

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

MARINA
ABADIA RAMOS
1997

ESTUDO DA FLORA MICROBIANA EM COLMÉIA
DE *Melipona scutellaris* Latreille, 1811.

MARINA ABADIA RAMOS

Orientador: Prof^a. Dr^a. ANA MARIA BONETTI

Co- Orientador: Prof. Dr. PAULO P. GONTIJO FILHO

DIRBI/UFU



1000187161

UBERLÂNDIA - M.G

1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

ESTUDO DA FLORA MICROBIANA EM COLMÉIA
DE *Melipona scutellaris* Latreille, 1811.

Marina Abadia Ramos

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Curso de Pós Graduação em Genética e Bioquímica, para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica.

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS
JULHO/ 1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**ESTUDOS DA FLORA MICROBIANA EM
COLMÉIA DE *Melipona scutellaris* Latreille, 1811**

Marina Abadia Ramos

Orientador: Prof^a. Dr^a. *Ana Maria Bonetti*.

Co-Orientador: Prof. Dr. *Paulo P. Gontijo Filho*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, para obtenção de Título de Mestre em Genética e Bioquímica.

**UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS
1997.**

COMISSÃO JULGADORA

R 175e Ramos, Marina Abadia.

Estudo da Flora Microbiana em uma Colméia de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 / Marina Abadia Ramos. - Uberlândia: 1997.

70 f.: il.

Orientador: Ana Maria Bonetti.

Dissertação (Mestrado) Universidade federal de Uberlândia.
Centro de Ciências Biomédicas.

Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Bibliografia: 54 - 66

1. Microorganismos. 2. Genética. 3. *Melipona*. I Universidade Federal de Uberlândia: Centro de Ciências Biomédicas.

II. Título.

CDU 579

Titulares:

- Ana Maria Bonetti
- Warwick Estevam Kerr
- Francisco A. Moura Duarte

Suplentes:

- Malcon M. Brandeburgo
- Nilce Maria Martinez Rossi

Dedicatória:

Dedico este meu trabalho aos meus amados pais Jack e Florita, às minhas irmãs, Jacqueline, Denise e Jeane, ao meu querido esposo Edison pelo afeto e compreensão e a Jesus Cristo por ser o meu maior mestre.

Agradecimentos

- À Dr^a. Ana Maria Bonetti pela orientação e apoio.
- Ao Dr. Paulo P. Gontijo Filho pela co-orientação e paciência.
- Ao Dr. Warwick Estevam Kerr pela cooperação e amizade.
- Aos meus colegas de disciplina, em particular, ao Prof. Roberto Cardoso Lemos pela colaboração.
- Ao Prof. Hudson Armando Nunes Canabrava pela flexibilidade na chefia.
- Aos técnicos dos Laboratórios: Aires, Claudete, Eleno, Hélio, Ricardo, Sr. João e Sr. Joaquim pela paciência, dedicação e pela boa vontade.
- Ao Edison Júnior pela presença segura e assistência constante.
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram para esse meu trabalho, principalmente aos companheiros do grupo religioso ao qual pertenço pela assistência constante e pelo carinho.
- Ao Dr. Francisco A. Moura Duarte por participar nessa Banca Examinadora.
- Aos laboratórios de Biofísica e de Microbiologia pela assistência técnica sem a qual não conseguiria comprovar essa minha dissertação.

- À Coordenação do Curso de Pós-Graduação de Genética e Bioquímica pela presteza.
- Ao Departamento de Ciências Fisiológicas por permitir desenvolver esse meu trabalho.
- À Universidade Federal de Uberlândia pelo apoio.

INDICE GERAL

I - Introdução	01
II - Objetivos	15
III - Materiais e Métodos	16
1. - Material	13
1.1- Alimento dos Alvéolos de Crias	13
1.2- Mel	14
1.3- Pólen	14
1.4- Própolis	14
2. - Métodos	14
2.1- Avaliação Microbiológica Quantitativa	14
2.2- Identificação das Espécies de <i>Bacillus</i>	15
IV - Resultados	19
V - Discussão	30
VI - Bibliografia	54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 A - Visualização da Diferença para o teste de Voges Proskrauer 16
- Figura 1B - Teste em meio SIM Mostrando a Mobilidade da Bactéria 17
- Figura 1C - Crescimento de Bactérias em Meio Manitol. Teste positivo: Mudança da Cor Vermelha do Meio para o Amarelo translúcido 18
- Figura 2 - Resultado da Coloração de Gram em Mel Retirado da Colméia de *Melipona scutellaris* em : 1 e 2 - *Bacillus*, Gram Positivo 20
- Figura 3 - Esfregaço de Colônia em Própolis de *Melipona scutellaris* Mostrando Bactérias do Tipo *Corineobacterias*. 21
- Figura 4 - Crescimento de Colônias de Fungos em Própolis de *melipona scutellaris* (1 e 2) 22
- Figura 5 - Própolis de *Melipona scutellaris*, Crescimento de Microorganismo em Placas de TSA com Própolis de *Melipona scutellaris*, Mostrando Colônia Branca, Circular, Irregular (1) 31
- Figura 6 - Própolis de *Melipona scutellaris*: Crescimento em Placas de TSA. Colônias em Forma de Rizóides e de Cor Amarela 32

- Figura 7 - Crescimento de Microorganismos em Placas de TSA com: Própolis de *Melipona scutellaris*: 1) Colônias Brancas, Irregulares; 2 e 3) Colônias Típicas de *Bacillus* (Colônias Grandes, Pastosas e Onduladas) 33
- Figura 8 - Crescimento de Microorganismo em Placas de TSA com Mel de *Melipona scutellaris*: 1) Colônia Branca, Regular e Circular; 2) Colônia Branca e Irregular; 3) Colônia Salmão, Circular e Convexa 34
- Figura 9 - Mel de *Melipona scutellaris* - Crescimento de Colônias em Placas de TSA com Mel de *Melipona scutellaris*. Colônia com Forma Regular, Tamanho Pequeno e Cor Alaranjado (Indicado) 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Contagem de Microorganismos Viáveis nos Diversos Materiais Coletados na Colméia de <i>Melipona scutellaris</i>	23
Tabela 2 -	Contagem de <i>Bacillus</i> nos Diversos Materiais Coletados na Colméia da <i>Melipona scutellaris</i>	23
Tabela 3 -	Tipos de Colônias de Microorganismos e Número de Isolados Seleccionados dos Materiais Coletados na Colméia da <i>Melipona Scutellaris</i>	25
Tabela 4 -	Características das Colônias de Microorganismos dos Isolados de Própolis das Colméias da <i>Melipona scutellaris</i>	26
Tabela 5 -	Características das Colônias de Microorganismos Isoladas do Mel dos Potes de <i>Melipona scutellaris</i>	27
Tabela 6-	características das Colônias de Microorganismos Isolados de Pólen de <i>Melipona scutellaris</i>	28
Tabela 7 -	Características das Colônias de Microorganismos Isolados dos Alimentos do Alvéolo (I) de <i>Melipona scutellaris</i>	28
Tabela 8 -	Características das Colônias dos Microorganismos Isolados do Alimento do Alvéolo (II) de <i>Melipona scutellaris</i>	29
Tabela 9 -	Características das Colônias Isoladas do Alimento do Alvéolo (III) de <i>Melipona scutellaris</i>	30
Tabela 10 -	Espécies de <i>Bacillus</i> Encontrados nos Componentes da Colméia de <i>Melipona scutellaris</i> .	38

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo contribuir com dados para a Genética Ecológica da urucu da zona da mata do nordeste (*Melipona scutellaris*, Latreille, 1811).

Foi avaliada quantitativamente a microflora de diferentes componentes da colméia das abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris*. As culturas quantitativas foram realizadas em agar tripticase soja (TSA) e MacConkey para o mel, pólen, própolis e alimento do alvéolo, sendo este último, coletado das porções superior (I), intermediária (II) e inferior (III) do alvéolo de cria. As colônias foram descritas quanto as suas características e os isolados representativos, identificados por meio de testes bioquímicos.

Os microorganismos isolados para a devida identificação foram os bastonetes Gram positivos, apesar de terem sido encontrados também cocos Gram positivos, fungos e crescimento de colônias em agar MacConkey (*Bacillus* entéricos Gram negativos). O nível de contaminação foi diferente nos diversos materiais investigados, sendo mais alto no própolis ($5,3 \times 10^6$ ufc/mL) e no mel ($3,5 \times 10^4$ ufc/mL). A morfologia das colônias foi aproximadamente a mesma. As espécies identificadas entre os isolados e suas porcentagens são: *Bacillus laterosporus* (35,38%), *Bacillus firmus* (12,30%), *Bacillus circulans* (10,76%), *Bacillus licheniformis* (9,23%), *Bacillus brevis* (6,15%), *Bacillus subtilis* (6,15%), *Bacillus anthracis* (4,61%), *Bacillus macerans* (4,61%), *Bacillus coagulans*

(3,07%), *Bacillus megaterium* (3,07%), *Bacillus stearothermophilus* (3,07%) e *Bacillus sphaericus* (1,53%). Entre os *Bacillus* identificados estão incluídos cinco espécies (*Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus macerans*, *Bacillus sphaericus* e *Bacillus subtilis*) que podem estar associadas à doenças em pacientes predispostos e intoxicações alimentares, além do *Bacillus anthracis*, agente do antrax (BRAUDE *et al.*, 1981; WILLIAN, 1981; LUND, 1990; MANDELL *et al.*, 1995). Os resultados, apontam o própolis e o mel como os materiais com números mais significativos (maior que 10^4 ufc/mL) de bactérias. Os isolados de *Bacillus subtilis* corresponderam a 11% ($5,8 \times 10^5$ ufc/mL) no própolis.

ABSTRACT

The objective of this work was to contribute with data for the genetic ecology of **uruçu** (*Melipona scutellaris*, Latreille, 1811.) that is peculiar of north - east from Brazil.

We evaluated the quantity of the microflora of different compounds of beehive of *Melipona scutellaris*. That are bees without sting. The quantities cultures were done in Trypticase Soya Agar (TSA) and MacConkey agar to honey, pollen, propoli and cavity food, this later was collected on higher, intermedium and lower portions of the cavity breed. The bees colonies were described by them nature characteristics and the isolated representatives, and identified by biochemical tests. The microorganisms identified were gram positives staffs, gram positives coccus, fungus and enteric gram negatives *Bacillus*. The level of contamination was different in the several investigated materials, being higher on propoli ($5,3 \times 10^6$ ufc/mL) and honey ($3,5 \times 10^4$ ufc/mL). The morphology was the same in all colonies.

The identified species between the isolated and your percentages are: *Bacillus laterosporus* (35,38%), *Bacillus firmus* (12,30%), *Bacillus circulans* (10,76%), *Bacillus licheniformis* (9,23%),

Bacillus brevis (6,15%), *Bacillus subtilis* (6,15%), *Bacillus anthracis* (4,61%), *bacillus macerans* (4,61%), *Bacillus coagulans* (3,07%), *Bacillus megaterium* (3,07%), *Bacillus steathermophilus* (3,07%), *Bacillus sphaericus* (1,53%).

Between the identified *Bacillus* five species are included *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus macerans*, *Bacillus sphaericus* e *Bacillus subtilis*, that could be associate on diseases in patient with predisposition and food intoxication, furthermore we found *Bacillus anthracis* that is the, Antrax agent (BRAUDE *et al.*, 1981; WILLIAN, 1981; LUND, 1990; MANDELL *et al.*, 1995). The results put forward the propoli and honey how the materials with more significant amount (more than 10^4 ufc/mL) of bacteria. The isolated of *Bacillus subtilis* correspond to 11% ($5,8 \times 10^{-5}$ ufc/mL) in the propoli.

ESTUDO DA FLORA MICROBIANA EM COLMÉIA DE *Melipona scutellaris latreille*, 1811.

I- INTRODUÇÃO

ASPECTOS DA BIOLOGIA DE *Melipona*

As abelhas brasileiras sem ferrão estão distribuídas em mais de 50 gêneros que variam em anatomia externa e interna, em tipo de ninhos, em comportamento, em fonte de proteína (pólen, folhas, carniça) e, também, em uma gama de microorganismos - tudo isso formando um micro-habitat para cada espécie. Este trabalho tem como alvo contribuir com dados para a genética ecológica da urucu da zona da mata do nordeste (*Melipona scutellaris*).

Taxonomicamente, as abelhas pertencem ao Phylum Arthropoda, classe Insecta, subclasse Pterigogênea, ordem Hymenoptera, subordem Apocrita, superfamília Apoidea, a qual é subdividida em oito famílias, a saber: Colletidae, Andrenidae, Halictidae, Melittidae, Fidelidae, Megachelidae, Anthophoridae e Apidae. DUCKE (1919) por achar as diferenças desses gêneros insuficientes para uma separação entre eles, agrupou-os em um único Gênero *Melipona*. MOURE (1946) considera as abelhas nativas na subfamília Meliponinae e as divide em três Tribos: 1) Meliponini, com doze gêneros, entre eles *Melipona* e *Plebeia*, 2) Trigonini, com oito gêneros e 3) Lestrimelittini, com um único gênero. SHWARZ (1948) admite três

gêneros: 1) *Lestrimellita*, 2) *Melipona* e 3) *Trigona*, assim como KERR (1949). Atualmente conhece-se quatorze espécies e cinquenta e nove subespécies do gênero *Melipona* (KERR, 1949).

As abelhas, material biológico, objeto do presente estudo, pertencem a:

Família: Apidae; Subfamília: Meliponinae; Tribo: Meliponini, Espécie: *Melipona scutellaris*, Latreille, 1811.

