



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS- UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC



SUZIANE PINTO RODRIGUES

MICROBIOTA ASSOCIADA AO INTESTINO DE ABELHA SEM FERRÃO
Scaptotrigona polysticta (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)

Manaus-AM

2022

SUZIANE PINTO RODRIGUES

MICROBIOTA ASSOCIADA AO INTESTINO DE ABELHA SEM FERRÃO

Scaptotrigona polysticta (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)

Dissertação de mestrado apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia do Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas.

Orientador: Carlos Gustavo Nunes da Silva

Coorientadora: Lorena Nacif Marçal

Coorientador: Luiz Antônio de Oliveira

Manaus-AM

2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R696m	Rodrigues, Suziane Pinto Microbiota associada ao intestino de abelha sem ferrão Scaptotrigona polysticta (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) / Suziane Pinto Rodrigues . 2022 124 f.: il. color; 31 cm. Orientador: Carlos Gustavo Nunes da Silva Coorientadora: Lorena Nacif Marçal Coorientador: Luiz Antônio de Oliveira Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas. 1. Bactérias intestinais. 2. Insetos sociais. 3. Simbiontes. 4. Enzimas hidrolíticas. 5. Biotecnologia. I. Silva, Carlos Gustavo Nunes da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título
-------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

SUZIANE PINTO RODRIGUES

MICROBIOTA ASSOCIADA AO INTESTINO DE ABELHA SEM FERRÃO
Scaptotrigona polysticta (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)

Dissertação de mestrado apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia do Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas.

Aprovado em: 30 de janeiro de 2022.

BRANCA EXAMINADORA

Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva - Presidente
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Dra. Sônia Maria da Silva Carvalho – Membro
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Dr. Ítalo Thiago Silveira Rocha Matos - Membro
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

À minha mãe Sônia, que sempre investiu e lutou para minha criação e formação.

Ao Alexsandro pela compreensão, incentivo e apoio incondicional oferecido em todos os aspectos. Muito obrigado pela sua presença em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder a competência de adentrar e concluir essa pós-graduação;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por me conceder auxílio financeiro durante o tempo que dediquei a este trabalho;

Ao Programa Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade de realizar esta pesquisa, trazendo contribuição para a comunidade;

Ao meu orientador Carlos Gustavo Nunes da Silva por acreditar em meu potencial, me incentivar e ter me ajudado nessa jornada. Agradeço por toda a dedicação, pelos valiosos conhecimentos transmitidos, incentivos e pela paciência que teve comigo durante esse período;

À Dra. Lorena Nacif Marçal que aceitou ser minha coorientadora, colaborando para meu crescimento profissional, conduzindo este trabalho com paciência e dedicação, sempre disponível a compartilhar todo o seu vasto conhecimento;

Ao Dr. Luiz Antônio de Oliveira por me abraçar e me acolher no momento que mais precisei, por abrir as portas de seu laboratório, por sempre acreditar no meu potencial, me incentivando e ajudando nessa jornada. Sou grata por toda a sua amizade, dedicação, coorientação, paciência e apoio;

À minha mãe Sônia Maria Carneiro Pinto, por ser minha mãe e pai, por me incentivar a estudar e sempre acreditar em meu potencial, e por ser a minha fã número 1, me aplaudindo em cada vitória. Espero que um dia eu possa retribuir toda a sua atenção e dedicação que me fizeram chegar até aqui;

Às minhas irmãs, Gesiane, Fabiane e Taciane, que mesmo distante sempre me apoiaram, me ensinaram e cuidaram de mim. Em especial, sou grata a Taciane, sempre ser meu exemplo, obrigada por me incentivar e me lembrar que das provas de vestibular. Amo cada uma de vocês;

Ao meu marido Alexandro Lemos, por seu amor, extrema paciência, e por estar comigo em todos os momentos desta caminhada, por nunca me deixar desistir, sempre me incentivar a crescer e, por ouvir minhas reclamações e momentos de surtos;

À Nadionara Costa Menezes, Thaíssa Cunha de Oliveira, Cassiane Minelle de Oliveira e José Carlos Ipuchima da Silva pela ajuda me dada, por ouvirem as vozes da minha cabeça, muitas vezes concordando com elas, por terem ficado até tarde no laboratório me ajudando a concluir meus experimentos, mesmo na pandemia com toque de recolher. Agradeço pela amizade e irmandade, pelos momentos de descontração e fofocas compartilhadas, pelos muitos miojos divididos e intoxicações alimentares adquiridas. Por ouvirem minhas muitas reclamações e por me ajudarem a lavar as muitas vidrarias que sujei nos experimentos.

Ao Centro Acadêmico Multidisciplinar-CAM, na pessoa da Dra. Enedina Nogueira de Assunção, por colaborar na identificação molecular das nossas bactérias, além de ajudar nas dúvidas que encontrei pelo caminho;

Aos Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia - LEBMAM / INPA III e Laboratório de Biologia Molecular – UFAM-ICB 2, por cederem espaço, equipamentos e reagentes;

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma, direto ou indiretamente, contribuíram na execução deste projeto.

Muito obrigada!

“Alguns homens veem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’ Eu sonho como as coisas
que nunca foram e digo ‘Por quê não?’”

Geroge Bernard Shaw

RESUMO

A diversidade e a abundância relativa de comunidades de microrganismos existentes no trato gastrointestinal de abelhas protagonizam complexas e diversas relações simbióticas, importantes para a manutenção das funções imunológicas, além de atuarem na fisiologia intestinal, proteção contra patógenos e processamento de nutrientes. No intestino de abelhas sem ferrão, estão presentes bactérias e leveduras responsáveis por processos fermentativos, onde ocorre inúmeras reações enzimáticas, constituindo um potencial de descobertas de novas enzimas e processos. Este trabalho teve como objetivo é identificar bactérias associadas ao intestino de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta* e verificar quanto a produção de enzimas de interesse industrial. Assim, foram coletadas abelhas sem ferrão *S. polysticta* de três meliponários, 20 indivíduos de abelhas cada, e a descrição da microbiota intestinal da abelha *S. polysticta* foi realizada por meio de métodos dependentes de cultivo, onde foram usados cinco meios de cultura, em três diferentes condições: aeróbica, anaeróbica e microaerofílico (5% CO₂), na temperatura de 35 °C, sendo analisadas a cada 24 horas por 72 horas. Foram obtidos um total de 110 bactérias no primeiro isolamento, entretanto apenas 76 bactérias foram purificadas e identificadas. Sendo 27 tipos de bactérias encontradas, onze famílias e três filos bacterinas. Dos 76 isolados, 26 apresentaram produção enzimática, sendo que proteases e amilases foram as enzimas mais produzidas. Dos 26 isolados produtores de enzimas hidrolíticas, 17 bactérias com potencial para produção enzimática, com índice enzimático >2, foram selecionadas para a quantificação de enzimas proteolíticas e amilolíticas. Como resultados, das 17 bactérias selecionadas apenas 7 bactérias tiveram produção enzimática. *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26, apresentou maior produção de α -amilase com $7,677 \pm 0,111$ U/mL, e as cepas *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11, *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26 e *Bacillus* sp. C3M1D2MI 68 obtiveram maiores atividades proteolíticas com $11,700 \pm 0,002$ U/mL, $11,733 \pm 0,004$ U/mL e $12,067 \pm 0,001$ U/mL de proteases, respectivamente, não tendo diferença estatística entre si. Os resultados demonstram que abelha sem ferrão *S. polysticta*, não possuem microbiota padrão ou *core* como descritas para abelhas melíferas e para outras espécies de abelhas. Além disso, foi observado que essas bactérias possuem propriedades de interesse biotecnológico, podendo assim serem uma alternativa viável para produção de enzimas amilolítica e proteolíticas.

Palavras-Chaves: Bactérias intestinais, insetos sociais, simbiontes, enzimas hidrolíticas, enzimas: potencial de produção, biotecnologia.

ABSTRACT

The diversity and relative abundance of communities of microorganisms existing in the gastrointestinal tract of bees play a leading role in complex and diverse symbiotic relationships, important for the maintenance of immune functions, in addition to acting in intestinal physiology, protection against pathogens and nutrient processing. In the intestine of stingless bees, bacteria and yeasts responsible for fermentation processes are present, where numerous enzymatic reactions occur, constituting a potential for discovering new enzymes and processes. This work aimed to identify bacteria associated with the intestine of stingless bees *Scaptotrigona polysticta* and verify the production of enzymes of industrial interest. Thus, stingless bees *S. polysticta* were collected from three meliponaries, 20 bee individuals each, and the description of the intestinal microbiota of the *S. polysticta* bee was carried out using culture-dependent methods, using five culture media, in three different conditions: aerobic, anaerobic and microaerophilic (5% CO₂), at a temperature of 35 °C, being analyzed every 24 hours for 72 hours. A total of 110 bacteria were obtained in the first isolation, however only 76 bacteria were purified and identified. There are 27 types of bacteria found, eleven families and three bacterial phyla. Of the 76 isolates, 26 showed enzyme production, with proteases and amylases being the most produced enzymes. Of the 26 isolates producing hydrolytic enzymes, 17 bacteria with potential for enzyme production, with an enzyme index >2, were selected for the quantification of proteolytic and amylolytic enzymes. As a result, of the 17 bacteria selected, only 7 bacteria had enzyme production. *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26, showed the highest production of α -amylase with $7,677 \pm 0,111$ U/mL, and *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11, *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26 and *Bacillus* sp. C3M1D2MI 68 had higher proteolytic activities with $11,700 \pm 0,002$ U/mL, $11,733 \pm 0,004$ U/mL and $12,067 \pm 0,001$ U/mL of proteases, respectively, with no statistical difference between them. The results demonstrate that stingless bees, *S. polysticta*, do not have a pattern or core microbiota as described for honey bees and other bee species. Furthermore, it was observed that these bacteria have properties of biotechnological interest, thus being a viable alternative for the production of amylolytic and proteolytic enzymes.

Key words: Intestinal bacteria, social insects, symbionts, hydrolytic enzymes, enzymes: production potential, biotechnology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Abelhas sem ferrão nitificando tronco de árvore oca.....	20
Figura 2. Entrado do ninho de abelhas sem ferrão <i>Scaptotrigona polysticta</i>	21
Figura 3. Ninho de abelhas sem ferrão <i>Scaptotrigona polysticta</i>	22
Figura 4. Composição da microbiota em uma típica abelha operária adulta de <i>Apis mellifera</i> e a localização de bactérias nos diferentes compartimentos do intestino.....	26
Figura 5. Fluxo de procedimento para a obtenção, isolamento e identificação de bactérias do intestino de <i>Scaptotrigona polysticta</i>	41
Figura 6. Mapa de localização das três colônias de abelhas sem ferrão <i>Scaptotrigona polysticta</i>	42
Figura 7. Colônia 1: Meliponários da empresa Amazomel Produtos e Serviços Apícolas, rodovia Manuel Urbano, s/n, Iranduba-AM (3°10'56.3"S 60°07'12.7"W).....	43
Figura 8. Colônia 2: Meliponários da empresa Amazomel Produtos e Serviços Apícolas, rua Massaranduba, s/n, Bairro alto, Iranduba-Am (3°16'50.9"S 60°11'47.9"W).	43
Figura 9. Colônia 3: Meliponário Novo Tempo, Ramal do January, s/n, Cacau Pirêra-Am (3°12'12.0"S 60°06'16.2"W).....	43
Figura 10. Dissecção do intestino de abelhas sem ferrão <i>Scaptotrigona polyticta</i>	44
Figura 11. Código de classificação bacteriana.	46
Figura 12. Quantitativo de colônias obtidas frente às condições e meios de cultivo bacteriano.	51
Figura 13. Foto da extração DNA genômico em gel de agarose 0,8%.....	56
Figura 14. Foto da amplificação do gene 16S rRNA por PCR em gel de agarose a 0,8%, mostrando o tamanho do fragmento de 1,000 pb. Controle positivo (C+): <i>E.coli</i> ATCC 25922. (C-): água deionizada. Marcador 1Kb Bioscience (M).	57
Figura 15. Percentual de identificação molecular do gene 16s rRNA por Filo, Família e Gênero.	59
Figura 16. Bactérias encontradas em intestino de abelhas sem ferrão <i>Scaptotrigona polysticta</i>	62
Figura 17. Mapa (heat map) de calor dos 27 filotipos bacterianos mais abundantes - OTUs (Linha) e Colônias de abelhas (coluna).	62
Figura 18. Diagrama de Venn-Euler com o número de filótipos compartilhados entre as três colônias de abelhas estudadas.....	64
Figura 19. Árvore filogenética das bactérias produtoras de pigmento isoladas do Intestino de abelhas sem ferrão <i>Scaptotrigona polysticta</i>	64
Figura 20. Potencial de produção de enzimas hidrolíticas por isolados bacterianos analisados.	85
Figura 21. Teste semiquantitativo de produção de enzimas hidrolíticas pelas bactérias isoladas de intestinos de abelhas sem ferrão: (A) protease = <i>Enterococcus faecalis</i> C2M5D3AE 59; (B) amilase = <i>Bacillus</i> sp. C1M3D2AE 26 (C) lipase = <i>Bacillus</i> sp. C1M2D1MI 11e (D) celulase = <i>Bacillus</i> sp. C3M3D1AE 75.....	87
Figura 22. Esquema da técnica de Miller (1959).....	104
Figura 23. Curvas padrão de calibração com glicose de Miller (1959) em espectrofotômetro a 540 nm.	104
Figura 24. Esquema da técnica de Leighton et al. (1973).	105

LISTA DE TABELAS

Nenhuma entrada de índice de ilustrações foi encontrada.

Tabela 1. Papel da microbiota intestinal de abelhas.	23
Tabela 2. Densidade populacional bacteriana expressa em UFC/g ⁻¹ de amostra intestinal de abelhas sem ferrão <i>Scaptotrigona polysticta</i> em diferentes meios de cultura.	50
Tabela 3. Caracterização Morfológica das colônias bacterianas isoladas de intestino de abelhas sem ferrão <i>Scaptotrigona polysticta</i>	52
Tabela 4. Caracterização bioquímica das colônias bacterianas isoladas.	55
Tabela 5. Identificação molecular dos microrganismos de acordo com identidade de sequências via banco de dados do GenBank por meio da ferramenta BLASTn do <i>National Center for Biotechnology Information</i> (NCBI).	60
Tabela 6. Comparação das famílias bacterianas encontradas no intestino de abelha sem ferrão <i>Scaptotrigona polysticta</i> com estudos da microbiota de abelhas.	67
Tabela 7. Teste semiquantitativo de produção de enzimas hidrolíticas pelas bactérias isoladas de intestinos de abelhas sem ferrão.	89
Tabela 8. Resultado dos ensaios de crescimento celular em meio de cultura líquido Lúria Bertani, usando comparações dos subconjuntos homogêneos.	107
Tabela 9. Resultado da leitura de pH em meio de cultura líquido Lúria Bertani.	108
Tabela 10. Resultado da quantificação amilolítica em meio líquido suplementado com 1% de amido, usando comparações dos subconjuntos homogêneos.	110
Tabela 11. Crescimento celular em meio líquido suplementado com 1% de amido, usando comparações dos subconjuntos homogêneos.	110
Tabela 12. Resultado da leitura de pH do crescimento celular em meio líquido suplementado com 1% de amido pH 7,0.	110
Tabela 13. Resultado da quantificação proteolítica com Azocaseína 1% em meio líquido suplementado com gelatina 1% e leite desnatado 2%, usando comparações dos subconjuntos homogêneos.	111
Tabela 14. Crescimento celular em meio líquido suplementado com gelatina 1% e leite desnatado 2%, usando comparações dos subconjuntos homogêneos.	111
Tabela 15. Resultado da leitura de pH do crescimento celular em meio líquido suplementado com gelatina e leite desnatado, pH 7,0.	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
μM	Micromolar
μmol	Micromol
μL	Microlitro
Abs	Absorbância
ANOVA	Análise de Variância
BHI	Ágar infusão de cérebro-coração
BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool nucleotide</i>
CAM	Centro Acadêmico Multidisciplinar
CO₂	Dióxido de carbono
dc	Diâmetro médio das colônias
dh	Diâmetro médio dos halos de degradação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
dNTPs	Desoxinucleotídeos trifosfato
F	<i>forward</i>
g/L	Grama por Litro
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
I.E	Índice Enzimático
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
Km	Quilômetros
KOH	Hidróxido de potássio
LB	Luria Bertani
LEBMAM	Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia
M	Molar
MgCl	Cloreto de magnésio
mim.	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milimetro

mM	Milimolar
MRS	Ágar De Man, Rogosa e Sharpe
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanômetro
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de Hidrogénio
q.s.p.	Quantidade suficiente para
R	<i>Reverse</i>
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
rpm	Rotação por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
s.	Segundos
SDA	Ágar Sabouraud dextrose
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
sp.	Espécie
spp.	Espécies
TCA	Ácido tricloroacético
TSA + Sangue	Ágar triptona de soja soja +5% de sangue desfibrinado
TSA	Ágar triptona de soja
U/μL	Unidades por microlitros
U/mL	Unidades por mililitros
UA	Unidade de Absorbância
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
US/ US\$	<i>United States Dollar</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Abelhas nativas sem ferrão	19
2.1.1	<i>Scaptotrigona</i>	spp. 21
2.1.1.1 <i>Scaptotrigona polysticta</i>	22
2.2	Relação entre microrganismos e abelhas	23
2.3	Bactérias associadas ao intestino de abelhas	25
2.4	Identificação de microrganismos	27
2.5	Enzimas.....	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo geral.....	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	32
	CAPÍTULO I: Bactérias associada ao intestino de abelha de sem ferrão <i>Scaptotrigona polysticta</i> (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)	38
	RESUMO	38
	ABSTRACT	39
1	INTRODUÇÃO	40
2	MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1	Coleta de Material Biológico	42
2.2	Dissecação dos Intestinos	44
2.3	Cultivo Bacteriológico	45
2.3.1	Preparo de diluições seriadas e plaqueamento	45
2.3.2	Contagem e seleção de bactérias	45
2.3.3	Preservação Microbiana	46
2.3.4	Caracterização Morfológica	46
2.4	Caracterização Bioquímica	47
2.4.1	Catalase	47
2.4.2	KOH 3%	47
2.5	Análises Moleculares	47
2.5.1	Identificação taxonômica	48

2.5.2	Filogenia.....	48
3	RESULTADOS	48
3.1	Coleta, Isolamento e purificação.....	49
3.2	Caracterização dos isolados bacterianos.....	51
3.3	Análise molecular dos isolados obtidos.....	56
4	DISCUSSÃO	66
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
6	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	71
	CAPITULO II: Atividade enzimática de bactérias intestinais de abelha de sem ferrão <i>Scaptotrigona polysticta</i> (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).	80
	RESUMO	80
	ABSTRACT	81
1	INTRODUÇÃO	82
2	MATERIAL E MÉTODOS	83
2.1	Ensaio Enzimático Semiquantitativo.....	83
2.1.1	Proteases.....	84
2.1.2	Amilases.....	84
2.1.3	Lipase.....	84
2.1.4	Celulase.....	84
3	RESULTADOS	85
4	DISCUSSÃO	93
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
6	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	95
	CAPITULO III: Determinação da atividade amilolítica e proteolítica de bactérias intestinais de abelha de sem ferrão <i>Scaptotrigona polysticta</i> (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)	99
	RESUMO	99
	ABSTRACT	100
1	INTRODUÇÃO	101
2	MATERIAL E MÉTODOS	102
2.1	Ensaio Enzimático Quantitativo.....	102
2.1.1	Controle de crescimento em meio líquido.....	102
2.2	Ensaio enzimático.....	102
2.2.1	Quantificação da produção enzimática em meio líquido.....	103
3	ESTATÍSTICA	106
4	RESULTADOS	106

5	DISCUSSÃO	113
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
7	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	115
	APÊNDICE	117
	Apêndice A- Coloração de gram.....	117
	Apêndice B- Receituário dos meios de cultura.....	118
	ANEXOS	121
	Anexo 1: Protocolo extração de DNA (Kit QIAmp® DNA Mini Kit).....	121
	Anexo 2: Protocolo de Purificação do produto de PCR (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up).....	123

1 INTRODUÇÃO

As abelhas são os principais agentes polinizadores na maioria dos ecossistemas e só no Brasil aproximadamente 60% das culturas agrícolas dependem da polinização por abelhas, o que traduzido monetariamente significa um agregado econômico da ordem de pelo menos US\$ 12 bilhões ao ano (GIANNINI *et al.*, 2015a).

A destruição de habitats e a redução da diversidade floral associada à agricultura intensiva e de monocultivos, pastagens e avanço de áreas urbanas, tem contribuído para o declínio das populações de várias espécies de abelhas nativas (CARVALHO-ZILSE; NUNES-SILVA, 2012; SÁNCHEZ-BAYO; WYCKHUYS, 2019). Uma situação preocupante, que vem mobilizando pesquisadores, conservacionistas e o poder público (GOULSON *et al.*, 2015; GIANNINI *et al.*, 2015b).

