

 **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

IDENTIFICAÇÃO DA FLORA MICROBIANA EM COLMÉIAS DE MELIPONINA

Ana Lúcia Santos

Orientador: Dr. Warwick Estevam Kerr

Co-Orientadora: Dra. Ana Maria Bonetti

Co-Orientador: Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho

UBERLÂNDIA - MG
2007

 **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

IDENTIFICAÇÃO DA FLORA MICROBIANA EM COLMÉIAS DE MELIPONINA

Ana Lúcia Santos

Orientador: Dr. Warwick Estevam Kerr

Co-Orientadora: Dra. Ana Maria Bonetti

Co-Orientador: Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Genética)**

UBERLÂNDIA-MG
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S237i Santos, Ana Lúcia, 1981-
Identificação da flora microbiana em colméias de meliponina / Ana Lúcia
Santos. - 2007.

35 f. : il.

Orientador: Warwick Estevam Kerr.

Co-orientadora: Ana Maria Bonetti.

Co-orientador: Paulo Pinto Gontijo Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-grama
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Abelha - Teses. I. Kerr, Warwick Estevam. II. Bonetti, Ana Maria. III.
Gontijo Filho, Paulo Pinto. IV. Universidade Federal de Uberlândia. Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 595.799

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

IDENTIFICAÇÃO DA FLORA MICROBIANA EM COLMÉIAS DE MELIPONINA

Ana Lúcia Santos

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Warwick Estevam Kerr (Orientador)

Examinadores: Ademilson Espencer Egea Soares
Geraldo Moretto

Data da Defesa: 28 / 02 / 2007

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Dedicatória

A Deus, Pai que sempre ampara e conforta em todos os momentos de minha vida

Aos meus pais, Osmar Vieira Santos e Marlúcia Martins Santos, minhas referências de amor, honestidade e dedicação.

Aos meus irmãos, Fábio Henrique Santos e Flávia Cristina Santos, pelo apoio e incentivo.

Ao meu querido Ricardo Amâncio Malagoni, pelo incansável incentivo.

Agradecimentos

Ao Prof Dr. Warwick Estevam Kerr, pela orientação do trabalho.

À Prof.^a Dra. Ana Maria Bonetti, pela co-orientação do trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho, pela co-orientação e disponibilização do Laboratório de Microbiologia.

À Prof.^a Dra. Daise Aparecida Rossi, pela colaboração na identificação de amostras.

Aos técnicos Claudete e Ricardo, pelo auxílio na preparação de materiais e na realização das análises.

Ao amigo Cristiano Menezes pelo auxílio nas coletas.

À Universidade Federal de Uberlândia, CNPq e FaPEMIG, pelo apoio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
I. INTRODUÇÃO	01
I.1. AS ABELHAS	01
I.2. FLORA MICROBIANA NOS PRODUTOS DAS ABELHAS	03
II. OBJETIVO	09
III. MATERIAL E MÉTODOS	10
IV. RESULTADOS	13
V. DISCUSSÃO	27
VI. CONCLUSÕES	30
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Teste da catalase em lâmina	13
Figura 2 – Teste da lecitinase	14
Figura 3 – Teste da motilidade	14
Figura 4 – Teste da redução do nitrato	15
Figura 5 – Teste da produção de indol	15
Figura 6 – Teste de Voges-Proskauer	16
Figura 7 – Teste do citrato	16
Figura 8 – Teste da redução de carboidrato (maltose)	17
Figura 9 – Teste da produção de gás pela oxidação da glicose	17
Figura 10 – Chave para identificação de <i>Bacillus</i> spp.	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil de crescimento e contagem de microrganismos nos materiais coletados em colméias de *M. scutellaris*. 19

Tabela 2 – Perfil de crescimento e contagem de microrganismos nos materiais coletados em colméias de *Trigona* sp. 20

Tabela 3 – Características morfológicas das colônias de microrganismos isolados dos materiais das colméias de *M. scutellaris*. 21

Tabela 4 – Características morfológicas das colônias de microrganismos isolados dos materiais das colméias de *Trigona* sp. 22

Tabela 5 – Frequência de espécies de *Bacillus* isolados dos materiais coletados em colméias de *Melípona scutellaris*. 24

Tabela 6 – Frequência de espécies de *Bacillus* isolados dos materiais coletados em colméias de *Trigona* sp. 25

Tabela 7 – Frequência das espécies de *Bacillus* em cada um dos materiais coletados em colméias de *M.scutellaris* e *Trigona* sp. 26

RESUMO

As abelhas de Meliponina, também conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão, estão presentes em várias regiões tropicais. As abelhas desempenham funções, como: polinização de fanerógamas, produção de mel, cera e própolis e coleta de pólen. Além disso, contribuem para os estudos de Biologia, especialmente na Genética e na Evolução e podem, ainda, ser utilizados como material didático, visto que não possuem ferrão e são um bom exemplo de organização social (KERR, 1997)

Dentre todas essas funções, a produção de mel e a utilização de mel, pólen e própolis como produtos medicinais são as que exercem maior interesse na população em geral. É necessário que os produtos tenham uma boa qualidade, como, por exemplo, apresentar uma contagem de microrganismos que não represente um risco à saúde humana.

Nesse trabalho, foi avaliada a quantidade e identificados os microrganismos presentes em mel, própolis pólen, alimento larval e cera em colméias de *Melipona scutellaris* e *Tetragona clavipes*.

PALAVRAS-CHAVE: Microrganismos, Colméias, Meliponina

ABSTRACT

The bees of Meliponina, also known as Indian's bees without sting, are in various tropical regions. They execute functions, like: polinization of fanerogams, production of honey, wax and propolis and the collection of pollen. Moreover, they contribute for the Biology's applications, especially in Genetic and Evolution and they also can be utilized as didactic material, because they don't have sting and they are a good example of social organization.

Among all these functions, the production of honey and the utilization of honey, pollen and propolis as medicinal products are the most interesting for the population. It's necessary that the products have good quality. As, for example, present a count of microorganisms that it don't represent a risk for human healthy.

In this work, we evaluated the quantity and the identification of microorganisms present in honey, propolis, pollen, larval food and wax in hives of *Melipona scutellaris* and *Tetragona clavipes*.

KEY-WORDS: Microorganisms; Hives; Meliponina

I. INTRODUÇÃO

I.1. AS ABELHAS

Taxonomicamente, as abelhas podem ser reunidas na superfamília Apoidea distribuídas em, aproximadamente, 20.000 espécies, representando 20% dos Hymenoptera. As espécies apresentam características comuns, tais como tamanho e coloração dos indivíduos diferenciados e corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen (prosoma, mesosoma e metasoma) (NETO, 2001).

A superfamília Apoidea é constituída por diversas famílias, sendo que a que tem hábitos mais avançados é a família Apidae. Engloba todas as abelhas altamente sociais como as abelhas com ferrão *Apis*, as abelhas sem ferrão, as mamangavas e as Euglossini.

A família Apidae é dividida em subfamílias, sendo que as abelhas desse estudo pertencem à subfamília Apinae. As tribos dessa subfamília são diferentes em várias características morfológicas, fisiológicas e comportamentais.

Meliponina reúne as chamadas abelhas indígenas sem ferrão, entre elas a jataí, a mandaçaia e a irapuá. Possui várias centenas de espécies em todas as regiões tropicais do mundo, bem como em regiões subtropicais do hemisfério sul. São abelhas de porte minúsculo a médio, em geral robustas (SILVEIRA *et al.*, 2002).

O gênero *Melipona* é o que possui maior número de espécies, e ocorre em toda a região neotropical, sendo mais diversificada na bacia amazônica. O gênero *Tetragona* é praticamente restrito à bacia amazônica, embora contenha uma espécie, *T. clavipes*, com ampla distribuição no Brasil (SILVEIRA, 2002).

Todas as espécies de Meliponinae são eussociais, com interações sociais muito complexas e um sistema cooperativo em que a divisão de trabalho e as castas são bem definidas.

Os ninhos estão localizados em cavidades e consistem em agrupamento de favos horizontais e potes elipsoidais, para armazenamento de mel e pólen e a maioria das colônias tem abertura suficiente para passar uma única abelha (ROUBICK, 1989).

Os meliponíneos se caracterizam, também, por não construírem células reais. As rainhas, operárias e machos se desenvolvem, até o estágio adulto, dentro de células de cria de igual tamanho.

A alimentação é massal, onde cada alvéolo recebe o alimento antes da oviposição pela rainha, sendo fechado logo após e aberto somente para a emergência do adulto. O alimento é constituído de pólen, mel e enzimas de origem glandular e na parte inferior do alvéolo deposita-se uma grande quantidade de pólen (MACHADO, 1971).

O pólen é constituído, principalmente, por proteínas, açúcares, água, vitaminas, enzimas, lipídeos, leveduras e íons (WEAVER, 1964).

O mel é produzido pelas abelhas a partir do néctar de plantas. Quimicamente, ele contém açúcares (80%), água (10-20%) e outros constituintes como ácidos orgânicos, sais minerais, vitaminas, proteínas, compostos fenólicos e aminoácidos livres (OUCHEMOUKH *et al.*, 2005). Os principais açúcares encontrados no mel são a frutose (cerca de 40%), a glicose (aproximadamente 30%) e a sucrose (cerca de 1%), os quais são responsáveis por propriedades do mel como viscosidade, granulação e valor energético (IURLINA & FRITZ, 2005).

