

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CO-AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA 16S DO RNA  
RIBOSSOMAL MITOCONDRIAL DE *Melipona scutellaris*  
(APIDAE; MELIPONINAE) E DE UM FRAGMENTO  
ESPECÍFICO EM BACTÉRIAS SIMBIÓTICAS PELA  
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)**

*ANA PAULA SORAGGI CAMPOS*

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG  
Dezembro – 1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CO-AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA 16S DO RNA  
RIBOSSOMAL MITOCONDRIAL DE *Melipona scutellaris*  
(APIDAE; MELIPONINAE) E DE UM FRAGMENTO  
ESPECÍFICO EM BACTÉRIAS SIMBIÓTICAS PELA  
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)**

*ANA PAULA SORAGGI CAMPOS*

*WARWICK ESTEVAM KERR*

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de  
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas.

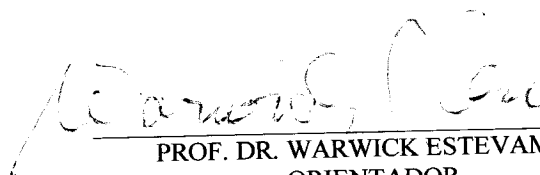
Uberlândia – MG  
Dezembro – 1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CO-AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA 16S DO RNA  
RIBOSSOMAL MITOCONDRIAL DE *Melipona sutellaris*  
(APIDAE; MELIPONINAE) E DE UM FRAGMENTO  
ESPECÍFICO EM BACTÉRIAS SIMBIÓTICAS PELA  
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)**

*ANA PAULA SORAGGI CAMPOS*

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 13/12/1997 NOTA 100<sup>00</sup>




PROF. DR. WARWICK ESTEVAM KERR  
ORIENTADOR



PROF. DR. LUIZ RICARDO GOULART FILHO  
CO-ORIENTADOR

*Análise  
de  
13/12/1997  
100,00*

  
ROSANA DE CÁSSIA OLIVEIRA  
CO-ORIENTADORA

Uberlândia, 13 de dezembro de 1997

## **DEDICATÓRIA**

**À meu pai José Luiz, minha mãe Maria José e minha avó Maria, que sempre serão eternas referências de humildade, perseverança e generosidade.**

## AGRADECIMENTOS

Ao Cristo, pela oportunidade de realizar esse trabalho científico, e conviver com pessoas ilustres que muito auxiliaram no meu amadurecimento espiritual.

Ao Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, exemplo de vida científica e humanitária, pela orientação, despertando-me à vida científica com confiança, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, pela disponibilidade e auxílio como co-orientador.

À Rosana de Cássia Oliveira e Soraya Matos Vasconcelos, pela força, companheirismo e acompanhamento brilhante neste trabalho.

À professora Ana Maria Bonetti, pela indicação para o estágio no laboratório de Genética .

Aos meus pais José Luiz e Maria José, e irmãos Rafael e Thiago, que sempre confiaram em mim, incentivando e apoiando nas horas difíceis.

À minha avó, Maria, que sempre se mostrou como uma estaca inabalável em todas os momentos da minha vida.

Ao meu namorado José Maria, pelo constante apoio e auxílio na minha formação pessoal e acadêmica.

As amigas de república Claudia e Dilmar, pela força e apoio.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Genética, Adelmo, Alexandre, Bárbara, Carlos Gustavo, Cícero, Cristiane, Cristiano, Elisângela, Gerson, Gislene, Juliana, Kleber, Marcolino, Maurício Machain, Roselis, Valdesse, Valter, Vânia, Viviam, Wânia, Warlei, que direta ou indiretamente me auxiliaram.

Ao Prof. Dr. Paulo Gontijo, pelos esclarecimentos na parte de microbiologia, e aos colegas do Laboratório de Microbiologia, Claudete, Ricardo, Marcos Antônio, Roseneide.

**Qualquer caminho é apenas um caminho e não constitui insulto algum - para si mesmo ou para os outros - abandoná-lo quando assim ordena o seu coração. (...) Olhe cada caminho com cuidado e atenção. Tente-o tantas vezes forem necessárias... Então, faça a si mesmo uma pergunta: possui esse caminho um coração? Em caso afirmativo, o caminho é bom. Caso contrário esse caminho não possui importância alguma.**

Carlos Castañeda, The Teachings of Don Juan

## RESUMO

A abelha *Melipona scutellaris*, pertence a subfamília Meliponinae, e em geral, é facilmente distinguível das outras, principalmente pela ausência do ferrão. Ao longo de seu período evolutivo, elas conquistaram vários habitats, encontrando-se desde savanas até mata mesófilas, porém sua maior diversidade e abundância encontra-se nos trópicos do hemisfério sul. A associação entre bactérias do gênero *Bacillus* e abelhas se mostra como uma simbiose obrigatória. Estas bactérias estão relacionadas com a conversão, fermentação e preservação do alimento estocado no interior da colméia. O objetivo deste trabalho foi identificar as bactérias presentes no mel, pólen e conteúdo intestinal de *M. scutellaris*, e detectar a presença de uma interferência na amplificação do fragmento 16S do RNAr mt desta abelha por bactérias simbióticas. Nós isolamos e identificamos nove espécies de bactérias, sendo 4 do gênero *Bacillus* e 3 Enterobacteriaceae. *Escherichia coli*, *Bacillus anthracis* e *B. laterosporus* foram isoladas do pólen, *E. coli*, *B. alvei* e *B. macerans* do mel e *Enterobacter* e *Klebsiella* do intestino. Foram feitas reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando separadamente DNA da abelha inteira, somente do tórax (sem o aparelho digestivo) e das bactérias. Foi detectada a amplificação do fragmento 16S do RNAr mt nas amostras de abelha e um fragmento de tamanho similar, e outro de 790 pb nas amostras de bactérias. O fragmento amplificado nas bactérias talvez não corresponda ao fragmento 16S do RNAr mt, porém, os **primers** encontraram sítios de anelamento no genoma bacteriano. A presença desses sítios associada à alta sensibilidade da técnica de PCR, torna-se um problema quando utiliza-se tecidos contaminados na extração. Esse problema ainda pode ser agravado por técnicas que usam baixas temperaturas de anelamento (RAPD), não correspondendo portanto, à real distância genética dos organismos em questão. Sendo assim, este trabalho mostrou inadequado o uso de indivíduos inteiros (possivelmente contaminados) nas extrações de DNA para o uso em PCR.