Um dos aspectos pouco explorados em estudos com meliponíneos (abelhas nativas sem ferrão) é a interação desses insetos com sua microbiota associada. Sendo cada vez mais consensual, o entendimento de que tais microrganismos fazem parte dos elementos chave para a homeostase, tanto do ninho quanto do indivíduo (KWONG *et al.*, 2017). Neste contexto, a diversidade e a abundância relativa de comunidades de microrganismos existentes no trato gastrointestinal de abelhas impactam o estado nutricional e a imunidade do hospedeiro (ZHENG *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2020). As abelhas abrigam comunidades bacterianas intestinais especializadas, as quais poderiam traçar um paralelo à microbiota de mamíferos, pois ambas são compostas principalmente por microrganismos anaeróbios facultativos e microaerofílicos. No entanto, ao que se sabe até o momento, essa microbiota é de baixa complexidade (comparada com a de mamíferos), e é transmitida por meio das interações sociais entre indivíduos.

A microbiota de *Apis mellifera*, abelha de origem africana e europeia, é normalmente composta por 8 a 9 tipos bacterianos com a maioria dessa diversidade sendo encontrada no intestino posterior (KWONG; MORAN, 2016; KWONG *et al.*, 2017). Essas bactérias protagonizam complexas e diversas relações simbióticas, importantes para a manutenção das funções imunológicas, além de atuarem na fisiologia intestinal, proteção contra patógenos e processamento de nutrientes em seus hospedeiros (ZHENG *et al.*, 2017; RAYMANN; MORAN 2018; WANG *et al.*, 2018; KWONG; STEELE; MORAN, 2018). Essas descobertas chamaram a atenção para o papel da microbiota, não somente na saúde das abelhas, bem como seu potencial como um modelo para o estudo da ecologia e evolução de simbiontes intestinais

(KWONG; MORAN, 2016; RAYMANN; MORAN 2018; WANG *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2018; KHAN *et al.*, 2020).

Kwong *et al.* (2017) realizaram o primeiro estudo que registra a análise comparativa entre as três tribos taxonômicas de abelhas sociais: Apini, Bombini e Meliponini. Abelhas da tribo Apini são as mais estudadas até o momento no quesito simbiose entre abelhas e microorganismos, seguido de Bombini, e por fim, ainda muito escasso, a tribo Meliponini, cuja diversidade e distribuição Pantropical lhe garante o primeiro lugar no “podium” das abelhas sociais corbiculadas. Assim, a variabilidade encontrada na microbiota de Meliponini pode ser uma marca evolutiva, que ainda é pouco explorada e compreendida.

Diante disto, este trabalho é voltado para o estudo de bactérias cultiváveis do microbioma intestinal de *Scaptotrigona polysticta* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini, Scaptotrigona) e de seu potencial biotecnológico para a produção de enzimas de interesse industrial. Apesar de sua importância, tanto ecológica quanto econômica, esta espécie de abelha ainda detém poucos estudos relacionados a sua microbiota. Tal conhecimento poderá auxiliar no entendimento de aspectos biológicos sobre esta espécie bem como contribuir com os escassos dados acerca da microbiota das abelhas nativas da Amazônia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Abelhas nativas sem ferrão

As abelhas sem ferrão são pertencentes à tribo Meliponini tendo ocorrência Pantropical (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Na região Neotropical são registradas 417 espécies, das quais uma grande diversidade dessas abelhas é encontrada no Brasil, onde ocorrem 244 espécies em 29 gêneros (PEDRO, 2014). Esses insetos possuem o ferrão atrofiado, sem função de defesa, tendo função apenas de ovipositor, daí o termo “abelhas sem ferrão” (MICHENER, 2013). Estão posicionadas taxonomicamente na tribo Meliponini e constituem um dos grupos das abelhas eussociais da família Apidae, a qual inclui também a tribo Apini (abelhas do gênero *Apis*, contendo a espécie mais conhecida, *Apis mellifera*) e a tribo Bombini, onde estão alocadas as abelhas do gênero *Bombus* e correlatos (mamangavas). Há ainda a presença da tribo Euglossini dentro das Apidae, abelhas de glossa longa, ou abelhas das orquídeas, as quais não apresentam comportamento eusocial, sendo mais gregário ou para-social. Não obstante, os Meliponini compõem um mosaico de espécies, sendo o mais complexo e diverso, no grupo

das abelhas eusociais e porque não dizer dos insetos reconhecidos como sociais (KERR *et al.*, 1996; GRÜTER, 2020).

Os meliponíneos nidificam principalmente em ocos de árvores, podendo algumas espécies nidificar em cavidades no solo, em cupinzeiros ou formigueiros, em ninhos de pássaros abandonados ou em paredes de casas (Figura 1). Algumas espécies por sua vez, constroem ninhos expostos ou semi-expostos em galhos de árvores ou fendas rochosas. As entradas dos ninhos são formadas por um tubo de cera ou cerume, cujo comprimento varia com a espécie, podendo não haver em algumas espécies (CAMARGO, 1989; ROUBIK, 1989; 2006; MICHENER, 2000; LOPES, 2012).

As colônias apresentam castas bem definidas com cada um cumprindo seu papel. São compostas, em geral, por única fêmea fértil (monogenia) a rainha, machos com função reprodutiva e um grande número fêmeas inférteis, as operárias, que cuidam das crias, assistem a rainha, coletam os recursos para alimentação, para crescimento e manutenção da colônia (KERR *et al.*, 1996).

Figura 1. Abelhas sem ferrão nidificando tronco de árvore oca.



Fonte: Elaborada pela autora.

No interior do ninho, as atividades realizadas pelas operárias se dão conforme a faixa etária; em média, após o 25º dia de vida a operária concentra suas atividades especialmente fora da colônia, quando saem para o campo em busca de pólen, néctar, barro, resina e outros recursos para manutenção e alimentação da colônia (KERR *et al.*, 1996).

As visitas em flores promovem a polinização, que é a forma de reprodução de grande parte das angiospermas (TOREZAN-SILINGARDI, 2012). Assim, os Meliponini são cruciais

para a manutenção de florestas e são os principais agentes polinizadores de várias espécies silvestres e cultivadas, prestando um serviço ecológico de fundamental importância (GARIBALDI *et al.*, 2013, GIANNINI *et al.*, 2014b; WOLOWSKI *et al.*, 2018).

2.1.1 *Scaptotrigona* spp.

O gênero *Scaptotrigona* é formado por 22 espécies distribuídas por toda região neotropical (CAMARGO; PEDRO, 2007). Destas, nove espécies são descritas no Brasil, das quais duas tem registro no Estado do Amazonas: *Scaptotrigona fulvicutis* e *Scaptotrigona tricolorata* (CAMARGO; PEDRO, 2013). Contudo, especula-se existir um grande número de espécies não descritas em varias regiões brasileiras (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002), o que torna possível haver um número maior espécies não catalogadas na região amazônica.

Este gênero apresenta um tamanho médio de 4-7mm (COSTA, 2019). Nos ninhos é possível observar a existência de células maiores no favo de cria das quais nascem rainhas, chamadas "células reais" ou "realeiras" (KERR *et al.*, 1996). São comumente encontradas em cavidades de troncos de árvores e a entrada dos ninhos é caracterizada por um tubo de cerume que varia de comprimento dependendo da espécie (Figura 2) (NOGUEIRA-NETO, 1997; ROUBIK, 2006).

Figura 2. Entrada do ninho de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta*.



Fonte: Elaborada pela autora.

O interior de seus ninhos é composto por células de cria em favos horizontais, formando uma sobreposição de placas (Figura 3) (NOGUEIRA-NETO, 1997). Possuem normalmente uma rainha fecundada, milhares de operárias, machos e rainhas virgens, formando uma população que varia de 2000 a 50000 abelhas (GRÜTER, 2020).

Figura 3. Ninho de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta*.



Fonte: Elaborada pela autora.

2.1.1.1 *Scaptotrigona polysticta*

A espécie apresenta uma coloração preta com asas foscas amareladas, com tamanho de aproximadamente 7 mm de comprimento. São chamadas popularmente de canudo, mijui, bijui, bui-kaiaki, abelha-canudão ou imrê-tié e estão presentes em vários estados do Brasil, inclusive nidificam grande parte da Amazônia legal (MOURE, 1950).

Esta espécie, assim como outras espécies nativas há séculos vem sendo usadas por índios Kayapó que habitam a Amazônia brasileira para a obtenção de mel, ninhada e pólen (CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2006). É bastante apreciada para a criação, pois pode produzir em média 3 litros de mel ao ano, considerado saboroso e suave (MAGALHÃES; VENTURIERI, 2010).

No município de Iranduba - Amazonas, há o meliponário da empresa Amazomel Produtos e Serviços Apícolas que atualmente cria abelhas para fins comerciais com uma

variedade de abelhas sem ferrão, incluindo as abelhas *Scaptrigona polysticta*, que em sua maioria foram desabrigadas através do desmatamento para a produção de carvão usados pelas olarias da região, fazendo o papel de conservação das mesmas.

2.2 Relação entre microrganismos e abelhas

A rápida expansão da pesquisa sobre microbiomas intestinais foi impulsionada por descobertas nas quais as bactérias intestinais geralmente estão diretamente associadas a saúde de seus hospedeiros (KHAN *et al.*, 2020). Especificamente, muitos estudos documentaram déficits de aptidão em animais experimentalmente privados de uma microbiota intestinal normal, seja com antibióticos ou criando indivíduos em ambientes estéreis para evitar a colonização (RYU *et al.*, 2008; YUN *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2018). Além disso, foi observado que os hospedeiros podem se beneficiar de sua microbiota intestinal na metabolização de alimentos, nutrição, desintoxicação, proteção contra a invasão por patógenos e desenvolvimento da imunidade (Tabela 1).

Tabela 1. Papel da microbiota intestinal de abelhas.

Colonizadores bacterianos intestinais	Espécie hospedeira	Benefício	Referências
<i>Lactobacillus</i> e <i>Bifidobacterium</i> sp.	Abelhas sem ferrão (Trigona, Meliponula bocandeei, Melipona beecheii). <i>Apis andreniformis</i> , <i>A. cerana</i> , <i>A. koschevnikovi</i> , <i>A. nuluensis</i> , <i>A. dorsata</i> , <i>A. laboriosa</i> , <i>A. florea</i> , <i>A. nigrocincta</i> , <i>A. mellifera</i> .	Estimulação imunológica, e consequente promoção da proteção contra patógenos (larvas de <i>Paenibacillus</i> e <i>Melisococcus plutonius</i>).	Forsgren <i>et al.</i> , 2010; Vásquez <i>et al.</i> , 2012; Wu <i>et al.</i> , 2013; Killer <i>et al.</i> , 2014; Asenjo <i>et al.</i> , 2016.
<i>Gilliamella</i> sp.	<i>Bombus</i> spp.	Redução da infecção por <i>Crithidia bombi</i>	Koch & Schmid-Hempel, 2011; Cariveau <i>et al.</i> , 2014.
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Apis cerana japônica</i>	Inibição do crescimento de um patógeno bacteriano (<i>P. larvae</i>)	Yoshiyama & Kimura, 2009.
<i>Gilliamella apicola</i> , <i>Lactobacillus</i> e <i>Bifidobacterium</i>	<i>Apis mellifera</i> e <i>Bombus</i> spp.	Nutrição das abelhas através do metabolismo de açúcares, além da produção de enzimas que degradam carboidratos e açúcares tóxicos encontrados na dieta das abelhas. Tendo papéis importantes na melhoria das tolerâncias dietéticas e na manutenção	Bottacini <i>et al.</i> , 2012; Engel & Martison; Moran, 2012; Engel & Moran, 2013; Kwong <i>et al.</i> , 2014; Kwong, Engel, Koch & Moran, 2014; Lee <i>et al.</i> , 2015; Zheng <i>et al.</i> , 2016; Kešnerová <i>et al.</i> , 2017; Lee, <i>et al.</i> , 2018.

Comunidade bacteriana intestinal	<i>Apis mellifera</i>	da saúde de seus hospedeiros. Estímulo de ganho de peso do hospedeiro, a sensibilidade à sacarose do hospedeiro e o aumento da expressão de genes relacionados à sinalização hormonal.	Zheng et al., 2017.
Comunidade bacteriana intestinal	<i>Apis mellifera</i>	Modificação das vias de desintoxicação dos xenobióticos do hospedeiro.	Wu et al., 2020.
<i>S. alvi</i> , <i>Gilliamella apicola</i> , <i>Frischella perrara</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp. e <i>Lactobacillus</i> Firm-4 e Firm-5	<i>Apis mellifera</i>	Estímulo à produção de peptídeos antimicrobiano e consequente contribuição para o sistema imunológico inato das abelhas.	Kwong, Mancenid & Moran, 2017.
Comunidade bacteriana intestinal	<i>Apis mellifera</i>	As alterações da microbiota intestinal afetam homeostase do hospedeiro, aumentam suscetibilidade à invasão de patógenos.	Kakumannuet et al., 2016; Schwarz, Moran & Evans, 2016; Raymann, Shaffer & Moran, 2017; Raymann, Bobay & Moran, 2018; Motta, Raymann & Moran, 2018; Nogrado et al., 2019.
<i>Frischella perrara</i>	<i>Apis mellifera</i>	Estimulação da resposta imunológica em abelhas.	Engel, Bartlett & Moran, 2015; Emery, Schmidt & Engel, 2017.

Fonte: Rodrigues *et al.* (2021)

As abelhas eusociais têm comunidades intestinais características e altamente específicas, dominadas por linhagens bacterianas que nunca ou raramente são detectadas fora de seus hospedeiros, sendo restritos ao ambiente intestinal (MORAN; OCHMAN; HAMMER, 2019). Em contrapartida, intestinos de abelhas não sociais, são dominadas por espécies bacterianas presentes no néctar e em outros ambientes (MARTINSON *et al.*, 2011; MCFREDERICK *et al.*, 2012; KWONG *et al.*, 2017). Desta forma, supõe-se que exista um compartilhamento ancestral da comunidade intestinal em abelhas sociais, e que com o passar do tempo esses microrganismos vão sendo passado às gerações através de interações sociais (KWONG *et al.*, 2017).

Do ponto de vista de aquisição e desenvolvimento da colonização microbiana, as abelhas recém emergidas apresentam uma microbiota ainda pouco desenvolvida, sendo adquirida principalmente através da transferência direta de fluidos orais via alimentação boca a boca, como também através das fezes frescas das abelhas enfermeiras, bem como de conteúdo do intestino posterior via alimentação ânus-boca, além da transferência por contato direto com material de colmeia contaminado com simbiote, como cera, pólen, mel e célula de cria, nos casos da microbiota transiente (ONCHURU *et al.*, 2018; KHAN *et al.*, 2020). Foi

observado também que ao fundar uma nova colônia, a rainha (de *Apis mellifera*) repassa simbiontes verticalmente a seus descendentes (MARTINSON *et al.*, 2011; ONCHURU *et al.*, 2018; RAYMANN; MORAN, 2018; KHAN *et al.*, 2020).

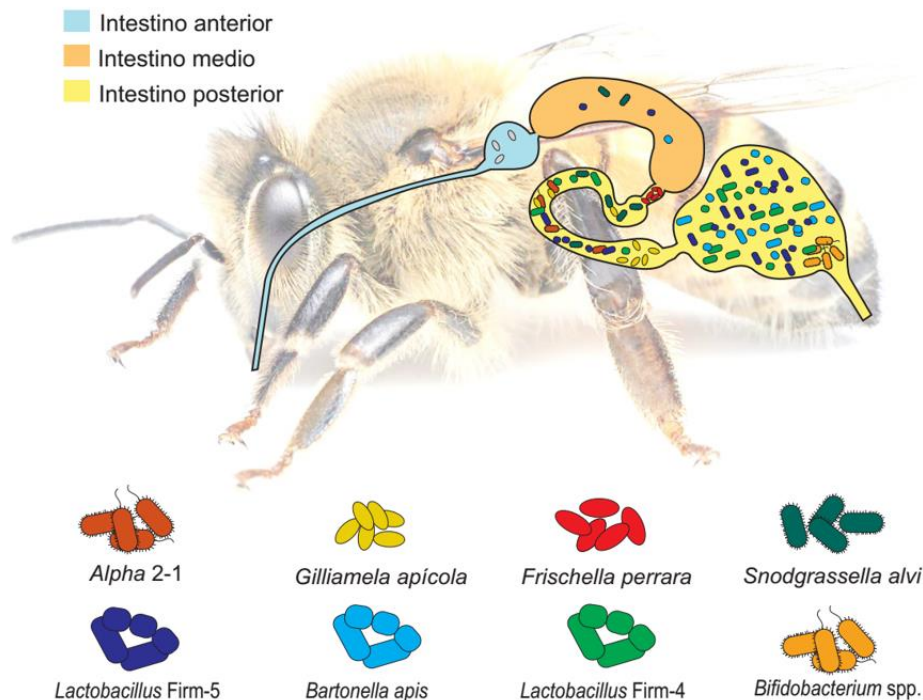
A compreensão dos processos e os meios pelos quais a microbiota intestinal evoluiu é um desafio para os estudos de comunidades intestinais (COYTE; SCHLUTER; FOSTER, 2015, FOSTER *et al.*, 2017). As inúmeras possibilidades de interação microrganismos-hospedeiro, oferece uma oportunidade excelente para investigar a evolução de diferentes estratégias de simbiose, além de como o estilo de vida do hospedeiro influencia na evolução da microbiota associada e vice versa (ENGEL *et al.*, 2016). Sendo assim, as abelhas representam um excelente modelo para as abordagens dessas questões, uma vez que estas possuem uma microbiota associada a qual, até onde sabemos, é bastante conservada e complexa.

2.3 Bactérias associadas ao intestino de abelhas

Nas abelhas, assim como na maioria dos animais, a seção distal do intestino (íleo e reto) abriga a maior parte das comunidades bacterianas, isso se dá devido à presença abundante de alimentos não digeridos pelo hospedeiro que são depositados nessa região, tornando-se fontes acessíveis de carbono e nitrogênio disponíveis para a microbiota (BONILLA-ROSSO; ENGEL, 2018).

O intestino posterior das abelhas *Apis mellifera*, por exemplo, é o lar de uma comunidade bacteriana relativamente simples, porém altamente específica (Figura 4). É composto por cinco membros principais, que normalmente estão presentes em quase todas as abelhas do gênero *Apis* (95% a 99,9%), e outros membros denominados de transientes, totalizando um pequeno número de 8 grupos bacterianos. As bactérias dominantes do intestino de abelhas do gênero *Apis* são em sua maioria anaeróbias facultativas ou microaerófilas, pouco frequentes em ambientes da colônia e provavelmente dependem das interações sociais para serem transmitidos de hospedeiro para hospedeiro (KWONG; MORAN, 2016; BONILLA-ROSSO; ENGEL, 2018; RAYMANN; MORAN, 2018).

Figura 4. Composição da microbiota em uma típica abelha operária adulta de *Apis mellifera* e a localização de bactérias nos diferentes compartimentos do intestino.



Fonte: Rodrigues *et al.* (2021).

Em um estudo pioneiro conduzido por Kwong *et al.* (2017) a microbiota intestinal de abelhas corbiculadas (Apini, Bombini, Meliponini e Euglossini) de diferentes continentes foi comparada. Detectou-se OTUs correspondentes ao gênero *Snodgrassella* em todas as espécies de *Apis* e *Bombus* pesquisadas, bem como em 9 de 13 espécies de abelhas sem ferrão. Da mesma forma, *Gilliamella*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* Firm-4 e *Lactobacillus* Firm-5 são predominantes nas três tribos eusociais (Apini, Bombini e Meliponini), sugerindo que parte da comunidade microbiana intestinal de abelhas eussociais é composta por um conjunto central de bactérias (*core*) bem estabelecidas e, portanto, adaptadas a este ambiente. Alguns filotipos estudados parecem ser específicos, como por exemplo *Bartonella apis* e *Frischella perrara* em abelhas *Apis mellifera*, *Bombiscardovia* e *Schmidhempelia* em abelhas *Bombus* e *Acetobacter* em abelhas sem ferrão. Entretanto, esse estudo compreende um pequeno número amostral de espécies das abelhas sem ferrão, não representativo da diversidade do grupo, sendo

apenas cinco de ocorrência no Brasil, além de serem dados baseados em sequenciamento de regiões do gene 16s rRNA, não sendo realizado isolamento e cultivo de linhagens.

Diante do exposto, vale ressaltar que apesar de registrarmos uma das maiores diversidade de meliponíneos do mundo, de acordo com PEDRO (2014), são poucos os estudos relacionados a microbiota de abelhas sem ferrão, não podendo ser afirmado a existência de uma microbiota intestinal de abelhas “central” ou *core*, do inglês, como já vem sendo confirmado em abelhas do gênero *Apis* e *Bombus*.

2.4 Identificação de microrganismos

Os microrganismos outrora não detectados em testes bioquímicos agora podem ser identificados via técnicas de biologia molecular (MADIGAN *et al.*, 2016), não excluindo, no entanto, os métodos convencionais já consagrados e indispensáveis para validação de resultados advindos de técnicas de alto desempenho.