A composição do mel é afetada pela florada, clima e condições ambientais. A diversidade das propriedades físicas e químicas do mel depende do néctar e do pólen da planta de origem (ÖZCAN *et al.*, 2006).

O mel é considerado importante para a medicina tradicional. Ele tem sido usado na etnomedicina desde a antiguidade e, mais recentemente, tem desempenhado importante papel no tratamento de queimaduras, infecções gastrointestinais, asma, ferimentos infeccionados e úlceras na pele (KÜÇÜK *et al.*, 2005).

Além do mel, as abelhas secretam cera que, misturada com resinas de plantas, é utilizada para construção dos potes de armazenamento. As resinas servem como agente biocida e, juntamente com a cera e outros materiais utilizados na construção do ninho, têm a função de protegê-lo da ação da água e de predadores (MICHENER, 1974; ROUBICK, 1989).

O própolis, muitas vezes referido como “cola da abelha”, é uma substância resinosa coletada em árvores pelas abelhas, que mastigam, adicionando enzimas salivares e cera. É altamente adesivo e é usado para preencher as fendas da

colméia, proteger contra a entrada de invasores e, principalmente, para evitar, por meio de mumificação com própolis, a decomposição, dentro da colméia, de organismos mortos, tais como besouros, baratas e, ocasionalmente, ratos (BRUMFITT *et al.*, 1990).

Atualmente, o própolis é bastante estudado devido as suas propriedades biológicas, pois tem atividades antibacterianas, antifúngicas e propriedades cicatrizantes. Os mais importantes constituintes, farmacologicamente ativos no própolis, são flavonóides, compostos fenólicos e aromáticos (UZEL *et al.*, 2005).

Os produtos derivados das abelhas apresentam características antibióticas (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 (WEAVER, 1964; HIGASHI & CASTRO, 1994). O própolis tem sido usado por suas atividades antimicrobianas (DAUGSCH *et al.*, 2006).

As abelhas sociais apresentam, para seu desenvolvimento físico, fisiológico e adaptação química normais, controle de deterioração dos estoques de alimentos, o que é importante principalmente para as espécies perenes, pois dependem do armazenamento de alimentos em ambientes tropicais (ROUBIK, 1989).

1.2. FLORA MICROBIANA NOS PRODUTOS DAS ABELHAS

O mel possui alguns fatores que evitam o crescimento bacteriano, como pH ácido, osmolaridade e peróxido de hidrogênio (MOLAN & RUSSEL, 1988; WESTON *et al.*, 1999). Essas propriedades intrínsecas atuam como bactericidas ou bacteriostáticos, portanto, espera-se que o mel possua um número pequeno e uma variedade limitada de microrganismos. Altas quantidades de formas vegetativas e bactérias no mel indicam contaminação recente, especialmente por fontes secundárias (IURLINA & FRITZ, 2005).

As fontes primárias de contaminação microbiológica em colméias são o pólen, o trato digestivo de abelhas, a poeira e as flores. As fontes secundárias de contaminação em mel são as mesmas de outros alimentos.

Os microrganismos encontrados em colméias e, conseqüentemente, em seus produtos, podem ser divididos em quatro tipos:

- 1 – Microrganismos que são comumente encontrados no mel – leveduras e bactérias formadoras de esporos;
- 2 – Microrganismos que indicam qualidade sanitária ou comercial – coliformes ou leveduras;
- 3 – Microrganismos que, em certas condições de germinação e crescimento em um produto alimentar não tratado pelo calor, podem causar doenças;
- 4 – Microrganismos que podem causar doenças em abelhas como, *Paenibacillus larvae* e *Melissococcus plutonius*, responsáveis, respectivamente, pelas doenças American foulbrood e European foulbrood (LAURO *et al.*, 2003, PICCINI *et al.* 2003).

Os microrganismos encontrados na colméia são, principalmente, bactérias e leveduras, provenientes das abelhas, do néctar ou de fontes externas. As larvas podem ser estéreis inicialmente, mas ao serem alimentadas com néctar e pólen pelas operárias, adquirem a flora das mesmas (SNOWDON & CLIVER, 1996; GILLIAM, 1997).

Existem vários organismos associados com alimentos específicos. Alguns organismos encontrados nas abelhas, nas colméias, no pólen, no solo e nas flores, por exemplo, também são encontrados no mel. Dentre esses microrganismos, estão *Actinobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Micrococcus*, *Sacharomyces* e *Lactobacillus* (JAY, 1992 apud SNOWDON & CLIVER, 1996).

GILLIAM & PREST (1987) isolaram várias espécies de microrganismos em fezes de larvas de abelhas, sendo que o gênero *Bacillus* foi o prevalente seguido por bactérias gram variáveis. Foram encontrados, também, fungos e leveduras.

O pólen pode ser a fonte de origem de microrganismos nos intestinos de abelhas (GILLIAM *et al.* 1983). As abelhas são alimentadas por pólen e por meio de trocas alimentares com outras abelhas, resultando na contaminação.

Bacilos aeróbicos formadores de esporos são os microrganismos mais freqüentemente encontrados na superfície externa, no aparelho bucal e no intestino das abelhas. Os intestinos de larvas, pupas ou abelhas recém-

emergentes são, usualmente, estéreis. Fungos e bactérias são, regularmente, encontrados nos intestinos de operárias adultas poucos dias após emergirem (SNOWDON & CLIVER, 1996). As bactérias do gênero *Bacillus* são encontradas no trato digestivo, hemolinfa e traquéia de abelhas saudáveis, sendo que o pólen pode ser a principal fonte da microflora intestinal em operárias, desde que exista pouco ou nenhum microrganismo no néctar (GILLIAM, 1985).

No intestino de abelhas é encontrado cerca de 1% de leveduras; 29% de bactérias gram positivas, incluindo espécies de *Bacillus*, *Bacterium*, *Streptococcus* e *Clostridium* e 70% de bactérias gram negativas ou gram variáveis, incluindo *Achromobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Proteus* e *Pseudomonas* (TYSSET *et al.*, 1970).

As bactérias introduzidas no mel pelas abelhas são, provavelmente, espécies do gênero *Bacillus* (TYSSET & ROUSSEAU, 1981). O fungo *Aspergillus* pode estar presente no mel, mas somente na forma de esporo, que impediria a produção de micotoxinas, tais como as aflatoxinas. As leveduras podem estar presentes no favo de mel, ar e no néctar (GRAHAM, 1992; MORSE & HOOPER, 1985).

Os fungos estão associados com a flora intestinal de abelhas, com a colméia e com o meio onde as abelhas forrageiam. *Aspergillus* foi descoberto em intestinos de larvas de abelhas (HAISIG & KAMBUROV, 1966). Poucos fungos são identificados com certeza, mas gêneros típicos incluem *Atichia*, *Coniothecium*, *Hormiscium* e *Triposporium*. Outros, como *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Penicillium* e *Peyronelia* têm sido isolados de fezes de larvas (GILLIAM & PREST, 1987). TYSSET *et al.* (1970) encontraram *Ascospaera*, *Aspergillus*, *Cephalosporium* e *Penicillium* no mel.

Alguns fatores podem evitar que outros gêneros de fungos cresçam no mel. Um deles, e talvez o mais importante, é a tolerância à pressão osmótica, visto que a grande quantidade de açúcar diminui bastante a atividade da água. Altas quantidades de fungos no mel podem indicar a recente contaminação pelo fungo, talvez por crescimento no meio de forrageamento das abelhas, nas colméias ou nos equipamentos de processamento do mel.

As leveduras podem crescer em condições ácidas e não são inibidas pela sucrose. Leveduras osmofílicas ou tolerantes ao açúcar são um problema na

indústria de mel, pois elas crescem em nível limitado de água disponível no mel resultando na fermentação do mesmo.

Alguns fatores, como aumento da umidade, temperaturas moderadas, alta contagem de leveduras e presença de nitrogênio, podem colaborar para a fermentação do mel, resultando na formação de álcool e dióxido de carbono. Na presença de oxigênio, o álcool pode ser convertido em ácido acético (CRANE, 1979).

Saccharomyces representa o gênero mais encontrado no mel, sendo encontrados, ainda, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Oosporidium*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Tricosporan*, *Nematospora*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Torula* e *Zygosaccharomyces* (TYSSET & DE RAUTLIN DE LA ROY, 1974; FUTURA & OTIKOMO, 1978, CRANE, 1979; TYSSET & ROUSSEAU, 1981).

A fermentação do mel é proporcional à concentração de leveduras existentes, sendo que mel com grande quantidade de leveduras não é palatável ou comercializável.

Existem poucas referências em relação aos microrganismos encontrados no mel. Os gêneros mais citados são *Bacteridium*, *Bacterium*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Neisseria*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* e os mais frequentemente isolados são espécies do gênero *Bacillus*, particularmente, *B. cereus* e *B. puyilus*. Acredita-se que alguns gêneros, como *Micrococcus* e *Pseudomonas*, são provenientes do intestino das abelhas. Foram encontradas, também, espécies de *Staphylococcus* em mel industrializado nos Estados Unidos. Foi encontrado *Flavobacterium lactis* no mel e acredita-se que esse microrganismo foi introduzido pelo homem via água contaminada (TYSSET *et al.*, 1970).