# ÍNDICE

## INTRODUÇÃO

<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>7</b>
Material biológico.....	7
Cultivo das bactérias.....	7
Identificação das bactérias.....	8
Extração do DNA bacteriano.....	8
Extração do DNA de <i>Melipona scutellaris</i> .....	10
Amplificação do fragmento 16S do RNAr mt.....	10
Eletroforese e visualização dos produtos amplificados.....	11
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>12</b>
Identificação das bactérias.....	12
Análise dos produtos amplificados.....	19
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>23</b>

## INTRODUÇÃO

No reino Animalia, os artrópodes têm cerca de 34.000.000 espécies das quais 80% pertencem a classe Insecta, sendo portanto, o grupo com maior números de indivíduos, superando todos os outros grupos animais reunidos (Adis, 1990). Dentre a classe Insecta, a superfamília Apoidea destaca-se por exibir grande diversidade de habitats e pela complexidade de comportamentos que culminaram em uma alta organização social. A família Apidae subdivide-se em quatro subfamílias : Apinae (as abelhas melíferas), Bombinae (os primitivos *Bombus* eussociais), Euglossinae (as mamangavinhas coloridas) e Meliponinae (as abelhas melíferas sem ferrão).

As abelhas da subfamília Meliponinae, em geral, são facilmente distinguíveis das outras, principalmente pela ausência do ferrão e por não possuir pêlos nos olhos. Ao longo de seu período evolutivo, os meliponíneos conquistaram vários habitats, encontrando-se desde savanas até matas mesófilas. Contudo, sua maior diversidade e abundância encontra-se nos trópicos (região Neotropical e Indo-Malaia), porém certos taxa estão restritos às zonas subtropicais do hemisfério sul (Moure, 1961; Kerr & Maule, 1962; Camargo, 1989; Michener, 1990; Camargo & Pedro, 1992).

A importância dessas abelhas reside no fato de apresentarem uma grande associação com plantas e outros animais, inclusive o homem. Contudo, o principal papel dessas abelhas é serem as mais eficientes polinizadoras conhecidas para a flora americana.

Desde a antigüidade, os Homens das Cavernas e, também nossos índios, mesmo não dispondo das modernas técnicas de produção e separação dos produtos das abelhas, simplesmente abocanhavam e saboreavam os pedaços dos favos, que, além do mel, também continham: própolis, pólen, geléia-real e larvas de abelhas e, até conseguir tal objetivo, levavam como receita extra para resolver seus problemas reumáticos e artríticos, centenas de ferroadas (Facchini,1996). Na apicultura atualmente, extraem-se comercialmente de *Apis mellifera*, o própolis que possui propriedades antibactericidas; geléia real com um alto valor nutritivo, superior ao leite normal e ao colostro dos mamíferos ; pólen que possui grande utilidade como suplemento na dieta humana e um saboroso mel (Silva, 1996). Contudo, no Brasil, a prática da meliponicultura tem crescido consideravelmente nos últimos anos. Além da maior especificidade dessas abelhas para com a flora nativa, o mel dos meliponíneos - menos concentrado que o de *Apis* - é notavelmente mais procurado entre os caboclos e os índios.

O mel é um líquido extraído dos potes (em meliponíneos) e favos (em apíneos) , sob forma de dispersão aquosa, e é composto por partículas de vários tamanhos, tais como íons inorgânicos, sacarídeos e polissacarídeos, proteínas, esporos de leveduras e grandes partículas de grãos de pólen. É formado por cerca de 84% de sólidos , sendo que, seus constituintes básicos são a glicose (dextrose) e a frutose (levulose). Ele possui de 0,2 a 1.8% de nitrogênio, 70 a 90% de aminoácidos ou amidas e de 90 a 95% de carboidratos (incluindo-se vários açúcares, até mesmo os que não fazem parte da seiva das plantas). O mel fabricado pelas abelhas é produzido a partir do néctar da flores e contém também

várias enzimas (invertases, diastases, peptidases e proteinases) derivadas da secreção das glândulas salivares e do trato digestivo das abelhas (Maurizio, 1975).

A principal fonte alimentar das abelhas, de uma forma geral, é o pólen e o néctar coletados diretamente de plantas (o néctar supre as necessidades calóricas e o pólen é o alimento proteico completo), com poucas exceções, como por exemplo, a preferência por carcaças de animais, em *Trigona hypogea* (Gilliam *et al.*, 1985) e abelhas que exercem atividade cleptobiótica (roubam alimento de colméias de outras espécies) como *Lestrimelitta limao* (Sakagami *et al.* 1993). O pólen é uma fonte extremamente rica em proteínas, lipídeos, minerais e vitaminas. Contudo, a sua composição química varia entre as espécies de plantas, de acordo com a idade e quantidade de nutrientes disponíveis à mesma, métodos de extração do pólen e estocagem (Ramos, 1997).

As abelhas não consomem o pólen tal qual foi coletado no forrageio. O pólen é estocado em potes dentro da colméia e sofre um processo de fermentação. Essa fermentação parece ocorrer devido à adição de mel, néctar e secreções glandulares, formando assim o chamado “pão-de-abelha” ou **bee bread** (Gilliam *et al.*,1990). Análises desse pólen estocado, bem como do conteúdo intestinal das abelhas revelaram a presença de uma grande microbiota, que é extremamente diversificada, dependendo da espécie de abelha (Machado 1971, Gilliam *et al.*, 1990). Segundo esses autores, a microflora intestinal das abelhas é dominada por bactérias Gram variáveis (positivas e negativas), principalmente do gênero *Bacillus* e Enterobacteriaceae e fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*.

A associação ecológica entre os Apoidea e as bactérias do gênero *Bacillus* são bem documentadas (Machado 1971; Gilliam *et al.* 1985; Gilliam *et al.* 1990; Cano *et al.* 1994). Em 1971, Machado constatou a associação entre *Melipona quadrifasciata* e uma espécie de *Bacillus*, similar ao *Bacillus pumilus*,

e posteriormente, classificado como *Bacillus meliponotrophicus*. Ele relatou a presença desse microorganismo no pólen, no tubo digestivo das abelhas e larvas, e no alimento alveolar. Esta bactéria apareceu em grande quantidade nas secreções glandulares depositadas sobre o pólen, e em baixo número nos méis. Analizando estas fontes, o autor verificou que o *Bacillus meliponotrophicus* atua na pré-digestão, fermentação do pólen e alimento alveolar, além de fornecer proteção ao alimento estocado, impedindo a competição de outros microorganismos. Constatou-se ainda que essa relação é obrigatória, pois quando ministrou-se antibióticos (penicilina e estreptomicina) ao xarope que as abelhas usavam como alimento, constatou-se a conseqüente morte da colméia.