Meliponinae são abelhas eusociais e, portanto, apresentam sobreposição de gerações adultas, com interações sociais muito complexas e um sistema cooperativo em que a divisão de trabalho e as castas são bem definidas. Meliponinae são abelhas sem ferrão, nativas em florestas tropicais. Os ninhos estão localizados em cavidades e consistem em agrupamento de favos horizontais e potes elipsoidais, para armazenamento de mel e pólen. As abelhas secretam cera que, misturada com resinas de plantas, é utilizada para construção dos potes de armazenamento. As resinas servem como agente biocida (MICHENER, 1974; ROUBICK, 1989). A maioria das colônias tem abertura de entrada de tamanho suficiente para passar uma única abelha. As resinas de plantas, a cera e outros materiais utilizados na construção do ninho estão bem localizados, protegendo-o da ação da água e de predadores.

Comparando o comportamento de alimentação das larvas de *Apis*, *Bombus* e *Melipona*, MACHADO (1971)

verificou diferenças. Em *Bombus*, uma vez confeccionado o alvéolo de provisionamento, a primeira abertura na cera, para colocar o alimento, é feita embaixo ou lateralmente, em relação à posição das larvas, sendo o alvéolo fechado com massa alimentar de pólen, mel e secreção glandular. Em *Apis*, a rainha faz postura em alvéolo sem alimento e quando o ovo eclode, as operárias depositam geleia real até o terceiro dia de vida de todas as larvas, daí em diante, as que darão origem a machos ou operárias recebem mel e pólen, por mais três dias, enquanto que as larvas que darão origem à rainha continuam recebendo geleia real por mais três dias, completando seis dias de alimentação, quando o alvéolo é fechado, permanecendo assim até a emergência do adulto. Em *Melipona*, a alimentação é massal, cada alvéolo recebe o alimento antes da oviposição pela rainha e é selado logo após, sendo aberto somente para a emergência do adulto. O alimento é constituído de pólen, mel e enzimas de origem glandular, sendo que na parte inferior do alvéolo deposita-se uma grande quantidade de pólen.

As meliponas usam potes de cera, destacados dos favos de cria, para armazenamento de mel e pólen, enquanto que *Apis* utiliza os próprios alvéolos, iguais aos de cria, para tal armazenamento.

Em *Apis mellifera*, a seleção, coleta, estocagem e uso de pólen aumentam com o tamanho do ninho e a quantidade de pólen coletado é grande durante os estágios

dos ovos e decresce, na fase adulta (HELLMICH & ROTHENBUHLER, 1986).

O própolis é um produto natural produzido pelas abelhas a partir de resina de árvores. As abelhas usam própolis para preencher as fendas da colméia e, principalmente, para evitar, por meio de mumificação com própolis, a decomposição de organismos mortos, tais como besouros, baratas e até, ocasionalmente, ratos que entram na mesma (BRUMFITT *et al.*, 1990).

Os produtos derivados das abelhas apresentam características antibióticas (FREUDENBERG & LIEBIGS, 1947; KALOUSEK *et al.*, 1955). O própolis é ativo contra *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *E. coli* (DIMOV *et al.*, 1992) e é vendido como produto medicinal, sendo descrito como uma substância que promove a saúde humana (WEARVER, 1964; HIGASHI & CASTRO, 1994). O própolis tem sido usado por sua atividade antimicrobiana.

As abelhas sociais e solitárias apresentam, para seu desenvolvimento físico, fisiológico e adaptação química normais, controle da deterioração dos estoques de alimentos (ROUBIK, 1989). Essa adaptação, em adição ao potencial mutualístico com os micróbios e outros organismos, é importante, principalmente, para espécies perenes, que dependem do armazenamento de alimentos em ambientes tropicais.

Com o objetivo de determinar a taxa de sobrevivência de espécies de microorganismos e para indicar se há uso

deles pelas abelhas, na pré-digestão, conversão, fermentação e preservação dos alimentos estocados, verificou-se que em *Apis mellifera*, o pólen difere bioquímica e microbiologicamente da flora de *Curcubitaceae* de onde provém (GILLIAM, 1979; LOPER *et al.*, 1980; STANDIFER *et al.*, 1980; GILLIAM *et al.*, 1990). Leveduras e bactérias do gênero *Bacillus*, apresentam papel rotineiro na conversão do pólen coletado pelas abelhas (GILLIAM, 1979). *Bacillus* têm existência saprofítica e estão amplamente distribuídos na natureza. As diversas características fisiológicas exibidas pelos microorganismos desse gênero estão refletidas nas variedades das espécies mesófilas facultativas, termófilas obrigatórias e facultativas, psicrófilas, acidófilas, halofílicas, que são capazes de sobreviver na forma de esporos ou de crescer em condições extremas (GILBERT *et al.*, 1980). O gênero *Bacillus* inclui cinquenta e uma espécies descritas e validadas, além de outras não citadas.

Do ponto de vista físico, o mel é um fluido, em forma de dispersão coloidal aquosa, composto de partículas de vários tamanhos, tais como íons inorgânicos, sacarídeos, macro-moléculas de proteínas, polissacarídeos, esporos de leveduras, mofos e grandes partículas de grãos de pólen. O mel é, superficialmente, um xarope, formado com cerca de 84% de sólidos, sendo que, basicamente, seus constituintes são a glicose (dextrose) e frutose (levulose). As suas propriedades (viscosidade, índice de refração,

densidade) diferem pelas suas soluções aquosas de açúcares invertidos (JEPSON & SMITH, 1953; TONNIES & KOLB, 1951; MAEDA *et al.*, 1962; MAURIZIO, 1968).

O mel fabricado pelas abelhas é produzido a partir de néctar das flores (fluídos doces das plantas) e tanto ele quanto o pólen funcionam como chamariz oferecido aos polinizadores (insetos, pássaros, morcegos e, raramente, outros animais). O mel depende do total de néctar secretado e da concentração de açúcar que o constitui (conforme a planta, varia de 79% a 15%). As abelhas não procuram néctar em temperaturas abaixo de 12^o C (CRANE, 1979).

O mel contém enzimas (invertases, diastases, peptidases e proteinases) derivadas da secreção das glândulas salivares e do trato digestivo das abelhas (LAXA, 1923). É composto 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 espectro de carboidratos pode afetar a composição do mel (STITZ, 1930; STISON *et al.*, 1960; SUBERS *et al.*, 1966; PORTALIER, 1967; WHITE & KUSHNIR, 1967; PETERSON, 1983), desde que nem todos os açúcares são de igual atração para as abelhas (MAURIZIO, 1975).

As proteínas são os principais constituintes do pólen, seguido de açúcares, água, vitaminas, enzimas, lípidos, leveduras e íons (WEAVER, 1964).

Estudando 18 plantas de guaraná, em Manaus - AM, GONDIN (1984) descreveu a biologia floral e os seus agentes polinizadores e encontrou nessas flores, cinco ordens de insetos (Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera e Lepidoptera). Desses, os principais eram os melíponíneos (32 %) que tanto visitavam as inflorescências masculinas quanto femininas. Entre todas as espécies de abelhas dos gêneros *Apis*, *Melipona*, *Trigona*, *Scaptotrigona*, *Tetragonisca* etc. que se estudou, verificou-se que existem abelhas que tem maior tendência a coletar pólen do que néctar e outras, em que ocorre o contrário. A maioria das *Melipona* é melhor polinizadora do que *Apis* porque, ao sair de uma flor, voa entre um a três metros, antes de pousar novamente. Há flores cujas anteras são porcidas (Solanáceas, Cesalpináceas, Bixáceas e Melastomatáceas) e que são as especialidades das *Melipona* (KERR, 1987).

ABSY & KERR (1977) estudaram pólenes trazidos, diariamente, durante um ano, por 267 operárias de *Melipona seminigra merrillae* e constataram que as abelhas coletaram pólen de 25 gêneros. ABSY *et al.*, (1980) ampliaram esses estudos e registraram que 3/4 do total das plantas são visitadas por abelhas polinizadoras.

Os melíponíneos terão, no futuro, grande uso na polinização, devido a sua alta eficiência em plantas nativas e, também, pelo fato de não terem ferrão. Por esse motivo

é necessário atenção para que não haja destruição de suas colônias.

Alguns pesquisadores tem contribuído para estudos da microflora normal de abelhas melíferas, seu alimento e ambiente. Para determinar o papel dos microorganismos na bioquímica, nutrição e fisiologia de Meliponíneos, GILLIAM, *et al.* (1987, 1989, 1988) estudaram o canal alimentar maduro de abelhas operárias, que contém uma diversidade de microflora devida, provavelmente, ao consumo de pólen e dos demais alimentos. Segundo esses autores, a microflora intestinal das abelhas é dominada por bactérias Gram variáveis, podendo ser encontradas bactérias Gram positivas e Gram negativas, principalmente, os microorganismos *Bacillus spp*, *Enterobacteriaceae*, *Penicilium* e *Aspergillum* e, em algumas condições, leveduras, as quais são representadas por *Torulopsis spp*.

Microorganismos associados com abelhas podem ser parasitas, comensais ou mutualistas, sendo que alguns podem infectar as abelhas e quando mais velhos, podem destruir o armazenamento de pólen. A presença desses microorganismos nos ninhos pode ser, ainda, de fundamental importância para a conversão metabólica ou preservação dos alimentos em ambientes úmidos e quentes.

Exame do material do ninho de *Centris flavofasciata*, *Xylocopa californica arizonensis* e *Crawfordapis luctuosa*, revelou a presença de microorganismos, particularmente,

do gênero *Bacillus*. Foi demonstrado que provisões dos ninhos de *Centris flavofasciata* continham *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*. Foram encontrados, no pólen coletado por *Xylocopa c. arizonensis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* e, também, em *Crawfordapis luctuosa*, um *Bacillus* não identificado, similar ao *Bacillus sphaericus* (GILLIAM et al., 1990).

Microorganismos do gênero *Bacillus* são usados para produzir e secretar enzimas antibióticas e ácidos graxos, desenvolvendo duas tarefas: a) conversão metabólica; b) controle na competição, para evitar a deteriorização dos alimentos. Foram feitas associações do mel e pólen (coletado e estocado) com *Bacillus* em *Apis mellifera* (GILLIAM, 1979) e *Melipona quadrifasciata* (MACHADO, 1971) com a finalidade de se relacionar *Bacillus* com conversão metabólica, competição e deteriorização dos alimentos.

Foram obtidas concentrações de *Bacillus larvae*, isolados em uma mistura de populações de *Bacillus larvae* e *Bacillus alvei*, presentes nas larvas, no mel, pólen e cera em colméias de *Apis mellifera* acometidas por AFB - American Foulbrood (GOLDSCHMIDT & BURKERT, 1955; GOCHNAUER, 1973; HORNITZKY & KARLOSVSKIS, 1989; REBOLI & BRYAN, 1989; ALLIPI, 1991).

Em *Apis mellifera*, infectadas por *Bacillus larvae*, não foi encontrada produção de substâncias antibacterianas

sintetizadas a partir desse patógeno (GLINSKI & JAROSZCZ, 1992; NISKAGEN *et al.*, 1995).

PINNOCK & FEATHERSTONE (1984) encontraram *Melissococcus pluton*, agente da European Foulbrood, na ordem de 10^5 células/mL em *Apis mellifera* (BAILEY & COLLINS, 1982).

Em fezes de larvas de *Apis mellifera*, em um total de 104 isolados microbianos, os microorganismos encontrados, em ordem de freqüência, foram *Bacillus spp*, actinomicetos e leveduras (GILLIAM & PREST, 1987).

Foi verificada a presença de *Bacillus larvae*, *Bacillus alvei* e *Bacillus laterosporus* em larvas mortas de *Apis mellifera* (ALLIPI, 1991).

Há redução da mortalidade de larvas de *Apis mellifera* inoculadas com *Bacillus larvae* e, posteriormente, tratadas com chlortetracycline, embora esse composto, em altas doses, retarde o crescimento e desenvolvimento larval, causando pigmentação precoce em estágios iniciais (PENG *et al.*, 1992).

Analisando a influência da idade, antibiótico, estações do ano e pólen, na presença de microorganismos intestinais em operárias de *Apis mellifera*, GILLIAM *et al.* (1988) encontraram uma bactéria Gram variável, não classificada segundo os padrões de classificação existentes. Os *Bacillus spp* foram numerosos durante o outono. No verão seqüente, foi encontrada uma grande quantidade de esporos que, juntamente com mofos e leveduras, foram os

que mais variaram em frequência nas diferentes épocas do ano. Os mofos não foram encontrados nos intestinos das abelhas durante a primavera, porém foram encontrados no outono. A presença de leveduras foi um indicativo de estresse.

Avaliando a conveniência do sistema API 50 CHB para identificação e caracterização bioquímica do *Bacillus larvae*, agente causador de doenças em *Apis*, CARPANA *et al.*, (1985) concluíram que esse sistema pode ser usado com base na variação e na acidificação dos carboidratos.

A detecção metodológica para identificação dos microorganismos do gênero *Bacillus* é feita por testes microscópicos e testes bioquímicos tais como, reação de Gram, catalase, Voges Proskauer, amido, decomposição de gelatina, citrato e fermentação de manitol (ALIPPI, 1991).

II- OBJETIVOS

1. Avaliar quantitativamente as bactérias presentes no mel, pólen, alimento do alvéolo e própolis de *Melipona scutellaris*.
2. Verificar a presença ou não de espécies de *Bacillus* patogênicos para as abelhas e para o homem, em colméia de *Melipona scutellaris*.
3. Contribuir para o estudo da Ecologia a que está submetida a *Melipona scutellaris* com relação a sua alimentação e fornecer dados para estudos Eco-Genéticos.