As metodologias tradicionais dependentes de cultivo, baseadas no uso de condições seletivas, permitem a recuperação de grupos microbianos específicos. Esses métodos são limitados para a real avaliação da diversidade microbiana (HUGENHOLTZ, 2002; ROMERO *et al.*, 2019). Entretanto estes métodos são usados para enriquecer uma amostra intestinal antes da análise genômica. A seleção ou direcionamento de espécies microbianas específicas é possível por meio da manipulação de diferentes variáveis, como fonte de carbono, elementos presentes no meio de cultivo, concentrações de carbono, nitrogênio, oxigênio e temperatura. Abordagens baseadas em cultivo tornaram viável a caracterização genômica, morfológica e bioquímica de todas as espécies principais da microbiota de abelhas *Apis* (OLOFSSON; VÁSQUEZ, 2008; KESNEROVÁ *et al.*, 2016; KWONG; MORAN, 2016; ROMERO *et al.*, 2018).

Para a identificação genotípica utiliza-se à amplificação molecular do gene 16S ribossomal, por meio de da técnica de PCR e seu posterior sequenciamento. O gene 16 ribossomal está entre as macromoléculas mais bem conservadas evolutivamente, tendo sua sequência altamente conservada e presente na maioria das bactérias, e tendo variações o suficiente para identificar as maiorias dos gêneros bacterianos (ROMERO *et al.*, 2019). Suas sequências podem ser usadas para medir distâncias filogenéticas, mesmo entre os organismos mais distintamente relacionados. As regiões altamente conservadas permitem o alinhamento das sequências, enquanto que as regiões altamente variáveis oferecem grandes possibilidades

para o desenho de sondas e *primers* universais, e estas podem ser usadas para identificação de espécies (ENGEL *et al.*, 2016; ROMERO *et al.*, 2019).

Apenas o sequenciamento de regiões do gene 16S rRNA não fornece informações suficientes para a identificação de uma espécie, limitando os estudos à classificação de taxa na hierarquia de gênero ou superior (SUNDQUIST *et al.*, 2007). De acordo com Clarridge (2004) e Romero *et al.* (2019), bactérias pertencem à mesma espécie se suas sequências apresentam 99,5% de similaridade ou mais e pertencem ao mesmo gênero se suas sequências apresentarem entre 95 e 99% de similaridade. As comparações de sequências de RNAs ribossomais se constituem numa ferramenta poderosa para deduzir relações filogenética evolutivas entre bactérias (CLARRIDGE, 2004). Através da utilização de sequências de 16S rRNA é possível maior confiabilidade acerca de identificação de espécies bacterianas. Assim, o advento das técnicas de reação da polimerase em cadeia (PCR) (SAIKI *et al.*, 1988) e sequenciamento de DNA (SANGER *et al.*, 1977), bem como o incremento exponencial de dados de nucleotídeos disponíveis em bancos genéticos para a comparação de sequências como o GenBank® do *National Institutes of Health*, e o banco de sequências 16S rRNA do *The Ribosomal Database Project* – RDP, têm sido fundamentais a genotipagem acurada, ou até mesmo como uma abordagem inicial na descoberta de novos microrganismos.

Todas essas técnicas trabalhadas em conjunto, permitem uma caracterização mais fidedigna da diversidade de microrganismos de um dado material. Desta forma, comunidades bacterianas associadas ao intestino de abelhas podem ser acessadas por meio da associação do isolamento, cultivo e sequenciamento.

2.5 Enzimas

No interior da colmeia de abelhas sem ferrão, os potes de alimento, repletos de pólen ou néctar, sofrem transformações na sua composição por intermédio de bactérias e leveduras por processos fermentativos. Podendo-se considerar que os potes de alimentos nesses insetos são verdadeiros pequenos biorreatores onde ocorrem inúmeras reações enzimáticas. Portanto, um potencial de descobertas de novas enzimas e processos (GILLIAM, 1990).

Enzimas são conhecidas industrialmente como biocatalisadores, sendo formadas por longas cadeias de aminoácidos com ligações peptídicas, sintetizadas por células vivas, atuando em quase todas as reações químicas do metabolismo dos organismos vivos; aceleram processos e convertem assim, uma substância conhecida como substrato, em outra denominada produto (CHAPMAN *et al.*, 2018).

A produção de enzimas é um vasto campo de estudo quando se trata de processos biotecnológicos, devido à sua especificidade para as reações que catalisam (SAYALI *et al.*, 2013). Elas constituem um dos mais importantes grupos de produtos biológicos de necessidade humana, possuindo várias aplicações nas mais diversas áreas de processos industriais e biotecnológicos, sendo ferramentas úteis em análises clínicas, análises de alimentos, análises químicas, de contaminação ou poluição de ambientes (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004).

Entre as enzimas encontram-se as proteases, que se sobressaem devido sua multifuncionalidade e por corresponderem com cerca de 60% do mercado de enzimas, sendo utilizadas frequentemente em indústrias de detergentes, couro, produtos farmacêuticos, alimentos e biotecnologia (RAVEENDRAN *et al.*, 2018).

As amilases clivam ligações glicosídicas interna da cadeia de amido produzindo oligossacarídeos mais curtos. Estas enzimas constituem uma classe de enzimas industriais que cobrem cerca de 30% do mercado mundial de enzimas (GUPTA *et al.*, 2003; WHITCOMB; LOWE, 2007; AZAD *et al.*, 2009), e são de grande importância no campo da biotecnologia, encontrando aplicações em uma série de processos envolvendo têxteis, papel, detergentes e indústrias alimentícias (EL-FALLAL, *et al.*, 2012; RANA; WALIA; GAUR, 2013).

As celuloses, um polissacarídeo com parede celular composta por biomassa lignocelulósica, sendo polissacarídeo mais abundante que auxilia como fonte renovável de carbono na produção de produtos de valor agregado (ZHENG *et al.*, 2016). As celulases microbianas são produzidas principalmente por fungos e bactérias, que participam da quebra polimérica de açúcares simples (SHAIKH *et al.*, 2013). Essa enzima é amplamente usada para a hidrólise de celulose em vários empreendimentos biológicos como: papel, têxteis, lavanderia, alimentos e rações, cerveja e indústrias agrícolas (JAYASEKARA; RATNAYAKE, 2019; YUAN *et al.*, 2016).

As lipases (triacilglicerol acilidrolase) uma enzima única que pode catalisar vários tipos de reações, como hidrólise, esterificação, alcoólise, etc. (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). São consideradas excelentes biocatalisadores em numerosos processos industriais nas mais diversas áreas, tais como alimentos, processos farmacêuticos, formulação de detergentes, oleoquímica, entre outras (GRBAVCC *et al.*, 2007; FRANKEN *et al.*, 2009).

Essas enzimas podem ser obtidas de animais, plantas e microrganismos, sendo este último, um dos principais produtores devido às suas vantagens econômicas e técnicas, além de sua diversidade bioquímica e a possibilidade de manipulação genética (LAXMAN *et al.*, 2015). Assim, a crescente demanda por enzimas com especificidade e estabilidade ao pH, íons

metálicos, temperatura, compatibilidade com compostos detergentes como os surfactantes e solventes orgânicos, continua a estimular a busca por novas fontes de enzimas (SAVITHA *et al.*, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar bactérias associadas ao intestino de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta* e verificar quanto à produção de enzimas de interesse industrial.

3.2 Objetivos específicos

- a. Isolar bactérias intestinais associadas as abelhas sem ferrão do gênero *Scaptotrigona polysticta*;
- b. Identificar por métodos morfológicos, bioquímicos e genotipagem molecular os isolados bacterianos obtidos do intestino abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta*;
- c. Realizar a análise comparativa da microbiota do intestino de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta* com a microbiota intestinal de outros Apidae;
- d. Verificar a produção enzimática das bactérias isoladas (Amilase, Protease, Lipase e Celulase).
- e. Quantificar as enzimas produzidas por bactérias intestinais de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta*.

Esta dissertação foi dividida em três capítulos:

I: Bactérias associada ao intestino de abelha de sem ferrão *Scaptotrigona polysticta* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini);

II: Atividade enzimática de bactérias intestinais de abelha de sem ferrão *Scaptotrigona polysticta* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini);

III: Determinação da atividade amilolítica e proteolítica de bactérias intestinais de abelha de sem ferrão *Scaptotrigona polysticta* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).

4 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AZAD, M. A.; BAE, J. H.; KIM, J. S.; LIM, J. K.; SONG, K. S.; SHIN, B. S.; KIM, H. R. Isolation and characterization of a novel thermostable alpha-amylase from Korean pine seeds. *New biotechnology*, v. 26, n. 3-4, p. 143–149, 2009.
- BONILLA-ROSSO, G.; ENGEL, P. Functional roles and metabolic niches in the honey bee gut microbiota. *Current Opinion in Microbiology*, v. 43, p. 69-76, 2018.
- CAMARGO, J. M. F.; PEDRO S. R. M. 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region* - online version. Disponível em <<http://www.moure.cria.org.br/catalogue>> Acesso em 13 de março de 2020.
- CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In: MOURE, J.S.; URBAN, D.; MELO, G. A. R. (Orgs.). *Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region*. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia, 2007.
- CARVALHO-ZILSE, G. A.; NUNES-SILVA, C. G. Threats to the Stingless Bees in the Brazilian Amazon: How to deal with scarce biological data and an increasing rate of destruction. 147- 168. In: Florio, R. M. (Ed.). *Bees: Biology, Threats and Colonies*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA, 2012.
- CLARRIDGE, J.E. 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, n. 4, p. 840–862, 2004.
- CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. W.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I.; VENTURIERI, G. C.; EARDLEY, C.; NOGUEIRA-NETO, P. Global meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie*, v. 37, n. 2, p. 275-292, 2006.
- COSTA, L. *Guia fotográfico de identificação de abelhas sem ferrão, para regate em áreas de supressão florestal*. Belém, PA: Instituto Tecnológico Vale, 2019.
- COYTE, K.Z.; SCHLUTER, J.; FOSTER, K.R. The ecology of the microbiome: networks, competition, and stability. *Science*, v. 350, n.6261, p.663–666, 2015.
- CHAPMAN, J.; ISMAIL, A. E.; DINU, C. Z. Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, v. 8, n. 6, p. 2-26, 2018.
- EL-FALLAL, A.; ABOU-DOBARA, M.A.; EL-SAYED, A.; OMAR, N. Starch and microbial alpha-amylase: from concepts to biotechnological applications. In: Chang CF, ed. *Carbohydrates: Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*. Croatia: InTech; 2012. p. 459-89.
- ENGEL, P. et al. The bee microbiome: impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *mBio*, v. 7, n. 2, p. 1-9, 2016.
- FOSTER, K.R., et al. The evolution of the host microbiome as na ecosystem on a leash. *Nature*, v. 548, n. 7665, p.43–51, 2017.

- FRANKEN, L. P. G.; MARCON, N. S.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; FREIRE, D. M. G.; DARIVA, C.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, J. V. Effect of treatment with compressed propane on lipases hydrolytic activity. *Food Bioprocess Tech.*, v. 3, p. 511-520, 2010.
- GARIBALDI, L. A. et al. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science*, v. 339, n. 6127, p. 1608-1611, 2013.
- GARIBALDI, L. A. et al. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science*, v. 339, n. 6127, p. 1608-1611, 2013.
- GIANNINI T.C., et al. The Dependence of Crops for Pollinators and the Economic Value of Pollination in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, v. 108, n. 3, p. 849-857, 2015a.
- GIANNINI, T. C. et al. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie*, v. 46, n. 2, p. 209-223, 2015b.
- GILLIAM, M.; ROUBIK, D. W.; LORENZ, B. J.; Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie*, v. 21, p. 89–97, 1990.
- GOULSON D., et al. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, v. 347, n.6229, 2015.
- GRBAVCIC, S. Z.; DIMITRIJEVIC-BRANKOVIC, S. I.; BEZBRADICA, D. I.; SILER-MARINKOVIC, S. S.; KNEZEVIC, Z. D. Effect of fermentation conditions on lipase production by *Candida utilis*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, v. 72, n. 8-9, p. 757–765, 2007.
- GRÜTER, C. *Stingless Bees: Their Behaviour, Ecology and Evolution*. Fascinating Life Sciences. Springer New York, 2020.
- GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial alpha-amylases: a biotechnological perspective. *Process. Biochem.*, v. 38, p. 1599-1616, 2003.
- HUGENHOLTZ, P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology*, v. 3, n. 2, p. 1-8, 2002.
- JAYASEKARA, S.; RATNAYAKEM, R. Microbial cellulases: an overview and applications. *In: Cellulose*, v. 2, n. 22, 2019. p. 1-21.
- KERR, W. K.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. *Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação*. Belo Horizonte: Acangaú, 1996.
- KEŠNEROVA, L., MORITZ, R., ENGEL, P. *Bartonella apis* sp. nov., a honey bee gut symbiont of the class Alphaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 66, n. 1, p.414–421, 2016.
- KHAN, K.A. et al. Structural diversity and functional variability of gut microbial communities associated with honey bees. *Microbial Pathogenesis*, v. 138, p. 1-12, 2020.
- KWONG, W.K., et al. Dynamic microbiome evolution in social bees. *Science Advances*, v. 3, n. 3, p. 1-16, 2017.

- KWONG, W.K., STEELE, M.I., MORAN, N.A. Genome Sequences of *Apibacter* spp., Gut Symbionts of Asian Honey Bees. *Genome Biology and Evolution*, v. 10, n. 4, p. 1174-1179, 2018.
- KWONG, W.K.; MORAN, N.A. Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 6, p. 374-384, 2016.
- LAXMAN, R. S.; SONAWANE, A. P.; MORE, S. V.; RAO, B. S.; RELE, M. V.; JOGDAND, V. V.; DESHPANDE, V., V.; RAO, M. B. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3152-3158, 2015.
- LOPES, L. A. *Abelhas sem ferrão em fragmentos preservados de floresta com Araucária em Cambará do Sul, RS, com ênfase em Melipona bicolor schencki*. 2012. 107p. Tese (Doutorado em Entomologia), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.
- MADIGAN, M.T. et al. *Microbiologia de Brock*. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- MAGALHÃES, T. L.; VENTURIERI, G. C. *Aspectos econômicos da criação de abelhas indígenas sem ferrão (Apidae: Meliponini) no Nordeste Paraense*. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2010.
- MARTINSON, V. G. et al. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology*, v. 20, n. 3, p. 619–628, 2011.
- McFREDERICK Q.S., et al. Environment or kin: Whence do bees obtain acidophilic bacteria?. *Molecular Ecology*, v.21, n.7, p.1754-1768, 2012.
- MICHENER, C. D. *The bees of the world*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2000.
- MICHENER, C. D. The Meliponini. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. H. (Orgs.). *Pot-Honey: A legacy of stingless bees*. New York: Springer, 2013.
- MORAN, N.A.; OCHMAN, H.; HAMMER, T. J. Evolutionary and ecological consequences of gut microbial communities. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 50, p. 451-475, 2019.
- MOURE, J. S. A Preliminary Supra-specific Classification of the Old World meliponine bees (Hym., Apoidea). *Stud. Entomol.*, v. 4, 1961.
- MOURE, J. S. Uma nova espécie de Trigonini do Território do Amapá (Hymenoptera-Apoidea). *Bol. Univ. Paraná*, v. 2, n. 4, p. 57-58, 1964.
- NOGUEIRA-NETO, P. *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. São Paulo: Nogueirapis, 1997.
- OLIVEIRA, F.F., et al. *Guia Ilustrado das Abelhas “Sem-Ferrão” das Reservas Amanã e Mamirauá, Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)*. Tefé: IDSM, 2013.

- OLOFSSON, T.C., VASQUEZ, A. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Current Microbiology*, v.57, n.4 p.356–363, 2008.
- ONCHURU, T.O. et al. Transmission of mutualistic bacteria in social and gregarious insects. *Current Opinion in Insect Science*, v. 28, p. 50-58, 2018.
- PEDRO, S.R.M. The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, v. 61, n.4, p.348-354, 2014.
- RANA, N.; WALIA, A.; GAUR, A. Alpha-amylases from microbial sources and its potential applications in various industries. *Natl Acad Sci Lett.*, v. 36, n. 1, p. 9–17, 2013.
- RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B; UMMALYMA, S. B.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; MADHAVAN, A.; PANDEY, A. Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technology and Biotechnology*, n. 56, n. 1, p. 16-30, 2018.
- RAYMANN, K.; MORAN, N.A. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current Opinion in Insect Science*, v. 26, p. 97-104, 2018.
- RODRIGUES, S. P.; SILVA, J. C. I.; OLIVEIRA, T. C.; SILVA, L. I.; MENEZES, N. C. O papel da microbiota intestinal de abelhas eussociais: uma revisão da literatura. *Research, society and development*, v. 10, n. 14, 2021.
- ROMERO, S. et al. The honey bee gut microbiota: strategies for study and characterization. *Insect Molecular Biology*, v. 28, n.4, p. 455-472, 2019.
- ROUBIK, D. W. Stingless bee nesting biology. *Apidologie*, v. 37, p.124-143, 2006.
- ROUBIK, D. W. *The Ecology and natural history of tropical bees*. Cambridge: University Press, 1989.
- RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade de celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, v. 27, n.2, p.205-211, 2004.
- RYU, J.H. et al. Innate immune homeostasis by the homeobox gene *caudal* and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science*, v. 319, n. 5864, p. 777-782, 2008.
- SAIKI, R.K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v. 239, n. 4839, p. 487–491, 1988.
- SÁNCHEZ-BAYO, F.; WYCKHUYS, K. A. G. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation*, v. 232, p. 8–27, 2019.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, EUA, v.74, p. 5463 – 5467, 1977.
- SAVITHA, S.; SADHASIVAM, S.; SWAMINATHAN, K.; LIN, F. H. Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 42, n. 2, p. 298-304, 2011.

- SAYALI, K.; SADICHHA, P.; SUREKHA, S. Microbial esterases: an overview. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. v. 2, n. 7, p. 135-146, 2013.
- SHAIKH, N.M.; PATEL, A.A.; MEHTA, S.A.; PATEL, N.D. Isolation and screening of cellulolytic bacteria inhabiting different environment and optimization of cellulase production. *Univ. J. Env. Res. Technol.*, v. 3, n. 1, p. 39-49, 2013.
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. *Abelhas do Brasil: Sistemática e Identificação*. Belo Horizonte: Edição eletrônica, 2002.
- SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 166, n. 2, p. 486–520, 2012.
- SUNDQUIST, A. et al. Bacterial flora-typing with targeted, chip-based Pyrosequencing. *BMC Microbiology*, v. 7, n. 108, p. 1-11, 2007.
- TOREZAN-SILINGARDI, H. M. Flores e animais: uma introdução à historia natural da polinização. In: DEL-CLARO, K.; TOREZAN-SILINGARDI, H. M. *Ecologia das interações plantas-animais: Uma abordagem ecológico-evolutiva*. Technical Books Editora, 2012.
- WANG, X. et al. Honey bee as a model organism to study gut microbiota and diseases. *Drug Discovery Today: Disease Models*, v. 28, p. 35-42, 2018.
- WHITCOMB, D. C.; LOWE, M. E. Human pancreatic digestive enzymes. *Digestive diseases and sciences*, n. 52, v. 1, p. 1–17, 2007.
- WOLOWSKI, M. et al. *Relatório temático sobre polinização, polinizadores e produção de alimentos no Brasil*. Rede Brasileira de Interações Planta-Polimerizador, 2019. Disponível em: <https://www.bpb.es.net.br/wp-content/uploads/2019/03/BPBES_CompletoPolinizacao-2.pdf> Acesso em: 09 de março de 2020.
- YUAN, B.; YANG, X. Q.; XUE, L. W.; FENG, Y. N.; JIANG, J. H. A novel recycling system for nano-magnetic molecular imprinting immobilised cellulases: Synergistic recovery of anthocyanin from fruit and vegetable waste. *Bioresource technology*, v. 222, p. 14-23, 2016.
- YUN, J.H. et al. Social status shapes the bacterial and fungal gut communities of the honey bee. *Scientific Reports*, v. 8, n.1, p.1-11, 2018.
- ZHENG, F.; HUANG, H.; WANG, X.; TU, T.; LIU, Q.; MENG, K.; WANG, Y.; SU, X.; XIE, X.; LUO, H. Improvement of the catalytic performance of a *Bispora antennata* cellulase by replacing the N-terminal semi-barrel structure. *Bioresour. Technol.*, v. 218, p. 279-285, 2016.
- ZHENG, H. et al. Honey bee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 114, n. 18, p. 4775–4780, 2017.