Gilliam *et al.* (1985) examinaram o alimento larval de *Trigona hypogea*, que possui hábitos necrófagos, e encontrou cinco espécies de *Bacillus*. Esta abelha substitui o pólen por tecidos de animais mortos como única fonte de proteína. *Bacillus pumilus* foi o mais freqüente, seguindo do *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. circulans* e *B. licheniformis*. Essas bactérias foram ativas metabolicamente e produziram várias enzimas, incluindo proteases, amilases e esterases, além de terem crescido em pH ácido e tolerar altas pressões osmóticas. Uma grande variedade de enzimas produzidas por essas bactérias também foi constatada por Gilliam *et al.* (1990), quando isolou-se bacilos de alimento larval, méis e pólen estocados de uma colméia de *Melipona fasciata*, incluindo aminopeptidases, fosfatases, lipases e glicosidases. *Bacillus megaterium*, *B. circulans* e *B. alvei* foram identificados e foram encontradas grande quantidade de substâncias, como antibióticos e ácidos graxos que podem inibir a competição de outros microorganismos, que causam a deteriorização do alimento estocado, particularmente em ambientes tropicais. Ramos (1997), analisando amostras de própolis, mel, pólen e conteúdo alveolar de *Melipona scutellaris* identificou doze espécies de bactérias do gênero *Bacillus*, sendo os mais frequentes, *B. laterosporus* (34,3%), *B. firmus* (11,9%) e *B. circulans* (10,4%). Essa relação

não parece ser recente, Cano *et al.* (1994), estudou esta simbiose entre quatro espécies extintas da abelha *Proplebeia dominicana* e *Bacillus* spp. Essa simbiose foi constatada por meio da amplificação via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de DNAs extraídos do tecido abdominal dessas abelhas conservadas em âmbar, o qual foi estimado a idade de 23 a 40 milhões de anos.

A técnica de PCR tem sido utilizada em vários estudos de sequências específicas e aleatórias do DNA. Esta técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento de DNA, na presença da enzima DNA polimerase, dNTPs e magnésio. Esta reação baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (**primers**, pequenas moléculas de DNA fita simples) utilizados como iniciadores que delimitam a sequência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Estes **primers** são sintetizados artificialmente de maneira que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares às sequências específicas que flanqueiam a região alvo. Um ciclo de PCR envolve 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA alvo é desnaturada através da elevação da temperatura para 90-92°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35-60°C, dependendo essencialmente do tamanho e sequência do **primer** utilizado, permitindo a hibridação DNA-DNA de cada **primer** com as sequências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos **primers**. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a sequência-alvo, de maneira que uma cópia desta sequência é feita no processo. Este ciclo é repetido algumas dezenas de vezes até que se consiga a quantidade de DNA desejada (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Em comparação com os Apinae que possuem 8 espécies, das quais a *Apis mellifera* tem 14 subespécies (Arias & Sheppard, 1995), os Meliponinae

possuem uma ampla variabilidade genética com cerca de 300 espécies (Camargo, 1992), das quais pelo menos 100 estão em perigo de extinção, devido à vários fatores, tais como: intensos desmatamentos em áreas florestais; atuação de meleiros que retiram o mel da colméia, descartando a cria no chão; criação errônea em meliponários particulares com baixo número de colméias, o que possivelmente levará ao desaparecimento da espécie aproximadamente em quinze gerações, devido ao sistema genético de determinação de sexo (Camargo 1972; Kerr *et al.* 1996).

O objetivo deste trabalho foi identificar as bactérias presentes no mel, pólen e conteúdo intestinal de *Melipona scutellaris*, e detectar uma interferência na amplificação do fragmento 16S do RNAr mitocondrial desta abelha por bactérias simbióticas.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Material Biológico**

O material biológico utilizado nesse estudo foram abelhas da espécie *Melipona scutellaris*, bem como pólen e mel coletados nas colméias provenientes do Meliponário Uberlândia. Foram coletadas abelhas nutrizas no interior da colméias.

### **Cultivo das bactérias**

As abelhas foram dissecadas em ambiente estéril e foi retirado o trato digestivo, com este material fez-se um homogeneizado com 2 ml de água destilada e deionizada. Também foram retirados 2 g de pólen e mel dos potes de armazenamento das colméias e preparados como descrito anteriormente. Amostras desses homogeneizados foram plaqueados, sob condições estéreis, em meio de cultura sólido TSA (Trypticase Soja Agar) . Após 24 horas em estufa, à 32 °C, observou-se o crescimento de várias tipos de colônias de bactérias. Foram escolhidas as colônias mais abundantes. As colônias foram então repicadas para certificar a sua pureza. Em seguida, foram estocadas em meio líquido TSB (Tryptone Soya Broth) + 10% de glicerol. Semeou-se, então, as



colônias em meio de cultura sólido McK (Mc Conkey), seletivo para Gram negativas.

### **Identificação das bactérias**

A identificação foi feita como se segue:

- 1) Baseado em características morfológicas das colônias, quando submetidas à coloração de GRAM, e comparação com lâminas permanentes feitas diretamente do pólen, mel e conteúdo intestinal (Figuras 1,2 e 3);
- 2) Baseado no crescimento das colônias em meios de culturas seletivos;
- 3) Testes Bioquímicos. Os testes utilizados na identificação das bactérias foram:

**Amostras gram positivas:** catalase, Voges Proskauer (VP), fermentação de glicose, manitol, arabinose, xilose, utilização de citrato, tioglicolato (crescimento anaeróbico), crescimento em NaCl 7%, crescimento à 50°C, hidrólise de amido e motilidade (Koneman *et al.*, 1983).

**Amostras gram negativas:** oxidase, oxidação/fermentação (OF), lactose, Voges Proskauer (VP), vermelho de metila (VM), utilização de citrato, fermentação de arabinose, ornitina, arginina, inositol, adonitol, sorbitol, indol, TSI (Triplíce Sugar Iron), uréia, motilidade, H<sub>2</sub>S (ácido sulfídrico), LDC (Lysinedecarboxylase), LIA (Lisine Iron Agar) (Koneman *et al.*, 1983).

