dos vegetais, e dos fitopatogênicos, que lhes causam doenças. Entre os microrganismos endofíticos, os fungos e bactérias que formam os nódulos nas raízes das plantas às quais estão associados, são bastante estudados devido a sua importância na agricultura, particularmente por sua participação na fixação de nitrogênio atmosférico (micorrizas diazotóficas de rizosfera). Ao contrário, os endofíticos das partes aéreas dos vegetais só recentemente têm despertado o interesse da comunidade científica, especialmente por seus potenciais na produção de metabólitos de interesse biotecnológico [2-5].

Apesar de devidamente compreendida a existência da microbiota endofítica, muitas pesquisas ainda devem ser feitas a respeito dos aspectos ecológicos, genéticos e fisiológicos desta interação. Além disto, é interessante conhecer a diversidade destes organismos, sua presença, frequência e funções. Existe uma série de razões para aprofundar os estudos dos endofíticos como a falta de informação para elucidar a base biológica dessas interações e as vantagens às plantas já atribuídas à presença deles [6].

Embora as interações endofítico-planta, ainda não sejam muito bem compreendidas, sabe-se que podem ser simbióticas, neutras ou antagonicas. Nas interações simbióticas, os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta tais como a diminuição da herbívora e do ataque de insetos, o aumento de tolerância a estresse abiótico e o controle de outros microrganismos. Exemplos de metabólitos que podem ser induzidos pelos endofíticos são as fitoalexinas, substâncias de baixo peso

molecular com atividades antimicrobianas produzidas pelas plantas ante a ação de microrganismos ou agentes estressantes, micotoxinas e outros metabólitos secundários produzidos por fungos que podem causar doenças em humanos e outros animais, e/ou, apresentar propriedades antimicrobianas, antioxidantes e antihipertensivos. Novos antibióticos, antimicóticos como cryptocardina, imunossuppressores e antineoplásicos como o taxol, poderoso antitumoral, são alguns exemplos de metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos de extrema relevância na indústria farmacêutica [7-17].

Além da importância descrita para a indústria farmacêutica, os microrganismos endofíticos são valiosas ferramentas como vetores para introduzir genes de interesse em plantas visando à produção de inibidores de pragas e patogênicos [18-21].

Agricultura orgânica ou agricultura biológica é o termo frequentemente usado para designar a produção de hortaliças e outros produtos vegetais sem uso de produtos químicos sintéticos, tais como fertilizantes inorgânicos (nitratos, fosfatos, etc) e pesticidas, nem organismos geneticamente modificados. Este sistema de produção, que exclui o uso de fertilizantes, agrotóxicos e produtos reguladores de crescimento, tem como base o uso de esterco animal, compostagem e controle biológico de pragas e doenças. Mas, é justamente na fertilização com esterco, que se não tratados adequadamente antes do emprego (e é sabido que são usadas até fezes de porco e fezes humanas na adubação de solos) que resulta numa alta fonte de contaminação microbiana.

O objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença de bactérias Gram negativas potencialmente patogênicas em pés de hortaliças oriundas de cultivos orgânicos (alface lisa e crespa, acelga, manjeriço, espinafre, coentro e couve) adquiridas em supermercados da região de Higienópolis da cidade de São Paulo.

Material e métodos

Esterilização do material coletado: O material coletado foi processado no prazo de 24 horas, após a coleta, lavando-o abundantemente com água corrente e detergente neutro. Em seguida, em câmara asséptica, o material foi imerso em álcool etílico 70% (v/v) por 1 minuto, a seguir, em hipoclorito de sódio 3% (v/v) por 4 minutos e novamente em álcool etílico 70% por 30 segundos para retirar o excesso de hipoclorito, e finalmente, enxaguou-se com água destilada estéril 3 vezes

para retirar qualquer resíduo.