KOKUBO *et al.* (1984) estudaram a incidência de esporos de *Bacillus* e *Clostridium* no mel provenientes do processamento de plantas e constataram que 94% das amostras tinham esporos facultativos e do gênero *Bacillus*, sendo que a espécie prevalente foi *B. cereus* seguida por *B. coagulans*, *B. megaterium* e *B. alvei*. Além de *Bacillus*, foram encontrados esporos de *Clostridium* em 79% das amostras, sendo 10.71% de *C. perfringes*. Nenhuma amostra estava contaminada com *C. botulinum*.

O gênero *Bacillus*, predominante em diversos estudos, compreende mais de 60 espécies de bacilos gram positivos aeróbicos ou anaeróbicos facultativos que produzem endósporo (KONNEMAN, 1997). Esses microrganismos são usados para produzir e secretar enzimas antibióticas e ácidos graxos, desempenhando, dessa forma, a conversão metabólica e o controle na competição, a fim de evitar a deterioração dos alimentos (RAMOS, 1998).

MACHADO (1971) analisou alvéolos e verificou que havia bactérias que pareciam ser *Bacillus*, semelhantes ao *B. subtilis* usado para comparação. As bactérias foram encontradas com alta frequência em todo o alimento da colméia, exceto no mel guardado no pote de depósito, onde poucas células bacterianas foram observadas.

RAMOS (1998) estudou a flora microbiana em colméias de *M. scutellaris* e foram isolados bastonetes e cocos gram positivos, com características de *Bacillus* e *Micrococaceae*, respectivamente, com predominância de *B. laterosporus* (35,38%) e *B. firmus* (12,30%). Essa autora identificou, ainda, outras 10 espécies desse gênero no mel, própolis e alimento dos alvéolos dessa abelha.

A maioria das pesquisas sobre fontes primárias de microrganismos no mel é feita para entender a ecologia microbiana da abelha. Apesar de não serem idênticas, há uma semelhança considerável entre os microrganismos que estão nas abelhas e aqueles que têm sido encontrados no mel, sugerindo que alguns microrganismos introduzidos no mel pelas abelhas não sobrevivem no mel e que alguns microrganismos não associados ao intestino das abelhas são introduzidos no mel. *Bacillus*, *Clostridium* e *Micrococcus* são comuns no ar, na poeira e no mel, sugerindo que o ar e a poeira também são fontes primárias de contaminação do mel. O solo e as flores devem ser fontes de leveduras no mel (SNOWDON & CLIVER, 1996).

As fontes secundárias de contaminação incluem os humanos, equipamentos, recipientes, vento, poeira, insetos, animais e água. Chão, paredes e teto podem também ser reservatórios de microrganismos que entram no mel, como em outros alimentos.

As possíveis rotas de transmissão de microrganismos para dentro do mel incluem o ar (durante o empacotamento), manipulação (de infecções da pele,

espirros ou contaminação fecal), contaminação cruzada (de animais ou produtos animais) e equipamentos (incluindo resíduos de alimentos e água).

Essas fontes secundárias de contaminação são controladas por práticas sanitárias padronizadas e boas práticas no processamento (SNOWDON & CLIVER, 1996).

OBJETIVO

Avaliar quantitativa e qualitativamente os microrganismos presentes no mel, própolis, pólen, cera e alimento larval de *Melipona scutellaris* e *Tetragona clavipes* e indicar os que são patogênicos ao homem e às abelhas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Material Biológico

O material biológico utilizado no estudo constituiu-se de abelhas *Melípona scutellaris* e *Tetragona clavipes*, provenientes do Meliponário Uberlândia, Uberlândia – MG, Brasil (S 18° 55' / W 48° 17'). Foram coletadas e analisadas amostras de mel, própolis, pólen, alimento larval e cera de 4 colônias de *M. scutellaris* e 3 de *T. clavipes*. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética do Instituto de Genética e Bioquímica e no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, ambos da Universidade Federal de Uberlândia.

1.2. Mel

Foi coletado, com o auxílio de uma seringa esterilizada, 1g de mel e, a partir dessa amostra, preparou-se uma solução a 10% em água destilada esterilizada.

1.3. Pólen

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

1.4. Alimento larval

As amostras foram coletadas em alvéolos aleatórios, sendo retirado 1g de cada um e misturando-os em um pool. A partir dessa amostra, foi preparada uma solução a 10% em água esterilizada.

1.5. Cera

Um grama de cera de dentro das colméias foi colocado em 10 mL de água esterilizada, agitada em vórtex e essa água foi utilizada para a fase experimental.

1.5. Própolis

Foi raspado 1g de própolis da tampa das colméias, triturado em 0,25 mL de solução concentrada de Tween-80 e a partir dessa, foi preparada uma solução a 10% em água destilada esterilizada.

2. MÉTODOS

2.1. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

A partir de 1mL das soluções de alimento larval, pólen, mel, própolis e cera, foram preparadas diluições decimais (10^{-1} e 10^{-2}), utilizando-se água esterilizada. Foi inoculado 0,1mL de cada uma dessas diluições em placas de Petri preparadas com Ágar Trypticase Soja (TSA), Ágar Manitol Salgado, Agar MacConkey e Ágar Sabouraud enriquecido com Cloranfenicol ($16 \mu\text{g/mL}$) e Gentamicina ($32 \mu\text{g/mL}$). Com o auxílio de uma alça de Drigalski, as amostras foram espalhadas por toda a superfície do meio. As placas contendo Ágar Manitol Salgado, Ágar MacConkey e Ágar TSA foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. As placas contendo Ágar Sabouraud foram incubadas em temperatura ambiente por 5 dias.

Após a incubação, as colônias de bactérias foram contadas e expressas em ufc/mL (unidade formadora de colônia por mL). Foram analisadas as seguintes características: morfologia, pigmentação, borda e dimensão das colônias bem como sua afinidade pela coloração de Gram.

As culturas analisadas foram colocadas em ágar estoque e mantidas em freezer a -20°C até o momento de sua identificação a nível de espécie.

Os fungos foram identificados como filamentosos ou leveduras.

2.2. IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

As amostras mantidas a -20°C foram descongeladas e cultivadas em tubos de ensaio contendo 1mL de Caldo Trypticase Soja (TSB), incubados em estufa a 35°C por 24 horas.

Para a identificação de microrganismos foram realizados os testes bioquímicos: Catalase, Lecitinase , Motilidade, Redução de Nitrato, Produção de Indol, Voges-Proskauer (pesquisa de Acetoína), Citrato, Hidrólise do Amido, Hidrólise da Gelatina, Fermentação da Maltose, Fermentação da Glicose (produção de gás) e Hemólise em Ágar Sangue.

RESULTADOS

Os resultados dos testes microbiológicos realizados para identificação dos microrganismos presentes nos produtos contidos em colméias de abelhas sem ferrão *Melípona scutellaris* e *Tetragona clavipes* são apresentados nas Figuras 1 a 9, a seguir.



Figura 1 – Resultado do Teste da Catalase em lâmina. As bolhas indicam a produção de oxigênio pelas bactérias a partir da quebra do peróxido de oxigênio pela catalase.

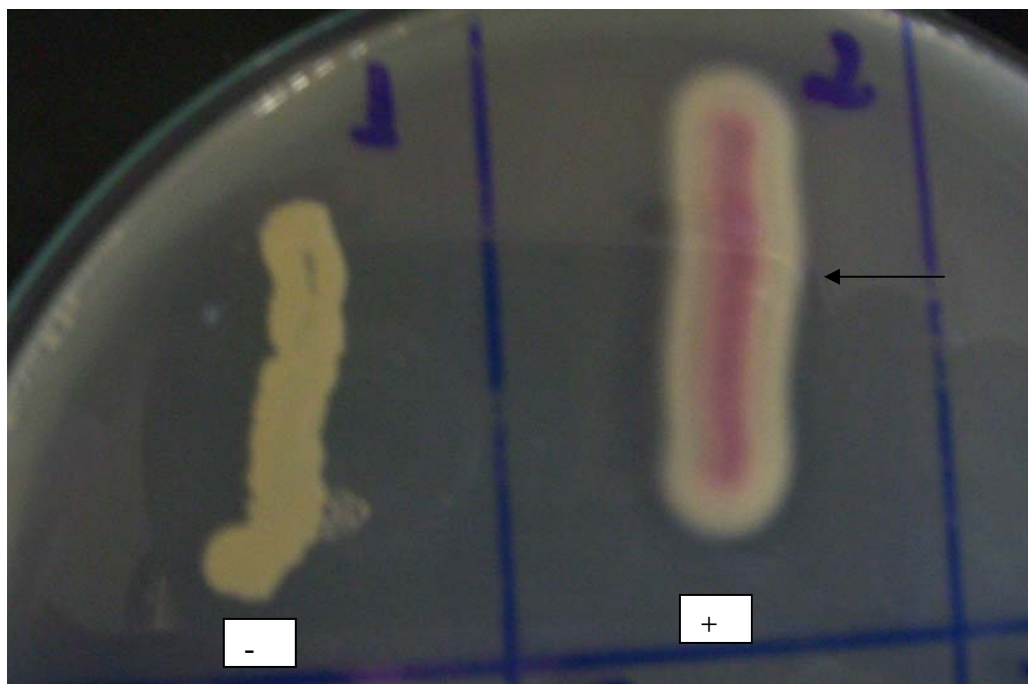


Figura 2 – Resultado do Teste da Lecitinase. O aro (seta) ao redor do esfregaço (vermelho) indica que a bactéria hidrolisa a lecitina da gema do ovo pela ação da enzima lecitinase.