CAPÍTULO I

Bactérias associada ao intestino de abelha de sem ferrão *Scaptotrigona polysticta* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

CAPÍTULO I: Bactérias associada ao intestino de abelha de sem ferrão *Scaptotrigona polysticta* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Suziane P. Rodrigues¹, Lorena Nacif-Marçal¹, Luiz A. Oliveira², Carlos Gustavo N. da Silva¹

1 Universidade Federal do Amazonas, Manaus-Brasil.

2 Laboratório de Microbiologia de solo, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus-Brasil.

RESUMO

As abelhas apresentam complexas interações simbióticas com microrganismos, os quais em troca de abrigo e alimento fornecem a seus hospedeiros uma série de benefícios, como metabolização de alimentos, desintoxicação, fornecimento de nutrientes essenciais, proteção contra a invasão por patógenos, modulação do desenvolvimento e a imunidade. Essas relações simbióticas muitas vezes são essenciais para a sobrevivência destas abelhas. Considerando que são poucos ou inexistentes estudos da microbiota intestinal de abelhas sem ferrão, sendo grande parte da literatura voltada para as abelhas *Apis mellifera*, além da Amazônia abrigar a maior diversidade de meliponíneos do mundo, o objetivo deste capítulo foi estudar as bactérias que colonizam o intestino posterior das abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta*, usando métodos dependentes de cultivo e comparar os resultados com a microbiota intestinal de outras abelhas. As abelhas foram coletadas de três meliponários, 20 indivíduos de abelhas de cada, e a descrição da microbiota intestinal da abelha *Scaptotrigona polysticta* foi realizada por meio de métodos dependentes de cultivo, onde foram usados cinco meios de cultura: ágar tripton de soja (TSA), ágar tripton de soja soja +5% de sangue desfibrinado (TSA + Sangue), ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS), ágar Sabouraud dextrose (SDA), ágar de cérebro coração (BHI), em três diferentes condições: aeróbica, anaeróbica e microaerofílico (5% CO₂), na temperatura de 35 °C, sendo analisadas a cada 24 horas por 72 horas. Os isolados bacterianos obtidos pelo cultivo dos intestinos posteriores da abelha *Scaptotrigona polysticta* foram submetidos a identificação fenotípica (métodos bioquímicos) e identificação molecular pela amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA, seguidos de análises filogenéticas dos grupos bacterianos presentes. Foram obtidos um total de 110 bactérias no primeiro isolamento, entretanto apenas 76 bactérias foram purificadas e identificadas. Sendo 27 tipos de bactérias encontradas, onze famílias, e três filos bacterianos (Actinobactérias, Proteobactérias e Firmicutes). As bactérias identificadas foram comparadas com as bactérias de outras Apidae, onde foi observado que em abelhas *Scaptotrigona polysticta* não há a presença de nenhum gênero bacteriano *core* estabelecido para *Apis mellifera*, como já visto em outras espécies de abelhas.

Palavras-Chaves: Bactérias intestinais, intestino posterior, insetos sociais, simbiotes.

ABSTRACT

Bees have complex symbiotic interactions with microorganisms, which in exchange for shelter and food provide their hosts with a series of benefits, such as food metabolism, detoxification, supply of essential nutrients, protection against invasion by pathogens, modulation of development and immunity. These symbiotic relationships are often essential for the survival of these bees. Considering that there are few or no studies on the intestinal microbiota of stingless bees, with a large part of the literature focused on *Apis mellifera* bees, in addition to the Amazon being home to the greatest diversity of meliponids in the world, the objective of this chapter was to study the bacteria that colonize the hindgut of stingless bees *Scaptotrigona polysticta*, using culture-dependent methods and comparing the results with the gut microbiota of other bees. The bees were collected from three meliponaries, 20 bee individuals each, and the description of the intestinal microbiota of the bee *Scaptotrigona polysticta* was carried out using culture-dependent methods, using five culture media: tryptone soybean agar (TSA), tryptone soy agar +5% defibrinated blood (TSA + Blood), De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS), Sabouraud dextrose agar (SDA), brain heart agar (BHI), in three different conditions: aerobic, anaerobic and microaerophilic (5% CO₂), at a temperature of 35 °C, being analyzed every 24 hours for 72 hours. Bacterial isolates obtained by culturing the hind intestines of the bee *Scaptotrigona polysticta* were subjected to phenotypic identification (biochemical methods) and molecular identification by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene, followed by phylogenetic analysis of the bacterial groups present. A total of 110 bacteria were obtained in the first isolation, however only 76 bacteria were purified and identified. There are 27 types of bacteria found, eleven families, and three bacterial phyla (Actinobacteria, Proteobacteria and Firmicutes). The identified bacteria were compared with bacteria from other Apidae, where it was observed that in *Scaptotrigona polysticta* bees there is no established core bacterial genus for *Apis mellifera*, as seen in other bee species.

Key words: Intestinal bacteria, hindgut, social insects, symbionts.

1 INTRODUÇÃO

A polinização é um dos mais importantes serviços prestados pelos insetos, com forte impacto ecológico, econômico e cultural. A manutenção da diversidade genética nas populações de plantas, a produtividade das lavouras e pomares para nutrição humana e a variedade floral no meio ambiente são inequivocamente asseguradas e satisfeitas por este serviço ecossistêmico, cuja preservação também depende da ação humana (GILL *et al.*, 2016).

As abelhas são os principais agentes polinizadores, e elas veem sendo afligidas por uma série de fatores bióticos e abióticos que afetam a saúde e a produtividade. Além de patógenos, pesticidas e falta de flores, cujas implicações na saúde dos insetos foram profundamente estudadas, as mudanças climáticas, perda de habitat e espécies invasivas estão se tornando igualmente cruciais para a integridade da colmeia (POTTS *et al.*, 2010; BOND *et al.*, 2014; GOULSON *et al.*, 2015; PORRINI *et al.*, 2016). Desta forma, estudar os fatores relacionados a manutenção desses polinizadores tornam-se de suma importância.

A sua microbiota intestinal está envolvida em vários processos fisiológicos, como na digestão do pólen, degradação dos metabólitos das plantas, produção de hormônios associados ao desenvolvimento, desintoxicação de xenobióticos e defesa contra patógenos (KEŠNEROVÁ *et al.*, 2017; RAYMANN; MORAN, 2018; WU *et al.*, 2020; MORAN *et al.*, 2012). São adquiridas logo após a emergência da abelha adulta por meio de interações sociais e contato com o meio ambiente (KWONG; MORAN, 2016).

A maioria dessas bactérias vive em comunidades geneticamente diversificadas e complexas sob condições naturais e, sua evolução e ecologia são ditadas por fatores ambientais externos e interações microbianas internas (SHAPIRO; POLZ, 2014). No entanto, em abelhas *Apis*, a microbiota parece ser específica do intestino, independentemente da origem geográfica das abelhas amostradas, sua idade ou estação anual (KWONG *et al.*, 2017; ROTHMAN *et al.*, 2018).

As bactérias da comunidade microbiana intestinal da abelha melífera pertencem aos filos Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria (Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria) que compreendem mais de 95% das sequências de 16S rRNA detectadas e são consideradas a bactéria intestinal central ou *core*, do inglês (COX-FOSTER *et al.*, 2007, KWONG; MORAN, 2016, MORAN *et al.*, 2012, MARTINSON *et al.*, 2011). Além das bactérias centrais, uma diversidade de bactérias transitórias também é encontrada nas abelhas e no ambiente da colmeia, que podem ser transmitidas por fontes ambientais (MCFREDERICK *et al.*, 2013). Entretanto, grande parte dos estudos são voltados

conhecimento das comunidades intestinais de abelhas do gênero *Apis*, e poucos para abelhas sem ferrão, sendo esta última a mais diversa com mais de 500 espécies no mundo.

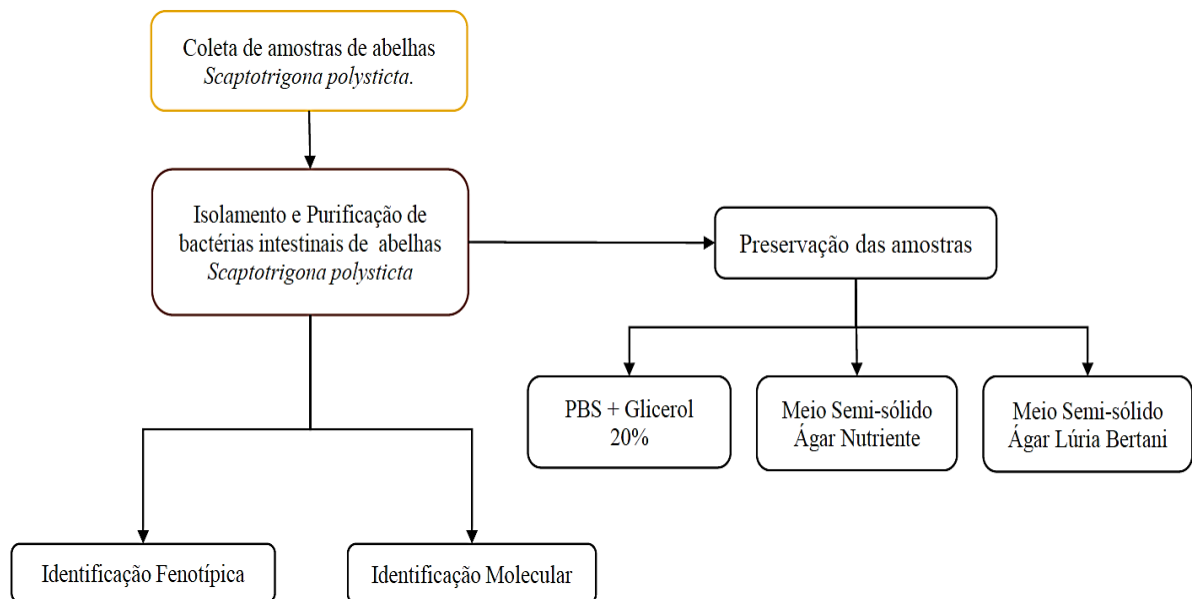
Sabendo disso, o objetivo deste capítulo foi isolar e identificar por meio de métodos morfológicos, bioquímicos e genotipagem molecular as bactérias que colonizam o intestino posterior das abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta*, usando métodos dependentes de cultura e comparar os resultados com a microbiota intestinal de outras abelhas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho encontra-se cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen, no projeto intitulado Insetos e microrganismos associados: genética, evolução e potenciais biotecnológicos, da Universidade Federal do Amazonas, sob o número de acesso A256E82.

Para auxiliar na compreensão foi desenvolvida uma esquematização das principais atividades desenvolvidas neste capítulo (Figura 5).

Figura 5. Fluxo de procedimento para a obtenção, isolamento e identificação de bactérias do intestino de *Scaptotrigona polysticta*.



Fonte: Elaborada pela autora.

2.1 Coleta de Material Biológico

Os indivíduos utilizados neste trabalho são provenientes de três colônias de abelhas da espécie *Scaptotrigona polysticta*, coletadas em diferentes lugares, nos municípios de Iranduba e Cacau Pirêra. A distância entre cada colônia coleta foi medida. Da Colônia 1 para a Colônia 2 são 13,57 Km de distância, Colônia 2 para a Colônia 3 são 13,05 Km e Colônia 3 para a Colônia 1, 2,87 Km de distância, como mostrada na figura 6.

Figura 6. Mapa de localização das três colônias de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta*.



Fonte: Google Earth

A Colônia de abelha 1 é proveniente do Meliponários da empresa Amazomel Produtos e Serviços Apícolas, localizada na rodovia Manuel Urbano, zona rural de Iranduba-Am (Figura 7), a Colônia de abelha 2 é originária do Meliponários da empresa Amazomel Produtos e Serviços Apícolas, rua Massaranduba, Bairro alto, Iranduba-Am (Figura 8) e a Colônia de abelha 3 do Meliponário Novo Tempo, Ramal do January, Cacau Pirêra-Am (Figura 9).

Figura 7. **Colônia 1:** Meliponários da empresa Amazomel Produtos e Serviços Apícolas, rodovia Manuel Urbano, s/n, Iranduba-AM (3°10'56.3"S 60°07'12.7"W).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 8. **Colônia 2:** Meliponários da empresa Amazomel Produtos e Serviços Apícolas, rua Massaranduba, s/n, Bairro alto, Iranduba-Am (3°16'50.9"S 60°11'47.9"W).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 9. **Colônia 3:** Meliponário Novo Tempo, Ramal do January, s/n, Cacau Pirêra-Am (3°12'12.0"S 60°06'16.2"W).



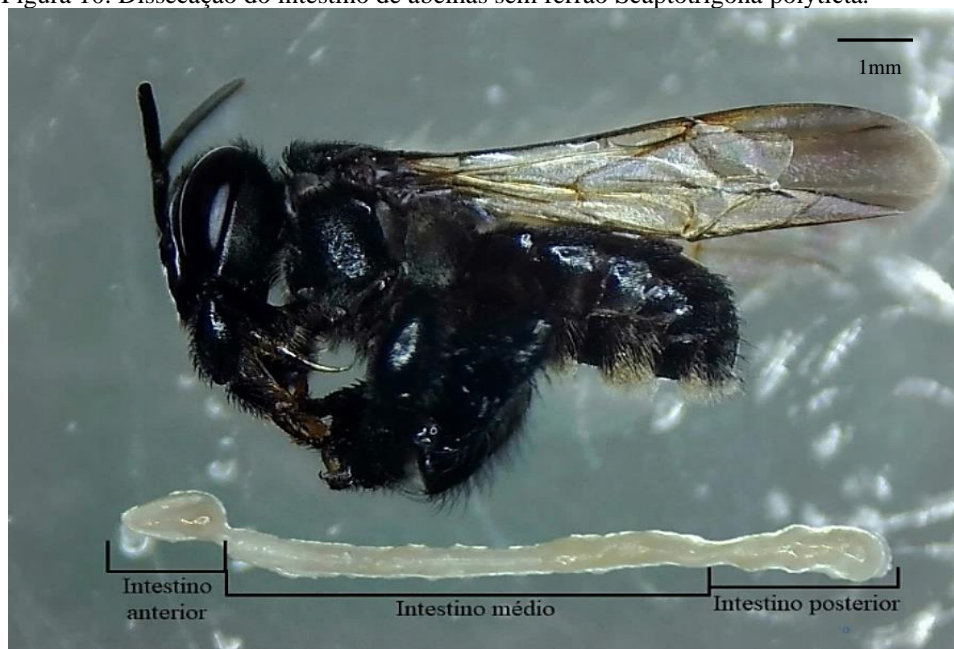
Fonte: Elaborada pela autora.

Para a obtenção dos intestinos, foram coletados 20 indivíduos de abelhas campeiras de cada colônia, as quais foram dissecadas para a remoção dos intestinos posteriores. As abelhas foram coletadas vivas e transferidas para frascos aeróbicos esterilizados e identificados, onde foram mantidas a uma temperatura de aproximadamente 4 °C e conduzidas ao Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA V8 para posteriores procedimentos.

2.2 Dissecação dos Intestinos

As dissecações dos intestinos posteriores foram realizadas no Laboratório Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia – INPA V8. Antes do procedimento, as abelhas foram lavadas com álcool a 70% por aproximadamente 30 segundos. A dissecação foi realizada com kit de dissecação entomológica previamente esterilizados, sendo que a cada troca de amostras o material de procedimento foi esterilizado com álcool a 70% e flambado. O intestino posterior foi retirado de cada abelha (Figura 10) e agrupados em *pool* por colônia, onde foi armazenado em 1000 µl solução PBS 1X em tubos criogênicos de 2000 µl com 350 uL de *beads* de vidro (Glass beads 0.5mm – cat# 11079.105) e submetido a 15 minutos de vórtex para a lise da parede intestinal.

Figura 10. Dissecação do intestino de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polyticta*.



Fonte: Elaborada pela autora.

2.3 Cultivo Bacteriológico

O cultivo bacteriológico foi realizado utilizando os seguintes meios de cultura: ágar triptona de soja (TSA), ágar triptona de soja +5% de sangue desfibrinado, ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS), ágar infusão de cérebro-coração (BHI), ágar Sabouraud dextrose (SDA), de acordo com as diretrizes de cultivo de microrganismo intestinais de abelhas *Apis mellifera* descritos por Romero *et al.* (2019), na temperatura de 35 °C e nas seguintes condições de cultivo: aeróbica, microaerofílico 5% CO₂, anaeróbicas.

2.3.1 Preparo de diluições seriadas e plaqueamento

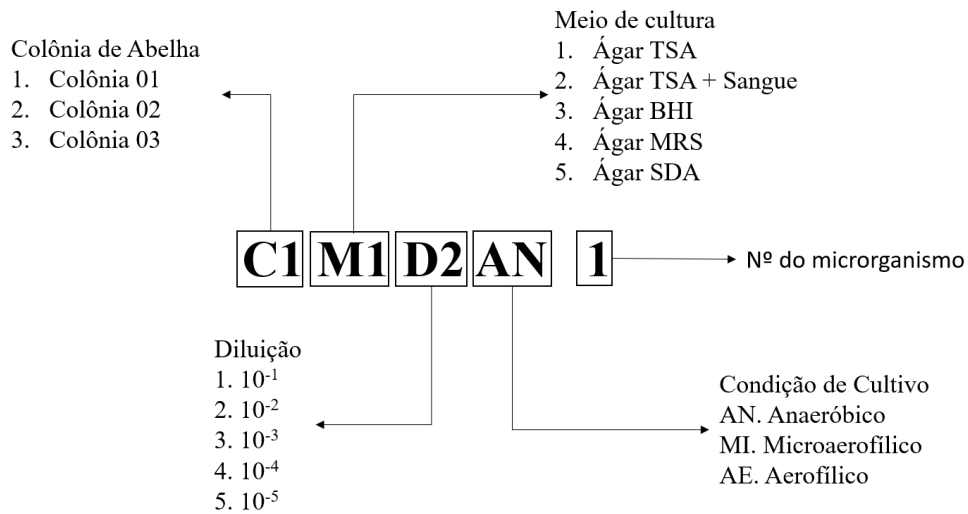
Após lise da parede intestinal o sobrenadante foi homogeneizado com auxílio de um misturador de ultra velocidade (Vortex GEHAKA) e a partir desta solução foi realizada uma série de diluições até a ordem 10⁻⁵. Duzentos microlitros de cada diluição foram semeados pela técnica de *spread plate* nas superfícies de cada meio (MRS, TSA, TSA+ 5% sangue desfibrinado, SDA, BHI), com o auxílio de *swabs* estéreis. As suspensões foram espalhadas na placa a fim de se obter boa distribuição e isolamento bacteriano (BUSSE *et al.*, 1996; MADIGAN *et al.*, 2016). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C em diferentes condições: aeróbica, microaerofílico 5% CO₂ (método da vela) e anaeróbicas (Sistema GasPak EZ Incubating Container), sendo analisadas a cada 24 horas por 72 horas (3 dias) (BRASIL, 2013)

2.3.2 Contagem e seleção de bactérias

Com o decorrer do tempo de incubação das culturas bacterianas, realizou-se a contagem de bactérias totais e de morfotipos por placa e, posteriormente, a estimativa do número de Unidades Formadoras de Colônia por grama de amostra (UFC/g). Seguiu-se a seguinte fórmula para os cálculos: “[UFC/mL] = UFC observadas x fator de diluição da placa (mL)”, sendo o resultado expresso em potência de 10. Como critério, adotou-se a diluição de placas que obtiveram maior número de colônias isoladas, tendo como principal critério características morfológicas distintas entre si tais como: borda, diâmetro, brilho, elevação, textura e cromogênese, as quais foram plaqueadas de modo a obter culturas axênicas.

Após seleção, cada bactéria foi classificada de acordo com o código explicitado na Figura 11.

Figura 11. Código de classificação bacteriana.



Fonte: Elaborada pela autora.

2.3.3 Preservação Microbiana

Após a realização da purificação os isolados bacterianos obtidos foram homogeneizados em 1,5 mL de PBS com 20% de glicerol e criopreservados em ultra freezer à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em microtubos criogênicos, na coleção de linhagens do Laboratório ecologia e biotecnologia de microrganismos da Amazônia (INPA V8). Além disso, as bactérias foram preservadas em tubos a vácuo contendo meio de cultura semi-sólido, Ágar Lúria Bertani e Ágar nutriente, mantidos em temperatura ambiente e a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.4 Caracterização Morfológica

A caracterização morfológica macroscópica das bactérias foi realizada de acordo com a metodologia empregada por Vincent (1970), Hungria e Araújo (1994), Zilli *et al.* (2000) e Prescott *et al.* (2004). Foram avaliadas as seguintes características: forma da colônia (Circular ou irregular), borda (regular ou irregular), a elevação foi observada inclinando a placa de petri contra a luz (plana e elevada), densidade (transparente ou opaca), coloração, aparência da colônia (homogênea ou heterogênea). Já com relação ao muco, foram avaliadas conforme sua aparência (homogênea ou heterogênea), tipo (viscoso, leitoso e seco) e quantidade do muco

(pouco, moderado, muito) podendo esse critério não se aplicar em casos de mucos do tipo seco.

Já a caracterização microscópica foi realizada pela análise morfotintorial através da técnica de Gram, onde diferenciou-se as bactérias de acordo com as características da parede celular e morfologia geral.

2.4 Caracterização Bioquímica

2.4.1 Catalase

A caracterização bioquímica foi realizada a partir do teste de catalase onde foi retirada uma porção da cultura microbiana de crescimento de 24 horas, feito um esfregaço em lâmina microscópica e posteriormente foi adicionado uma gota de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3%. A confirmação da presença da catalase foi observada a partir da formação de bolhas de ar, indicativo de teste positivo para catalase (MADIGAN *et al.*, 2016).