III- MATERIAIS E MÉTODOS

III - 1 - MATERIAL:

O material biológico utilizado no presente estudo constituiu-se de abelhas *Melipona scutellaris*, provenientes de Lençóis - BA e Catu - BA, mantidas no Meliponário Uberlândia-MG. Foram coletados e analisados quanto à presença de microorganismos:

- a) alimento depositado pelas operárias nos alvéolos de cria,
- b) mel e pólen, dos potes de armazenamentos e
- c) própolis, que estava vedando as aberturas da colméia.

III - 1.1 - ALIMENTO DOS ALVÉOLOS DE CRIAS:

O alimento das crias, contido em alvéolos, foi coletado e analisado, considerando-se as subporções:

- Terço superior: alimento contido na porção superior do alvéolo de cria (designado de I).
- Porção intermediária: alimento contido na porção intermediária do alvéolo de cria (designado de II).
- Terço inferior: alimento contido na porção inferior (fundo) do alvéolo de cria (designado de III).

De cada um dos cinco alvéolos analisados, foram recolhidos 35 μ l dos alimentos das porções I, II e III com auxílio de uma micropipeta regulável Socorex, de 100 μ l.

III- 1.2 - MEL:

Foram retirados 10 g de mel dos potes de armazenamento e preparou-se uma solução a 10% em água destilada esterilizada.

1.3 - PÓLEN:

Foi retirado 1 g de pólen dos potes de armazenamento e preparou-se uma solução a 10 % em água destilada esterilizada.

1.4 - PRÓPOLIS:

Foi raspado 1 g de própolis da tampa da colméia, colocado em gral de porcelana e triturado com 0,25 mL de solução concentrada de Tween-80. Em seguida foi preparada uma solução a 10% em água destilada e esterilizada.

As soluções foram feitas em duplicatas e mantidas em refrigerador (4^o C) até o momento de se realizar as contagens das viáveis, em tempo não superior a uma semana.

III - 2 - MÉTODOS:

III - 2.1 - AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA QUANTITATIVA

A partir de 1 mL das soluções dos alimentos dos alvéolos (I, II, III), pólen, mel e própolis foram preparadas diluições decimais (10^{-1} e 10^{-2}) utilizando água destilada esterilizada.

Alíquotas de 0,1 mL foram inoculados em placas de agar tripticase soja (TSA) e agar MacConkey, espalhados com alça de Drigalski, seguindo-se de incubação, à temperatura ambiente, por 48 horas.

O número de colônias de bactérias (ufc = unidade formadora de colônia por mililitro ou por grama) foi determinado para cada experimento investigado. As colônias representativas em TSA foram selecionadas com base nas características de dimensão, presença de pigmentos, borda, morfologia e afinidade pelo Gram. Os materiais coletados nas colméias de *Melipona scutellaris* foram subcultivados em tubos de caldo tripticase soja (TSB) contendo 2 mL do meio de cultura, por 24 horas a 37⁰ C, para a leitura da coloração de Gram. As culturas resultantes foram mantidas em freezer (-20⁰ C) em agar estoque, até o momento da identificação.

2.2 - IDENTIFICAÇÕES DAS ESPÉCIES DE *Bacillus*

As culturas mantidas a -20⁰ C foram descongeladas e subcultivadas em tubos contendo TSB, por 24 horas a 37⁰ C, para o preparo dos inóculos.

Os testes utilizados na identificação dos microorganismos foram os seguintes: Voges Proskauer (pesquisa de acetoína), atividade catalásica, redução de nitrato, produção de indol, crescimento em meio de tioglicolato, crescimento na presença de 6,5% de cloreto de sódio, hidrólise do amido, manitol, fermentação de arabinose e xilose (Figuras 1A, 1B, 1C).

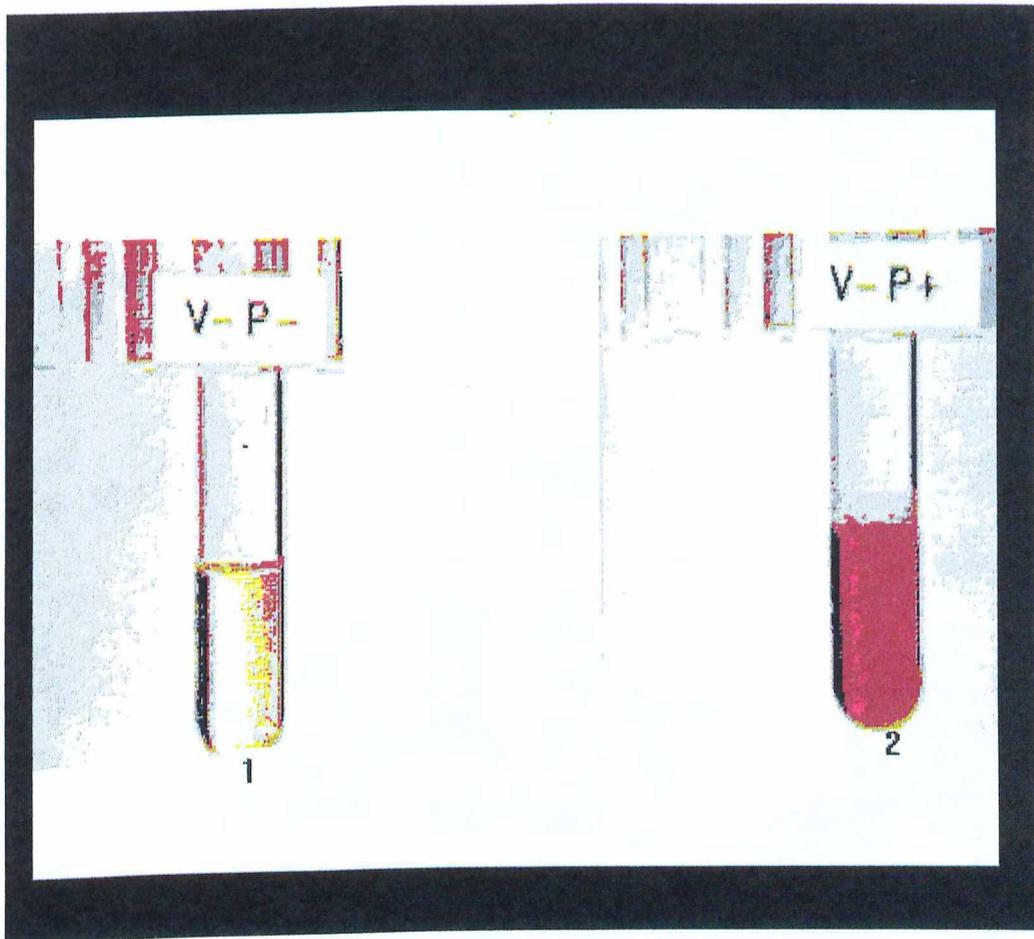


FIGURA 1 A - Visualização da Diferença para o Teste de Voges Proskrauer.

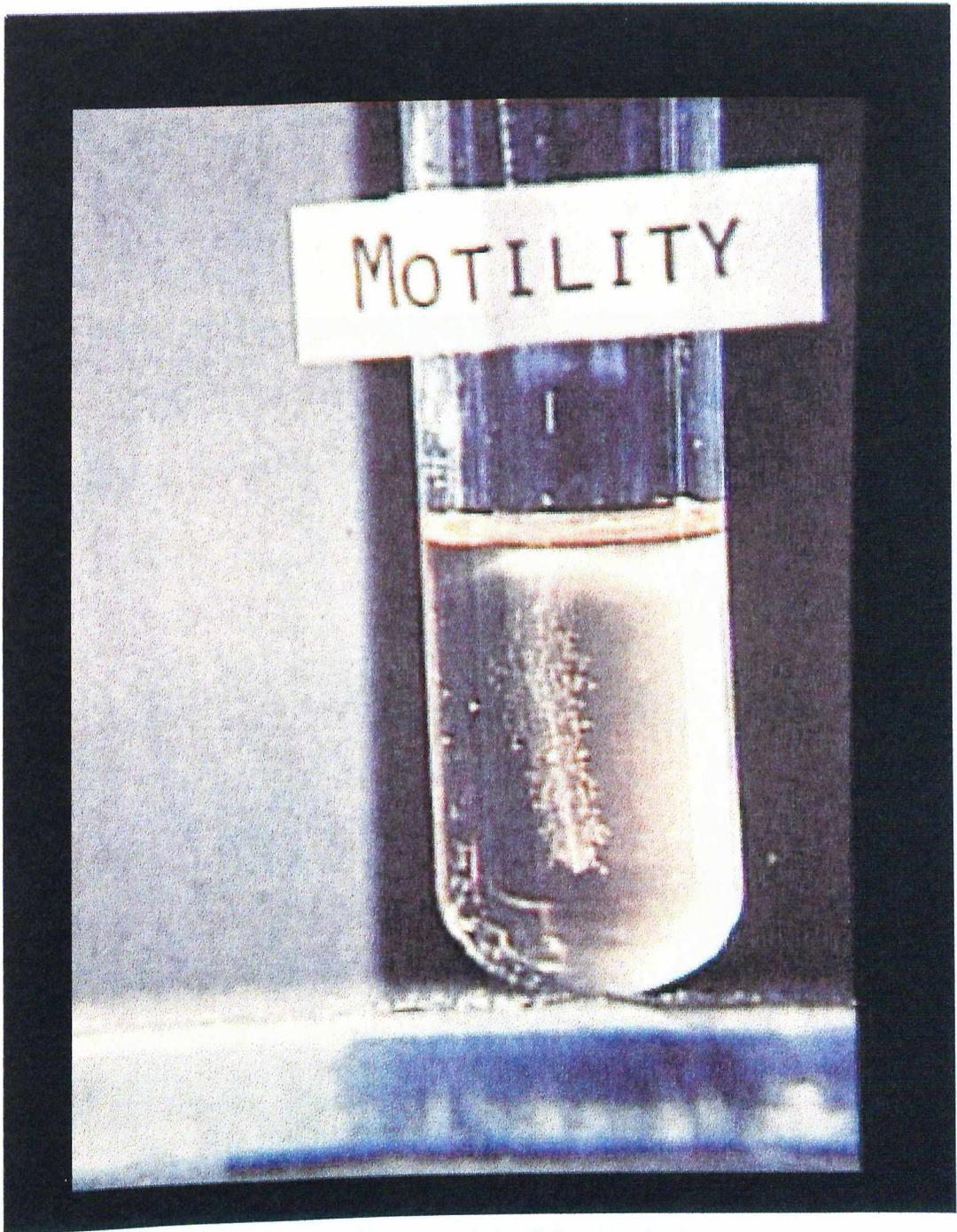


FIGURA 1 B - Teste em Meio SIM Mostrando a Mobilidade da Bactéria.

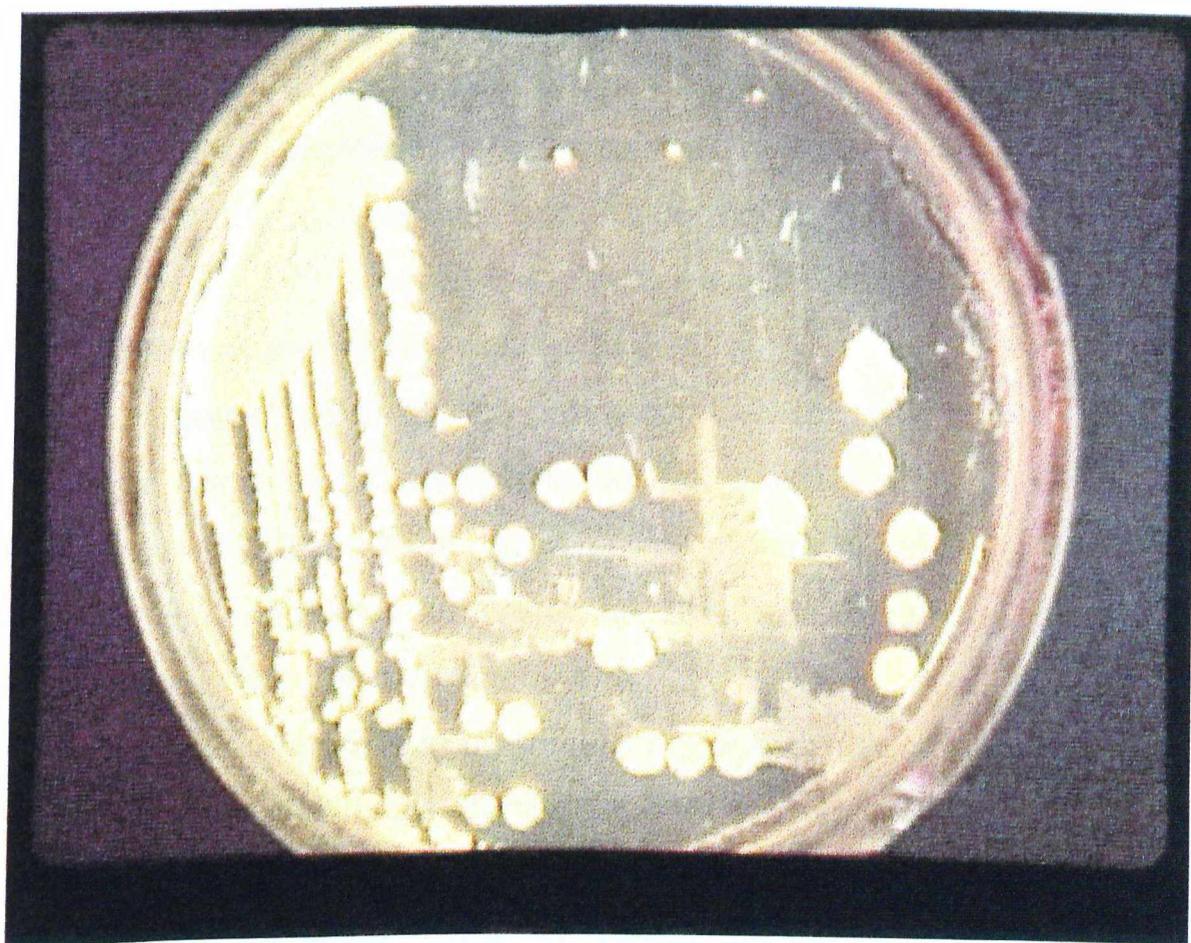


FIGURA 1 C - Crescimento de Bactérias em Meio Manitol. Teste Positivo: Mudança da Cor Vermelha do Meio para Amarelo Translúcido.