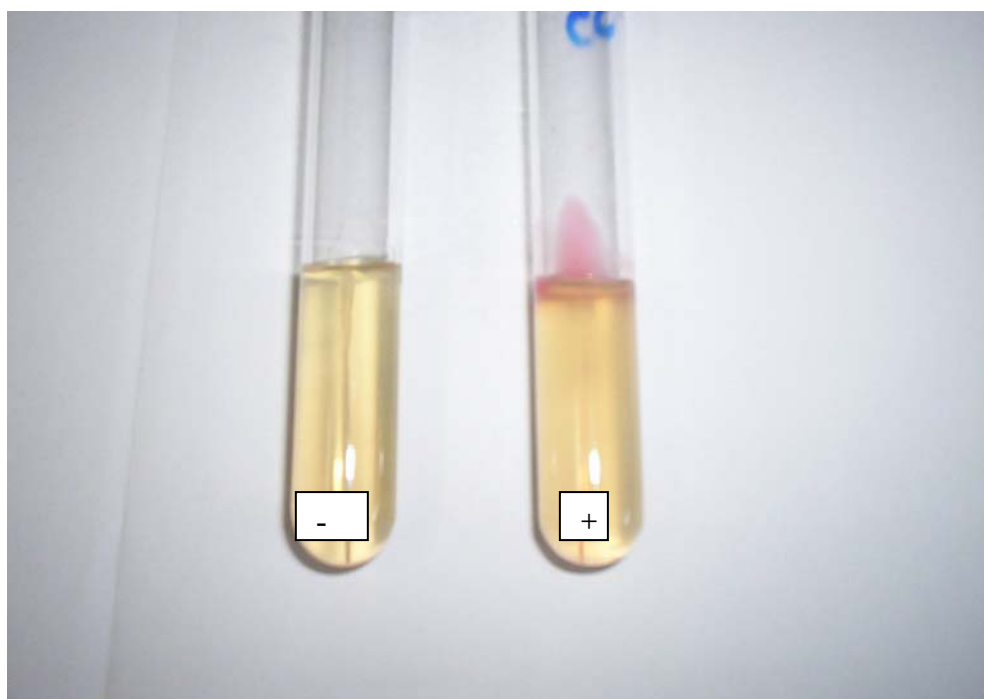


Figura 3 – Resultado do Teste da Motilidade. A bactéria difunde-se pelo meio e torna-o turvo, indicando sua motilidade.

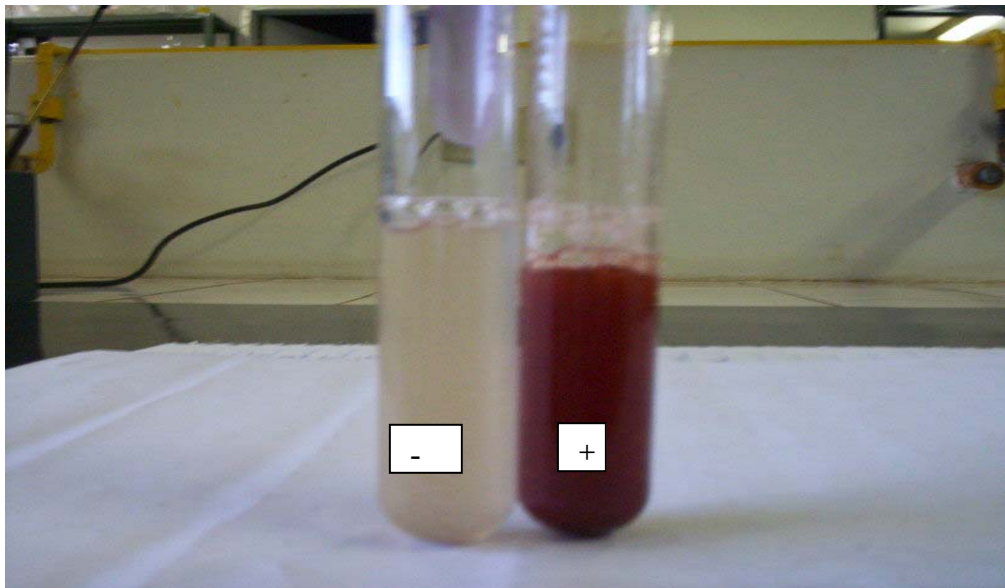


Figura 4 – Resultado do Teste da Redução de Nitrato. A cor vermelha indica que houve redução de nitrato a nitrito pela bactéria.

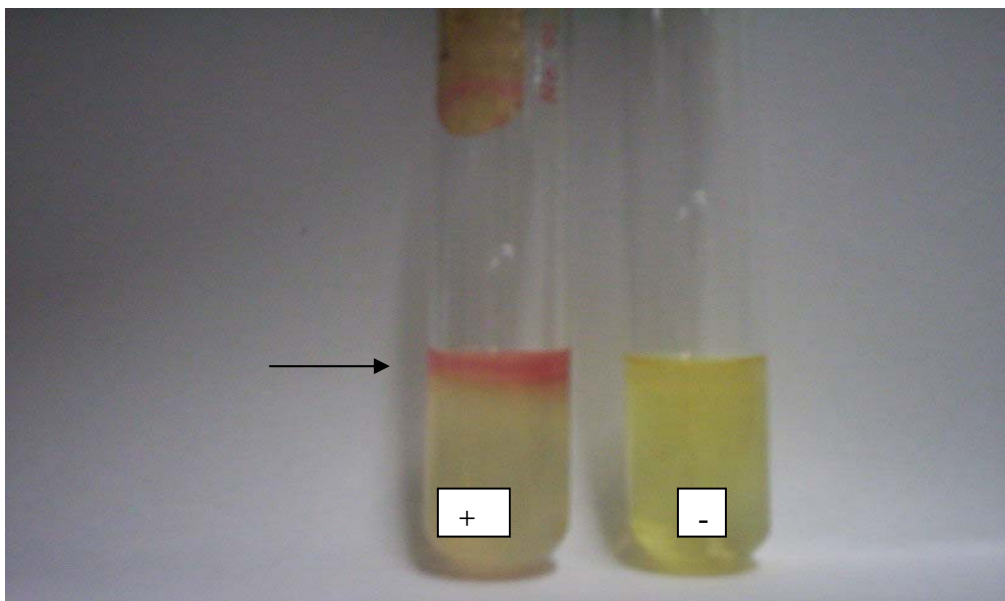


Figura 5 – Resultado do Teste da Produção de Indol. A cor vermelha (seta) indica que a bactéria produz indol.

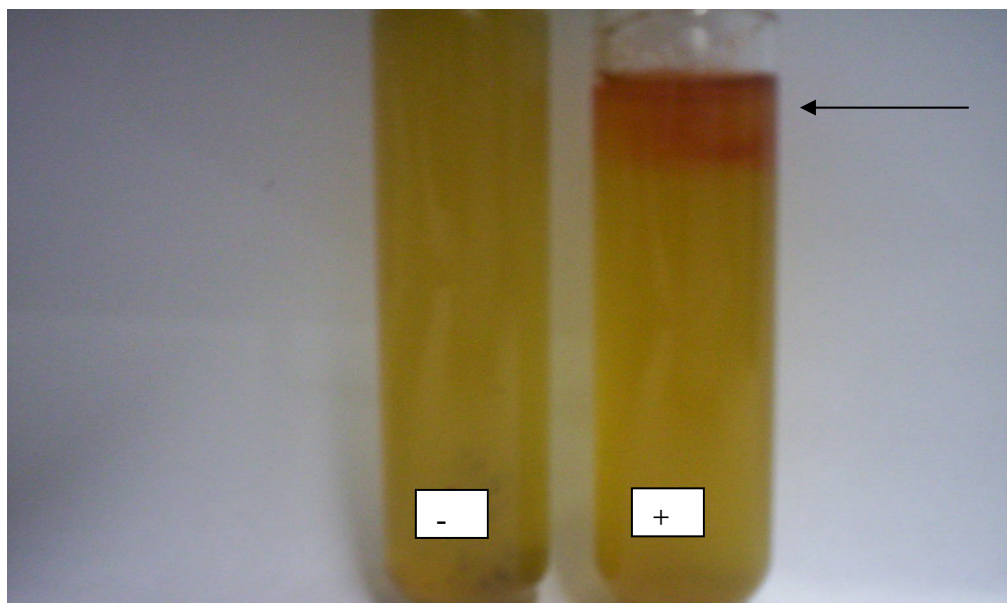


Figura 6 – Resultado do Teste de Voges Proskauer. A cor vermelha (seta) indica a produção de acetoina pelas bactérias.