2.4.2 KOH 3%

A reação de Gram direto foi realizada com hidróxido de potássio (KOH) 3%, com o objetivo de confirmar o resultado obtido através da coloração de Gram. Em lâmina microscópica foi adicionado uma gota de KOH 3% e uma alçada bacteriana foi homogeneizada. Como resultado, bactérias Gram-negativas apresentaram viscosidade devido a dissolução de sua parede celular, permitindo que seu DNA entra em contato com o reagente, sendo considerada positivas no teste. Já as bactérias Gram-positivas não apresentaram viscosidade, pois as paredes celulares destas por serem mais espessas não foram lisadas, sendo negativas para o teste (BRASIL, 2010; OLIVEIRA, 2000).

2.5 Análises Moleculares

As análises moleculares foram realizadas no laboratório de Biologia Molecular – ICB2/UFAM e no Centro Acadêmico Multidisciplinar-CAM.

Os isolados bacterianos foram reativados em placa de petri, cada um em seu meio de origem, e incubados por 48 horas à 35 °C. A extração do DNA foi realizada usando um kit de

isolamento de DNA genômico de bactérias QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook (QIAGEN Sample and Assay Technologies), seguindo as recomendações do fabricante. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foi realizada a partir de oligonucleotídeos iniciadores de DNA (*primers*) desenhados com base nas sequências nucleotídicas que compõem as regiões variáveis V1 e V9 do gene bacteriano 16S rRNA (ROMERO et al. 2019). Os iniciadores utilizados na reação são 27F-5'-AGRGTTYGATYMTGGCTCAG-3'; 907R-5' CCGTCAATTCMTTTRRAGTTT – 3', gerando fragmentos de ~880 pares de bases. A amplificação foi realizada em uma reação de 25 µL contendo 2 µL de DNA genômico, 0,3 µL de Taq DNA polimerase - *Platinum*® 5 U/µL, 1,25 µL de tampão de reação (10 ×), 2,5 µL de dNTPs (2,5 mM cada), 2,5 µL de MgCl (50 mM), 0,5 µL de cada primer (10 µM) e 15,95 µL de água Milli-Q estéril com a seguinte programação: 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s; anelamento a 55 °C por 30 s; extensão a 72 °C por 40 s e extensão final a 72 °C por 5 min. Os amplicons foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v), purificados com kit de purificação de bandas de gel PCR clean-up Gel extraction (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) e sequenciados seguindo o protocolo BigDye® V3.1 em um sequenciador ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA).

2.5.1 Identificação taxonômica

As sequências obtidas foram avaliadas quanto a sua qualidade e alinhadas utilizando o programa MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018). O alinhamento comparativo das sequências foi no banco de dados do *GenBank* por meio da ferramenta BLASTn (ALTSCHUL, *et al.*, 1990) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), na qual foram consideradas sequências do com no mínimo >95% de identidade taxonômica.

2.5.2 Filogenia

A análise filogenética foi conduzida pelo programa MEGA X versão 10.2.6 e o modelo evolutivo utilizado foi realizado pelas inferências de *Neighbor-Joining* e as distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de máxima verossimilhança (SAITOU; NEI, 1987; TAMURA; NEI; KUMAR, 2004; KUMAR *et al.*, 2018)

3 RESULTADOS

3.1 Coleta, Isolamento e purificação

Os *pools* intestinais por colônias foram plaqueados em cinco meios de cultura (ágar MRS, ágar TSA, ágar TSA+ 5% sangue desfibrinado, ágar SDA, ágar BHI), em triplicata, e após 48 horas foi realizado a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC), como mostrado na tabela 2. Os meios TSA, TSA+Sangue e BHI, renderam maior densidade populacional bacteriana.

Foram obtidos um total de 110 bactérias no primeiro isolamento, tendo perda de 34 bactérias devido sensibilidade da mesma quanto técnica utilizada (dependente de cultura), sendo 76 bactérias foram purificadas e identificadas.

Tabela 2. Densidade populacional bacteriana expressa em UFC/g⁻¹ de amostra intestinal de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta* em diferentes meios de cultura.

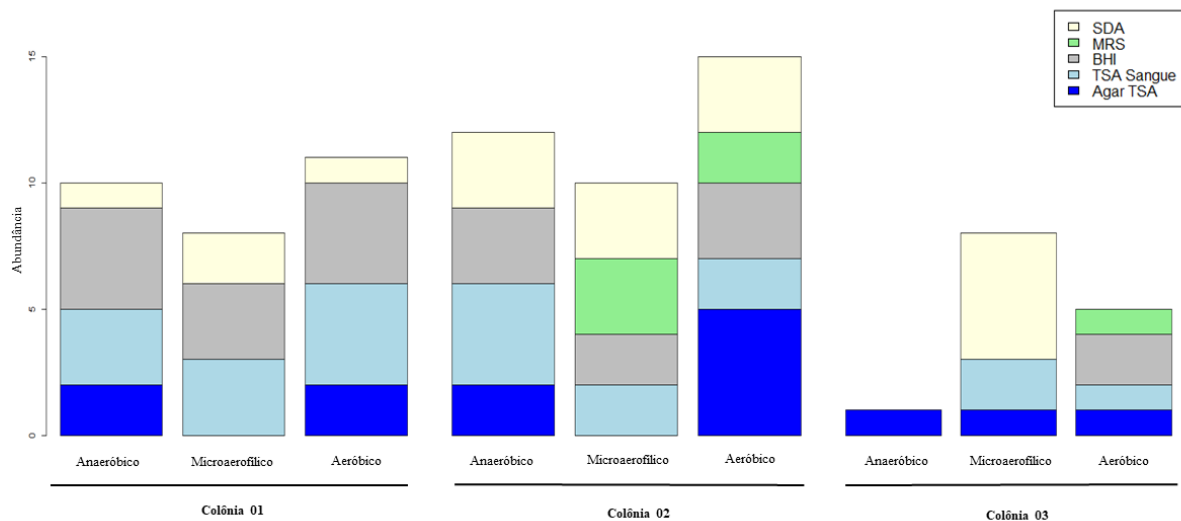
Meio de Cultura	Diluições	Colônia 01			Colônia 02			Colônia 03		
		Anaeróbico	Microaerofílico	Aeróbico	Anaeróbico	Microaerofílico	Aeróbico	Anaeróbico	Microaerofílico	Aeróbico
TSA	10 ⁻¹	8,1 x 10 ⁴	6,2 x 10 ³	5,6 x 10 ¹	8,2 x 10 ³	8,2 x 10 ³	1,0 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁴	3,7 x 10 ²
	10 ⁻²	7,7 x 10 ³	1,1 x 10 ³	1,3 x 10 ³	3,2 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁴	1,8 x 10 ⁴	3,1 x 10 ⁵	3,7 x 10 ⁵	1,6 x 10 ²
	10 ⁻³	7,2 x 10 ⁴	3,0 x 10 ³	1,5 x 10 ⁴	4,0 x 10 ⁴	3,3 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁴	5,4 x 10 ⁵	6,0 x 10 ⁵	<1
	10 ⁻⁴	<1	3,3 x 10 ³	<1	2,6 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁴	1,8 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁵	<1
	10 ⁻⁵	7,0 x 10 ⁵	<1	6,6 x 10 ⁴	<1	3,3 x 10 ⁴	<1	2,3 x 10 ⁶	8,0 x 10 ⁵	<1
TSA + Sangue	10 ⁻¹	1,9 x 10 ⁴	5,1 x 10 ³	1,4 x 10 ²	1,0 x 10 ⁴	4,4 x 10 ³	7,3 x 10 ³	1,1 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁴
	10 ⁻²	1,0 x 10 ³	1,3 x 10 ²	2,9 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁴	1,7 x 10 ⁴	1,3 x 10 ³	4,6 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁵	2,8 x 10 ⁴
	10 ⁻³	2,4 x 10 ⁴	3,3 x 10 ²	<1	2,8 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁴	5,4 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁵
	10 ⁻⁴	3,3 x 10 ³	<1	3,3 x 10 ³	2,3 x 10 ⁴	4,3 x 10 ⁴	3,3 x 10 ⁴	6,0 x 10 ⁵	1,6 x 10 ⁶	6,6 x 10 ³
	10 ⁻⁵	3,3 x 10 ⁴	<1	<1	<1	3,3 x 10 ⁴	6,6 x 10 ⁴	1,7 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁶	<1
BHI	10 ⁻¹	7,3 x 10 ¹	8,0 x 10 ¹	1,1 x 10 ²	9,5 x 10 ³	4,9 x 10 ³	9,0 x 10 ³	9,5 x 10 ⁴	3,7 x 10 ⁴	2,3 x 10 ¹
	10 ⁻²	1,9 x 10 ³	5,2 x 10 ³	1,2 x 10 ³	7,9 x 10 ³	9,3 x 10 ³	1,1 x 10 ⁴	3,1 x 10 ⁵	2,0 x 10 ⁵	4,3 x 10 ²
	10 ⁻³	3,3 x 10 ³	7,7 x 10 ⁴	3,3 x 10 ²	1,9 x 10 ⁴	8,6 x 10 ³	4,0 x 10 ⁴	2,6 x 10 ⁶	8,2 x 10 ⁵	<1
	10 ⁻⁴	2,6 x 10 ⁴	4,0 x 10 ⁴	3,3 x 10 ³	1,3 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁴	5,3 x 10 ⁴	1,8 x 10 ⁶	6,1 x 10 ⁵	<1
	10 ⁻⁵	1,6 x 10 ⁶	6,3 x 10 ⁵	3,6 x 10 ⁵	<1	6,6 x 10 ⁴	3,3 x 10 ⁵	8,6 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁵	<1
MRS	10 ⁻¹	2,5 x 10 ²	1,2 x 10 ²	2,0 x 10 ¹	8,4 x 10 ³	6,6 x 10 ³	7,1 x 10 ³	2,0 x 10 ¹	<1	3,3 x 10
	10 ⁻²	8,6 x 10 ²	4,0 x 10 ²	5,6 x 10 ²	9,7 x 10 ³	9,8 x 10 ³	8,9 x 10 ³	<1	<1	<1
	10 ⁻³	<1	3,3 x 10 ³	3,3 x 10 ²	1,1 x 10 ⁴	9,6 x 10 ³	3,8 x 10 ⁴	<1	<1	<1
	10 ⁻⁴	<1	<1	<1	3,3 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁴	3,6 x 10 ⁴	<1	<1	<1
	10 ⁻⁵	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
SDA	10 ⁻¹	2,0 x 10 ¹	4,6 x 10 ¹	7,0 x 10 ¹	1,5 x 10 ⁴	1,1 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁴	3,4 x 10 ³	<1	<1
	10 ⁻²	8,6 x 10 ²	5,6 x 10 ²	3,1 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁴	2,7 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁵	<1	<1	<1
	10 ⁻³	1,0 x 10 ³	1,6 x 10 ³	2,6 x 10 ³	9,1 x 10 ⁴	4,0 x 10 ⁵	3,6 x 10 ⁴	<1	<1	<1
	10 ⁻⁴	<1	<1	<1	3,3 x 10 ³	2,5 x 10 ⁵	3,3 x 10 ³	<1	<1	<1
	10 ⁻⁵	<1	<1	<1	<1	<1	3,3 x 10 ⁴	<1	<1	3,3 x 10 ³

3.2 Caracterização dos isolados bacterianos

As bactérias obtidas dos isolamentos foram analisadas segundo as suas características macroscópicas e microscópicas com auxílio da técnica de coloração de Gram, que permite direcionar o processo de identificação, como resultado foram obtidas trinta e quatro bactérias Gram-negativas e quarenta e duas Gram-positiva (Tabela 3).

Da Colônia 1 obteve-se dez bactérias isoladas em anaerobiose, oito bactérias em microaerofilia e 11 bactérias em aerobiose. Sendo os meios de cultura com maior número de microrganismos crescidos o ágar BHI, seguido de TSA+Sangue, e não se isolou microrganismos em ágar MRS. Já na Colônia 2, foram obtidas 12 bactérias isoladas em anaerobiose, 10 bactérias em microaerofilia e 15 bactérias em aerobiose, sendo o ágar SDA o que obteve maior número de bactérias isoladas e o meio ágar MRS o menor número. Por sua vez, da colônia 3 obteve-se o menor número de microrganismos isolados, sendo 1 bactéria em anaerobiose, 4 em microaerofilia e 5 em aerobiose, sendo o meio SDA o que obteve maior número de isolados bacterianos e ágar MRS o menor número (Figura 12).

Figura 12. Quantitativo de colônias obtidas frente às condições e meios de cultivo bacteriano.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3. Caracterização Morfológica das colônias bacterianas isoladas de intestino de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta*.

Identificação da amostra	Forma	Borda	Elevação	Densidade	Cor	Aparência da colônia	Aparência do muco	Textura do muco	Muco	Coloração de Gram	Morfologia
C1M1D2AN 1	Circular	Regular	Plana	Transparente	Creme	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	-	Bastonetes
C1M1D5AN 2	Circular	Regular	Plana	Transparente	Salmon	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	+	Bastonetes
C1M2D1AN 3	Irregular	Regular	Plana	Transparente	Creme	Heterogênea	Homogênea	Viscoso	Moderado	-	Bastonetes
C1M2D1AN 4	Circular	Regular	Plana	Opaca	Branca	Heterogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	+	Estafilococcus
C1M2D1AN 5	Irregular	Regular	Plana	Transparente	Branca	Heterogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	-	Bastonetes
C1M3D2AN 6	Circular	Regular	Plana	Transparente	Creme	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	-	Bastonetes
C1M3D2AN 7	Circular	Regular	Plana	Transparente	Creme	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	-	Bastonetes
C1M3D2AN 8	Circular	Regular	Plana	Transparente	Creme	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	-	Bastonetes
C1M3D2AN 9	Circular	Regular	Plana	Opaca	Branca	Homogênea	Homogênea	Leitosa	Pouco	-	Bastonetes
C1M5D1AN 10	Irregular	Regular	Plana	Transparente	Creme	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	+	Bastonetes
C1M2D1MI 11	Irregular	Irregular	Plana	Opaca	Branca	Heterogênea	Heterogênea	Viscoso	Muito	+	Bastonetes
C1M2D1MI 12	Circular	Irregular	Plana	Opaca	Creme	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Moderado	-	Bastonetes
C1M2D2MI 13	Circular	Irregular	Plana	Opaca	Branca	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Muito	-	Bastonetes
C1M3D1MI 14	Circular	Regular	Plana	Transparente	Creme	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Moderado	+	Bastonetes
C1M3D1MI 15	Circular	Regular	Plana	Transparente	Creme	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Moderado	+	Bastonetes
C1M3D1MI 16	Circular	Regular	Elevada	Opaca	Branca	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Moderado	-	Bastonetes
C1M5D1MI 17	Irregular	Irregular	Plana	Opaca	Creme	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	+	Bastonetes
C1M5D1MI 18	Circular	Regular	Plana	Opaca	Creme	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	+	Bastonetes
C1M1D1AE 19	Circular	Regular	Elevada	Opaca	Branca	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	+	Diplococos
C1M2D2AE 20	Circular	Regular	Plana	Transparente	Creme	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Moderado	-	Bastonetes
C1M1D2AE 21	Irregular	Regular	Plana	Opaca	Creme	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	-	Bastonetes
C1M2D1AE 22	Circular	Regular	Plana	Opaca	Branca	Heterogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	-	Bastonetes
C1M2D2AE 23	Irregular	Regular	Plana	Transparente	Creme	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	+	Cocos
C1M2D2AE 24	Circular	Regular	Plana	Opaca	Branca	Heterogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	-	Bastonetes
C1M3D1AE 25	Circular	Regular	Plana	Transparente	Amarela	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	+	Cocos
C1M3D2AE 26	Circular	Regular	Plana	Transparente	Rosa	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	+	Bastonetes
C1M3D2AE 27	Irregular	Regular	Elevada	Opaca	Creme	Homogênea	Homogênea	Leitosa	Pouco	+	Bastonetes
C1M3D2AE 28	Circular	Regular	Plana	Opaca	Creme	Homogênea	NA	Seca	NA	+	Bastonetes
C1M5D2AE 29	Irregular	Irregular	Plana	Opaca	Creme	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	-	Bastonetes

C2M1D2AN 30	Irregular	Irregular	Plana	Transparente	Creme	Homogênea	NA	Seca	NA	-	Bastonetes
C2M1D3AN 31	Circular	Regular	Plana	Transparente	Creme	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	-	Bastonetes
C2M2D2AN 32	Circular	Irregular	Plana	Transparente	Creme	Homogênea	NA	Seca	NA	+	Bastonetes
C2M2D2AN 33	Circular	Regular	Elevada	Opaca	Branca	Heterogênea	NA	Seca	NA	+	Cocos
C2M2D2AN 34	Circular	Regular	Plana	Opaca	Creme	Heterogênea	Heterogênea	Viscoso	Pouco	-	Bastonetes
C2M2D3AN 35	Irregular	Irregular	Plana	Transparente	Creme	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	-	Bastonetes
C2M3D3AN 36	Irregular	Irregular	Plana	Transparente	Creme	Heterogênea	NA	Seca	NA	+	Bastonetes
C2M3D3AN 37	Circular	Regular	Elevada	Opaca	Creme	Heterogênea	NA	Seca	NA	-	Bastonetes
C2M3D3AN 38	Irregular	Irregular	Plana	Opaca	Creme	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Moderado	-	Bastonetes
C2M5D3AN 39	Circular	Regular	Elevada	Opaca	Branca	Heterogênea	NA	Seca	NA	-	Bastonetes
C2M5D3AN 40	Circular	Regular	Elevada	Opaca	Creme	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	-	Bastonetes
C2M5D3AN 41	Circular	Regular	Plana	Opaca	Branca	Homogênea	NA	Seca	NA	+	Cocos
C2M4D2MI 42	Circular	Regular	Elevada	Opaca	Branca	Homogênea	Homogênea	Leitosa	Pouco	+	Cocos
C2M2D2MI 43	Irregular	Irregular	Plana	Opaca	Creme	Heterogênea	Heterogênea	Leitosa	Moderado	-	Bastonetes
C2M2D4MI 44	Irregular	Irregular	Elevada	Transparente	Branca	Homogênea	NA	Seca	NA	+	Cocos
C2M3D2MI 45	Irregular	Irregular	Plana	Opaca	Branca	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Moderado	-	Bastonetes
C2M3D2MI 46	Irregular	Irregular	Plana	Opaca	Branca	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Moderado	-	Bastonetes
C2M5D3MI 47	Circular	Regular	Plana	Opaca	Branca	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Moderado	-	Bastonetes
C2M5D3MI 48	Circular	Regular	Plana	Opaca	Branca	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	+	Cocos
C2M5D3MI 49	Circular	Regular	Plana	Opaca	Branca	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	+	Cocos
C2M4D1MI 50	Circular	Regular	Plana	Opaca	Branca	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	+	Cocos
C2M4D1MI 51	Circular	Regular	Plana	Opaca	Branca	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	+	Cocos
C2M1D3AE 52	Irregular	Irregular	Plana	Transparente	Branca	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	+	Bastonetes
C2M1D3AE 53	Irregular	Irregular	Elevada	Transparente	Creme	Homogênea	Homogênea	Leitosa	Moderado	-	Bastonetes
C2M2D3AE 54	Irregular	Irregular	Plana	Transparente	Branca	Homogênea	NA	Seca	NA	+	Cocos
C2M2D3AE 55	Irregular	Irregular	Plana	Opaca	Branca	Homogênea	Homogênea	Leitosa	Pouco	-	Bastonetes
C2M3D2AE 56	Irregular	Irregular	Plana	Transparente	Branca	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	+	Cocos
C2M3D2AE 57	Irregular	Irregular	Elevada	Opaca	Branca	Homogênea	Homogênea	Leitosa	Moderado	-	Bastonetes
C2M3D3AE 58	Circular	Regular	Plana	Opaca	Amarela	Homogênea	Homogênea	Leitosa	Moderado	+	Cocos
C2M5D3AE 59	Circular	Regular	Plana	Opaca	Branca	Homogênea	NA	Seca	NA	+	Cocos
C2M5D3AE 60	Circular	Regular	Plana	Opaca	Creme	Homogênea	Homogênea	Leitosa	Pouco	+	Bastonetes
C2M5D3AE 61	Circular	Regular	Elevada	Opaca	Branca	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	-	Bastonetes

C2M4D2AE 62	Circular	Regular	Plana	Opaca	Branca	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	+	Cocos
C2M4D2AE 63	Circular	Regular	Elevada	Opaca	Branca	Homogênea	NA	Seca	NA	+	Cocos
C2M1D2AE 64	Irregular	Irregular	Plana	Opaca	Branca	Homogênea	Homogênea	Leitosa	Moderado	-	Bastonetes
C2M1D2AE 65	Irregular	Irregular	Plana	Transparente	Branca	Homogênea	NA	Seca	NA	+	Cocos
C2M1D2AE 66	Circular	Regular	Plana	Transparente	Branca	Homogênea	Homogênea	Viscoso	Pouco	+	Bastonetes
C3M1D1AN 67	Irregular	Irregular	Plana	Transparente	Creme	Homogênea	Homogênea	viscoso	Pouco	+	Bastonetes
C3M1D2MI 68	Irregular	Irregular	Plana	Opaca	Creme	Heterogênea	Heterogênea	Leitosa	Moderado	+	Bastonetes
C3M2D2MI 69	Circular	Regular	Plana	Opaca	Azul	Heterogênea	Heterogênea	Seca	Moderado	-	Bastonetes
C3M2D2MI 70	Circular	Regular	Plana	Opaca	Azul	Heterogênea	Heterogênea	Seca	Pouco	-	Bastonetes
C3M5D1MI 71	Circular	Regular	Plana	Opaca	Azul	Heterogênea	Heterogênea	Seca	Pouco	+	Bastonetes
C3M1D1AE 72	Circular	Regular	Elevada	Opaca	Amarela	Homogênea	Homogênea	Leitosa	Pouco	+	Cocos
C3M2D4AE 73	Circular	Regular	Elevada	Opaca	Rosa	Homogênea	Homogênea	Leitosa	Pouco	+	Bastonetes
C3M3D2AE 74	Circular	Regular	Elevada	Opaca	Branca	Homogênea	Homogênea	Leitosa	Pouco	+	Estafilococos
C3M3D1AE 75	Irregular	Irregular	Elevada	Opaca	Branca	Heterogênea	Homogênea	Leitosa	Pouco	+	Bastonetes
C3M4D1AE 76	Circular	Regular	Elevada	Transparente	Creme	Homogênea	NA	Seca	NA	+	Cocos

Fonte: Elaborado pela autora

Para complementar as análises morfológicas foram realizadas provas bioquímicas, utilizadas na rotina do laboratório de microbiologia. Foram realizadas a técnica do KOH 3%, para a confirmação do teste Gram das bactérias e o teste de catalase para verificação da capacidade de decomposição de peróxido de hidrogénio (H₂O₂). Vinte e três bactérias foram catalase negativa e 53 bactérias catalase positiva (Tabela 4).