IV- RESULTADOS

Os microorganismos isolados a partir dos componentes da colméia da *Melipona scutellaris* foram bastonetes (Figuras 2 e 3) e cocos Gram positivos, com características de *Bacillus* e *Micrococaceae*, respectivamente. Foram encontrados dois fungos (Figura 4) sendo um proveniente do própolis e o outro do pólen, além de bactérias Gram negativas nos inóculos do mel ($2,0 \times 10^1$ ufc/mL) e do própolis ($3,0 \times 10^2$ ufc/mL) nas placas de agar MacConkey, as quais não foram avaliadas pela coloração do Gram.

Os resultados relativos à presença de microorganismos evidenciaram uma maior contaminação no propólis ($5,3 \times 10^6$ ufc/mL) e no mel ($2,2 \times 10^5$ ufc/ g) conforme mostra a Tabela 1. O número de microorganismos foi menor, da ordem de 10^3 ufc/mL ou menos, nos alimentos dos alvéolos de cria.

Em virtude da importância do gênero *Bacillus*, isolados com os quais trabalhamos, não foram identificados os microorganismos do tipo cocos Gram positivos que foram encontrados e representaram $7,0 \times 10^1$ ufc/mL no pólen, $1,0 \times 10^1$ ufc/mL no mel e $1,0 \times 10^1$ ufc/mL, na porção I do alimento do alveolo. Tampouco, foram identificadas as bactérias Gram negativas. A Tabela 2 relaciona o número de unidades viáveis de *Bacillus* nos diferentes componentes de colméia de *Melipona scutellaris*.

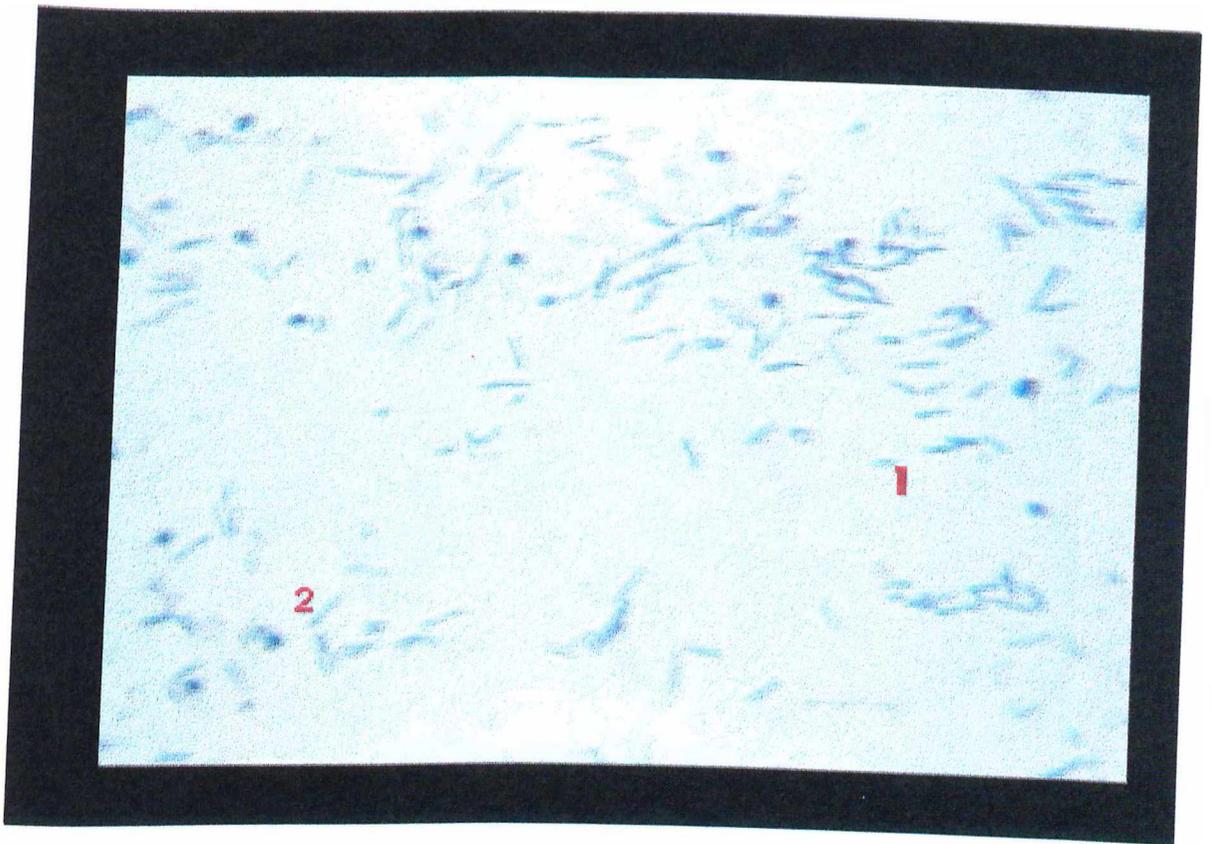
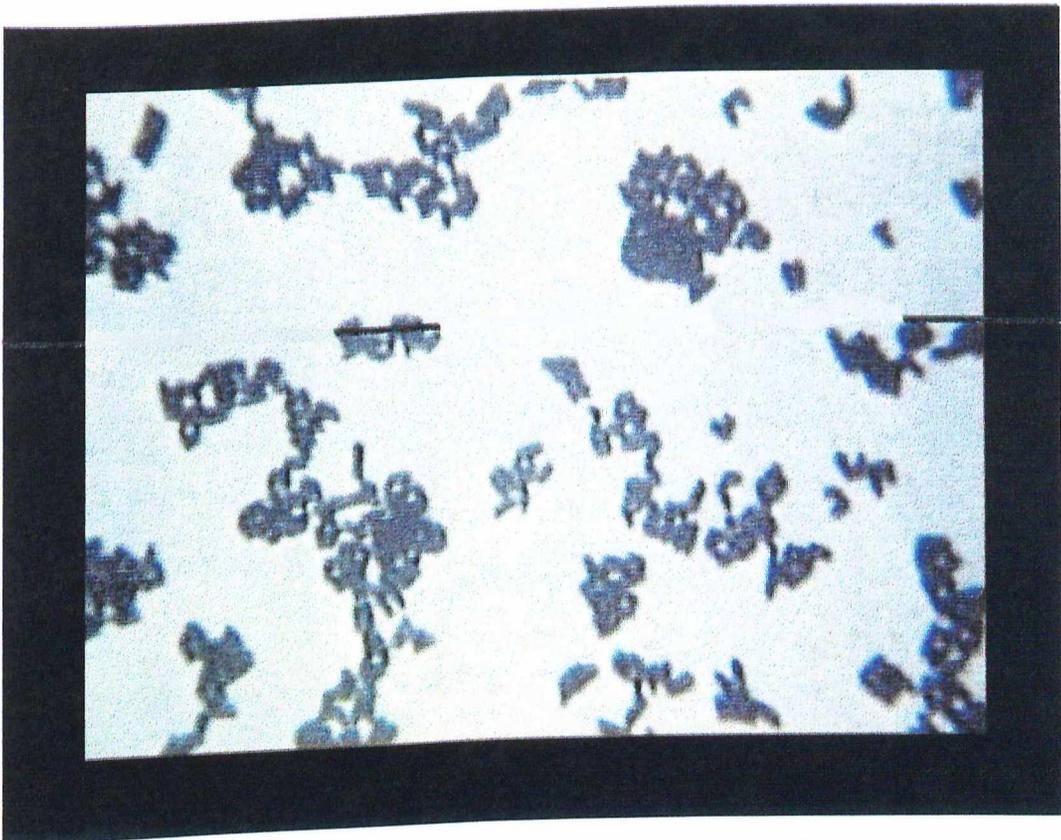


FIGURA 2 - Resultado da Coloração de Gram em Mel retirado da Colméia de *Melipona scutellaris* em: 1 e 2 - *Bacillus*, Gram positivo



Universidade Federal da Paraíba
Biblioteca

FIGURA 3 - Esfregaço de Colônia em Própolis de *Melipona scutellaris* mostrando bactérias do tipo *Corineobacterias*.



FIGURA 4 - Crescimento de Colônias de Fungos em Própolis de *Melipona scutellaris* (1 e 2).

TABELA 1 - Contagem de microorganismos viáveis nos diversos materiais coletados na colméia de *Melipona scutellaris*.

Material	Contagem (ufc/mL)
Propólis	$5,3 \times 10^6$
Mel	$2,2 \times 10^5$
Pólen	$4,0 \times 10^4$
I	$4,0 \times 10^3$
II	$4,0 \times 10^1$
III	$3,0 \times 10^1$

TABELA 2 - Contagem de *Bacillus* nos diversos materiais coletados na colméia da *Melipona scutellaris*.

Material	Contagem (ufc/mL)
Propólis	$5,3 \times 10^6$
Mel	$3,5 \times 10^4$
Pólen	$1,1 \times 10^3$
I	$6,0 \times 10^2$
II	$4,0 \times 10^1$
III	$3,0 \times 10^1$

A Tabela 3 apresenta os números dos diferentes tipos de morfologia das colônias encontrados em cada um dos materiais investigados, bem como o número de amostras que foram investigadas e estocadas para posterior identificação. Embora o nível de contaminação tenha sido diferente nos vários materiais investigados, a diversidade quanto à morfologia da colônia foi aproximadamente a mesma, excetuando-se o alimento da parte superior do alvéolo (I) onde foram encontrados três tipos diferentes de microorganismos, nas diferentes colônias.

As descrições dos tipos morfológicos, considerando dimensões, presença de pigmentos, forma, bordas, aparência da superfície e consistência, para os isolados de própolis, pólen, mel e alimento do alvéolo (I, II e III) estão relacionados nas Tabelas 4, 5, 6, 7, 8 e 9, respectivamente.

As figuras 5, 6, 7, 8 e 9 mostram as variações de forma e presença de pigmentos nas colônias isoladas nos componentes da colméia de *Melipona scutellaris*.

TABELA 3 - Tipos de colônias de microorganismos e número de isolados selecionados dos materiais coletados na colméia da *Melipona scutellaris*.

Material	Número de isolados Estocados	Variedades Morfológicas das Colônias
Propólis	18	09
Pólen	15	06
Mel	14	06
I	05	03
II	05	05
III	09	08

TABELA 4 - Características das colônias de microorganismos dos isolados de Propólis das colméias da *Melipona scutellaris*.

Número da Colônia	Dimensões (mm)	Cor	Forma, borda, aparência da superfície e consistência
1	18	creme	irregular
2	12	creme	circular
3	16	creme	ondulada
4	12	branca	irregular
5	10	branca	rizóide
6	25	branca	irregular, rugosa
7	8	branca	irregular, rugosa
8	3	creme	redonda
9	6	creme	rizóide

TABELA 5 - Características das colônias de microorganismos isoladas do Mel dos potes de *Melipona scutellaris*.

Número da Colônia	Dimensões (mm)	Cor	Forma, borda, aparência da superfície e consistência
1	20	branca	rizóide
2	≤ 1	branca **	rizóide, pastosa*
3	50	creme	rizóide
4	33	creme	rizóide
5	3	creme	redonda
6	20	creme	irregular, pastosa*

* O termo pastosa se refere à forma "butyrous", descrita na literatura.

** Grifo para colônia de Bactérias com Cheiro Forte.

TABELA 6 - Características das colônias de microorganismos isolados de Pólen de *Melipona scutellaris*.

Número da Colônia	Dimensões (mm)	Cor	Forma, borda, aparência da superfície e consistência
1	50	creme	rizóide
2	10	branca	rizóide
3	3	alaranjada	redonda
4	10	creme	rizóide
5	7	branca	rizóide
6	17	branca	irregular, pastosa*

*O termo pastosa se refere à forma "butyrous", descrita na literatura.

TABELA 7 - Características das colônias de microorganismos isolados dos Alimento do Alvéolo (I) de *Melipona scutellaris*.

Número da Colônia	Dimensões (mm)	Cor	Forma, borda, aparência da superfície e consistência
1	5	creme	irregular
2	5	branca	irregular
3	13	creme	irregular, pastosa*

*O termo pastosa se refere à forma "butyrous", descrita na literatura.

TABELA 8 - Características das colônias dos microorganismos isolados do Alimento do Alvéolo (II) de *Melipona scutellaris*.

Número da Colônia	Dimensões (mm)	Cor	Forma, borda, aparência da superfície e consistência
1	9	creme	irregular, pastosa*
2	50	branca	irregular, pastosa*
3	10	branca	irregular, pastosa*
4	18	branca	irregular, pastosa*
5	3	salmão	circular, côncava/convexa

*O termo pastosa se refere à forma "butyrous", descrita na literatura.

TABELA 9 - Características das colônias isoladas do Alimento Alvéolo
(III) de *Melipona scutellaris*.

Número da Colônia	Dimensões (mm)	Cor	Borda e Forma, borda, aparência da superfície e consistência Forma
1	2	amarela	irregular, convexa
2	2	amarela	rizóide
3	5	creme	irregular, rugosa
4	1	branca	circular, rugosa
5	3	amarela	circular
6	15	branca	irregular, pastosa*
7	50	creme	crescimento sobreposto
8	3	branca	irregular, pastosa*

*O termo pastosa se refere à forma "butyrous", descrita na literatura.