### **Extração do DNA bacteriano**

Inoculou-se em erlenmeyers individuais contendo 50 ml de TSB líquido, amostras das bactérias já purificadas e mantidas em estoque. Estes meios foram mantidos em agitação por 24 horas à 180 rpm e 32°C, para crescimento até o momento da extração.

A seguir, realizou-se a extração do DNA bacteriano seguindo o seguinte protocolo:

- 1) Centrifugou-se 5ml de cultura líquida de bactérias a 8.000 rpm por 10 min.;
- 2) Adicionou-se 500µl da Solução I (SDS 1% (Duodecil Sulfato de Sódio); EDTA 0,0005M; TrisCl 0,1M pH 8,0; NaCl 0,2M; proteinase K 100µg/ml), 15µl de proteinase K (10 mg/ml) e incubou-se a 50°C por 2 horas ou pernoite;
- 3) Adicionou-se 300µl de fenol e 200µl de clorofórmio e agitou-se por suaves inversões por 10 min.;
- 4) Centrifugou-se a 8.000 rpm por 10 min. e transferiu-se o sobrenadante para outro microtubo;
- 5) Adicionou-se 15µl de RNase (10mg/ml) e incubou-se por 1 hora a 37°C;
- 6) Adicionou-se igual volume de clorofórmio, agitou-se suavemente e centrifugou-se a 8.000 rpm por 10 min.;
- 7) Repetiu-se o passo 3 e 4 mais duas vezes;
- 8) Precipitou-se os ácidos nucléicos pela adição de isopropanol gelado (2 volumes). Misturou-se por inversões até que os ácidos nucléicos se tornassem visíveis;
- 9) Centrifugou-se a 13.000 rpm por 15 min. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 500µl de etanol a 70%. Centrifugou-se novamente a 13.000 por 10 min., descartou-se o sobrenadante e deixou o **pellet** secar;
- 10) Ressuspendeu-se o **pellet** em 100µl de ddH<sub>2</sub>O;
- 11) Quantificou-se o DNA em Espectrofotômetro (GPC) e o qualificou em gel de agarose 0,8%.

### **Extração do DNA de *Melipona scutellaris*:**

Seguiu-se o seguinte protocolo:

- 1) Triturou-se separadamente amostras de abelhas inteiras e o tórax sem intestino, em nitrogênio líquido, depois adicionou-se 600µl da Sol. I (TrisHCl 2M pH 7,2; NaCl 5M; EDTA 0,2M; Sucrose 50%) e transferiu-se para o microtubo;
- 2) Adicionou-se 600µl da Sol. II (TrisHCl 2M pH 7,2; EDTA 0,2 M; SDS 20%; Sucrose 50%; 40µl de DEPC; ddH<sub>2</sub>O) e 15µl de proteinase K e incubou-se pernoite a 45°C;
- 3) Centrifugou-se a 2.000 rpm por 2 min., extraiu-se o sobrenadante e centrifugou-se novamente a 6.000 rpm por 5 min.;
- 4) Retirou-se o sobrenadante, dobrou-se o volume com clorofórmio e centrifugou-se a 3.000 por 2 min. Repetiu-se esse passo 2 vezes;
- 5) Adicionou-se 1/10 volume de NaCl 2M e 2 volumes de Etanol 100% (temperatura ambiente) e colocou-se a -20°C pernoite;
- 6) Removeu-se do freezer e centrifugou-se a 13.000 rpm por 15 minutos;
- 7) Descartou-se a fase aquosa, mantendo somente o **pellet** no fundo do microtubo. Entornou-se a fase aquosa (álcool). Adicionou-se 500µl de Etanol a 70%. Misturou-se suavemente;
- 8) Pipetou-se para fora do tubo todo o etanol e deixou-se secar;
- 9) Checou-se o tamanho do **pellet** e ressuspendeu-se em 50µl de ddH<sub>2</sub>O de acordo com o tamanho do **pellet**. Misturou-se bem para assegurar que o DNA estivesse totalmente ressuspendido e retirou-se uma alíquota de 10µl da amostra para correr em gel de agarose 0,8%.

### **Amplificação do fragmento 16S do RNA ribossomal mitocondrial**

Os **primers** usados: 875-16SmF (24 pb) e 874-16SIR (20 pb), foram descritos para *Apis mellifera* por Cameron (1992) e flanqueiam o fragmento 16S do RNA ribossomal mitocondrial.

Cada reação da PCR foi feita para um volume final de 20 $\mu$ l, contendo: 50ng de DNA genômico, 2mM de MgCl, 400 $\mu$ M de dNTPs , tampão 1X da Taq polimerase, 1 unidade de Taq polimerase e 6 pmoles de **primer** e o volume final foi completado com H<sub>2</sub>O ultra-pura.

Foi utilizado um termociclador (PTC-100<sup>TM</sup> , MJ Research, Inc.) com o seguintes condições: 95°C por 4 minutos; (39X) 94°C por 2 minutos, 52°C por 45 segundos, 72°C por 30 segundos e com última extensão de 72°C por 4 minutos.

### **Eletroforese e visualização dos produtos amplificados**

Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose (1.2%), TBE 0,045M e 150V , visualizados e fotografados em Image Master VDS, Pharmacia, Biotech.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### Identificação das bactérias

Pelo crescimento em meio McK, separou-se as colônias em dois grupos: 5 colônias cresceram em McK, sendo classificadas como Gram negativas e 4 colônias não cresceram, sendo classificadas como Gram positivas. A confirmação dessa classificação se deu pela Coloração de Gram a partir do crescimento destas em TSB líquido. As características morfológicas das colônias foram observadas quando semeadas em TSA e McK (Tabela 1).