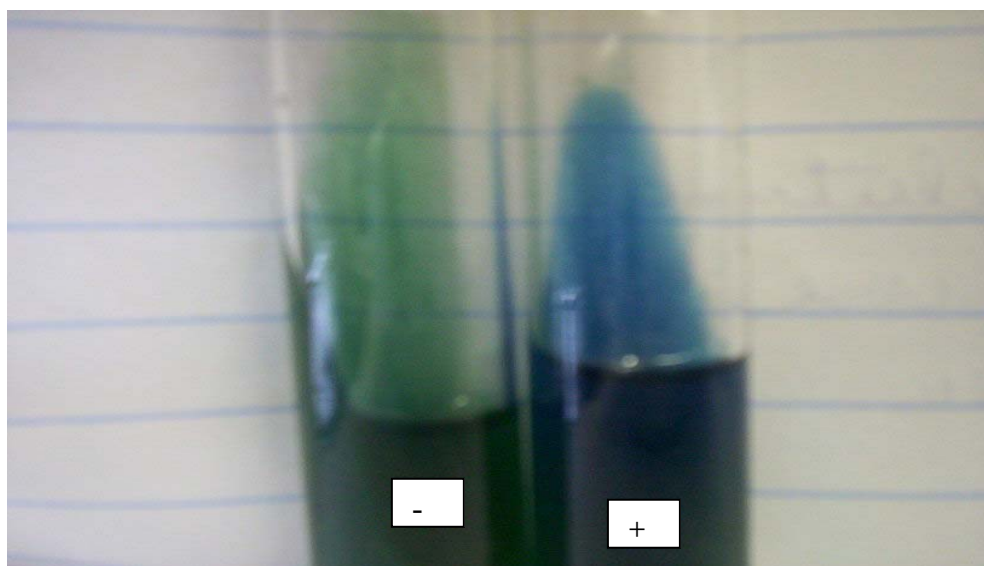


Figura 7 – Resultado do Teste do Citrato. A variação de cor em + indica que a bactéria utiliza o citrato como fonte de carbono. O metabolismo do citrato é observado pela variação de cor.

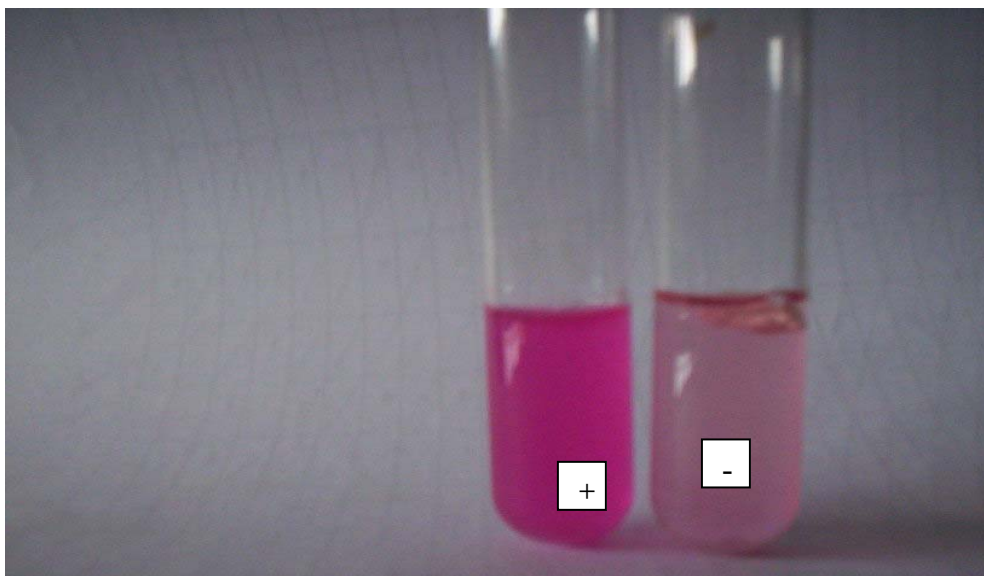


Figura 8 – Resultado do Teste da Oxidação de Carboidrato (Maltose). A oxidação da maltose pela bactéria resulta em coloração específica.

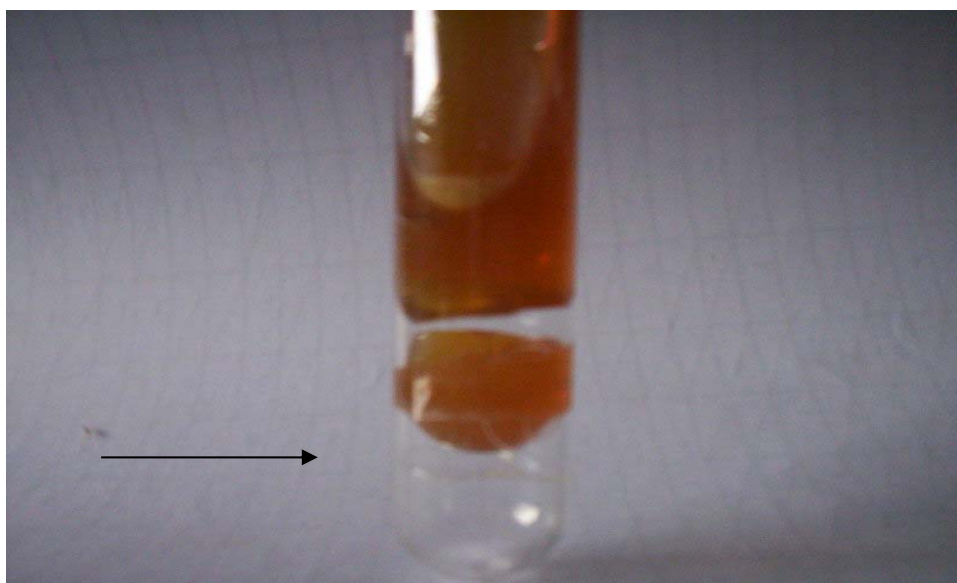


Figura 9 – Resultado do Teste da Produção de Gás pela Oxidação da Glicose. A bactéria oxidou a glicose, com produção de gás (seta).

De um total de 92 (noventa e duas) amostras, observou-se crescimento bacteriano em 60 (sessenta), sendo 38 (trinta e oito) em amostras provenientes de *Melípona scutellaris* e 22 (vinte e duas) provenientes de *Tetragona clavipes*. Das 60 amostras, 15 (25%) apresentaram crescimento em meio Manitol Salgado, 05 (8,33%) em meio Mac Conkey e 40 (66,67%) em meio TSA. Além do crescimento bacteriano, observou-se crescimento de fungos, em placas de ágar Sabouraud com cloranfenicol 16 µg/mL e gentamicina 32 µg/mL. Foram positivas 06 amostras, sendo 04 provenientes de própolis de *M. scutellaris*, 01 de mel de *M. scutellaris* e 01 de própolis de *T. clavipes*. Verificou-se crescimento de leveduras em uma placa oriunda de própolis de *M. scutellaris*.

O própolis foi o produto que apresentou maior quantidade de microrganismos nas duas espécies, com contagens variando de 1×10^3 a 4×10^5 ufc/mL em *M. scutellaris* e de 1×10^3 a 9×10^4 ufc/mL em *T. clavipes* (Tabelas 1 e 2).

As Tabelas 3 e 4 mostram os aspectos morfológicos de cada colônia em relação à pigmentação, forma, bordas, tamanho e aparência da superfície.

As colônias foram submetidas à coloração de Gram e todas elas apresentaram bacilos gram positivos. Os testes para a identificação das espécies de bacilos, realizados de acordo com a chave de identificação proposta por KONNEMAN *et al.*, (1997) são apresentados na Figura 10. A identificação das espécies mostrou que, em amostras de *M. scutellaris*, a espécie predominante foi *Bacillus cereus*, enquanto que em *T. clavipes* foi *Bacillus mycoides* (Tabelas 5 e 6)

O produto da colméia mais contaminado por microrganismos foi o própolis tanto em *M. scutellaris* (68,42%) como em *T. clavipes* (54,55%) conforme mostra a Tabela 7.

Tabela 1 - Perfil de crescimento e contagem de microrganismos nos produtos coletados em colméias de *M. scutellaris*

Nº DA AMOSTRA	PRODUTO	CONTAGEM (ufc/mL)
01	Própolis	5×10^4
02	Própolis	$2,5 \times 10^3$
03	Própolis	$1,8 \times 10^3$
04	Própolis	3×10^3
05	Pólen	1×10^3
06	Própolis	3×10^4
07	Mel	1×10^3
08	Própolis	4×10^4
09	Própolis	$1,6 \times 10^5$
10	Mel	1×10^3
11	Cera	1×10^3
12	Própolis	3×10^3
13	Própolis	2×10^5
14	Própolis	2×10^4
15	Pólen	$3,4 \times 10^4$
16	Pólen	$2,8 \times 10^4$
17	Pólen	$3,2 \times 10^3$
18	Própolis	$3,7 \times 10^4$
19	Própolis	9×10^4
20	Própolis	4×10^5
21	Mel	4×10^3
22	Cera	1×10^4
23	Própolis	$1,3 \times 10^5$
24	Própolis	$1,8 \times 10^5$
25	Própolis	$3,4 \times 10^4$
26	Cera	3×10^4
27	Alimento larval	1×10^3
28	Própolis	8×10^4
29	Própolis	$1,4 \times 10^4$
30	Própolis	1×10^4
31	Própolis	$3,4 \times 10^3$
32	Própolis	$3,4 \times 10^3$
33	Própolis	$1,3 \times 10^4$
34	Própolis	1×10^4
35	Própolis	2×10^4
36	Mel	$1,9 \times 10^4$
37	Própolis	3×10^4
38	Própolis	8×10^4

Tabela 2 - Perfil de crescimento e contagem de microrganismos nos produtos coletados em colméias de *T. clavipes*.