FIGURA 5 - Própolis de *Melipona scutellaris*, Crescimento de microorganismo em Placas de TSA com própolis de *Melipona scutellaris*, mostrando Colônia Branca, Circular, Irregular (1).

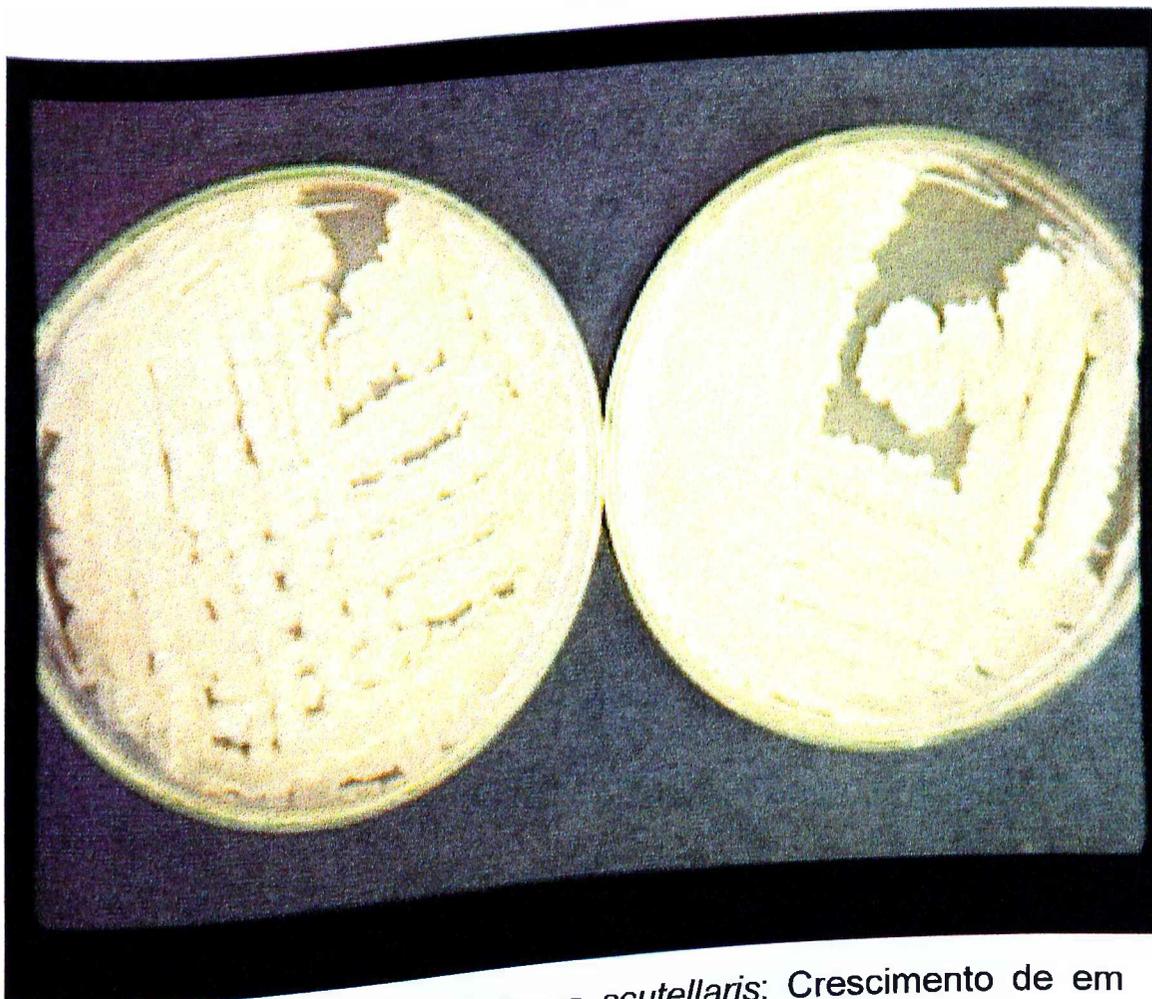


FIGURA 6 - Própolis de *Melipona scutellaris*: Crescimento de em Placas de TSA. Colônias em Forma de Rizóides e de Cor Amarela.



FIGURA 7 - Crescimento de microorganismo em placas de TSA com: Própolis de *Melipona scutellaris*: 1) Colônias Brancas, Irregulares; 2 e 3) Colônias típicas de *Bacillus* (Colônias Grandes, Pastosas e Onduladas).



FIGURA 8 - Crescimento de microorganismo em placas de TSA com Mel de *Melipona scutellaris*: 1) Colônia Branca, Regular e Circular, 2) Colônia Branca e Irregular, 3) Colônia Salmão, Circular e Convexa.

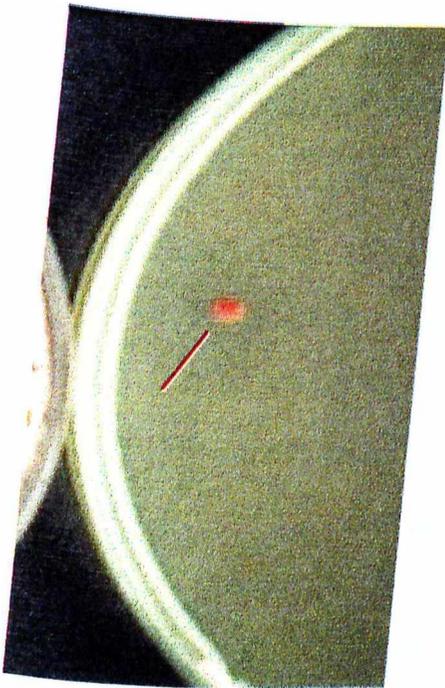


FIGURA 9 - Mel de *Melipona scutellaris* - Crescimento de colônia em placas de TSA com Mel de *Melipona scutellaris*. Colônia com Forma Regular, Tamanho Pequeno e Cor Alaranjado (seta).

GORDON *et al.* (1973) subdividem *Bacillus* em três grupos, com base na morfologia dos esporângios e esporos, a saber:

- Grupo 1 - não dilatado com esporo elíptico, central ou terminal, Gram positivo, apresentando 2 subgrupos - a) largura maior ou igual a 1 μm (células grandes) - b) largura menor que 1 μm (células pequenas);
- Grupo 2 - dilatado com esporo elíptico, central ou terminal, Gram variável e
- Grupo 3 - dilatado com esporo esférico, subterminal ou terminal e Gram variável.

As espécies que não pertencem a nenhum desses, foram colocadas em um quarto grupo. As mais importantes incluem: *Bacillus megaterium* e *Bacillus cereus*, no Subgrupo 1a; *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus coagulans*, no Subgrupo 1b; *Bacillus polymyxa*, *Bacillus macerans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alvei*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus brevis*, no Grupo 2; *Bacillus sphaericus* no Grupo 3; e *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis* e a subespécie *mycoides*, no Grupo 4 (GOCHNAUER, 1973; FEELY & PATTON, 1980; WEARVER, 1980; LENNETTE *et al.*, 1980; BALOWS *et al.*, 1980; KRAMER *et al.*, 1982; KONEMAN *et al.*, 1989; TUAZON, 1995; TORTORA *et al.*, 1995; TURNBULL & KRAMER, 1995).

Nesse trabalho não foi considerada essa subdivisão prévia, com base nas morfologias das células vegetativas e dos esporos, partindo-se diretamente, para a identificação das respectivas espécies.

Em nosso estudo, apenas dois dos isolados de *Bacillus* não foram identificados a nível de espécie. Como mostra a Tabela 10, houve uma predominância de *Bacillus laterosporus* (35,38%) e *Bacillus firmus* (12,30%). Foram encontrados outros dez representantes desse gênero: *Bacillus anthracis*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis*.

As análises das contaminações pelos microorganismos mais prevalentes nos diversos materiais, mostraram pequenas variações. Na porção I do alimento houve 4,61% de *Bacillus laterosporus*, enquanto que outras espécies de *Bacillus* estavam representadas com menos da metade disso (1,53%). Na porção III, destacam-se os *Bacillus firmus* e *Bacillus laterosporus* com 6,15% dos identificados.

Algumas espécies de *Bacillus* foram encontradas em apenas dois dos materiais analisados, como mostra a Tabela 10. Assim, o *Bacillus anthracis* só foi isolado no pólen e na porção III do alimento; o *Bacillus brevis*, no mel e alimento I; o *Bacillus coagulans* no mel e alimento II; o *Bacillus licheniformis*, no própolis e no alimento I; o *Bacillus sphaericus*, no alimento II; o *Bacillus stearothermophilus*, no própolis e pólen e o *Bacillus subtilis*, no própolis e mel.

TABELA -10 Espécies de *Bacillus* encontrados nos componentes da colméia de *Melipona scutellaris*.

Espécie	Material															N ^o Total				
	Própolis			Mel			Pólen			Alvéolo										
	N ^o	% Ident	% Total	N ^o	% Ident	% Total	N ^o	% Ident	% Total	I			II			III			N ^o	%
										N ^o	% Ident	% Total	N ^o	% Ident	% Total	N ^o	% Ident	% Total		
<i>B. anthracis</i>	-	-	-	-	-	-	2	3,07	2,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. brevis</i>	-	-	-	3	4,61	4,47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. circulans</i>	1	1,53	1,49	2	3,07	2,98	4	6,15	5,97	1	1,53	1,49	-	-	-	1	1,53	1,49	3	4,47
<i>B. coagulans</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	5,97
<i>B. firmus</i>	1	1,53	1,49	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1,53	1,49	-	-	-	7	10,4
<i>B. laterosporus</i>	6	9,23	8,95	1	-	-	1	1,53	1,49	-	-	-	1	1,53	1,49	-	-	-	2	2,98
<i>B. licheniformis</i>	6	9,23	8,95	3	4,61	4,47	6	9,23	8,95	3	4,61	4,47	1	1,53	1,49	4	6,15	5,97	8	11,9
<i>B. macerans</i>	5	7,69	7,46	-	-	-	-	-	-	1	1,53	1,49	1	1,53	1,49	4	6,15	5,97	23	34,3
<i>B. megaterium</i>	-	-	-	1	1,53	1,49	-	-	-	1	1,53	1,49	-	-	-	-	-	-	6	8,95
<i>B. sphaericus</i>	-	-	-	-	-	-	1	1,53	1,49	-	-	-	1	1,53	1,49	-	-	-	3	4,47
<i>B. stearothermophilus</i>	1	1,53	1,49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1,53	1,49	1	1,53	1,49	2	2,98
<i>B. subtilis</i>	1	1,53	1,49	-	-	-	1	1,53	1,49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1,49
Sub-Total	15	22,9	22,3	14	21,4	20,8	15	23,0	22,3	5	7,69	7,46	5	7,69	7,46	9	13,8	13,43	65	
Não Identificados	-	5	8	1	2	9	-	7	5	-	-	-	-	-	-	9	13,8	13,43	4	
Total	16	23,0	23,8	15	23,0	22,3	16	23,0	23,8	5	7,46	7,46	5	7,46	7,46	10	16,85	14,92	67	99,98

V- DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo fornecer dados para a Genética Ecológica da uruçu da zona da mata do nordeste (*Melipona scutellaris*).

A *Melipona scutellaris* tem uma grande capacidade de coletar pólen e o pólen armazenado por essas abelhas é mais digerível que o de *Apis* (MACHADO, 1971; KERR, 1987).

Em alguns gêneros de abelhas examinados, foram encontradas espécies de *Bacillus*, a saber; a) em *Trigona* e *Apis Mellifera*, nas células glandulares e no pólen: *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*; b) em *Anthophora spp* e *Centris pallida*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*; c) em *Melipona fasciata*, no alimento: *Bacillus alvei*, *Bacillus circulans*, *Bacillus megaterium*; d) em *Anthophora spp*, nas provisões do ninho, pólen estocado e potes de mel: *Bacillus megaterium* (GILLIAM *et al.*, 1990, BALLOWS *et al.*, 1992).

Comparando as propriedades antibacterianas do mel de abelhas africanizadas e de abelhas sem ferrão, LAURINO & GELLI (1991) verificaram que o dessas últimas tem maior capacidade inibidora de crescimento dos microorganismos do que o de *Apis*, variando conforme a espécie. A bactéria que se mostrou menos resistente foi o *Bacillus stearothermophilus* e a mais resistente foi *E. coli*. A ação dos méis foi, essencialmente, bacteriostática. O mel dos

Trigonini foi melhor agente antibacteriano do que o de *Meliponini*.

GILLIAM *et al.* (1984) analisando o provisionamento larval da abelha eussocial sem ferrão, *Trigona hypogea*, encontraram, pelo menos, 5 espécies de micróbios que confirmam o papel de conversão metabólica e preservação dos armazenamentos de alimentos por esses microorganismos.

Investigando a flora microbiana presente em intestino de *Melipona quadrifasciata*, LANDIN (1996) detectou 5 morfotipos diferentes de bactérias, porém, somente as da porção posterior do intestino apresentavam relações com os alimentos ingeridos e com a parede do epitélio, indicando que são autóctones.

O pólen é de difícil digestão por causa do seu envelope de celulose. A presença de bactérias nos potes de pólen das colônias de abelhas pode indicar um papel na pré-digestão do pólen, embora o papel de digestão da celulose seja, essencialmente, atribuído a microorganismos presentes no intestino. A presença de bactérias em diferentes partes do intestino das abelhas permite concluir sobre algumas de suas funções. Existem dúvidas sobre a ação das bactérias no íleo, onde elas se agrupam formando material eletrodense compacto, que pode ser visto dentro da cutícula intestinal. Observa-se grande concentração de bactérias no reto, como tem sido registrado para *Apis*, (GILLIAM, 1987, 1988; LANDIN, 1996).