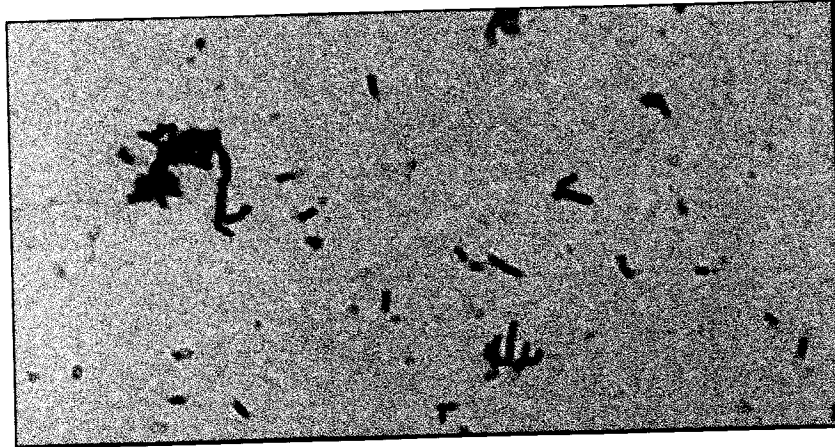
A partir de 19 testes bioquímicos com as amostras Gram negativas (Tabela 2) e 13 testes com as Gram positivas (Tabela 3), identificou-se por chaves (Koneman *et al.*, 1983) nove bactérias de hábitos cosmopolitas (Tabela 4). Isto está de acordo com o encontrado por Gilliam *et al.* (1990) para alimento larval, méis e pólen de *Melipona fasciata*. O presente trabalho também está de acordo com Ramos (1997) que identificou as mesma flora bacteriana para *Melipona scutellaris*, exceto uma única bactéria termófila (*Bacillus stearothermophilus*). Geralmente a faixa de temperatura no interior das colméias desta abelha está

entre 28-34°C (Kerr, 1996) logo, parece improvável que esta bactéria esteja adaptada às essas condições, uma vez que seu habitat é em altas temperaturas, se mostrando como um provável contaminação de autoclave.

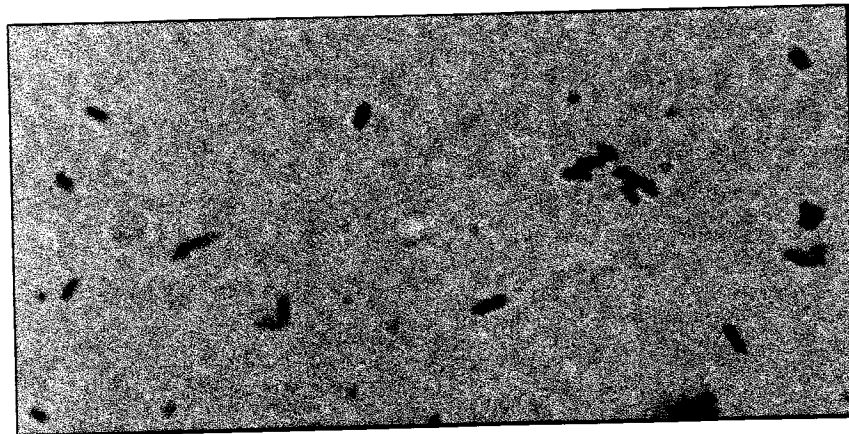
O pólen se mostrou como a fonte mais abundante em quantidade de bactérias (Figura 1 e 2). Foram encontradas: *Escherichia coli*, *Bacillus anthracis* e *Bacillus laterosporus*. Machado (1971), relatou esse fato para a flora bacteriana de *Melipona quadrifasciata*. Isto pode estar relacionado com a constituição protéica do pólen, a qual o faz um alvo potencial para a proliferação bacteriana. Outras considerações são, a forma de barril dos potes, o fechamento destes e a alta umidade no armazenamento, que podem também estar propiciando esta proliferação.

No mel foram encontradas *E. coli*, *Bacillus alvei* e *Bacillus macerans*. Esta fonte se apresentou como a mais restrita em quantidade de bactérias. Isso pode estar relacionado a alta concentração de açúcar (glicose e frutose) neste meio. A identificação dessas bactérias despertou algumas dúvidas. Como estas bactérias estariam sobrevivendo e reproduzindo nessas condições? Considerando que *B. macerans* foi encontrado exclusivamente no mel (concordando com Ramos 1997), qual seria o papel desta bactéria neste meio?

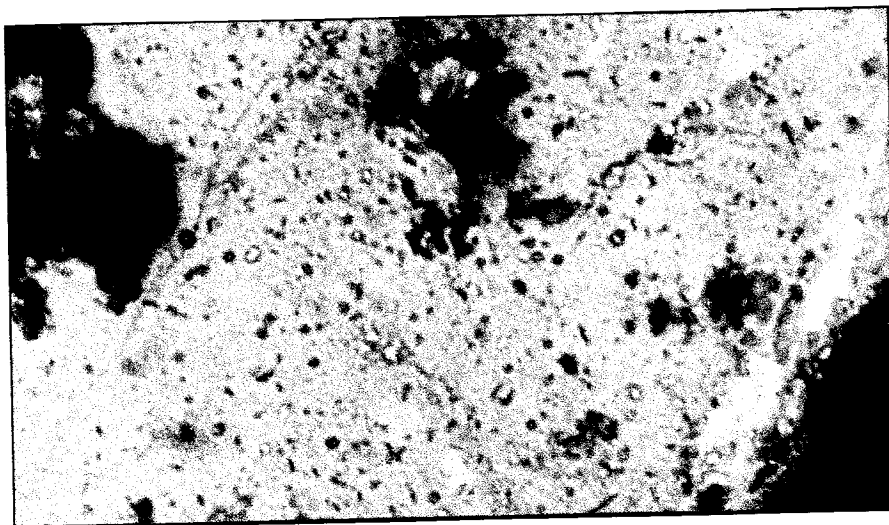
Por sua vez, foram encontradas no intestino, *Enterobacter* sp e *Klebsiella* sp, correspondentes ao grupo das enterobactérias presentes normalmente na flora intestinal de diversos animais.