Isolamento de endofíticos: Após a assepsia, pequenos fragmentos de folhas e caules de aproximadamente 1 cm² cortados com tesoura esterilizada, foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultivo LB (Luria-Bertani) de composição: extrato de levedura 0,5%, triptona 1,0%, cloreto de sódio 1% e agar 1,5%. As placas com os fragmentos foram incubadas a 25-30 °C por uma semana.

Identificação de bactérias: Os testes bioquímicos realizados foram: fermentação de lactose, produção de gás, produção de gás sulfídrico, produção de uréase, produção de L-triptofanodesaminase, produção de lisina descarboxilase, produção de indol, motilidade, utilização de citrato como fonte de carbono e presença de citocromo-oxidase. Os resultados foram interpretados de acordo com as instruções do fabricante (enterokit Probac® Brasil) e de acordo com “Koneman, diagnóstico microbiológico, 2006” [22] e “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, 2005” [23].

Foram escolhidas aleatoriamente várias colônias isoladas de bactérias desenvolvidas ao redor dos fragmentos de folhas e caules e transferidas (cultivo por esgotamento) para placas contendo meio seletivo McConkey. Depois de incubadas por 24-48 horas, foram transferidas colônias isoladas fermentadoras de lactose (de cor vermelha) e colônias não fermentadoras de lactose (colônias esbranquiçadas) para provas bioquímicas (reações fornecidas pelo “Enterokit” Probac® Brasil) e mais teste complementar, como prova de presença da enzima citocromo oxidase para aquelas bactérias suspeitas de serem *Pseudomonas* e/ou *Acinetobacter*.

Resultados

Foram analisadas qualitativamente diferentes hortaliças provindas de cultivos orgânicos adquiridas em supermercado da região de Higienópolis, cidade de São Paulo: Alface (*Lactuca sativa*, família Asteraceae); manjeriço (*Ocimum gratissimum* L., família Lamiaceae); acelga (*Beta vulgaris* var. cicla (L) K, Koch, família Amaranthaceae); espinafre (*Spinacia oleracea*, família Amaranthaceae); couve (*Brassica oleracea*, família Brassicaceae) e coentro (*Coriandrum sativum* L., família Apiaceae).

Da alface, foram analisados dois pés de alface crespa, um pé de alface lisa e um pé de alface roxa crespa. Das demais hortaliças, só um pé. De todas, tomaram-se três folhas ao acaso para fazer as análises.

Foram identificadas 46 colônias bacterianas Gram negativas, das quais 27 (58,7%) resultaram pertencentes às enterobactérias, 14 (30,4%) ao gênero *Acinetobacter* e 5 (10,9%) ao gênero *Pseudomonas* (Tabela 1).

Discussão

São microrganismos endofíticos (bactérias e fungos) aqueles que habitam em pelo menos um período de seu

Tabela 1. Classificação das bactérias Gram negativas endofíticas encontradas em hortaliças provenientes de cultivos orgânicos baseada em provas bioquímicas.

| Linhagens encontradas | Classificação |
|-----------------------|--|
| A1 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| A2 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| A3 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| A4 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| A5 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| A6 | <i>Escherichia coli</i> |
| A7 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| A8 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| A9 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| A10 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| A11 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| A12 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| A13 | <i>Serratia marcescens</i> |
| A14 | <i>Hafnia alvei</i> |
| A15 | <i>Yersinia enterocolitica</i> |
| A16 | <i>Shigella</i> spp. ou <i>Yersinia pestis</i> |
| A17 | <i>Pseudomonas</i> sp. |
| A18 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| M1 | <i>Proteus vulgaris</i> |
| M2 | <i>Escherichia coli</i> |
| M3 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| M4 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| M5 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| M6 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| C1 | <i>Salmonella</i> sp. |
| C2 | <i>Proteus mirabilis</i> |
| C3 | <i>Proteus vulgaris</i> |
| C4 | <i>Salmonella</i> sp. |
| C5 | <i>Pseudomonas putrefasciens</i> |
| C6 | <i>Klebsiella oxytoca</i> |
| ARC1 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| ARC2 | <i>Proteus vulgaris</i> |
| ARC3 | <i>Edwardsiella parva</i> |
| ARC4 | <i>Salmonella typhi</i> |
| AC1 | <i>Klebsiella oxytoca</i> |
| AC2 | <i>Proteus mirabilis</i> |
| AC3 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| AC4 | <i>Serratia marcescens</i> |
| E1 | <i>Serratia marcescens</i> |
| E2 | <i>Escherichia coli</i> |
| E3 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| Co1 | <i>Escherichia coli</i> |
| Co2 | <i>Pseudomonas putrefasciens</i> |
| Co3 | <i>Proteus vulgaris</i> |
| Co4 | <i>Salmonella</i> spp. |
| Co5 | <i>Salmonella typhi</i> |