Tabela 4. Caracterização bioquímica das colônias bacterianas isoladas.

Identificação da amostra	KOH 3%	Catalase	Identificação da amostra	KOH 3%	Catalase
C1M1D2AN 1	-	+	C2M5D3AN 39	-	+
C1M1D5AN 2	+	+	C2M5D3AN 40	-	+
C1M2D1AN 3	-	+	C2M5D3AN 41	+	-
C1M2D1AN 4	+	+	C2M4D2MI 42	+	-
C1M2D1AN 5	-	+	C2M2D2MI 43	-	+
C1M3D2AN 6	-	+	C2M2D4MI 44	+	-
C1M3D2AN 7	-	+	C2M3D2MI 45	-	+
C1M3D2AN 8	-	+	C2M3D2MI 46	-	+
C1M3D2AN 9	-	+	C2M5D3MI 47	-	+
C1M5D1AN 10	+	+	C2M5D3MI 48	+	-
C1M2D1MI 11	+	+	C2M5D3MI 49	+	-
C1M2D1MI 12	-	+	C2M4D1MI 50	+	-
C1M2D2MI 13	-	+	C2M4D1MI 51	+	-
C1M3D1MI 14	+	-	C2M1D3AE 52	+	+
C1M3D1MI 15	+	-	C2M1D3AE 53	-	+
C1M3D1MI 16	-	+	C2M2D3AE 54	+	-
C1M5D1MI 17	+	+	C2M2D3AE 55	-	+
C1M5D1MI 18	+	+	C2M3D2AE 56	+	-
C1M1D1AE 19	+	-	C2M3D2AE 57	-	-
C1M2D2AE 20	-	+	C2M3D3AE 58	+	+
C1M1D2AE 21	-	+	C2M5D3AE 59	+	+
C1M2D1AE 22	-	+	C2M5D3AE 60	+	+
C1M2D2AE 23	+	-	C2M5D3AE 61	-	+
C1M2D2AE 24	-	+	C2M4D2AE 62	+	-
C1M3D1AE 25	+	-	C2M4D2AE 63	+	-
C1M3D2AE 26	+	+	C2M1D2AE 64	-	-
C1M3D2AE 27	+	-	C2M1D2AE 65	+	-
C1M3D2AE 28	+	+	C2M1D2AE 66	+	+
C1M5D2AE 29	-	+	C3M1D1AN 67	+	+
C2M1D2AN 30	-	+	C3M1D2MI 68	+	+

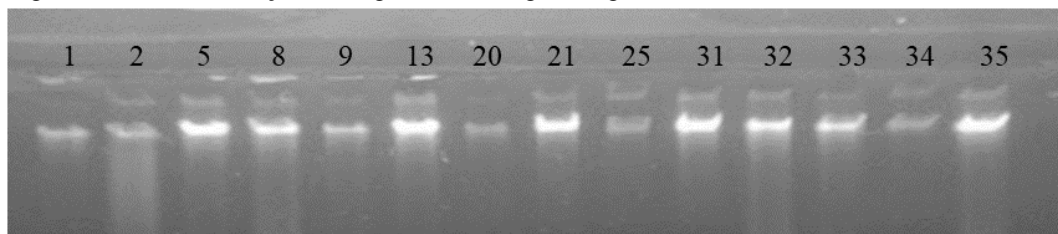
C2M1D3AN 31	-	+	C3M2D2MI 69	-	+
C2M2D2AN 32	+	+	C3M2D2MI 70	-	+
C2M2D2AN 33	+	-	C3M5D1MI 71	+	+
C2M2D2AN 34	-	+	C3M1D1AE 72	+	+
C2M2D3AN 35	-	+	C3M2D4AE 73	+	+
C2M3D3AN 36	+	+	C3M3D2AE 74	+	-
C2M3D3AN 37	-	+	C3M3D1AE 75	+	+
C2M3D3AN 38	-	+	C3M4D1AE 76	+	-

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Análise molecular dos isolados obtidos

A extração de DNA foi realizada e visualizada em gel de agarose 0,8%, como exemplificado na Figura 13, utilizando 14 amostras como exemplo de uma extração bem sucedida. Com as amostras extraídas pode-se seguir para a etapa de amplificação do gene 16S rRNA.

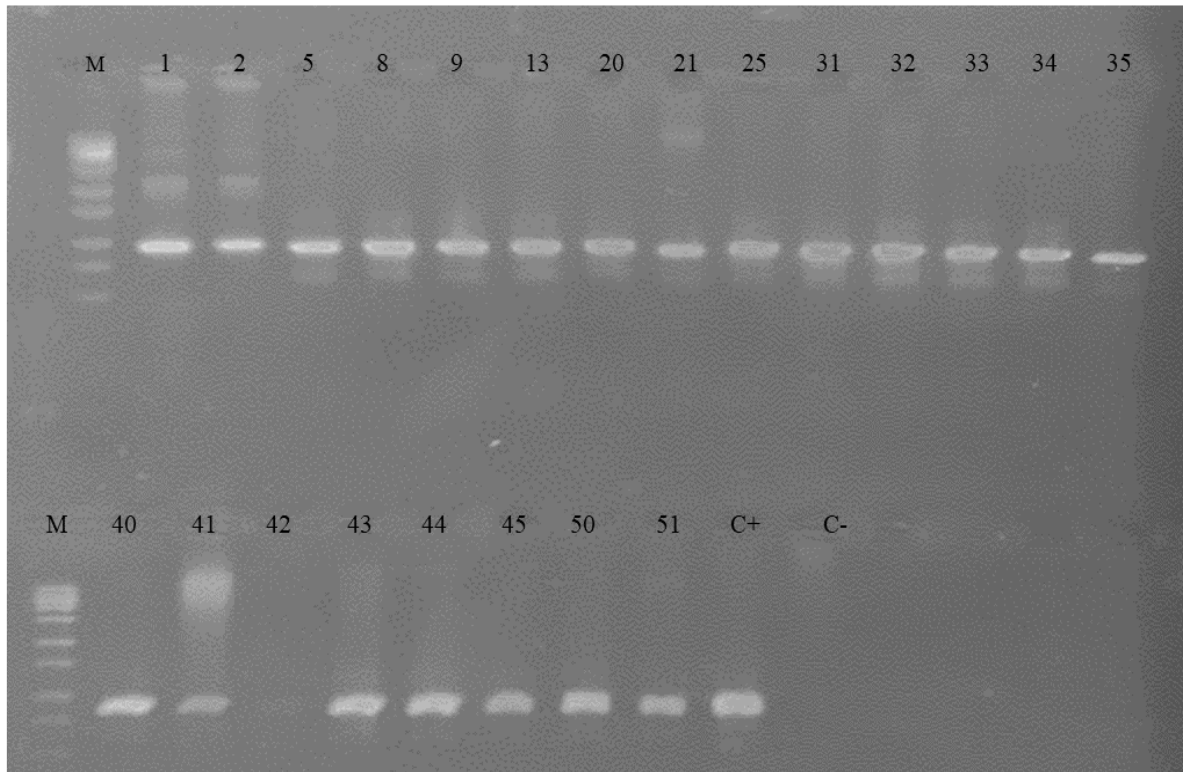
Figura 13. Foto da extração DNA genômico em gel de agarose 0,8%.



Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 14 mostra que o resultado da amplificação do DNA de 22 amostras bacterianas utilizadas neste trabalho, usando os oligonucleotídeos P027F e 907R, que foram capazes de amplificar de forma satisfatória o DNA bacteriano. Após, as amostras foram purificadas e utilizadas para a reação de sequenciamento.

Figura 14. Foto da amplificação do gene 16S rRNA por PCR em gel de agarose a 0,8%, mostrando o tamanho do fragmento de 1,000 pb. Controle positivo (C+): *E.coli* ATCC 25922. (C-): água deionizada. Marcador 1Kb Bioscience (M).

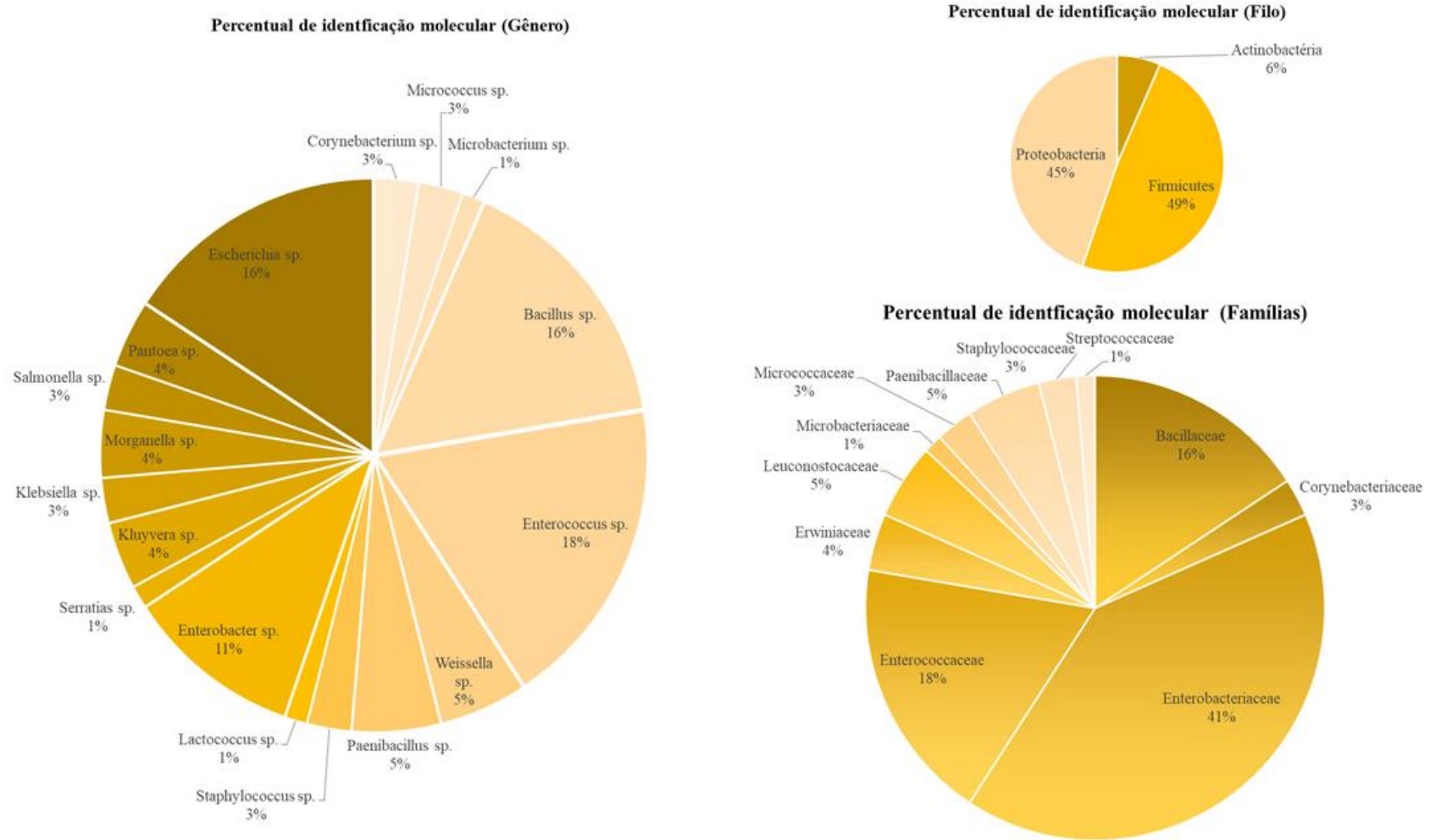


Fonte: Elaborada pela autora.

A identificação molecular foi realizada com os 76 microrganismos isolados, a partir do alinhamento comparativo entre espécies obtidos a partir do banco de dados do BLAST (Tabela 5). Foram encontrados 3 filos bacterianos: Actinobactérias, Proteobactérias e Firmicutes, divididos em 11 famílias bacterianas: Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Enterococcaceae, Bacillaceae, Corynebacteriaceae, Enterobacteriaceae, Erwiniaceae, Lactobacillaceae, Microbacteriaceae, Micrococcaceae e Paenibacillaceae. Pertencentes a família Enterobacteriaceae (41%), sendo esta a mais representativa, onde foram identificadas 18 bactérias do gênero *Escherichia* spp., 12 *Enterobacter* spp., 2 *Klebsiella* sp., 3 *Kluyvera* sp., 3 *Morganella* sp., 2 de *Salmonella* spp., e 1 uma *Serratia* sp. A segunda família mais abundante é Enterococcaceae (18%), com 14 bactérias do gênero *Enterococcus* spp. Seguido da família Bacillaceae (16%), com 12 bactérias do gênero *Bacillus* spp. Família Paenibacillaceae (5%) com 4 bactérias do gênero *Paenibacillus* spp., Família Leuconostocaceae (5%) com 4 bactérias *Weissella* sp. Família Erwiniaceae (4%) com 3 bactérias *Pantoea* sp. Família Staphylococcaceae (3%) com 2 bactéria do gênero *Staphylococcus* spp. Família

Micrococcaceae (3%) com o gênero *Micrococcus* spp. Família Corynebacteriaceae (3), 2 bactéria *Corynebacterium* sp., e 1% das famílias Microbacteriaceae e Streptococcaceae com 1 bactéria, cada, *Microbacterium* sp. e *Lactococcus* sp, respectivamente (Figura 15).

Figura 15. Percentual de identificação molecular do gene 16s rRNA por Filo, Família e Gênero.



Fonte: Elaborada pela autora.

Das 11 famílias estudadas foi possível identificar 56 bactérias em nível de espécie, sendo 1 uma possível *Pantoea dispersa* C1M3D2AN 7, que obteve apenas 41% de cobertura com 98,33% de identidade e outra possível *Escherichia coli* C2M5D3AN 39 com 75% de cobertura e 97,57% de identidade e as demais obtiveram >95% de cobertura e identificação taxonômica. Foram identificadas 20 bactérias a nível de gênero, sendo duas bactérias do gênero *Salmonella* sp. C3M2D2MI 69 e C3M2D2MI 70 com 99% de cobertura e 93,02%, 93,23% de identificação, respectivamente, e o restante obteve cobertura e identificação taxonômica >95% (Tabela 5).

Tabela 5. Identificação molecular dos microrganismos de acordo com identidade de sequências via banco de dados do GenBank por meio da ferramenta BLASTn do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

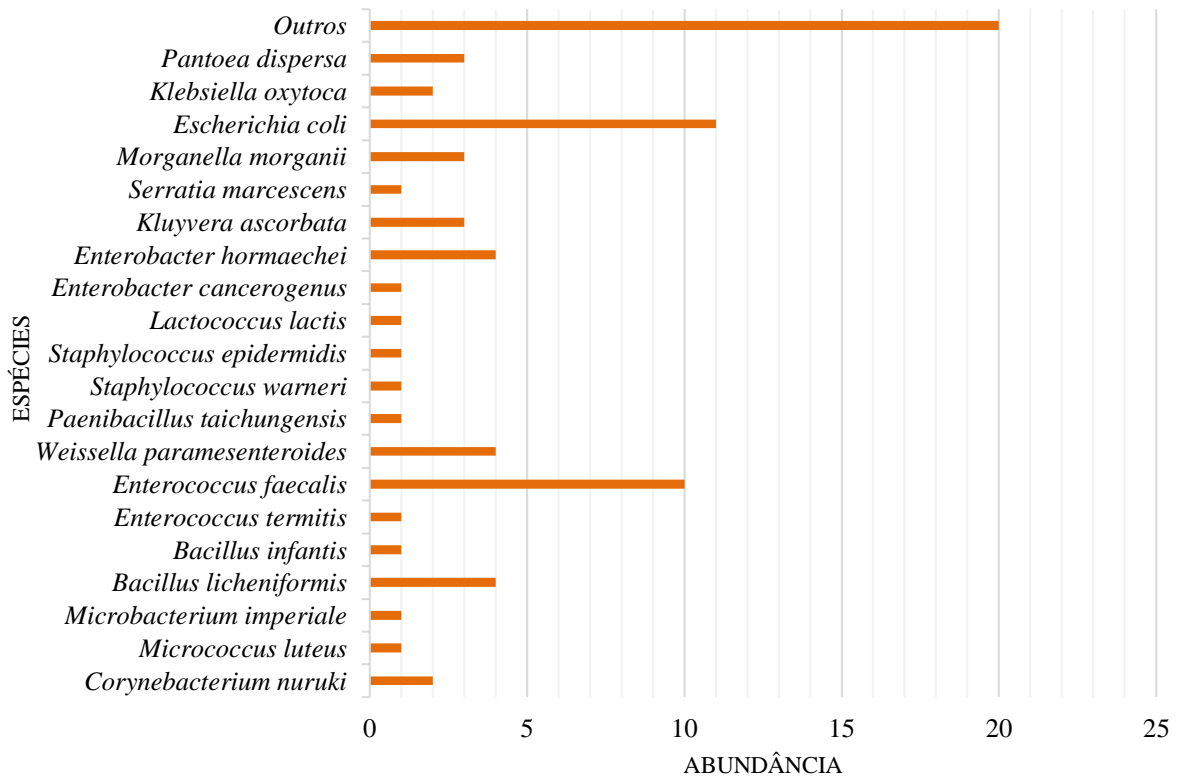
Identificação da amostra	Microrganismo	Cobertura (%)	ID (%)	Número de Acesso
C1M1D2AN 1	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	100%	99,76%	MF457527.1
C1M1D5AN 2	<i>Paenibacillus</i> sp.	100%	99,76%	OK067440.1
C1M2D1AN 3	<i>Enterobacter hormaechei</i>	100%	99,88%	CP083472.1
C1M2D1AN 4	<i>Staphylococcus warneri</i>	100%	100,00%	MT642942.1
C1M2D1AN 5	<i>Kluyvera ascorbata</i>	99%	98,95%	AP022665.1
C1M3D2AN 6	<i>Enterobacter</i> sp.	100%	90,95%	JF513187.1
C1M3D2AN 7	<i>Pantoea dispersa?</i>	41%	98,33%	KM402116.1
C1M3D2AN 8	<i>Enterobacter</i> sp.	99%	99,28%	KM242536.1
C1M3D2AN 9	<i>Enterobacter hormaechei</i>	99%	99,30%	CP083472.1
C1M5D1AN 10	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	98%	99,08%	JX010963.1
C1M2D1MI 11	<i>Bacillus</i> sp.	100%	99,88%	KX622635.1
C1M2D1MI 12	<i>Serratia marcescens</i>	100%	100,00%	MG516125.1
C1M2D2MI 13	<i>Enterobacter hormaechei</i>	99%	99,75%	CP083472.1
C1M3D1MI 14	<i>Paenibacillus</i> sp.	98%	99,75%	KJ725141.1
C1M3D1MI 15	<i>Enterococcus</i> sp.	100%	99,05%	MK617519.1
C1M3D1MI 16	<i>Enterobacter hormaechei</i>	98%	97,12%	KY859831.1
C1M5D1MI 17	<i>Bacillus licheniformis</i>	100%	99,36%	MT487695.1
C1M5D1MI 18	<i>Paenibacillus</i> sp.	100%	99,75%	KJ725141.1
C1M1D1AE 19	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	99,76%	MT645510.1
C1M2D2AE 20	<i>Pantoea dispersa</i>	100%	99,88%	MH465010.1
C1M1D2AE 21	<i>Enterobacter</i> sp.	97%	98,96%	KM242536.1
C1M2D1AE 22	<i>Kluyvera ascorbata</i>	96%	98,57%	KT260530.1
C1M2D2AE 23	<i>Enterococcus</i> sp.	95%	99,76%	MZ562888.1
C1M2D2AE 24	<i>Kluyvera ascorbata</i>	99%	98,70%	KT260530.1
C1M3D1AE 25	<i>Enterococcus termitis</i>	96%	98,71%	MT760127.1
C1M3D2AE 26	<i>Bacillus</i> sp.	100%	100,00%	MT571639.1
C1M3D2AE 27	<i>Microbacterium imperiale</i>	95%	97,06%	MT803959.1
C1M3D2AE 28	<i>Corynebacterium nuruki</i>	97%	99,51%	MH429848.1
C1M5D2AE 29	<i>Pantoea dispersa</i>	100%	100,00%	HM583993.1
C2M1D2AN 30	<i>Morganella morganii</i>	100%	99,76%	CP068145.1