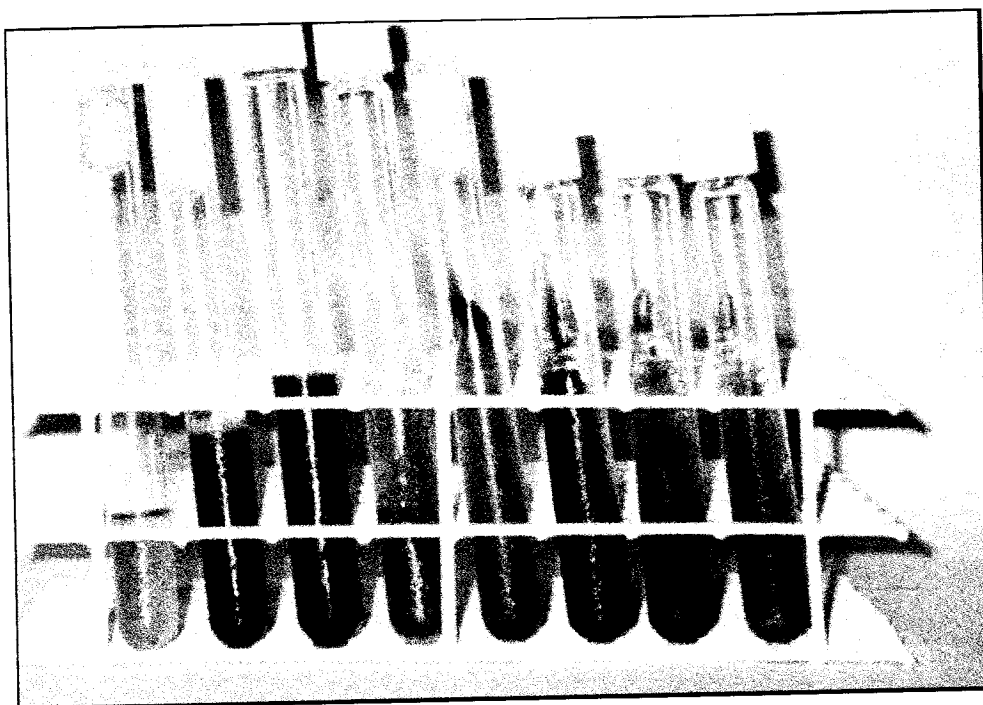
**Figura 1:** Microscopia direta do pólen, mostrando bacilos gram positivos  
(1.000X)



**Figura 2:** Microscopia direta do pólen, mostrando bacilos gram negativos  
(1.000X)



**Figura 3:** Microscopia direta do conteúdo intestinal de *M. scutellaris*  
(800X)



**Figura 4:** Alguns testes bioquímicos utilizados para identificação das bactérias



**Tabela 1:** Características morfológicas das colônias de bactérias obtidas do pólen, mel e conteúdo intestinal de *Melipona scutellaris* do Meliponário Uberlândia.

<b>Amostra</b>	<b>Origem</b>	<b>Cor</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Borda</b>	<b>GRAM</b>
1	Pólen	opaca/translúcida/amarelada	circular/côncava	regular/centro saliente	G-/lac +
2	Mel	opaca/translúcida/amarela	circular/chata	regular	G- /lac -
3	Pólen	opaca/translúcida/branca	irregular/enrugada	irregular	G +
4	Pólen	opaca/translúcida/amarela	circular	regular	G +
5	Mel	opaca/translúcida/branca	irregular/enrugada	irregular	G +
6	Mel	branca/translúcida	puntiforme	regular	G +
7	Intestino	opaca/translúcida/amarela	circular	regular	G- / lac-
8	Intestino	opaca/translúcida/amarela	circular	regular	G- / lac-
9	Intestino	opaca/translúcida/amarela	circular	regular	G- / lac-

Obs: G: gram, lac: lactose, +: crescimento positivo, -: crescimento negativo.

**Tabela 2:** Comportamento bioquímico das bactérias Gram Negativas, obtidas de 3 fontes em colônias de *M. scutellaris*.

AMOSTRA	1	2	7	8	9
Oxidase	-	-	-	-	-
OF	+	+	+	+	+
Lactose	+	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	+
VM	+	+	+	+	+
Citrato	-	-	+	+	+
Arabinose	+	+	-	-	-
Ornitina	-	-	-	-	-
Arginina	-	-	-	-	-
Inositol	+	-	-	-	-
Adonitol	+	-	-	-	-
TSI	A/A	A/A	A/A	K/A	K/A
Urea	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	+
Motilidade	+	-	+	-	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-
LIA	-	-	-	-	-
LDC	+	-	+	+	+

Obs: A/A: comportamento ácido/ácido

K/A: comportamento básico/ácido

+: crescimento positivo

--: crescimento negativo

**Tabela 3:** Comportamento bioquímico das bactérias Gram Positivas, obtidas de 3 fontes em colméias de *M. scutellaris*.

<b>AMOSTRAS</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Catalase	+	+	+	+
Arabinose	-	-	-	+
Glicose	+	+	+	+
Manitol	-	+	-	+
Xilose	+	-	-	-
Citrato	-	+	-	-
VP	+	+	+	+
Tioglicolato	-	+	+	+
NaCl 7%	-	-	-	-
Hemólise	-	+	+	-
Hidrólise amido	+	+	+	+
Redução nitrato	+	+	+	+
Cresc. 50°C	-	-	-	-

Obs: +: crescimento positivo

--: crescimento negativo

**Tabela 4:** Espécies de bactérias obtidas em 3 fontes em colméias de *M. scutellaris*, identificadas por chaves (Koneman, 1983) e suas respectivas origens.