Observação: Não pertencem a Enterobacteriaceae os gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. Legendas: Linhagens M1 a M6 isoladas de manjeriço. Linhagens C1 a C6 isoladas de couve. Linhagens ARC1 a ARC4 isoladas de alface roxa crespa. Linhagens AC1 a AC4 isoladas de acelga. Linhagens E1 a E3 isoladas de espinafre. Linhagens Co1 a Co5 isoladas de coentro.

ciclo de vida tecidos vegetais sadios podendo permanecer latentes ou colonizando ativamente tecidos de forma localizada ou sistêmica, exercendo diversas atividades benéficas para a planta hospedeira assim como fixação de

nitrogênio, produção de metabólitos biologicamente ativos como antibacterianos e antifúngicos, fatores de crescimento etc. Contudo, muitas espécies bacterianas endofíticas são patogênicas ou potencialmente patogênicas para o homem [2].

A agricultura orgânica ou agricultura biológica exclui o uso de produtos químicos sintéticos, tais como fertilizantes inorgânicos (nitratos, fosfatos, etc) pesticidas, e organismos geneticamente modificados, mas tem como base o uso de esterco animal, compostagem e controle biológico de pragas e doenças. Mas, é justamente na fertilização com esterco, que se não tratados adequadamente antes do emprego que resulta numa alta fonte de contaminação microbiana.

A utilização de excretas é motivada pelo reconhecimento de seu valioso conteúdo de nutrientes para as plantas. É sabido que são utilizados esterco de porco e fezes humanas como adubos de hortaliças. A excreta humana pode conter também microrganismos patogênicos, que diretamente ameaça a saúde humana. A diarreia e as doenças parasitárias são fatores importantes que contribuem com a *Carga Mundial de Doenças* onde os maiores causadores são a transmissão ambiental através da água e dos cultivos alimentícios contaminados, ou mediante o contato direto com as fontes contaminadas por matéria fecal. As excretas usualmente não contêm contaminantes químicos industrializados, mas devem ser tratados para reduzir os níveis de patógenos em níveis de segurança. Metabólitos humanos como os hormônios podem também existir, mas o reuso em terras cultiváveis diminuiria o impacto negativo assim como nas fontes de água [24].

Um sistema para o controle e gestão da exposição microbiana no que diz respeito ao uso de águas residuárias e excretas foi elaborado e publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) na década de oitenta [25] e revisado posteriormente [26]. Nesse relatório enfocou-se o tratamento e manejo das fezes e da urina, levando em conta informação atual da gestão de riscos e limitando a uma estratégia de separação na fonte.

A presença dos organismos causadores de doenças na excreta humana é o resultado da infecção dos indivíduos. Este tipo de infecção não se manifesta necessariamente com sintomas clínicos (portadores assintomáticos) mas podem conduzir a uma excreção dos patógenos em questão. Para os organismos que infectam o trato gastrointestinal, esta contaminação se dá basicamente através das fezes.

A prevalência e a incidência de infecções é um espelho da situação de higiene da sociedade. As infecções são sempre uma exceção e não um estado comum do indivíduo. As infecções podem ser crônicas para doenças bacterianas e virais. Nestes casos os indivíduos são chamados de "portadores". Parasitas como vermes (helmintos) podem estabelecer-se por períodos prolongados de tempo no corpo humano e têm uma taxa alta de prevalência na sociedade com condições insalubres.