Nº DA AMOSTRA	PRODUTO	CONTAGEM (ufc/mL)
01	Própolis	5×10^3
02	Mel	1×10^3
03	Própolis	$1,1 \times 10^4$
04	Pólen	$1,2 \times 10^4$
05	Própolis	$7,2 \times 10^4$
06	Cera	1×10^3
07	Própolis	9×10^4
08	Própolis	2×10^4
09	Própolis	5×10^4
10	Pólen	5×10^4
11	Própolis	$2,9 \times 10^4$
12	Cera	1×10^3
13	Pólen	$1,7 \times 10^4$
14	Própolis	$2,8 \times 10^3$
15	Própolis	$1,2 \times 10^4$
16	Mel	1×10^3
17	Cera	4×10^4
18	Própolis	2×10^4
19	Própolis	3×10^3
20	Própolis	1×10^3
21	Cera	$2,4 \times 10^3$
22	Cera	$1,5 \times 10^3$

Tabela 3 – Características morfológicas das colônias de microrganismos isolados dos produtos das colméias de *M. scutellaris*.

Nº. DA AMOSTRA	PRODUTO	COR DA COLÔNIA	MORFOLOGIA DA COLÔNIA
01	Própolis	Creme	Redondas, bordas regulares, pequenas
02	Própolis	Creme	Redondas, bordas regulares, pequenas
03	Própolis	Creme	Redondas, bordas regulares, pequenas
04	Própolis	Creme	Redondas, bordas regulares, pequenas
05	Pólen	Branca	Redondas, bordas regulares, pequenas
06	Própolis	Creme	Pequenas, bordas regulares, mucosas
07	Mel	Creme	Redondas, bordas regulares, mucosas
08	Própolis	Creme	Redondas, bordas regulares, mucosas
09	Própolis	Creme	Redondas, bordas regulares, mucosas
10	Mel	Creme	Redondas, bordas regulares, mucosas
11	Cera	Rosa	Pequenas, redondas, bordas regulares
12	Própolis	Rosa	Pequenas, redondas, bordas regulares
13	Própolis	Branca	Grandes, mucosas, bordas irregulares
14	Própolis	Branca	Grandes, mucosas, bordas regulares
15	Pólen	Branca	Grandes, mucosas, bordas irregulares
16	Pólen	Branca	Grandes, mucosas, bordas irregulares
17	Pólen	Branca	Grandes, mucosas, bordas irregulares
18	Própolis	Branca	Grandes, mucosas, bordas irregulares
19	Própolis	Branca	Grandes, mucosas, bordas regulares
20	Própolis	Branca	Grandes, mucosas, bordas regulares
21	Mel	Branca	Grandes, mucosas, bordas irregulares
22	Cera	Branca	Pequenas, redondas, mucosas
23	Própolis	Branca	Redondas, mucosas, bordas regulares
24	Própolis	Creme	Redondas, pequenas, bordas irregulares
25	Própolis	Branca	Grandes, mucosas, bordas irregulares
26	Cera	Branca	Grandes, mucosas, bordas irregulares
27	Alimento larval	Branca	Grandes, mucosas, bordas irregulares
28	Própolis	Branca	Pequenas, redondas, bordas irregulares
29	Própolis	Branca	Pequenas, redondas, bordas irregulares
30	Própolis	Branca	Pequenas, redondas, bordas irregulares
31	Própolis	Branca	Pequenas, redondas, bordas irregulares
32	Própolis	Branca	Pequenas, redondas, bordas irregulares
33	Própolis	Branca	Pequenas, redondas, bordas irregulares
34	Própolis	Branca	Pequenas, redondas, bordas irregulares
35	Própolis	Branca	Pequenas, redondas, bordas regulares
36	Mel	Branca	Grandes, redondas, bordas regulares
37	Própolis	Branca	Pequenas, bordas irregulares, redondas
38	Própolis	Branca	Pequenas, bordas irregulares, redondas

Tabela 4 – Características morfológicas das colônias de microrganismos isolados dos produtos das colméias de *T. clavipes*.

Nº. DA AMOSTRA	PRODUTO	COR DA COLÔNIA	MORFOLOGIA DA COLÔNIA
01	Própolis	Creme	Redondas, bordas regulares, pequenas
02	Mel	Branca	Redondas, bordas regulares, pequenas
03	Própolis	Creme	Redondas, bordas regulares, pequenas
04	Pólen	Branca	Redondas, bordas regulares, pequenas
05	Própolis	Creme	Mucosas, bordas regulares, pequenas
06	Cera	Rosa	Redondas, bordas regulares, pequenas
07	Própolis	Branca	Redondas, bordas irregulares, grandes
08	Própolis	Branca	Redondas, bordas irregulares, grandes
09	Própolis	Branca	Redondas, bordas irregulares, grandes
10	Pólen	Branca	Mucosas, bordas regulares, pequenas
11	Própolis	Creme	Redondas, bordas regulares, pequenas
12	Cera	Branca	Redondas, bordas regulares, pequenas
13	Pólen	Creme	Redondas, bordas irregulares, grandes
14	Própolis	Branca	Redondas, grandes, bordas irregulares
15	Própolis	Branca	Redondas, grandes, bordas irregulares
16	Mel	Branca	Redondas, grandes, bordas irregulares
17	Cera	Branca	Redondas, pequenas, bordas irregulares
18	Própolis	Creme	Redondas, grandes, bordas irregulares
19	Própolis	Branca	Redondas, grandes, bordas irregulares
20	Própolis	Branca	Redondas, grandes, bordas irregulares
21	Cera	Creme	Redondas, pequenas, bordas irregulares
22	Cera	Branca	Redondas, grandes, bordas irregulares

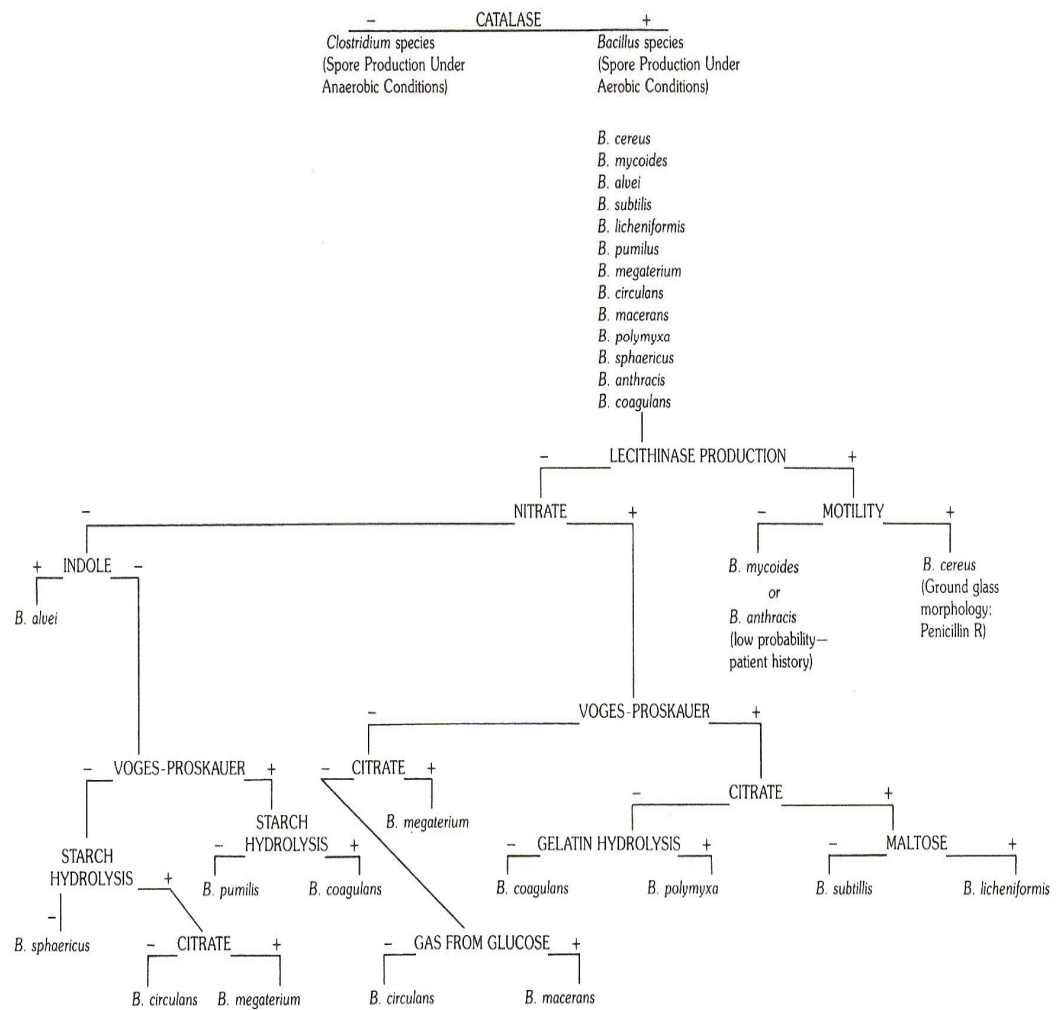


Figura 10 – Chave para identificação de *Bacillus* spp. (Fonte: KONEMAN *et al.*, 1997).