Em amostras de pólen, mel e provisões de *Centris flavofasciata* e *Xylocopa californica arizonensis* verificou-se uma associação desses microorganismos com os alimentos. Isso poderia estar relacionado ao processo de estocagem do alimento, embora, o pólen estocado tenha aparência de ser mais úmido do que seco. Isso não significa, necessariamente, que os microorganismos presentes, tem o papel de transformadores do pólen, tornando-os mais úmidos para a estocagem. Isso se deve mais à coleta do néctar e do pólen do que aos microorganismos (GILLIAM *et al.*, 1990).

Nos Meliponíneos o armazenamento de alimentos é suficiente para que as células de cria sejam aprovisionadas e para que as larvas sejam alimentadas por 5-10 dias. A partir daí, a alta porcentagem de bactérias encontradas no aprovisionamento dos alvéolos (cerca de 71%) é maior que a porcentagem de bactérias encontradas no pólen (27%) ou no mel (50%) (GILLIAM *et al.*, 1990). Nossos resultados diferem desses, pois encontramos grande número de microorganismos no mel ($2,2 \times 10^5$ ufc/mL) e pólen ($4,0 \times 10^4$ ufc/mL) e números significativamente menores no alimento de alvéolo ($4,0 \times 10^3$ a $3,0 \times 10^1$ ufc/mL).

Foi encontrada uma associação entre o pólen estocado de *Melipona quadrifasciata* e um *Bacillus* similar a *Bacillus pumilis*. Parece que este é importante para a pré - digestão do pólen, pois a eliminação dessas bactérias com antibióticos, provoca morte da colônia. Foi encontrado um

pequeno número desses microorganismos nos potes de armazenamento de mel. Pelo menos uma espécie de *Bacillus* foi encontrada em cada 13 espécies de abelhas sem ferrão estudadas (MACHADO, 1971). Nossa análise dos componentes da colméia de *Melipona*, também, revelou quase que a totalidade dos microorganismos com características de *Bacillus*.

Examinando provisões de larvas de *Anthophora* spp, *Centris pallida* e *Trigona*, foram encontradas de uma a cinco espécies de *Bacillus*, não se observando outros microorganismos. Entre eles, os *Bacillus pumilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans* e *Bacillus firmus*, foram os mais freqüentes (GILLIAM et al., 1984, 1985). Também, encontramos os *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans* e *Bacillus firmus* distribuídos entre os componentes da colméia de *Melipona scutellaris*.

As espécies de *Bacillus*, encontradas e isoladas nas provisões de *Melipona fasciata*, cresceram em condições ácidas e de alta pressão osmótica, produzindo numerosas enzimas envolvidas no metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos. As bactérias podem participar na conversão metabólica e, mais tarde, podem ser utilizadas pelas abelhas no controle da competição com outros microorganismos (GILLIAM et al., 1984, 1985). Esses *Bacillus* são conhecidos pela sua capacidade de secretar, extracelularmente, um grande número de enzimas que,

depois de algum tempo, produzem também antibióticos, vindos de ácidos graxos (COOLINS *et al.*, 1995, CURZON & GILTROW, 1953, DICKMANN & CROCKETT, 1956,).

Tantos as abelhas sociais quanto as solitárias possuem estocadas no seu alimento, *Bacillus* pré-digestivos concussores, para a conversão metabólica (GILLIAN *et al.*, 1984, 1985 e 1990).

Microorganismos pertencentes a todos os quatro grupos, incluindo os subgrupos 1a e 1b mencionados em resultados foram reconhecidos nos materiais coletados nas colméias da *Melipona scutellaris* aqui estudadas, a saber: *Bacillus megaterium* (1a); *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus coagulans* e *Bacillus firmus* (1b); *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus macerans* e *Bacillus brevis* (2); *Bacillus sphaericus* (3); e, *Bacillus anthracis* (4). No total foram encontrados, nessa série, representantes de doze espécies de *Bacillus*, apenas dois dos isolados não puderam ser identificados com os testes utilizados, um proveniente do mel e outro, do alimento do alvéolo (III).

A presença de microorganismos do gênero *Bacillus* no aparelho digestório das abelhas adultas e larvas, bem como no alimento, no mel e própolis da *Apis mellifera*, assim como em Meliponíneos, foi descrita por vários investigadores (MACHADO, 1971, GILLIAM *et al.*, 1990; VANDERBERG & SHIMANUKI, 1990; LANDIN, 1996; LAURINO & GELLI, 1991).

Nessa investigação, não foi coletado o conteúdo do aparelho digestório da *Melipona scutellaris*, sendo preparadas soluções de própolis, mel, alimentos dos alvéolos de cria e pólen. Os materiais que apresentaram maior número de *Bacillus* foram própolis ($5,30 \times 10^6$); mel ($3,50 \times 10^4$) e pólen ($1,10 \times 10^3$ ufc/mL).

As investigações em *Melipona scutellaris* referem-se à análises qualitativas dos micróbios pertencentes ao gênero *Bacillus*, que foram os que ocorreram em maior proporção nos materiais analisados.

MACHADO (1971) descreve a presença de *Bacillus* em todos os alimentos de Meliponíneos, a exemplo de HORNITZKY & KARLOVSKIS, (1989) e GILLIAM *et al* (1990). Em *Apis mellifera* foram encontradas bactérias do gênero *Bacillus* no aparelho digestório (GILLIAM, 1987; LANDIN, 1996) na colméia, no mel (HUSSEY *et al.*, 1985; GILLIAM *et al.*, 1990; ALLIPI, 1991; DERAKHSHIFAR, 1994; NORDSTRÖN & FRIES, 1995), no alimento do alvéolo (GILLIAM *et al.*, 1990; GILLIAM, ROUBICK & LOREZ, 1990) e no própolis (BRUMFITT *et al.*, 1990).

As bactérias Gram negativas são de relevante importância para o homem causando inúmeros casos de patologias. Nessa investigação foi registrado o crescimento de colônias em meio MacConkey, da ordem de $2,0 \times 10^1$ ufc/mL no mel e $3,0 \times 10^2$ ufc/mL no própolis entretanto, esses Gram negativos não foram identificados.

Entre os componentes da colméia da *Melipona scutellaris*, o mel ($3,5 \times 10^4$ ufc/ g) e própolis ($5,3 \times 10^6$ ufc/mL) foram os que apresentaram maior número de *Bacillus*. A presença de *Bacillus* no mel é conhecida (HORNITZKY & KARLOVSKIS, 1989; ALIPPI, 1991; NORDSTRÖN & FRIES, 1995). Não há registro na literatura da presença desses microorganismos no própolis, obtido de amostras de abelhas com ou sem ferrão.

Em nossa investigação, as bactérias mais prevalentes no mel, assim como no própolis foram, pela ordem: *Bacillus brevis*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus subtilis* (no primeiro) e *Bacillus laterosporus*, *Bacillus licheniformis* (no último).

O *Bacillus stearothermophilus* é um microorganismo termófilo, sendo tradicionalmente empregado no controle biológico de autoclaves (RUSSEL, HUGO & AYLIFFE, 1982). Em função de sua exigência por temperaturas mais altas é improvável ser encontrado nas colméias. Entretanto, dois (2,98%) dos isolados de *Bacillus* identificados, comportaram-se como sendo dessa espécie, pelos testes utilizados.

O *Bacillus coagulans* também foi isolado em colônias afetadas com doença larval em *Apis mellifera*, denominada doença da meia lua (HMD) restrita à Nova Zelândia, o que indica esse microorganismo como causador da doença (VANDERBERG & SHIMANUKI, 1990).

Identificamos um dos isolados como *Bacillus coagulans*, com ocorrência no mel, pólen, alimento II e III, sem evidências da doença nas colônias que estudamos.

Encontramos *Bacillus sphaericus* no alimento de cria (II), assim como registrado para *Apis mellifera* por VANDENBERG & SHIMANUKI (1990).

Entre os microorganismos que podem estar associados à doenças ou intoxicações alimentares no homem, os mais importantes são os *Bacillus anthracis* e *Bacillus subtilis* (WILSON, 1990; ARMSTRONG, 1973).

Bacillus anthracis é o agente do anthrax, doença de insetos, mamíferos e herbívoros com acometimento accidental do homem. Os casos humanos, freqüentemente, resultam do contato com animais portadores, doentes ou que morreram da doença. Esse microorganismo pode ser, também transmitido pela carne (WILLIAN, 1986).

Nesse estudo, três dos microorganismos isolados dos materiais biológicos pesquisados foram identificados nessa espécie, sendo dois deles provenientes do pólen e um, do alimento do alvéolo, contudo, as colônias não apresentavam indicativos de acometimento por doença. Nossa sugestão é que, em *Melipona scutellaris*, essa bactéria contribua para a preservação e transformação metabólica do alimento.

Os *Bacillus spp* colocam-se como o segundo patógeno mais comum em, cinco de seis, revisões sobre endooftalmite pós-traumática (TUAZON & KRAMER, 1995).

Nas infecções oculares os agentes mais freqüentes são o *Bacillus subtilis* e o *Bacillus cereus* (WILSON, 1990; LEW, 1995). *Bacillus subtilis* são responsáveis por quadros de infecções alimentares (WILSON, 1990).

Nessa investigação, dentre esses, foram isoladas amostras de *Bacillus subtilis*, a partir do mel (4,61%) e do própolis (1,53%) representando 6,14% dos microorganismos identificados. Também foram encontrados outros isolados de *Bacillus* oportunistas, correspondentes ao *Bacillus circulans*, no pólen, própolis e mel; *Bacillus megaterium*, no pólen e alimento III e o *Bacillus sphaericus*, alimento II.

Em nossa análise, encontramos *Bacillus licheniformis*, no própolis e alimento I, o *Bacillus subtilis*, no própolis e mel, o *Bacillus firmus* no própolis, mel, pólen e alimento (II, III) e o *Bacillus coagulans*, no mel e alimento II.

Embora as intoxicações alimentares sejam causadas, normalmente, pelo *Bacillus cereus* (TERRANOVA & BLAKE 1978) outros microorganismos, também, estão relacionados com as mesmas, incluindo o *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e, mais raramente, o *Bacillus pumilis*, sendo associados com a ingestão de carnes e vegetais, particularmente o arroz (WILSON, 1990).

Bactéria do grupo 1 b como os *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus coagulans*, também encontrados em nossa investigação, foram detectados em dependentes de drogas. Na maioria dos

casos, provavelmente, como resultado do uso indevido de seringas contaminadas, quando da injeção de heroína e outras drogas. (TUAZON & HILL, 1974).

Esse estudo registrou a presença de *Bacillus* pertencentes às espécies oportunistas ou não, com altos índices ($3,5 \times 10^4$ ufc/mL) no mel, sendo que o *Bacillus subtilis* foi um dos mais prevalentes, correspondendo a cerca de 21,43 % ($7,5 \times 10^3$ ufc/mL). Isso indica a necessidade de adoção de um controle mais rígido nas análises e controle de qualidade do mel.

O mel e própolis com finalidades antissépticas e cicatrizantes são recomendados em muitos trabalhos (LAPCHINE *et al.*, 1985; ESPINA & ENRIQUE, 1989; MENDOZA *et al.*, 1991; SUBRAHMANYAM, 1991, DIGRAK *et al.*, 1995). Existem pesquisas mostrando bons resultados quanto ao uso tópico do mel em cortes cirúrgicos ou traumáticos (ESPINA & ENRIQUE, 1989; SUBRAHMANYAM, 1991; TOSTES & LEITE, 1994; GUTIÉRREZ, *et al.*, 1995; HEJASE *et al.*, 1996) e, ainda, a sua aplicação, com sucesso, no tratamento da catarata senil (GOLYCHEV, 1990).

As utilizações do própolis, com bons resultados, foram recomendadas no tratamento de gengivite, alveolite (QUINTANA & CARLOS, 1992; SILVEIRA *et al.*, 1992) lesões herpéticas (GARCIA & GARGUERA, 1993) na fabricação de cremes com finalidade cicatrizante, em úlceras cutâneas (MAICHUK *et al.*, 1995) nas preparações

de uso tópico para lesões da córnea e no tratamento de cervicites (PEREZ *et al.*, 1995).

As soluções alcoólicas de própolis, evidenciaram uma atividade "in vitro", principalmente, para as bactérias Gram positivas, tais como: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus brevis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus sp*; para bactérias Gram negativas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* e ainda para fungos *Mycobacterium tuberculosis*, assim como para fungos leveduriformes (*Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*) (MASTEROV, 1995).

Os resultados obtidos e nossa análise constataram a presença de algumas bactérias com potencialidade patogênica para o homem em componentes da colméia de *Melipona scutellaris*, particularmente, no própolis e no mel, que são, tradicionalmente, recomendados com finalidades antisséptica, antimicrobiana e cicatrizante. As demais espécies encontradas, no entanto, podem ser justamente as responsáveis pela produção de substâncias que conferem as propriedades conservantes e protetoras aos produtos apícolas, as quais ao competirem com as toxinas daquelas bactérias, anulam seu efeito.

Sugerimos, ainda, que as espécies encontradas no pólen tenham ação na pré-digestão, com provável conversão metabólica.