Uma pessoa normalmente excreta grandes quantidades de microrganismos na matéria fecal. Os números estão

na faixa de 10^{11} - 10^{13} /g. Estes organismos saprófitos geralmente não são motivo de preocupação para a saúde. A urina é normalmente estéril na bexiga, mas pode carregar organismos que se encontram nas partes baixas do trato urinário. Assim, um conteúdo de 10^3 organismos/mL na urina não é um indicativo de infecção. Os organismos saprófitos são normalmente inofensivos. Se um organismo causador de doença infecta uma pessoa, as manifestações clínicas são governadas por fatores relacionados ao organismo da pessoa em questão. A maioria dos organismos causadores de doenças relacionadas a saúde pública é excretada nas fezes, em uma quantidade variável, mas poucos deles através da urina. A probabilidade de que eles infectem novos indivíduos está em função do contato e da exposição. Esta, por sua vez, é regida por fatores como as quantidades excretadas e da dose infecciosa (número de organismos que deve ser ingerido de maneira oral para causar uma infecção), que varia entre os diferentes organismos e até mesmo entre as linhagens. Poucos tipos de organismos podem infectar através da pele. A probabilidade de contato e exposição está relacionada à capacidade das diferentes espécies e cepas de tolerar condições ambientais adversas fora do corpo humano e persistir no estágio no qual podem infectar um novo indivíduo exposto [24].

Neste trabalho foram identificados vários gêneros bacterianos de relevância clínica tais como os pertencentes às enterobactérias: *Klebsiella*, *Serratia*, *Hafnia*, *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Edwardsiella*, *Proteus*, *Escherichia*, e o não fermentadores: *Acinetobacter* e *Pseudomonas*.

Conclusões

Todos os microrganismos identificados no presente trabalho ocupam o mesmo nicho ecológico, como água, solo, plantas, trato intestinal de animais de sangue quente etc. podendo desencadear doenças como infecções do trato urinário e gastroenterites, sendo que se não tratadas rapidamente e de forma efetiva podem levar a quadros graves e até a morte.

Mesmo depois de passar por um minucioso processo de desinfecção as hortaliças orgânicas analisadas apresentaram potencial patogênico para os consumidores, uma vez que se o indivíduo estiver com o sistema imunológico prejudicado, ao ingerir este tipo de hortaliça, pode desenvolver alguma das doenças supracitadas.

As pessoas geralmente adquirem produtos orgânicos pelo fato dos mesmos serem rotulados como mais saudáveis, por não possuírem agrotóxicos e pesticidas. Mas, a utilização de adubo natural, composto por restos de alimentos e dejetos de animais é passível de contaminação bacteriana. Todas as plantas possuem microrganismos endofíticos que podem ser simbióticos ou comensais; porém, poucos estudos foram realizados com relação à interação desses organismos endofíticos com os consumidores diretos das plantas hospedeiras. Logo, se faz necessário realizar estudos buscando estabelecer a relação entre consumo deste tipo de alimentos (hortaliças orgânicas) e surtos, uma vez

que se demonstrou nesse trabalho a existência de bactérias potencialmente patogênicas para os seres humanos.