C2M1D3AN 31	<i>Escherichia coli</i>	100%	99,15%	KM200314.1
C2M2D2AN 32	<i>Bacillus licheniformis</i>	100%	99,38%	MT487695.1
C2M2D2AN 33	<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	100,00%	MT611694.1
C2M2D2AN 34	<i>Escherichia coli</i>	99%	99,31%	CP053296.1
C2M2D3AN 35	<i>Morganella morganii</i>	97%	99,64%	MN807694.1
C2M3D3AN 36	<i>Bacillus</i> sp.	91%	96,04%	MK757660.1
C2M3D3AN 37	<i>Escherichia coli</i>	100%	98,85%	KP789334.1
C2M3D3AN 38	<i>Escherichia coli</i>	99%	99,17%	CP025739.1
C2M5D3AN 39	<i>Escherichia coli</i>	75%	97,57%	KP789329.1
C2M5D3AN 40	<i>Escherichia coli</i>	99%	99,53%	HM584002.1
C2M5D3AN 41	<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	99,76%	MT158863.1
C2M4D2MI 42	<i>Weissella paramesenteroides</i>	100%	99,29%	MT613634.1
C2M2D2MI 43	<i>Escherichia coli</i>	100%	99,63%	OK175786.1
C2M2D4MI 44	<i>Enterococcus faecalis</i>	99%	100,00%	MT211551.1
C2M3D2MI 45	<i>Escherichia coli</i>	100%	99,19%	MT180571.1
C2M3D2MI 46	<i>Escherichia coli</i>	100%	99,30%	CP069438.1
C2M5D3MI 47	<i>Klebsiella oxytoca</i>	97%	95,22%	CP072914.1
C2M5D3MI 48	<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	99,88%	MT611645.1
C2M5D3MI 49	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99%	99,24%	KX246785.1
C2M4D1MI 50	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99%	99,24%	KX246785.1
C2M4D1MI 51	<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	100,00%	MT611694.1
C2M1D3AE 52	<i>Bacillus</i> sp.	100%	99,06%	OK325876.1
C2M1D3AE 53	<i>Escherichia coli</i>	100%	99,39%	CP076305.1
C2M2D3AE 54	<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	100,00%	OK135660.1
C2M2D3AE 55	<i>Escherichia</i> sp.	99%	99,52%	gi 2103567832 OK326499.1
C2M3D2AE 56	<i>Enterococcus faecalis</i>	99%	99,60%	MT611694.1
C2M3D2AE 57	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99%	96,53%	MK000711.1
C2M3D3AE 58	<i>Micrococcus luteus</i>	100%	99,88%	MH669309.1
C2M5D3AE 59	<i>Enterococcus faecalis</i>	99%	99,88%	MT158863.1
C2M5D3AE 60	<i>Corynebacterium nuruki</i>	98%	99,87%	MH429848.1
C2M5D3AE 61	<i>Morganella morganii</i>	99%	98,48%	CP068145.1
C2M4D2AE 62	<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	99,76%	KM609191.1
C2M4D2AE 63	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99%	99,41%	MH431814.1
C2M1D2AE 64	<i>Escherichia coli</i>	100%	99,14%	KY367386.1
C2M1D2AE 65	<i>Enterococcus</i> sp.	100%	100,00%	LC484732.1
C2M1D2AE 66	<i>Bacillus</i> sp.	98%	99,66%	HM543459.1
C3M1D1AN 67	<i>Bacillus licheniformis</i>	100%	98,85%	MK327813.1
C3M1D2MI 68	<i>Bacillus</i> sp.	100%	100,00%	MW092690.1
C3M2D2MI 69	<i>Salmonella</i> sp.	99%	93,02%	MT729821.1
C3M2D2MI 70	<i>Salmonella</i> sp.	99%	93,23%	MT729821.1
C3M5D1MI 71	<i>Bacillus licheniformis</i>	100%	99,28%	CP065943.1
C3M1D1AE 72	<i>Micrococcus</i> sp.	100%	99,88%	MT634725.1
C3M2D4AE 73	<i>Bacillus infantis</i>	97%	99,53%	KT758480.1
C3M3D2AE 74	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99%	98,52%	MH447044.1
C3M3D1AE 75	<i>Bacillus</i> sp.	100%	99,88%	MN784678.1
C3M4D1AE 76	<i>Enterococcus faecalis</i>	98%	99,32%	MK333650.1

Fonte: Elaborada pela autora.

Das bactérias identificadas a nível de espécies, 20 foram espécies diferente, sendo *Escherichia coli* a mais abundante, seguida de *Enterococcus faecalis*. Além disso, foram encontrados sete gêneros não identificando a nível de espécie as bactérias, sendo: *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Enterococcus* sp. *Micrococcoccus* sp., *Escherichia* sp., *Salmonella* sp., *Paenibacillus* sp., representados como outros na figura 16. Desta, foram encontrados 27 tipos bacterianos diferentes, divididos em 20 espécies e 7 gêneros.

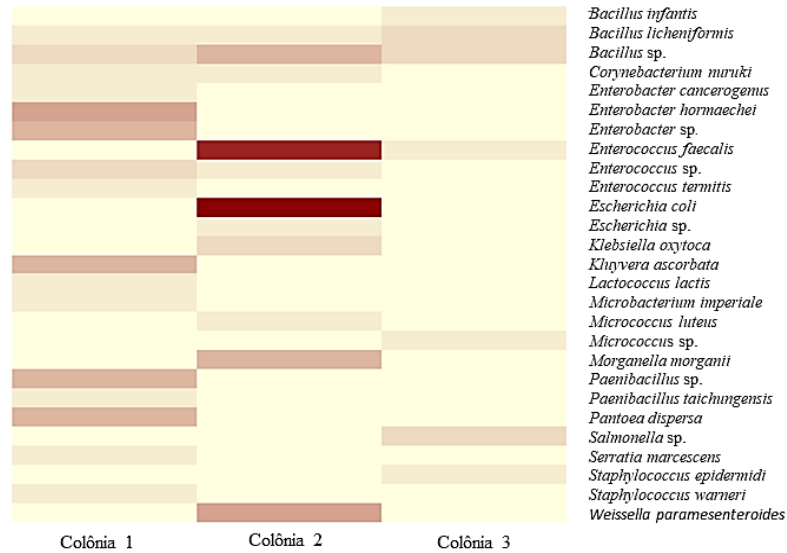
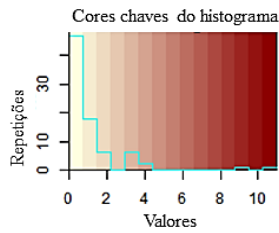
Figura 16. Bactérias encontradas em intestino de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta*.



Os 27 tipos bacterianos encontrados foram colocados e agrupados em mapa de calor (*heat map*) para observar a abundância dos microrganismos em cada (Figura 17). Neste gráfico, é possível notar que a colônia 1 obteve maior diversidade de microrganismos isolados, já a colônia 2 obteve maior abundância de microrganismos, sendo em maior quantidade as famílias Enterobacteriaceae e Enterococcaceae, enquanto a colônia 3 obteve menor diversidade e abundância.

Figura 17. Mapa (*heat map*) de calor dos 27 filotipos bacterianos mais abundantes - OTUs (Linha) e Colônias de abelhas (coluna).

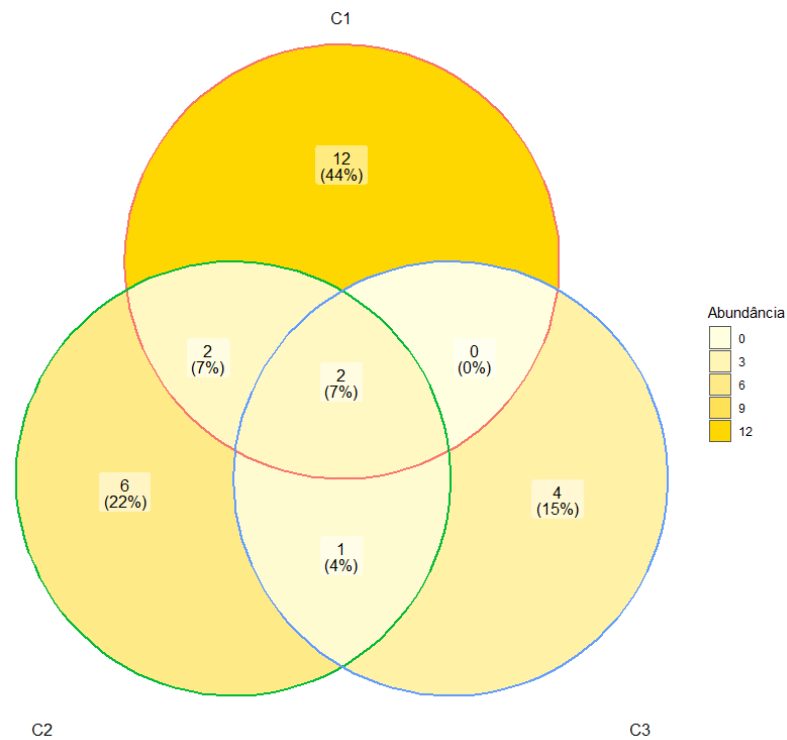
As médias dos tratamentos apresentados pela letra “a” (maior valor), as letras diferentes não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



Mapa de calor (*heat map*) a escala de cor varia de vermelho escuro ao amarelo claro, indicando a abundancia e diversidade dos microrganismos presentes em cada colônia de abelhas. Desse modo, a coloração vermelha escura indica que um microrganismo está mais presente em uma colônia do que em outra e, a maior variedade de tons de vermelho indica maior diversidade por colônia.

Assim, os 27 tipos bacterianos foram agrupados em um conjunto de colônias (Figura 18), onde é possível notar quais as bactérias que elas compartilham entre si. O diagrama mostra que as três colônias (C1, C2, C3) compartilham 2 bactérias, sendo elas *Bacillus licheniformis* e *Bacillus sp.* Já a colônia 1 (C1) e colônia 2 (C2) compartilham 4 bactérias, sendo exclusivo 2 bactérias, *Corynebacterium nuruki* e *Enterococcus sp.* As colônias C1 e C3 compartilham 2 e nenhum microrganismos exclusivo. Já a colônia C2 e C3 compartilham 3 bactérias, sendo apenas 1 bactéria exclusiva dessas duas colônias, *Enterococcus faecalis*.

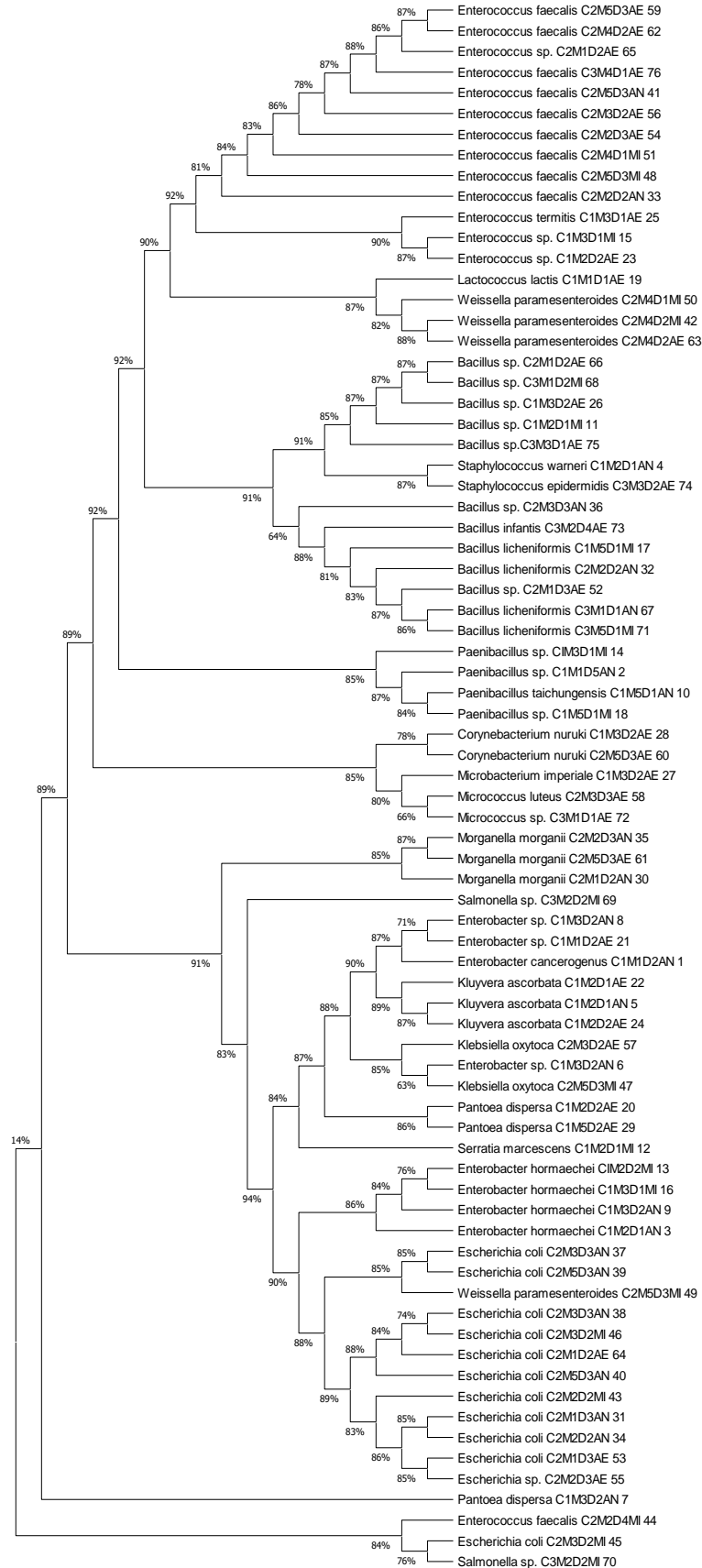
Figura 18. Diagrama de Venn-Euler com o número de filótipos compartilhados entre as três colônias de abelhas estudadas.



Fonte: Elaborada pela autora.

A árvore filogenética foi realizada utilizando o método de *Neighbour-Joining* e a distância evolutiva foi calculada pelo método de Máxima Verossimilhança (Figura 19). A análise envolveu 76 sequências de nucleotídeos, num total de 963 posições no conjunto final. Foi desenhada em escala, com os comprimentos dos ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética.

Figura 19. Árvore filogenética das bactérias produtoras de pigmento isoladas do Intestino de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta*.



Fonte: Elaborada pela autora.

4 DISCUSSÃO

Os insetos vivem em associação com vários microrganismos por meio de interações simbióticas, o que provavelmente contribuiu para seu sucesso evolutivo e adaptativo (KWONG *et al.*, 2017). Além disso, em insetos eussociais, essas interações simbióticas estão relacionadas a uma diversidade de benefícios ao hospedeiro, que em troca de abrigo e alimento, obtém proteção contra patógenos, metabolismo de açúcares tóxicos, nutrição, entre outros (KEŠNEROVÁ *et al.*, 2017; RAYMANN; MORAN, 2018; WU *et al.*, 2020; MORAN *et al.*, 2012).

Em abelhas a associação entre microrganismos e hospedeiro pode estar associada a diversos fatores do estilo de vida, como: alimentação, reprodução e interações sociais (KHAN, *et al.*, 2020; KWONG; MORAN, 2016). A eussocialidade das abelhas pode estar diretamente relacionada ao desenvolvimento e a manutenção de uma microbiota *core*, como já comprovado para o gênero *Apis*, mostrando que ao longo dos anos esses microrganismos foram sendo adquiridos e repassados aos seus descendentes por interações sociais entre as abelhas, o que não é observado em insetos solitários (MARTINSON *et al.*, 2011; MCFREDERICK *et al.*, 2012; KWONG *et al.*, 2017). Entretanto, essa teoria não é comprovada com as abelhas sem ferrão, havendo a necessidade de mais estudos que nos guie quanto à composição do microbioma de meliponini.

Neste trabalho nos concentramos em uma espécie de abelha sem ferrão amplamente distribuída na Amazônia legal, com grande valor social e econômico na meliponicultura, *Scaptotrigona polysticta*, esta espécie até o momento não detém informações sobre sua microbiota intestinal.

Aparentemente, nossos resultados sugerem que o ambiente ao qual as abelhas estão expostas podem afetar a microbiota bacteriana, particularmente na abundância e na diversidade, o que corrobora com os estudos conduzidos por Jones *et al.* (2017). De acordo com Yun *et al.*, (2014), a composição relativa de bactérias no intestino de insetos varia de acordo com os habitats em que estão inseridos. A floresta amazônica detém uma das maiores biodiversidade do mundo, com uma flora extremamente variada, com árvores de grande porte totalizando 2.5 mil espécies e são mais de 30 mil espécies de plantas (MMA, 2019), o que acarreta uma diversidade alimentar, pólen e néctar, portanto, uma maior abundância floral para forrageamento, o que pode direcionar a composição da comunidade intestinal bacteriana.

A microbiota *core* descrita para a maioria das abelhas eussociais, (*Gilliamella*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* Firm-4 e *Lactobacillus* Firm-5, *Snodgrassella*, *Frischella perrara*, *Bartonella apis* e *Acetobacteraceae*) não foi observada nesse estudo, por outro lado, as famílias relatadas já foram descritas relacionados a abelhas, podendo ser encontrado em larvas, intestino, tegumento, potes de mel, mel e em pólen, como demonstrado na tabela 6 (KWONG; MORAN, 2016; ELLEGAARD *et al.*, 2015; KWONG; MORAN, 2013; ENGEL; KWONG; MORAN, 2013; KESNEROVA; MORITZ; ENGEL, 2016; CORBY-HARRIS *et al.*, 2014).

Tabela 6. Comparação das famílias bacterianas encontradas no intestino de abelha sem ferrão *Scaptotrigona polysticta* com estudos da microbiota de abelhas.

Família	Gênero	Origem	Hospedeiros	Referência
Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i> sp.	Intestino e tegumento	<i>Apis mellifera</i>	ANJUM <i>et al.</i> , 2018; AYO-FASASI, 2018.
Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i> sp.	Intestino e tegumento	<i>sApis mellifera</i> , <i>Apis mellifera</i> <i>Adansonii</i>	ANJUM <i>et al.</i> , 2018; AYO-FASASI, 2018.
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Klebsiella</i> sp., <i>Kluyvera</i> sp., <i>Morganella</i> sp., <i>Salmonella</i> spp., e <i>Serratia</i> sp.	Intestino e tegumento	<i>Apis mellifera</i> , <i>Apis mellifera</i> <i>Adansonii</i>	MORAN <i>et al.</i> , 2012; SABREE; HANSEN; MORAN, 2012; CORBY-HARRIS; MAES; ANDERSON, 2014; BUDGE <i>et al.</i> , 2016; RAYMANN <i>et al.</i> , 2018; AYO-FASASI, 2018; ANJUM <i>et al.</i> , 2018; LAKMAN <i>et al.</i> , 2021
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i> sp.	Intestino e tegumento	<i>Apis mellifera</i>	ANJUM <i>et al.</i> , 2018; AYO-FASASI, 2018.
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> sp.	Intestinos e larvas de abelhas	<i>Apis mellifera</i>	EVANS; ARMSTRONG, 2006; KHAN <i>et al.</i> , 2020
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i> sp.	Intestino	<i>Apis mellifera jemenitica</i> e <i>Apis mellifera</i> <i>Apis mellifera jemenitica</i>	KHAN <i>et al.</i> , 2017; ANJUM <i>et al.</i> , 2018.
Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i> sp.	Intestino	<i>Apis mellifera jemenitica</i>	KHAN <i>et al.</i> , 2017
Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i> sp.	Mel e larvas de abelhas	<i>Apis mellifera</i>	GENERSH <i>et al.</i> , 2006
Erwiniaceae	<i>Pantoea</i> sp.	Pólen, favos de mel e néctar recém-armazenado	<i>Apis mellifera</i>	LONCARIC <i>et al.</i> , 2009
Leuconostocaceae	<i>Weissella</i> sp.	Pólen, alimento larval, favos de armazenamento de pólen e intestino de abelhas.	<i>Melipona seminigra</i> e <i>Bombus</i> sp.	PRAET <i>et al.</i> , 2015; NACIF-MARÇAL, 2017
Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i> sp.	Pólen	<i>Melipona seminigra</i>	NACIF-MARÇAL, 2017

Foi observado também a variância na composição bacteriana nas colônias estudadas. A colônia 1 foi coletada e analisada no período chuvoso, mês de março, obteve maior diversidade de bactérias intestinais, além de estarem recebendo suplementação alimentar com xarope de açúcar, quando comparadas as colônias 2, que obteve maior abundância de microrganismos e a colônia 3 que teve menor abundância e diversidade de bactérias, essas foram coletadas na transição do período chuvoso para o período seco (final do mês de maio e início de junho, respectivamente), e não estavam recebendo suplementação.