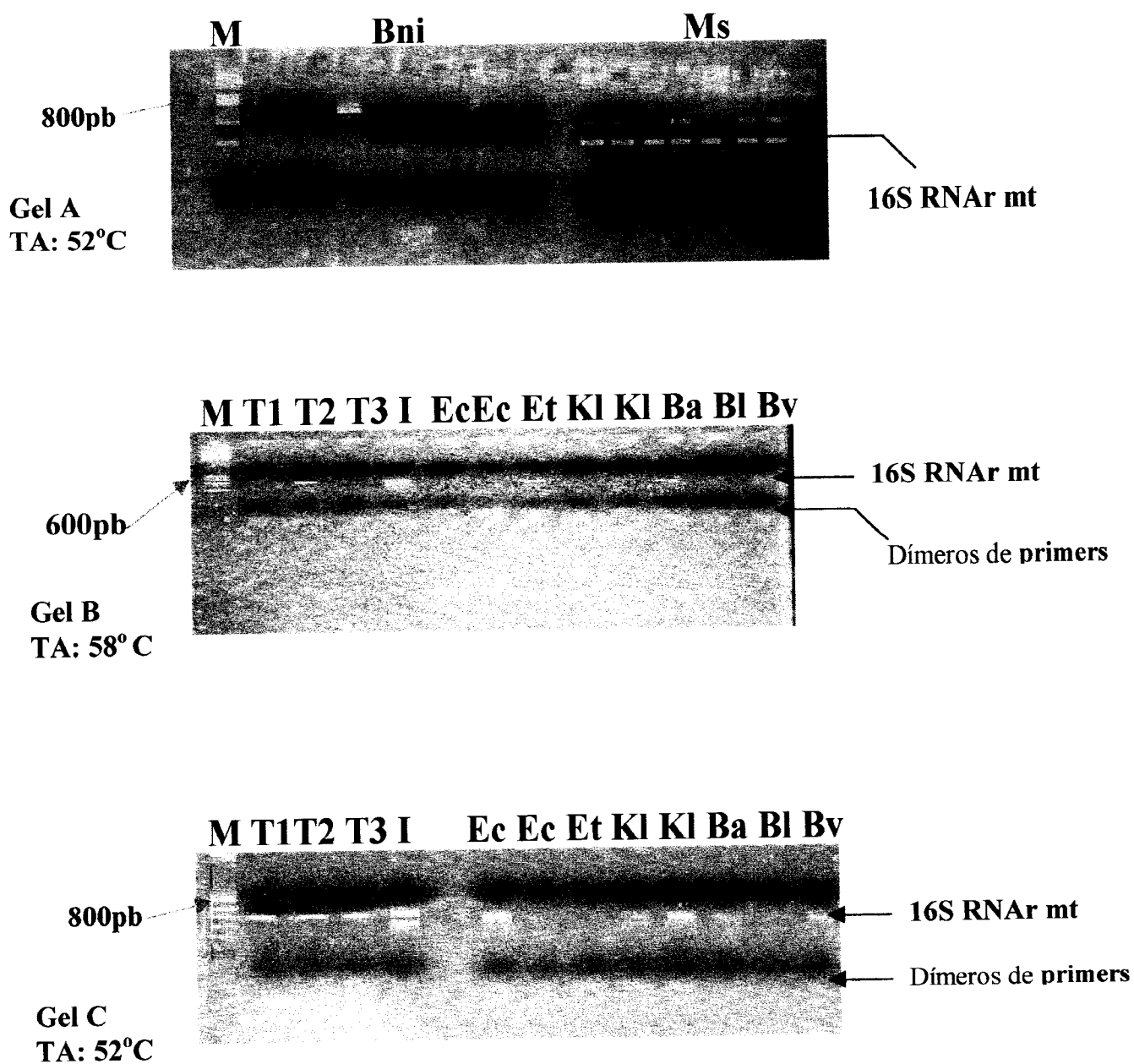
<b>AMOSTRA</b>	<b>ESPÉCIE</b>	<b>ORIGEM</b>
<b>1</b>	<i>Escherichia coli</i>	Pólen
<b>2</b>	<i>Escherichia coli</i>	Mel
<b>3</b>	<i>Bacillus anthracis</i>	Pólen
<b>4</b>	<i>Bacillus laterosporus</i>	Pólen
<b>5</b>	<i>Bacillus alvei</i>	Mel
<b>6</b>	<i>Bacillus macerans</i>	Mel
<b>7</b>	<i>Enterobacter</i> sp	Intestino
<b>8</b>	<i>Klebsiella</i> sp	Intestino
<b>9</b>	<i>Klebsiella</i> sp	Intestino

### Análise dos produtos amplificados

O gel **A** (Figura 6) mostrou a amplificação do fragmento 16S do RNAr mt (594 pb) de 7 amostras da abelha *Melipona scutellaris*. As amostras 1, 2, 4, 6 e 7 mostraram a amplificação de um segundo fragmento (aproximadamente 720 pb). Apenas uma das bactérias, a qual não foi identificada, mostrou um fragmento de aproximadamente 790 pb. Essa bactéria até então, não tinham sido identificadas, e foi perdida por contaminação do meio de cultura. A segunda banda (720 pb) amplificada de *Melipona scutellaris* pode ter aparecido devido ao fato de ter se usado na extração do DNA, todo o indivíduo. Sabe-se que as abelhas nutrizas manipulam constantemente o pólen fermentado para prover os alvéolos de cria. Nesta manipulação ela se contamina com o pólen, rico em bactérias ( Figura 1,2 e 3).

No gel **B** (Figura 6) observou-se a amplificação do fragmento 16S do RNAr mt na amostra T2 (tórax 2) e na amostra I (abelha inteira), que por sua vez, apresentou a amplificação de um segundo fragmento de menor tamanho (em torno de 500 pb). A amostra Et (*Enterobacter* sp), apresentou a amplificação de um fragmento similar ao fragmento 16S do RNAr mt, bem como a amostra Ba (*B. anthracis*). A visualização das duas bandas na amostra I (abelha inteira), ficaram prejudicadas pelo baixo tempo de corrida (30 minutos) e concentração do gel (1.2%). Sabe-se que essa concentração é indicada para fragmentos em torno de 600 a 1.2 Kb, logo impossibilitou a maior separação das bandas.

No gel **C** (Figura 6) observou-se a amplificação do fragmento 16S do RNAr mt nas amostras T1, T2, T3 (tórax), I (abelha inteira), e um fragmento de similar tamanho em Ec (*E. coli*), K1 (*Klebsiella*), Ba (*B. anthracis*), Bv (*B. alvei*). A amostra I apresentou a amplificação de um segundo fragmento de menor tamanho (em torno de 500 pb), coincidente com o gel **B**, embora as temperaturas de anelamento tenham sido diferentes (52°C para o gel **C** e 58°C para o gel **B**).



**Figura 6:** Géis de agarose (1,2 %) mostrando a interferência na amplificação do fragmento 16S do RNAr mt . As letras significam M: marcador, T1: tórax 1, T2: tórax 2, T3: tórax 3, I: abelha inteira, Ec: *Escherichia coli*, Et: *Enterobacter*, Kl: *Klebsiella*, Ba: *Bacillus anthracis*, Bl: *Bacillus laterosporus*, Bv: *Bacillus alvei*. Bni: bactérias não identificadas, Ms: *Melipona scutellaris*, TA: temperatura de anelamento.

Embora no gel **A** tenha sido obtido a presença de uma banda extra de 720 pb e nos géis **B** e **C** uma banda de aproximadamente 500 pb nos produtos amplificados de *M. scutellaris*, deve-se ressaltar que os indivíduos usados na extração do DNA da abelha para o gel **A** (abelhas campeiras) foram diferentes dos usados na extração para o gel **B** e **C** (abelhas nutrizas).