Referências

- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock Biology of Microorganisms. 8th ed. New Jersey:Prentice Hall; 1997.
- Melo, IS de, Azevedo JL, Editors. Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998.
- Souza A, Souza ADL, Astolfi Folho A, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira JO. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl) rich e *Strychnos cogens* bentham. Acta Amazônica. 2004; 34:185-95.
- Cao I, Qiu Z, You J, Tan H, Zhou S. Isolation and characterization on endophytic *Streptomyces* strains from surface sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. Lett Appl Microbiol. 2004; 39:425-30.
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. Bacterial endophytes: recent developments and applications. FEMS Microbiol Lett. 2008; 278:1-9.
- Bhagat J, Kaur A, Sharma M, Saxena AK, Chadha BS. Molecular and functional characterization of endophytic fungi from traditional medicinal plants. World J Microbiol Biotechnol. 2012; 28:963-71.
- Cordeiro NF, Dietrich SM. C. Phytoalexin induction by leaf-surface fungi of tropical Rubiaceae. Ciência e Cultura. 1992; 44:342-4.
- Araújo WL. Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de citros. Dissertação de Mestrado, ESALQ, Piracicaba: São Paulo; 1996.
- D'Mello JPF, Macdonald AM. C. Mucotoxins. Anim Feed Sci Tech 1997; 69:155-66.
- Wang J, Li G, Lu H, Zheng Z, Huang Y, Su W. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. FEMS Microbiol Lett. 2000; 193:249-53.
- Strobel G, Daisy B, Castilho U, Harper J. Natural products from endophytic microorganisms. J Nat Prod. 2004; 67:257-68.
- Rothballer M, Eckert B, Schmid M, Fekete A, Schloter M, Lehner A, Pollmann S, Hartmann A. Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. FEMS Microbiol Ecol. 2008; 66:85-95.
- Zhang HW, Huang WY, Chen JR, Yan WZ, Xie DQ, Tan RX. Cephalosol: an antimicrobial metabolite while an unprecedented skeleton from endophytic *Cephalosporium acremonium* IFB-E007. Chemistry. 2008; 14:10670-4.
- Tejesvi MV, Kini KR, Prakash HS, Subbiah V, Shetty HS. Antioxidant, antihepatoxic, and antibacterial properties of endophytic *Pestalotiopsis* spp. from medical plants. Can J Microbiol. 2008; 54:769-80.
- Artani N, Tachibana S, Kardono LB, Sikiman H. Screening of endophytic fungi having ability for antioxidative and alpha-glucosidase inhibitor isolated from *Taxus sumatrana*. Pak J Biol Sci. 2011; 14:1019-23.
- Zhang Y, Han T, Ming Q, Wu L, Rahman K, Qin L. Alkaloids produced by endophytic fungi: a review. Nat Prod Commun. 2012; 7:963-8.
- Ding L, Maier A, Fiebig HH, Lin WH, Peschel G, Hertweck C. Kandenols A-E, eudemenes from an endophytic *Streptomyces* sp. of the mangrove tree *Kandelia candel*. J Nat Prod. 2012; 75:2223-7.
- Hallmann J, Sikora RA. Toxicity of fungal endophytic secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-born plant pathogeny fungi. Eur J Plant Pathol. 1996; 102:155-16
- Wagner BL, Lewis LC. Colonization of corn *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Appl Environ Microbiol. 2000; 66:3468-73.
- Ownley BH, Griffin MR, Klingeman WE, Gwinn KD, Moulton JK, Preira RM. *Bauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. J Invertebr Pathol. 2008; 98: 267-70.
- Ikeda AC, Bassani LL, Adamoski D, Stringari D, Cordeiro VK, Glienke C, Steffens MB, Hungria M, Galli-Teresawa LV. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. Microb Ecol 2013; 65:54-60.
- Koneman E. Diagnóstico microbiológico. 6^a edition. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2. 2nd edition, USA: Williams & Wilkins; 2005.
- Schönning C, Stenström TA. EcoSanRes. Diretrizes para o uso de urina e fezes nos sistemas de saneamento ecológico. Estocolmo Suecia: Instituto Ambiental de Estocolmo; 2004. Disponível em: http://www.ecosanres.org/pdf_files/ESR_Publications_2004/ESR2004-1-portuguese.pdf. Acesso 28 de setembro de 2013.
- WHO. Guidelines for the safe use of wastewater and excreta in agriculture and aquaculture. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1989.
- WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Technical report series 916. 2003. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_916.pdf. Acesso 28 de setembro de 2013.