Nesse trabalho foi evidenciado, entre os isolados, a presença de sete, das nove espécies citadas para *Melipona quadrifasciata* por MACHADO (1971), nas seguintes porcentagens: *Bacillus circulans* (10,76%), *Bacillus licheniformis* (9,23%), *Bacillus brevis* (6,15%), *Bacillus subtilis* (6,15%), *Bacillus macerans* (4,61%), *Bacillus anthracis* (4,61%) e *Bacillus sphaericus* (1,53%). Não foi possível detectar qualquer bactéria diferente que pudesse ser caracterizada como *Bacillus meliponotrophicus*, como sugerido por aquele autor. Contudo, no mel, foi encontrada uma colônia de bactérias de dimensão menor que 1 mm, de cor branca e de cheiro forte. O comportamento para a coloração Gram mostrou ser positivo, do tipo bastonete, não sendo possível identificá-las segundo os testes bioquímicos aqui empregados (TABELA 5).

A Genética Ecológica representa a união entre a Genética de Populações e a Ecologia de Populações, combinando certos aspectos de cada disciplina.

Apesar de sua intrínseca complementaridade, Genética e Ecologia, às vezes, tem sido maus vizinhos, a Genética tratando "do que existe" e a Ecologia, de "como existe" (BERRY *et al.*, 1991).

Um Geneticista de populações, muitas vezes, assume um ambiente constante, enquanto que um Ecologista de populações assume que todos os membros de uma população tem genótipos idênticos. Raríssimamente, tais suposições são verdadeiras (MERRELL, 1981).

Para melhorar os parâmetros para esses dois grupos de especialistas é necessário obter dados biológicos sobre cada espécie em estudo. Essa área é chamada de Genética Ecológica.

Em geral, os bons estudos sobre variação geográfica são feitas em plantas, devido ao fato de não se moverem, porém há animais que não se movimentam como os corais, esponjas, colônias de abelhas (KERR, 1949) ou que se movimentam pouco (escorpiões, alguns sapos) que são ideais para esses estudos.

Os componentes biológicos de uma colônia de abelhas são suas interações com o clima, entre as castas, com seus comportamentos, ferômonios, secreções e são, também, as reservas alimentares, que dependem das flores e das bactérias, que desdobram as proteínas do pólen.

Os nossos resultados ratificam a presença significativa de microorganismos do gênero *Bacillus* nos componentes da colméia das abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris*, com a identificação de isolados pertencentes a doze espécies desse gênero. Todos os materiais analisados mostraram-se contaminados, com números mais expressivos no própolis e no mel. A presença de poucas bactérias com potencialidade patogênica para o homem foi também constatada, destacando-se sua ocorrência, principalmente, no própolis e no mel, que são, tradicionalmente, recomendados com finalidades antissépticas e cicatrizantes.

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo contribuir com dados para a Genética Ecológica da urucu da zona da mata do nordeste (*Melipona scutellaris*, Latreille, 1811).

Foi avaliada quantitativamente a microflora de diferentes componentes da colméia das abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris*. As culturas quantitativas foram realizadas em agar tripticase soja (TSA) e MacConkey para o mel, pólen, própolis e alimento do alvéolo, sendo este último, coletado das porções superior (I), intermediária (II) e inferior (III) do alvéolo de cria. As colônias foram descritas quanto as suas características e os isolados representativos, identificados por meio de testes bioquímicos.

Os microorganismos isolados para a devida identificação foram os bastonetes Gram positivos, apesar de terem sido encontrados também cocos Gram positivos, fungos e crescimento de colônias em agar MacConkey (*Bacillus* entéricos Gram negativos). O nível de contaminação foi diferente nos diversos materiais investigados, sendo mais alto no própolis ($5,3 \times 10^6$ ufc/mL) e no mel ($3,5 \times 10^4$ ufc/mL). A morfologia das colônias foi aproximadamente a mesma. As espécies identificadas entre os isolados e suas porcentagens são: *Bacillus laterosporus* (35,38%), *Bacillus firmus* (12,30%), *Bacillus circulans* (10,76%), *Bacillus licheniformis* (9,23%), *Bacillus brevis* (6,15%), *Bacillus subtilis* (6,15%), *Bacillus anthracis*

(4,61%), *Bacillus macerans* (4,61%), *Bacillus coagulans* (3,07%), *Bacillus megaterium* (3,07%), *Bacillus stearothermophilus* (3,07%) e *Bacillus sphaericus* (1,53%). Entre os *Bacillus* identificados estão incluídos cinco espécies (*Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus macerans*, *Bacillus sphaericus* e *Bacillus subtilis*) que podem estar associadas à doenças em pacientes predispostos e intoxicações alimentares, além do *Bacillus anthracis*, agente do antrax (BRAUDE *et al.*, 1981; WILLIAN, 1981; LUND, 1990; MANDELL *et al.*, 1995). Os resultados, apontam o própolis e o mel como os materiais com números mais significativos (maior que 10^4 ufc/mL) de bactérias. Os isolados de *Bacillus subtilis* corresponderam a 11% ($5,8 \times 10^5$ ufc/mL) no própolis.

BIBLIOGRAFIA

- ABDULSALAM, K. S.; MOHAMED, M. I. & NAWAWY, M. A. E. L. (1990) - Effect of Própolis on some Bacterial Species. *Egyptian Journal of Phytopathology* 21 (1): 61 - 68.
- ABSY, M. L. & KERR, W. E. (1977) - Algumas Plantas Visitadas Para Obtenção De Pólen Por Operárias De *Melipona seminigra merrillae* Em Manaus. *Acta Amazonica*, 7 (3): 309 - 15.
- ABSY, M. L., BEZERRA, E. B. & KERR, W. E., (1980) - Plantas Nectaríficas Utilizadas Por Duas Espécies De *Melipona* Da Amazônia. *Acta Amazônica*, 10 (22): 271 - 81.
- ALIPPI, A. A. (1991) - A Comparison Of Laboratory Techniques For The Detection Of Significant Bacteria Of The Honey Bee, *Apis mellifera*, in Argentina. *Journal of Apicultural Research* 30(2): 75-80
- ARMSTRONG, D.C. (1973) - Clinical Spectrum Of Infection Due To *Bacillus* Species. *Am J. Med.* 55: 839- 45.
- BAILEY, L. & COLLINS, M. D. (1982) - Taxonomic Studies on *Streptococcus pluton*. *J. Appl Bacteriol* 53: 209 - 213.

- BALLOWS, A. H. G.; TRUPER, M. D.; HARDER, W. & SCHLEIFER, K. H. - eds (1992) - *The Prokaryotes*, 2 ed Published, New York, Springer - Verlag.
- BERRY, R. J.; CRAWFORD, T. J. & HEWITT, G. M. (1991) - (Ed. By) *Genes in Ecology*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, Cap. 12: 315 - 334.
- BRAUDE, A. I.; DAVIS, C. E. & FIERER, J. (1981). *Medical Microbiology e Infections Diseases*. Vol II, EUA, W. B. Saunders Company.
- BRUMFITT, J. M. T.; HAMILTON, M. & FRANKLIN, I. (1990) - Antibiotic Activity Of Natural Products: 1- Propolis. *Microbios* 62, 19-22.
- CARPANA, E.; MAROCCHI, L. & GELMINI, L. (1985) - Evaluation Of The API 50CHB System For The Identification And Biochemical Characterization Of *Bacillus larvae*. *Apidologie* 26: 11-16.
- COOLINS, C. H.; LYNE, P. M. & GRANCGE, J. M. (1995). - *Microbiological Methods O Bacillus*. 7 ed., Jordan Hill, Ed. Butterworth - Heinemann.
- CRANE, EVA (1979) - The Flowers Honey Comes From, chapter 1. In: CRANE, E. *A Comprehensive Survey Honey*. London, Heinemann.

CURZON, G. & GILTROW, J. (1953). - *Bacillus*. *Nature* 172: 356.

DERAKHSHIFAR, I. (1994) - Occurrence Of *Bacillus* Larvae Spores
In, Tombo: O. *Apidologie* 25 (5): 475- 479.

DICKMANN, S.R. & CROCKETT, A. L. (1956) - Aspects the Genus
Bacillus. *J. Biol. Chem* 220: 957.

DIGRAK, M; YILMZ, O. & OZCELIK, S. (1995) - In Vitro Antimicrobial
Effets of Propolis Collected in Elazig region. *Turkish Journal of
Biology* 19 (3): 249 - 257.

- 1 DIMOV, V.; IVANOVSKA, K.; BANKOVA, V. & POPOV, S. (1992) - Immunomodulatory Action Of Propolis: IV Prophylactic Activity Against Gram - Negative Infections And Adjunt Effect Of The Water Soluble Derivate. *Vaccine* 10(12): 817 - 823.
- DUCKE, A. (1919) - *Enumeração dos Hymenopteros Corrigidos pela Comissão e Revisão das espécies de Abelhas do Brasil*. História Natural - Zoologia 35(5): 1 - 175.
- ESPINA, C. & ENRIQUE, L. (1989) - Uso de Miel de Abeja en Heridas Operatorias Dehiscentes en Pacientes Post - Cirúrgia Obstétrica. *Universidad de San Carlos de Guatemala*: 47.
- FEELEY, J. C. & PATTON, C. T. (1980) - *Bacillus*. Chapter 13 In: LENNETTE, E. H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W. S. JR. & TRUANT, J. P - *Manual of Clinical Microbiology*. 3^aed. Washington, D. C. Ed. American Society for Microbiology.
- FREUDENBERG, K.; LIEBIGS, M. B. (1947) - Honey. *Liebigs Ann. Chem.* 558: 1.
- GARCIA, C. L. & GARGUERA, E. G (1993) - Efectos del Propolan en el Tratamiento Aftas Bucales. *Rev. Cuba. Med. Mil*; 22 (1): 42 - 45.

- GILBERT, R. J.; TURNBULL, P. C. D.; PARRY, J. M. & KRAMER, J. M. (1980) - Food Poisoning And Other Clinical Infections Associated With *Bacillus* Species With Particular Reference To *Bacillus cereus*, In: BERKELEY, R. & GOODFELLOW, M. (eds): *The Aerobic Endospore- Forming Bacteria: Classification And Identification*. Soc. Gen. Microbiol Special Publications Series, Ney York, Academic Press.
- GILLIAM , M. (1979) - Microbiology of Pollen and Bee Bread: The genus *Bacillus*. *Apidologie* 10: 269 - 274.
- GILLIAM, MARTHA (1985) - Microbes from Apiarian Sources: *Bacillus spp* in Frass of the Greater Wax Moth. *Journal of invertebrate Pathologw* 45: 218 - 224.
- GILLIAM, M. (1989) - Microbial Ecology of Honey Bees. The XXXI st Int Cong. of Apiculture,. Bucharest, Warsaw, Poland. *Apimondia Publ*, 217 - 220.
- GILLIAM, M.; BUCHANBB, L. & LORENZ, J. B. (1984) - Microbial Flora Of The Larval Bees, *Centris pallida* and *Anthophora sp.* *Apidologie*, 15 (1): 1-10.
- 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. & PREST, D. B. (1987 a) - Microbiology of feces of the Larval Honey Bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* 49: 70 - 75.
- GILLIAM, M. & PREST, D. B. (1987 b) - Microbiology Of Feces Of The Larval Honey Bee, *Apis mellifera*. *Juornal of Invertebrate Pathology* 49: 70-75.
- GILLIAM, M.; LORENZ, B. J. & RICHARDSON, G. V. (1988) - Digestive Enzymes and Microorganisms In Honey Bees, *Apis mellifera*: Influence of streptomycin, Age, Season and Pollen. *Microbios* 55: 95 - 114.
- GILLIAM, M.; BUCHMANN, S. L.; LORENS, B. J. & SCHMALZEL, R. J. (1990) - Bacteria Belonging To The Genus *Bacillus* Associated With Three Species Of Solitary Bees. *Apidologie* 21: 99-105.

- GILLIAM, M.; ROUBIK, D. W.; LORENS, B. J. (1990) - Microorganisms Associated With Pollen, Honey, and Brood Provisions In The Nest Of A Stingless Bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie* 21: 89-97.
- GLINSKI, Z. & JAROSZCZ, J. (1992) - Does Bacillus Larvae Produce An Antibacterial Substance In Infected Honey Bee Larvae? *Apidologie* 23: 193-201.
- GOCHNAUER, T. A. (1973)- Growth, Protease Formation, And Sporulation Of *Bacillus* Larvae In Aerated Broth Culture. *Journal of Invertebrate Pathology* 22 (2): 251 - 257.
- GOLDSCHMIDT, S. & BURKERT, H. (1955) - Über Das Vorkommen Einigerim Bienenhonig Bisher Undekanner Zucher. Hoppe-Seyler's. *Physiol. Chem.* [B, 197/56]. 300:188-200.
- GOLYCHEV, V. N. (1990) - Use of Honey in Conservative Treatment of Senile Cataracts. *Vestn Oftalmol. Nov-Dec.* 106(6): 59 -62.
- GONDIN, C. J., 1984 - Alguns Aspectos Da Biologia Reprodutiva Do Guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbillis* (Martins) Ducke - Sapindaceae). *Acta Amazonica*, 14 (1 - 2): 9 - 38.
- GORDON, R. E.; HAYNES, W. C. & HOR-NAY, P. C. (1973) - The Genus *Bacillus*. *USDA Handbook* 427: 1 - 283.