Tabela 5 – Frequência de espécies de *Bacillus* isolados dos produtos coletados em colméias de *M. scutellaris*

Espécies	N (nº. de indivíduos)	%
<i>B. cereus</i>	10	26,32
<i>B. megaterium</i>	08	21,05
<i>B. mycoides</i>	07	18,42
<i>B. anthracis</i>	04	10,53
<i>B. coagulans</i>	02	5,26
<i>B. licheniformis</i>	02	5,26
<i>B. macerans</i>	02	5,26
<i>B. subtilis</i>	02	5,26
<i>B. circulans</i>	01	2,64
TOTAL	38	100,00

Tabela 6 – Frequência de espécies de *Bacillus* isolados dos produtos coletados em colméias de *T. clavipes*.

Espécies	N (nº. de indivíduos)	%
<i>B. mycoides</i>	08	36,36
<i>B. sphaericus</i>	05	22,73
<i>B. cereus</i>	04	18,18
<i>B. megaterium</i>	02	9,09
<i>B. subtilis</i>	02	9,09
<i>B. anthracis</i>	01	4,55
TOTAL	22	100,00

Tabela 7 – Frequência das espécies de *Bacillus* em cada um dos produtos coletados em colméias de *M.scutellaris* e *T. clavipes*.

Espécie de <i>Bacillus</i>	<i>M. scutellaris</i>					<i>T. clavipes</i>				
	Mel	Própolis	Pólen	Alimento Larval	Cera	Mel	Própolis	Pólen	Alimento Larval	Cera
<i>B. anthracis</i>	01	03	--	--	--	--	01	--	--	--
<i>B. cereus</i>	01	09	--	--	--	--	02	--	--	02
<i>B. circulans</i>	01	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>B. coagulans</i>	--	01	--	--	01	--	--	--	--	--
<i>B. licheniformis</i>	--	02	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>B. macerans</i>	--	01	--	01	--	--	--	--	--	--
<i>B. megaterium</i>	01	05	--	--	02	--	--	--	--	02
<i>B. mycoides</i>	--	03	04	--	--	02	02	02	--	01
<i>B. sphaericus</i>	--	--	--	--	--	--	05	01	--	--
<i>B. subtilis</i>	--	02	--	--	--	--	02	--	--	--
TOTAL	04	26	04	01	03	02	12	03	00	05

DISCUSSÃO

Na investigação de microrganismos presentes em produtos de colméias de abelhas sem ferrão da tribo Meliponini foram identificadas, em relação a bactérias, somente espécies de *Bacillus*. Isso confirma estudos anteriores, sugerindo que as espécies de *Bacillus* exercem um tipo de relação harmônica com as abelhas em geral. MACHADO (1971) sugeriu que as bactérias do gênero *Bacillus* vivam em simbiose com as abelhas da subfamília Apidae. Em *Melipona quadrifasciata*, espécie mais estudada por esse autor, foi verificada a presença de microrganismo no pólen, no tubo digestivo de larvas e adultos e no alimento dos alvéolos.

Diversos estudos demonstraram a presença de microrganismos do gênero *Bacillus* no aparelho digestório de abelhas adultas e larvas, assim como no alimento, no mel e no própolis (VANDERBERG & SHIMANUKI, 1990; LANDIN, 1996, LAURINO E GELLI, 1991). Essas bactérias crescem 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 microrganismos. *Bacillus* são conhecidos, ainda, por secretarem extracelularmente um grande número de enzimas que, depois de algum tempo, produzem antibióticos, a partir dos ácidos graxos (GILLIAM *et al.*, 1984,1985).

Entre os produtos das colméias de *M. scutellaris* e *T. clavipes*, o própolis foi o que apresentou maior número de microrganismos, $1,8 \times 10^5$ e 9×10^4 ufc/mL, respectivamente. Não existem estudos sobre a presença e quantidade de bactérias no própolis, mas essa alta incidência pode ser devido à mistura de barro no própolis, o chamado geoprópolis, que é comum nas colméias das espécies estudadas.

No mel, onde esse gênero de bactérias também já foi identificado por outros autores, observou-se maior incidência de *Bacillus* em *M. scutellaris*, com presença de 4×10^4 ufc/mL, do que em *T. clavipes*, que apresentou 1×10^3 ufc/mL. Em análise de 270 amostras de mel no Japão, houve uma contagem de cerca de 83 ufc/g de bactérias aeróbicas viáveis (NAKANO & SAKAGUCHI, 1991). Na França, TYSSET & ROUSSEAU (1981) encontraram, em média, 227

ufc/g de bactérias viáveis, com contagens variando de 3 a 9500 ufc/g. Valores menores de bactérias aeróbicas foram reportados por PIANA *et al.* (1991), que encontraram números variando de 1 a 55 ufc/g. RAMOS (1998) estudou a flora microbiana em colméias de *M. scutellaris* e isolou *Bacillus*, com contagens de $5,3 \times 10^6$, $3,5 \times 10^4$, $1,1 \times 10^3$ e 6×10^2 ufc/mL em própolis, mel, pólen e alimento larval, respectivamente. De acordo com IURLINA & FRITZ (2005), essa variação existente na contagem de bactérias em mel deve-se ao tipo de amostra, ao frescor do mel, ao tempo entra a coleta e a análise das amostras e ao tipo de técnicas analíticas utilizadas.

IURLINA & FRITZ (2005) identificaram os microrganismos de amostras de mel provenientes da Argentina e verificaram que 23% das amostras tinham espécies de *Bacillus*, sendo 26% *B. cereus*, 13% *B. pumilus* e 26% *B. laterosporus*. No presente estudo, *B. cereus* também foi predominante em colméias de *M. scutellaris*, representando um total de 26,32%, enquanto que em colméias de *T. clavipes*, essa espécie de *Bacillus* representou 18,18% das amostras. Em *T. clavipes*, os *Bacillus* mais presentes foram *B. mycoides* (36,36%) e *B. sphaericus* (22,73%).

B. cereus, que é ubíquo e está presente no solo, vegetação, água e poeira, tem sido isolado de uma grande variedade de alimentos, incluindo vegetais, carnes, cereais, leite pasteurizado e leite em pó. Eles produzem duas toxinas que são responsáveis por doença clínica. A primeira, chamada de toxina emética, causa vômito e lembra uma infecção alimentar estafilocócica, com náusea e vômitos de 1 a 6 horas após a ingestão de alimento. A segunda é uma enterotoxina e é associada com dor abdominal e diarreia aquosa. Clinicamente, essa enterotoxina lembra uma intoxicação alimentar causada por *Clostridium perfringes* (KONEMAN *et al.*, 1997).

Outra espécie identificada nas amostras analisadas e que merece destaque é o *B. anthracis*. Presente em 03 amostras de própolis e em 01 de mel de *M. scutellaris* e em 01 de própolis de *T. clavipes* (Tabela 7), esse microrganismo pode estar associado à doenças ou intoxicações alimentares no homem. RAMOS (1998) isolou 03 amostras com essa espécie, sendo 02 provenientes do pólen e 01 de alimento do alvéolo de *M. scutellaris* e, como as colônias não apresentavam indicativos de acometimento por doenças, sugeriu

que essa bactéria contribuisse para a preservação e transformação metabólica do alimento.

B. anthracis é o agente ativo do antrax, que provoca doença em insetos, mamíferos e herbívoros, com acometimento accidental do homem. Os casos humanos, frequentemente, resultam do contato dos animais portadores, doentes ou que morreram da doença, sendo que também pode ser transmitido pela carne. Tem sido encontrada como uma doença ocupacional de veterinários, agricultores e outras pessoas que manipulam animais e seus produtos (WILLIAM, 1986).

O microrganismo possui três ciclos bem-definidos: multiplicação dos esporos no solo, infecção em animal e infecção em humanos. Solo com pH maior que 6.0, solos ricos em matéria orgânica e mudanças no micro ambiente do solo após períodos de chuvas e de seca favorecem a multiplicação dos esporos, que podem permanecer infecciosos por décadas (KONEMAN *et al.*, 1997).

Cerca de 95% dos casos de *B. anthracis* em humanos são infecções cutâneas, começando de 1 a 5 dias após o contato com materiais infectados. Essas lesões se agravam e desenvolvem vesículas hemorrágicas, que se rompem e podem espalhar os bacilos pelo sistema linfático. Em alguns casos, pode ocorrer septicemia (KONEMAN *et al.*, 1997).