Esse fragmento normalmente tem sido usado em trabalhos de parentesco filogenético. Ele codifica a subunidade maior do RNA ribossômico mitocondrial e por ser altamente conservado, poderia estar sofrendo influência nas ampliações por PCR. Pelos géis **B** e **C** observou-se que algumas dessas bactérias amplificaram um fragmento de igual tamanho. Este fragmento talvez não seja o 16S do RNAr mt, contudo observou-se que os **primers** encontraram sítios de anelamento (mesmo em uma temperatura estridente, 58°C) no genoma bacteriano. A presença do sítios de anelamento associada a alta sensibilidade da técnica de PCR, que a partir de uma única cópia de DNA **template** após 30 ciclos, obtêm-se 1.073.741.764 cópias do fragmento desejado (Cell Molecular Biology, Animation PCR), torna-se um problema quando utiliza-se tecidos (animais e vegetais) contaminados (vírus, bactérias, etc..) na extração. Esse problema ainda poderia ser potencializado para técnicas de PCR que usam baixas temperaturas de anelamento (RAPD), levando à diferentes distâncias genéticas, portanto não correspondendo à história natural dos organismos.

A bactéria *B. macerans* não foi utilizada nas reações de PCR, devido ao fato de ter apresentado problemas na extração. Possivelmente, essa dificuldade pode estar relacionada com algum papel específico desse microorganismo no mel, já que só foi encontrado neste meio.

## CONCLUSÃO

Encontrou-se uma grande flora bacteriana associada a esta abelha, onde o pólen se mostrou como a fonte mais abundante em quantidade de bactéria, e o mel a mais restrita. *Bacillus macerans*, só foi encontrado no mel, isto indica que este microorganismo pode apresentar um papel específico junto a este meio (muito estrigente para a maioria dos microorganismos).

A presença da co-amplificação do fragmento 16S do RNAr mt de *M. scutellaris* por bactérias simbióticas mostrou inadequada a utilização de indivíduos inteiros (possivelmente contaminados) nas extrações de DNA para o uso na técnica de PCR.

Estudos posteriores precisam ser realizados para identificação completa da flora bacteriana das abelhas sem ferrão, em busca de microorganismos de interesse biotecnológico. Várias reações específicas de PCR devem ser otimizadas e padronizadas para certificar que, as bandas amplificadas não sejam contaminações durante a montagem das reações por tubos contaminados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIS, J. 1990. Thirty million arthropod species - too many or too few ? **Journal of Tropical Ecology** 6: 115-118.
- ARIAS, M.G. & SHEPPARD, W.S. 1996. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 5(03): 557-566.
- CAMARGO, C.A. 1972. Determinação de castas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Brasil Biol.** 32(1): 133-138.
- CAMARGO, J.M.F. 1989. Comentários sobre a sistemática de Meliponinae (Hymenoptera: Apidae). In: **An XIV Simp Anual da ACIESP** 68 (suppl.): 41-61.
- CAMARGO, J.M.F. & WITTMANN, D. 1989. Nest architecture and distribution of the primitive stingless bee, *Mourella caerulea* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae): evidence for the origin of *Plebeia* (sensu lato) on the Gondwana continent. **Stud. Neotrop. Fauna Environ.** 24(4): 213-229.
- CAMARGO, J.M.F. & PEDRO, S.R.M. 1992. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. **Apidologie** 23: 509-522. CANO, R.J., BORUCKI, M. K., HIGBY-SCHWEITZER, M., POINAR, H.N., POINAR, G.O., POLLARD, K.J. June



1994. *Bacillus* DNA in Fossil Bees: an Ancient Symbiosis?. **Applied and Environmental Microbiology**, pp. 2164-2167.
- FACCHINI, O. 1996. **Anais do XI Simpósio Estadual da Apicultura do Paraná e XIII Exposição de Equipamentos e Materiais Apícolas**, Pato Branco, Paraná, Editora Universitária Champagnat, pp. 42-45.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1996. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em Análise Genética**. Brasília - DF, 2<sup>a</sup> Ed., pp. 170-178.
- GILLIAM, M.; BUCHMANN, S.L. & LORENZ, B.J. 1985. Microbiology of the larval provisions of the stingless bee, *Trigona hypogea*, an obligate necrophage. **Biotropica** 17(1): 28-31.
- GILLIAM, M., ROUBIK, D.W., LORENZ, B.J. 1990. Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. **Apidologie** 21: 89-97.
- KERR, W.E.; CARVALHO, G.A. & NASCIMENTO, V.A. 1996. **Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação**. Ed. Fundação Acangaú.. Belo Horizonte.
- KERR, W.E. & MAULE, V. 1962. Geografic distribution of stinglees bees and its implications (Hymenoptera: Apidae). **J NY Entomol. Soc.** 72: 2-17.
- KONEMAN, E. W. 1983. **Diagnóstico Microbiológico**. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires, Argentina. pp:61-132, 359-367.
- MACHADO, J.O. 1971. Simbiose entre as abelhas sociais brasileiras (Meliponinae, Apidae) e uma espécie de bactéria. **Ciência e Cultura** 23(5): 625-633, São Paulo.
- MAURIZIO, A. 1975. How bees make honey. IN: CRANE, E. (org) **Honey - A Comprehensive Survey**. London, Willian Heinemann LTDA. p. 77 - 105.
- MICHENER, C.D. 1990. **Classification of the Apidae (Hymenoptera)** 54(4): 75-164, Univ. Kansas Sci Bll.

- MOURE, J.S.1961. A preliminary supra-specific classification of the Old World Meliponine bee (Hymenoptera, Apoidea). **Stud. Entomol.** 4(1-4): 181-242.
- RAMOS, M. A. 1997. **Estudo da flora microbiana em colônia de *Melipona sutellaris* Latreille, 1811.** Tese de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.
- SAKAGAMI, J. O., ROUBIK, D.W. AND ZUCCHI,R. 1993. Ethology of the robber stingless bee, *Lestrimellita limao* (Hymenoptera, Apidae). **Sociobiology**, 21(2): 237-277.
- SILVA, C.H.M.1996. **Anais do XI Simpósio Estadual da Apicultura do Paraná e XIII Exposição de Equipamentos e Materiais Apícolas**, Pato Branco, Paraná, Editora Universitária Champagnat, pp. 83-85.