- GUTIÉRREZ, V. R.; ORTIZ, I. B.; LAZOS, O. M.; CHASSIN, O. A. & BEZ, A. R. (1995) - Efecto de Miel Aplicada topicalmente sobre la Cicatrización en Heridas Infeccionadas. Modelo Esperimental. *Rev. Méd. Hosp. Gen. Méx.* 58 (3): 101 - 4.
- HEJASE, M. J.; SIMONIN, J. E.; BIHRLE, R. & COOGAN, C. L. (1996) - Genital Fournier's Grangrene: Experience With 38 Patients. English. *Urology*, May; 47 (5): 734 - 739.
- HELLMICH, R. L & ROTHENBUHLER, W. C (1986) - Relationship Between Different Amounts of Brood and the Collection and Use of Pollen by the Honey Bee (*Apis mellifera*) - *Apidologie*, 17(1): 13 - 20.
- HIGASHI, K. O. & CASTRO, S. L. (1994) - Propolis Extracts are Effetic Against *Trypanosoma cruzi* and Have an Impact on its Interation with Host Cells. *Ethnopharmacol.* Jul 8 43(2): 149 - 155.
- HORNITZKY, M. A. Z. & KARLOVSKIS, S. (1989) - A Culture Technique For The Detection Of *Bacillus larvae* In Honeybees. *Journal of Apicultural Research* 28(2):118-120.
- HUSSEY, M. R; SKINNER, Q. D.;ADAMS, J. C. & HARVEY, A. J. (1985) - Denitrification and Bacterial Numbers In Riparian Soils Of a Wymoning Mountain Watershed. November. *Journal Of Range Management*: 38 (6): 74 - 81.

- JEPSON, J. B. & SMITTH, (1953) - Sugar of the Chemistry. *J. Nature* 172: 1100 - 1132.
- KALOUSEK, J.; KUTACEK, M.; BILEK, J. & CESKOSLOV, J. (1955) Effects Medicinal Honey Bee. *Farm.* 4 (188): 36 - 42.
- KERR, W. E. (1949) - Agumas Comparações entre a abelha Européia (*Apis mellifica* L.) e as Abelhas Nativas Brasileiras (Meliponini). *O Solo* 41: 39 - 47.
- KERR, W. E., (1987) - Abelhas Indígenas Brasileiras (Meliponíneos) Na Polinização e na Produção De Mel, Pólen, Geoprópolis e Cera. *Informe agropecuário* 13 (149): 15 - 22.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWELL, V. R. JR. & SOMMERS, H. M. (1989) - *Diagnóstico Microbiológico - Texto e atlas colorido*. 2 ed, São Paulo - SP, Edit. Panamericana.
- KRAMER, J. M.; TURNBULL, P. C. B.; MUNSHI, G. & GILBERT, R. J. (1982) - Identification and Characterization of *Bacillus cereus* and Other *Bacillus* Species Associated with Foods and Food Poisoning Organisms. In: *Isolation and Identification Methods for Food Poisoning Organisms* Eds J.E.L. Corry, Roberts an F. A. Skinner, Society for Applied Bacteriology Technical Series 17, London, Academic Press.

- LANDIN, CARMINDA DA CRUZ, (1996) - Bacteria Present in the Intestinal Tract of *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier (Hymenoptera, apidae, Meliponinae). *J. HYM. RES.* 5: 264-272.
- LAPCHINE, L.; MOATTI, N.; RICHOLLEY, G.; GASSET, G. ; BES, J. C. TEMPLIER, J. & TIXADOR, R. (1985) - Étude des Concentrations Minimales D'antibiotiques Inhibitrices de Bactéries Cultivées *In vitro* Pendant *In Vol* Spatial. Expérience cytos 2. *C. R. Soc. Biol* 179: 48 - 52.
- LAURINO, M.C. & GELLI, D. S. (1991) - Pollen Analysis, Physicochemical Proprieties and Antibacterial Action of Brazilian Honeys from africanized Honeybees (*Apis mellifera* L.) and Stingless Bees. *Apidologie* 22 (1): 61 - 74.
- LAXA, O. (1923) - Méthode Nouvelle Et Simple Pour Le Dosage Des Albuminoïdes Dans Le Miel. *Annls Falsif. Fraudes* 16: 286-289.
- LENNETTE, E. H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W. S. JR. & TRUANT, J. P (1980) - *Manual of Clinical Microbiology*. 3^{ed}, Washington, D. C, Ed. American Society for Microbiology.
- LEW, D. (1995) - *Bacillus anthracis* (Anthrax), chapter 187, p 1985 - 1989 In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E. & DOLIN, R. *Infections Diseases* . 4^{ed}. New York. Ed. Churchill Livingstone.

LOPER, G. M., STANDIEFER, L. N. THOMPSON, M. J.; GILLIAM, M. (1980) - Biochemistry and Microbiology of Bee Collected Almond (*Prunus dulcis*) Pollen and Bee Bread. I Fatty Acids, Sterols, Vitamins and Minerals. *Apidologie* 11: 63 - 73.

LUND, B. M. (1990) - Foodborne Disease Due To *Bacillus* And *Clostridium* Species. *Lancet* 336: 982- 986.

MACHADO, O. J. (1971)- Simbiose Entre Abelhas Sociais Brasileiras (Meliponinae, Apidae) E Uma Espécie De Bactéria. *Ciência e Cultura* 23 (5):625-633.

MAEDA, S. , MUKAI, A., KOSUGI, N. & OKADA, Y. (1962) - The Flavour Components Of Honey. *J. Fd Sci. Tech.* 9 (7): 270-274.

MAICHUCK, I. F.; ORLOVSKAIA, L. E. & ANDREEV, V. P. (1995) - The Use of Ocular Drug Films of Propolis in the Sequelae of Ophthalmic Herpes, Russian. *Voen Med Zh DEc* (12): 36 - 39.

MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. (1995) - *Principles And Practice Of Infections Diseases, Infectious Disaseses*. 4 ed, New York, Ed. Churchil Linningstone.

MASTEROV, G. D. (1995) - Apitherapy in the Combined treatment of Patients with Pulmonary Tuberculosis Taking into Account the Hypophyseal Adrenal System Indices. Russian. *Vrach. Delo. Jan-Feb* (1-2): 120 - 2.

- MAURIZIO, A. (1975) - How Bees Make Honey. In: CRANE, E. (org) *Honey - A Comprehensive Survey*. London, William Heinemann LTDA. p. 77 - 105.
- MAURIZIO, A., (1968) - La Formation Du Miel. In: *Traité De Biologie De L' Abeille. Vol. IV*, Paris, Ed. R. Chauvin: 264 - 276.
- MENDOZA, O. H.; PÉREZ, A. J.; RAMOS, C. L. & ARIOZA, M. C. (1991) - Propóleo Flebostticas/ Propolis and Phlebostic ulcers. *Rev. Cuba Circ.* 30(1): 28 - 33.
- MERRELL, D. J. (1981) - *Ecological Genectics*, Minneapolis. University of Minnesota Press.
- MICHENER, C. D. (1974) - *The Social Behavior of the Bees: A Comparative Study*. Cambridge, Massachusetts. Mass, Havard University Press.
- MOURE, Pe. J. (1946) - Melíponas do Brasil. *Cha e Qui.* 74: 609 - 612.
- NISKANEN, M.; JOHANSSON, L. K. & TUULA, J. A. (1995) - Eikotelomädän Aiheyttajan, *Bacillus Larvae* -Bakteerin Toteaminen Hunajasta Veriagarmenetelmällä. *Suomen Elainlaakarilehti*, 101 (2): 73 - 78.

- NORDSTRÖM, S. & FRIES, I. (1995) - A Comparação De Meios E Condições Da Cultura Para Identificação De *Bacillus larvae* In Honey. *Journal of Apicultural research* 34 (2): 97 - 103.
- PENG, C. Y. S.; MUSSEN, E.; FONG, A.; MONTAGUE, A. M. & TYLER, T. (1992) - Effects Of Chlortetracycline Of Honey Bee Worker Larvae Reared In Vitro. *Journal of Invertebrate Pathology* 60, 127-133.
- PEREZ, E. L.; BOTELL, M. L.; PEREZ, O. S. & BRITO, B. C. (1995) - Parasitismo vaginal y cervicitis Aguda: tratamiento Local com Propoleo. Informa Preliminar. *Rev. Cuba Enferm;* 11(1): 51 - 56.
- PETERSON, G.L. (1983) *Methods Enzimol* 91: 95-15.
- PINNOCK, D. E. & FEATHERSTONE, E. N. (1984) - Detection And Quantification Of *Melissococcus Pluton* Infection In Honeybee Colonies By Means Of Enzyme-Linked Immunosorbente Assay. *Journal of Apicultural Research* 23(3): 168-170.
- PORTALIER, J. (1967) - Détermination Quantitative Des Sucres Des Miels Par Chromatographie En Phase Gazeuse. *Bull. Apic. Doc. Sci. Tech. Inf.* 10 (2): 209 -212.
- QUINTANA, D & CARLOS, J. (1992) - El Uso de la Propolina al 8 Por Ciento en el Tratamiento de la Alveolitis. Estudio Preliminar. *Rev. Cuba Estomatol* 29 (2): 93 - 97.

- REBOLI, A. C.; BRYAN, C. S. (1989) - Farrar WE Bacteremia And Infection Of A Hip Prosthesis Caused By *Bacillus Alvei*. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1395 -6.
- ROUBICK, D. W. (1989) - *Ecology and Natural History of Tropical Bees*. NY, Cambridge University Press.
- RUSSEL, A. D.; HUGO, W. B. & ALYLIFFE, G. A. J. 1982 (eds). - *Principles and Praticce of desinfection, Preservation and Sterilization*, Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- SCHWARZ, H. F. (1948) - Stingless Bees (Meliponinae) of the Western Hemisphere *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 90: 1- 546.
- SIDDIQUI, I. R. (1970) - The Sugars Of Honey. *Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.* 25:285-309. [B, 191/72]
- SILVEIRA, M. G.; GONZALEZ, E. A.; DELGADO, L. O. & GODOY, A. G. (1992) - Efectos Curativos de una Solución Hidroalcohólica del Propóleos Cubano al 1,5 en Uma terapéutica Periodontal. *Rev. Cuba Estomatol* 29(1): 14 - 19.
- STANDIEFER, L. N.; MC CAUGHEY, W. F.; DIXON, S. E.; GILLIAM, M.; LOPER, G. M. (1980) - Biochemistry and Microbiology of Pollen Colletect By Honey Bees (*Apis mellifera* L.) From Almond, *Prunus dulcis*. N. Protein, Amino Acids and Enzymes. *Apidologie* 11: 163 - 171.

- STINSON, E. E., SUBERS, M. H., PETTY, J. & WHITE, J. W. Jr.
(1960) - The Composition Of Honey. V. Separation And
Identification Of Organic Acids. *Archs Biochem. Biophys.* 89 (1):
6-12.
- STITZ, J. (1930). A'Méz Fehérjetartalma. German. *Mezogazd. Kutat.*
3: 25-29.
- SUBERS, M. H., SCHERPARTZ, A. I. & KOOB, R. P. (1966) -
Separation And Identification Of Some Organic Phosphates In
Honey By Column And Paper Chromatography. *J. Aplic. Rev.* 5
(1): 49-57.
- SUBRAHMANYAN, M. (1991) - Topical Aplication of Honey in
Treatment of Burns. India. *Br. J. Surg. Apr.* 78(4): p 497 - 8.
- TERRANOVA, W. & BLAKE P. A. (1978) - *Bacillus cereus* Food
Poisoning. *N. Engl. J. Med.* 298: 143 - 4.
- TONNIES, G. & KOLB, J. J. (1951) - Determination Sugar Honey
Bee. Anal. Chem. 23: 823.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. & CASE, C. L. (1995) - *Microbiology
an Introduction.* 5 ed., California, The Benjamim/ Cummings
Publishing Company, Inc.

- TOSTES, R. O. G. & LEITE, F. E. P (1994) - Novas Considerações sobre o Uso Tópico de Açúcar e Mel em Feridas. *Rev. Méd. Minas Gerais*, 4 (3): 35 - 39.
- TUAZON, C. D. (1995) - Other *Bacillus* Species, chapter 188: 1994 - 1995 In: MANDELL, G. L. ; BENNETT, J. E. & DOLIN, R. *Infections Diseases* . 4 ed., New York, Ed. Churchill Livingstone.
- TUAZON, C. D.; HILL, R. (1974) - Sheagren J. N. Microbiologic Study Of Street Heroin And Infection Paraphernalia. *J. Infect Dis.* 129: 327- 329.
- TURNBULL, P. C. B. & KRAMER, J. M. (1995) - *Bacillus* Chapter 28 In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, C. & YOLKEN, R. H. - *Manual of Clinical Microbiology*. 6 ed, Washington DC, ASM PRESS: 349 - 356.
- VANDERBERG, J. D. & SHIMANUKI, H . (1990) - Isolation And Characterization Of Bacillales Coagulans Associated With Half - Moon Disorder Of Honey - Bees. *Apidologie* 21: 233-241.
- WEARVER, R. E. (1980) - Erysipelothrix, Chap 12 IN: LENNETTE, E. H.; HAUSLER, W. J. Jr. & TRUANT, J. P (eds): *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology. Washington, DC.

- WEAVER, N. (1964) - A Pollen Substitute For Honeybee Colonies.
Reprinted Form Gleanings In Bee. *Culture* 92 (9): 550-553.
- WHITE, J. W. Jr., KUSHNIR, I. (1967) - Composition Of Honey. VII.
Proteins. *J. Aplic. Res.* 6(2): 69-89.
- WILLIAN, R. P (1981) - *Bacillus Anthracis* And Other Aerobic Spore.
Forming Bacilli: 315-326. In: BRAUDE, A. I.; DAVIS, C. E. &
FIERER, J. (eds.). *Medical & Infections - Diseases*,
Philaderphia, WB Saunders CO.
- WILLIAN, R. P. (1986) - *Bacillus anthracis* And Other Aerobic Spore-
Forming Bacilli: 220 - 278. In: Braude, A, ed. *Medical
Microbiology and Infectious Diseases*. Philadelphia. WB
Saunders.
- WILSON, G. (1990) - *Bacillus: The Aerobic Spore - Bearing Bacilli*.
In: Parker MT, ed. *Topley and Wilson's Principles of
Bacteriology, Virology and Immunity*. Beltimore, Willians &
Wilkins.

FU-00010091-2