Outras espécies de *Bacillus* isoladas nos produtos das colméias, no presente estudo, foram *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. mucoides*, *B. macerans*, *B. coagulans*, *B. sphaericus*, e *B. licheniformis*, os quais possuem potencial para causar infecções oportunistas.

Os resultados desse estudo mostraram a presença de bactérias *B. cereus* e *B. anthracis*, potencialmente patogênicas para o homem, em produtos da colméia, particularmente no mel e no própolis, que são recomendados com finalidades antisséptica, antimicrobiana e cicatrizante. As espécies encontradas nos produtos das colméias podem ser responsáveis pela produção de substâncias que conferem propriedades conservantes e protetoras aos produtos apícolas, por competirem com as toxinas das bactérias patogênicas e anularem seu efeito.

CONCLUSÕES

A análise da flora microbiana presente em produtos das colméias de *Melípona scutellaris* e de *T. clavipes* revelou que:

- Os produtos da colméia de *M. scutellaris* mostraram maior contaminação do que os de *T. clavipes*, principalmente o mel e o própolis, que são os produtos de maior importância para o homem.
- Os produtos das colméias de *M. scutellaris* e *T. clavipes* mais contaminados com microrganismos foram própolis e cera.
- Os microrganismos prevalentes nos produtos das abelhas estudadas foram *B. cereus*, *B. mycoides* e *B. megaterium*.
- As bactérias *B. anthracis* e *B. cereus* isoladas do mel, do própolis e da cera das abelhas são microrganismos com potencial patogênico, podendo acometer o homem e outros mamíferos, além dos próprios insetos.
- As bactérias presentes nas colméias e nos seus produtos parecem estar intimamente relacionadas às abelhas e parecem ser importantes para a vida delas, estando envolvidas em conversões metabólicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUMFITT, J.M., HAMILTON, M, FRANKLIN, I. (1990) Antibiotic activity of natural products: 1 – Propolis. **Microbios** **62**: 19-22.

CORTOPASSI-LAURINO, M., GELLI, D.S. (1991) Pollen analysis, physicochemical properties and antibacterial action of Brazilian honeys from africanized honeybees (*Apis mellifera* L.) and stingless bees. **Apidologie** **22** (1): 61-74.

CRANE, E. (1979) **Honey: a comprehensive survey**. Heinemann, London.

CRUZ-LANDIM, C. (1996) Bacteria present in the intestinal tract of *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Journal of Hymenoptera Research** **5**: 264-272.

DAUGSCH, A., MORAES, C.S., FORT, P., PACHECO, E., LIMA, I.B., ABREU, J.A., PARK, Y.A. (2006) Própolis vermelha e sua origem botânica. **Mensagem Doce** **89**: 2-7.

DIMOV, V., IVANOVSKA, K., BANKOVA, V., POPOV, S. (1992) Immunomodulatory action of propolis: IV prophylactic activity against gram negative infections and adjunct effect of the water soluble derivate. **Vaccine** **10** (12): 817-823.

FUTURA, T., OKIMOTO, Y. (1978) Further investigations on honey yeast. **Agriculture** **18**: 32-38.

GILLIAM, M., MOFFETT, J.O., KAUFFELD, N.M. (1983) Examination of floral nectar of citrus, cotton and Arizona desert plants for microbes. **Apidologie** **14**: 299-302.

GILLIAM, M., BUCHANBB, L., LORENZ, J.B. (1984) Microbial flora of the larval bees, *Centris pallida* and *Anthophora* sp. **Apidologie 15**: 1-10.

GILLIAM, M. (1985) Microbes from apiarian sources: *Bacillus* spp in frass of the greater wax moth. **Journal of Invertebrate Pathology 45**: 218-224.

GILLIAM, M., PREST, D.B. (1987) Microbiology of feces of larval honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Invertebrate Pathology 49**: 70-75.

GILLIAM, M. (1997) Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. **FEMS Microbiology Letters 155**: 10.

GRAHAM, J.M. (1992) **The hive and the honey bee**. Dadant and Sons, Hamilton, Illinois.

HAISIG, M., KAMBUROV, G. (1996) Yeast from the larvae of healthy honey bee colonies. **Veterinary Archives 36**: 66-69.

HIGASHI, K.O., CASTRO, S.L. (1994) Propolis extracts are effetic against *Trypanossoma cruzi* and have an impact on its interation with host cells. **Journal of Ethnopharmacological 43 2**: 149-155.

IURLINA, M.O., FRITZ, R. (2005) Characterization of microorganismos in Argentinean honeys from different sources. **International Journal of Food Microbiology 105**: 297-304.

KALOUSEK, J., KUTACEK, M., BILEK, J., CESKOSLOV, J. (1955) Effects medicinal honey bee. **Farmacology 4 (188)**: 36-42.

KERR, W.E. (1997) A importância da meliponicultura para o país. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento 1(3)**: 42-44.

KOKUBO, Y., JINBO, K., KANEKO, S., MATSUMOTO, M. (1984) Prevalence of spore-forming bacteria in commercial honey. **Journal of Public Health** **35**: 192-196.

KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C., WINN JR, W.C. (1997) **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. Philadelphia, USA, 5 ed., Editora Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1393.

KÜÇÜK, M., KOLAYLI, S., KARAOGLU, S., ULOSOY, E., BALTAÇI, C., CANDAN, F. (2005) Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. **Food Chemistry** **100**: 526-534.

LAURO, F.M., FAVARETTO, M., COVOLO, L. RASSU, M., BERTOLINI, G. (2003) Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. **International Journal of Food Microbiology** **81**: 195-201.

MACHADO, J.O. (1971) Simbiose entre as abelhas sociais brasileiras (Meliponinae, Apidae) e uma espécie de bactéria. **Revista Ciência e Cultura** **23** (5): 625-633.

MICHENER, C.D. (1974) **The social behaviour of the bees: a comparative study**. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press.

MOLAN, P.C., RUSSELL, K.M. (1988) Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. **Journal of Apicultural Research** **27**: 62-67.

MORSE, R., HOOPER, T. (1985) **The illustrated encyclopedia of beekeeping**. Dutton, NY.

NAKANO, H., SAKAGUCHI, G. (1991) An usually heavy contamination of honey products by *Clostridium botulinum* type F and *Bacillus alvei*. **FEMS Microbiology Letters** **79**: 171-178.

NETO, J.T. (2001) **Morfologia comparada de operárias, machos e rainha de abelha Uruçu do Nordeste *Melipona scutellaris* Latreille, 1811**. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 197 p.

OUCHEMOUKH, S., LOUALECHE, H., SCHWEITZER, P. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. **Food Control 18**: 52-58.

ÖZCAN, M., ARSLAN, D., CEYLAN, D.A. (2006) Effect of inverted saccharose on some properties of honey. **Food Chemistry 99**: 24-29.

PIANA, M.L., PODA, G., CESARONI, D., CUETTI, L., BUCCI, M.A., GOTTI, P. (1991) Research on microbial characteristics of honey samples of Udine province. **Journal of Society Italian of Science Alimentary 20**: 293-301.

PICCINI, C., ANTÚNEZ, K., ZUNINO, P. (2004) An Approach to the characterization of the honey bee hive bacterial flora. **Journal of Apicultural Research 43 3**: 101-104.

RAMOS, M.A. (1998) **Estudo da flora microbiana em colméia de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811**. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 79 p.

ROUBICK, D.W. (1989) **Ecology and natural history of tropical bees**. Cambridge University Press, NY,

SILVEIRA, F.A., MELO, G.A.R., ALMEIDA, E.A.B. (2002) **Abelhas brasileiras – sistemática e identificação**. Belo Horizonte-MG, Editora Composição e Arte, 253 pp.

SNOWDON, J.A., CLIVER, D.O. (1996) Microorganisms in honey. **International Journal of Food Microbiology 31**: 1-26.

TYSSET, C., DURAND, C., TALIERGIO, Y.P. (1970) Contribution to the study of the microbial contamination and the hygiene of commercial honey. **Journal of Medicine Veterinary 146:** 1471-1492.

TYSSET, C., DE RAUTLIN DE LA ROY, Y. (1974) Assays on the stdy of osmophilic yeasts, organisms causing fermentations of honey collected in France. **Microbiology and Pharmacology University Nancy Bull 134:** 1-26.

TYSSET, C., ROUSSEAU, M. (1981) Problem of microbes and hygiene of commercial honey. **Journal of Medicine Veterinary 132:** 591-600.

UZEL, A., SORKUN, K., ÖNÇAG, Ö, ÇOGULU, D, GENÇAY, Ö, SALIH, B. (2005) Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research 160:**189-195.

VANDERBERG, J.D., SHIMANUKI, H. (1990) Isolation and characterization of bacileses coagulans associated with half-moon disorder of honey bees. **Apidologie 21:** 233-241.

WEAVER, N. (1964) A pollen substitute for honeybee colonies. **Gleanings in Bee Culture 92 (9):** 550-553.

WESTON, R.J., MITCHELL, K.R., ALLEN, K.L. (1999) Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. **Food Chemistry 64:** 295-301.

WILLIAN, R.P. (1986) *Bacillus anthracis* and other aerobic spore-forming bacilli. **Medical Microbiology and Infectious Diseases:** 220-228.