Na colônia 1 foram encontradas as seguintes bactérias: *Enterobacter cancerogenus*, *Paenibacillus* sp., *Enterobacter hormaechei*, *Staphylococcus warneri*, *Kluyvera ascorbata*, *Enterobacter* sp., *Pantoea dispersa*, *Paenibacillus taichungensis*, *Bacillus* sp., *Serratia marcescens*, *Enterococcus* sp., *Bacillus licheniformis*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus termitis*, *Microbacterium imperiale*, *Corynebacterium nuruki*. Na colônia 2: *Morganella morganii*, *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus* sp., *Weissella paramesenteroides*, *Klebsiella oxytoca*, *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium nuruki*, *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp. E na colônia 3 as bactérias: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus* sp., *Salmonella* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus infantis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*.

De acordo com nossos resultados, através do gráfico de Veen-Euler (Figura 18), percebe-se que as espécies *Bacillus licheniformis* e *Bacillus* sp. foram encontradas nas 3 colônias estudadas. Já as espécies *Bacillus licheniformis*, *Bacillus* sp., *Corynebacterium nuruki* e *Enterococcus* sp., foram encontradas nas colônias C1 e C2 sendo as duas últimas exclusivas dessas colônias. As colônias C1 e C3 compartilham apenas *Bacillus licheniformis*, *Bacillus* sp. E por fim a colônia C2 e C3 compartilham *Bacillus licheniformis*, *Bacillus* sp., *Enterococcus faecalis*. Sendo assim, foram encontrados 27 tipos de bactérias que se diferiam entre gênero e espécie, totalizando 11 famílias.

A família Bacillaceae está presente em todas as colônias estudadas, sendo representada pelo gênero *Bacillus*, que são bastões gram-positivas, aeróbicos facultativos, que apresentam catalase positiva. Esse gênero já foi detectado em intestino de abelhas, tendo cepas que em estudos conseguiram inibir os patógenos de abelhas, causador da doença de giz, *Ascophaera apis*, além da inibição contra *Paenibacillus larvae* (EVANS; ARMSTRONG, 2006; KHAN *et al.*, 2020). Essas bactérias “ambientais” podem colonizar apenas o intestino da abelha de forma

oportunista, mas, no entanto, podem ter papéis importantes a desempenhar na digestão dos alimentos ou no controle de patógenos (KHAN *et al.*, 2020).

Já na família Enterococcaceae, representada nesse estudo pelo gênero *Enterococcus*, são cocos gram-positivo, anaeróbicas facultativamente, catalase negativa (MANERO; BLANCH, 1999). Este gênero foi observado nos estudos com abelhas *Apis mellifera jemenitica* desenvolvidas por Khan *et al.*, 2017, e com abelhas *Apis mellifera* e nos estudos de Anjum *et al.*, (2018).

Na família Corynebacteriaceae temos a espécie *Corynebacterium nuruki*, bastonetes gram-positivos, catalase positiva e aeróbicas (COLLINS *et al.*, 2004; SHIN *et al.*, 2011). Este gênero é amplamente distribuído na natureza e são em sua maioria inofensivos (COLLINS *et al.*, 2004), entretanto alguns incluem patógenos, como *Corynebacterium difteria* e *Corynebacterium minutissimum* e algumas espécies fermentativas de valiosa importância industrial, como *Corynebacterium glutamicum*, que cresce aerobicamente com uma variedade de carboidratos e ácidos orgânicos (GRANOK *et al.*, 2002; DALAL; LIKHI, 2008; WAGNER *et al.*, 2012; ANDERSON *et al.*, 2013; CORBY-HARRIS; MAES; ANDERSON, 2013; LEE *et al.*, 2016). Entretanto não há estudos que correlacione *Corynebacterium nuruki* em intestino de abelhas, mas, em abelhas do gênero melíferas do norte do Paquistão foi relatado a presença de *Corynebacterium* sp. em sua microbiota intestinal (ANJUM *et al.*, 2018).

Quanto a família Paenibacillaceae, bastões gram-positivos, anaeróbicos facultativos, representado pelo gênero *Paenibacillus*, são bactérias amplamente distribuídas em diversos ambientes, como solo, águas residuais, intestino de minhoca, amostras clínicas humanas, sedimento marinho, composto e larvas de abelhas melíferas (YOON *et al.*, 2005; MEEHAN, BJORSON, MCMULLAN, 2001; HORN *et al.*, 2005; ROUX; FENNER; RAOULT, 2008; LEE *et al.*, 2013; UEDA; YAMAMOTO; KUROSAWA, 2013; GENERSCH *et al.*, 2006). Neste gênero encontra-se o patógeno de abelhas *Paenibacillus larvae* causador da *foulbrood* em abelhas americanas (GENERSH, 2010; FÜNFHAUS; EBELING; GENERSCH, 2018). E neste estudo foi encontrado o gênero *Paenibacillus* e a espécie *Paenibacillus taichungensis*, sendo este último, bastão gram positivo e catalase positiva, ainda não descrita em intestino de abelhas, porém já descrita em solos de acordo com estudo realizados por LEE *et al.*, (2008).

Já a família Erwiniaceae, neste estudo, representada pela espécie *Pantoea dispersa*, gram-negativas em forma de bastonete, catalase positiva. O gênero *Pantoea* já foram isolados de uma variedade de ambientes de solo e água, bem como em associação com diferentes hospedeiros (WALTERSON; STAVRINIDES, 2015). Este gênero já foi descrito em intestino

insetos, exercendo papel na decomposição de substâncias tóxicas, fixação de nitrogênio, nutrição e digestão (STAVRINIDES; NO; OCHMAN, 2010; SOOD; NATH, 2002; MACCOLLOM *et al.* 2009).

Na família Leuconostocaceae encontramos *Weissella paramesenteroides* bactérias gram-positivas em forma de cocos, catalase negativa (LIBONETTI *et al.*, 2019; BAUGH *et al.*, 2021). O gênero *Weissella* pertence a um grupo de bactérias ácido-lácticas fermentativas (LBA) comumente associadas a alimentos, e encontradas em pólen, alimento larval e em favos de armazenamento de polén e intestino de abelhas sem ferrão *Melipona seminigra* e abelhas *Bombus* sp. (PRAET *et al.*, 2015; NACIF-MARÇAL, 2017).

Foram encontradas bactérias do gênero *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* sp., *Kluyvera* sp., *Morganella* sp., *Salmonella* spp., e *Serratia* sp. pertencentes a família Enterobacteriaceae. As cepas pertencentes à Enterobacteriaceae são frequentemente associadas a doenças gastrointestinais em mamíferos (MAHNIC, *et al.*, 2020; PILLA; SUCHODOLSKI, 2020). Em abelha, estão correlacionadas com a disbiose intestinal e colônias insalubres (KWONG; MORAN, 2016; BUDGE *et al.*, 2016; RAYMANN *et al.*, 2018; LAKMAN *et al.*, 2021).

As famílias Staphylococcaceae e Micrococcaceae, foram representadas nesse estudo pelas bactérias *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Micrococcus* sp. e *Micrococcus luteus*. Este estudo não encontrou associação das espécies *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus warneri* em intestino de abelhas, porém, foram encontradas associações outras espécies *Staphylococcus* sp. em abelhas melíferas. Observamos também a presença no intestino de nossas abelhas estudadas as bactérias *Micrococcus* sp. e *Micrococcus luteus*, encontradas também em abelhas *Apis mellíferas* (ANJUM *et al.*, 2018, AYO-FASASI, 2018).

Na família Streptococcaceae encontramos *Lactococcus lactis*, bactéria anaeróbica facultativa e cocos gram-positiva, originalmente isolada de plantas onde se acreditava estar dormente, e só se tornou ativa e se multiplicou no trato gastrointestinal após ser consumida por ruminante (BOLOTIN *et al.*, 2001). O presente estudo não encontrou associação entre esse microrganismo com o intestino de abelhas, porém Nacif-Marçal (2017) relata sua presença no polén coletado de ninhos de *Melipona seminigra*, dessa forma esse microrganismo pode ter sido adquirido através de interações sociais e contato com material da colônia.

Por fim, temos a família Microbacteriaceae, representada neste estudo pela bactéria *Microbacterium imperiale*, são bactérias bastões gram-positiva, produtoras de catalase,

aeróbica, podendo sobreviver em baixas concentrações em oxigênio (COLLINS; JONES; KROPPESTEDT, 1983). Este gênero, *Microbacterium* sp., já foram relatadas em intestino de abelhas melíferas, porém a espécie *M. imperiale*, encontrada nesse estudo até o presente momento não foi relatada em intestino de abelhas (KHAN *et al.*, 2017).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As coletas de abelhas sem ferrão foram bem sucedidas e o cultivo dos intestinos permitiu a identificação de 76 microrganismos, os quais se reúnem em vinte e sete tipos bacterianos (classificados em gênero e/ou espécie) e onze famílias pertencentes a três filos bacterianas.

As bactérias obtidas foram identificadas a nível molecular pelo gene 16S rRNA e foi possível verificar que em *Scaptotrigona polysticta*, neste estudo, não houve a presença de nenhuma bactéria core (*Gilliamella*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* Firm-4 e *Lactobacillus* Firm-5, *Snodgrassella*, *Frischella perrara*, *Bartonella apis* e *Acetobacteraceae*) estabelecido para *Apis mellifera* e, como já visto em outras espécies de abelhas.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular Biology*, v. 215, n.3, p. 403-410, 1990.

ANDERSON, K. E.; SHEEHAN, T. H.; MOTT, B. M.; MAES, P.; SNYDER, L.; SCHWAN, M. R.; WALTON, A.; JONES, B. M.; CORBY-HARRIS, V. Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). *PloS one*, v. 8, n.12, p. 1-16, 2013.

ANJUM, S. I.; SHAH, A. H.; AURONGZEB, M.; KORI, J.; AZIM, M. K.; ANSARI, M. J.; BIN, L. Characterization of gut bacterial flora of *Apis mellifera* from north-west Pakistan. *Saudi journal of biological sciences*, p. 25, n. 2, p. 388–392, 2018.

AYO-FASASI, K. Microbiota of Honeybees, *Apis mellifera Adansonii* (Hymenoptera: Apidae) from Selected Ecozones, South West Nigeria. *Pakistan journal of biological sciences : PJBS*, v. 21, n. 5, p. 232–238, 2018.

BAUGH, A. V.; HOWARTH, T. M.; WEST, K. L.; KERR, L.; LOVE, J.; PARKER, D. A.; FEDENKO, J. R.; TENNANT, R. K. Draft Genome Sequence of *Weissella paramesenteroides*

STCH-BD1, Isolated from Ensiled Sorghum bicolor. *Microbiology resource announcements*, v. 10, n. 7, p. 1-3, 2021

BLEAU, N.; BOUSLAMA, S.; GIOVENAZZO, P.; DEROME, N. Dynamics of the Honeybee (*Apis mellifera*) Gut Microbiota Throughout the Overwintering Period in Canada. *Microorganisms*, v. 8, n. 8, p. 1-11, 2020.

BOLOTIN, A.; WINCKER, P.; MAUGER, S.; JAILLON, O.; MALARME, K.; WEISSENBACH, J.; EHRLICH, S. D.; SOROKIN, A. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome research*, p. 11, n. 5, p. 731–753, 2001.

BOND, J.; PLATTNER K.; HUNT, K. Fruit and Tree Nuts Outlook: Economic Insight. US Pollination-Services Market. *USDA Economic Research Service Situation and Outlook FTS-357SA*, p. 1-6, 2014.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. *Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde - Modulo IV: Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos, Anvisa/Ministério da saúde*. 1. ed. Brasília: Anvisa, 2010.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. *Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência a Saúde. Modulo 3: Principais Síndromes Infeciosas/Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria*.— Brasília: Anvisa, 2013.

BUDGE, GE; ADAMS, I .; THWAITES, R .; PIETRAVALLE, S .; DREW, GC; HURST, GDD; TOMKIES, V .; BOONHAM, N .; BROWN, M. Identifying bacterial predictors of honey bee health. *J. Invertebr. Pathol.* v. 141, p. 41–44, 2016

BUSSE, H. J.; DENNER, E. B. M.; LUBITZ, W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology*. V. 47, p. 3-38, 1996.

CASTELLI, L.; BRANCHICCELA, B.; ROMERO, H.; ZUNINO, P.; ANTÚNEZ, K. Seasonal Dynamics of the Honey Bee Gut Microbiota in Colonies Under Subtropical Climate : Seasonal Dynamics of Honey Bee Gut Microbiota. *Microbial ecology*, 2021.

COLLINS, M. D.; HOYLES, L.; FOSTER, G.; FALSEN, E. *Corynebacterium caspium* sp. nov., from a Caspian seal (*Phoca caspica*). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 54, n. 3, p. 925–928, 2004.

COLLINS, M.D.; JONES, D.; KROPPENSTEDT, R.M. Reclassification of *Brevibacterium imperiale* (Steinhaus) and “*Corynebacterium laevaniformans*” (Dias and Bhat) in a Redefined Genus *Microbacterium* (Orla-Jensen), as *Microbacterium imperiale* comb. nov. and *Microbacterium laevaniformans* nom. rev.; comb. nov.. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 4, n. 1, p. 65–78, 1983.

CORBAY-HARRIS, V.; MAES, P.; ANDERSON, K. E. The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLoS ONE*, v. 9, n. 4, p. 1-13, 2014.

CORBY-HARRIS, V.; SNYDER, L. A.; SCHWAN, M. R.; MAES, P.; MCFREDERICK, Q. S.; ANDERSON, K. E. Origin and effect of Alpha 2.2 Acetobacteraceae in honey bee larvae and description of *Parasaccharibacter apium* gen. nov., sp. nov. *Applied and environmental microbiology*, v. 80, n. 24, p. 7460–7472, 2014.

COX-FOSTER, D. L.; CONLAN, S.; HOLMES, E. C.; PALACIOS, G.; EVANS, J. D.; MORAN, N. A.; QUAN, P. L.; BRIESE, T.; HORNIG, M.; GEISER, D. M.; MARTINSON, V.; VANENGLSDORP, D.; KALKSTEIN, A. L.; DRYSDALE, A.; HUI, J.; ZHAI, J.; CUI, L.; HUTCHISON, S. K.; SIMONS, J. F.; EGHOLM, M.; ... LIPKIN, W. I. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science (New York, N.Y.)*, v. 318, n. 5848, p. 283–287, 2007

DALAL, A.; LIKHI, R. *Corynebacterium minutissimum* bacteremia and meningitis: a case report and review of literature. *The Journal of infection*, v. 56, n. 1, p. 77–79, 2008.

ELLEGAARD, K. M.; TAMARIT, D.; JAVELIND, E.; OLOFSSON, T. C.; ANDERSSON, S. G.; VÁSQUEZ, A. Extensive intra-phyloptype diversity in *lactobacilli* and bifidobacteria from the honeybee gut. *BMC genomics*, v. 16, n. 1, p. 1-22, 2015.

ENGEL, P.; KWONG, W. K.; MORAN, N. A. *Frischella perrara* gen. nov., sp. nov., a gamma proteobacterium isolated from the gut of the honeybee, *Apis mellifera*. *Int J Syst Evol Microbiol.*, v. 63, p. 3646–3651, 2013.

EVANS, J. D.; ARMSTRONG, T-N. Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC Ecol.*, v. 6, n. 4, p. 1-9, 2006.

FÜNFHAUS, A.; EBELING, J.; GENERSCH, E. Bacterial pathogens of bees. *Current opinion in insect science*, v. 26, p. 89–96, 2018.

GENERSCH, E. American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol.*, v. 103, n. 1, p.10–19, 2010.

GENERSCH, E.; FORSGREN, E.; PENTIKÄINEN, J.; ASHIRALIEVA, A.; RAUCH, S.; KILWINSKI, J.; FRIES, I. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 56, n. 3, p. 501–511, 2006.

GILL, R. J.; BALDOCK, K. C.; BROWN, M. J.; CRESSWELL, J. E.; DICKS, L. V.; FOUNTAIN, M. T.; GARRATT, M. P. D.; GOUGH, L. A.; HEARD, M. S.; HOLLAND, J. M.; OLLERTON, J.; STONE, G. N.; TANG, C. Q.; VANBERGEN, A. J.; VOGLER, A. P.; WOODWARD G.; ARCE N. A.; BOATMAN, ND.; BRAND-HARDY, R.; BREEZE; T. D.; GREEN, M.; HARTFIELD, C. M.; O’CONNOR, R. S.; OSBORNE, J. L.; PHILLIPS J.; SUTTON P. B. Protecting an ecosystem service: approaches to understanding and mitigating threats to wild insect pollinators. *Advances in Ecological Research*, v. 54, p. 135–206, 2016.

GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science (New York, N.Y.)*, v. 347, n. 6229, 12559571-12559579, 2015.

GRANOK, A. B.; BENJAMIN, P.; GARRETT, L. S. *Corynebacterium minutissimum* bacteremia in an immunocompetent host with cellulitis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 35, n. 4, p. 40–42, 2002.

HORN, M. A.; IHSEN, J.; MATTHIES, C.; SCHRAMM, A.; ACKER, G.; DRAKE, H. L. *Dechloromonas denitrificans* sp. nov., *Flavobacterium denitrificans* sp. nov., *Paenibacillus anaericus* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* strain MH72, N₂O-producing bacteria isolated from the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 55, n. 3, 2005.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. CNPq, CNPAF. EMBRAPA/ SPI. (EMBRAPA-CNPAF, Documento, 46), Brasília, 1994. 542p.

JONES, J. C.; FRUCIANO, C.; HILDEBRAND, F.; AL TOUFALILIA, H.; BALFOUR, N. J.; BORK, P.; ENGEL, P.; RATNIEKS, F. L.; HUGHES, W. O. Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees. *Ecology and evolution*, v. 8, n. 1, p. 441–451, 2017.

KEŠNEROVÁ, L.; MARS, R.; ELLEGAARD, K. M.; TROILO, M.; SAUER, U.; ENGEL, P. Disentangling metabolic functions of bacteria in the honey bee gut. *PLoS biology*, v. 15, n. 12, p. 1-28, 2017.

KESNEROVA, L.; MORITZ, R.; ENGEL, P. *Bartonella apis* sp. nov., a honey bee gut symbiont of the class Alphaproteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol.*, v. 66, p. 414–421, 2016.

KHAN, K. A.; ANSARI, M. J.; AL-GHAMDI, A.; NURU, A.; HARAKEH, S.; IQBAL, J. Investigation of gut microbial communities associated with indigenous honey bee (*Apis mellifera jemenitica*) from two different eco-regions of Saudi Arabia. *Saudi journal of biological sciences*, v. 24, n. 5, p. 1061–1068, 2017.

KHAN, S.; SOMERVILLE, D.; FRESE, M.; NAYUDU, M. Environmental gut bacteria in European honey bees (*Apis mellifera*) from Australia and their relationship to the chalkbrood disease. *PloS one*, v. 15, n. 8, p. 1-22, 2020.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, v. 35, p. 1547-1549, 2018.

KWONG, W. K.; MEDINA, L. A.; KOCH, H.; SING, K. W.; SOH, E.; ASCHER, J. S.; JAFFÉ, R.; MORAN, N. A. Dynamic microbiome evolution in social bees. *Science advances*, v. 3, n. 3, p. 1-16, 2017.

KWONG, W. K.; MORAN, N. A. Gut microbial communities of social bees. *Nat Rev Microbiol.*, v. 14, p. 374–384, 2016.

LAKMAN, A.; GALATIUK, O.; ROMANISHINA, T.; BEHAS, V.; ZASTULKA, O. BEES klebsiellosis: key aspects of pathogenesis. *Adv. Anim. Vet. Sci.* v. 9, n. 8, p. 1190-1193, 2021.

- LEE, F. L.; TIEN, C. J.; TAI, C. J.; WANG, L. T.; LIU, Y. C.; CHERN, L. L. *Paenibacillus taichungensis* sp. nov., from soil in Taiwan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 58, n. 11, p. 2640–2645, 2008.
- LEE, H. W.; ROH, S. W.; YIM, K. J.; SHIN, N. R.; LEE, J., et al. *Paenibacillus marinisediminis* sp. nov., uma bactéria isolada de sedimento marinho. *J Microbiol.*, v. 51, p. 312–317, 2013.
- LEE, J. Y.; NA, Y. A.; KIM, E.; LEE, H. S.; KIM, P. The *Actinobacterium Corynebacterium glutamicum*, an Industrial Workhorse. *Journal of microbiology and biotechnology*, v. 26, n. 5, p. 807–822, 2016.
- LIBONATTI, C.; AGÜERIA, D.; GARCÍA, C.; BASUALDO, M. *Weissella paramesenteroides* encapsulation and its application in the use of fish waste. *Revista Argentina de microbiologia*, v. 51, n. 1, p. 81–83, 2019.
- MACCOLLOM, G. B.; LAUZON, C. R.; SJOGREN, R. E.; MEYER, W. L.; OLDAY, F. Association and attraction of blueberry maggot fly Curran (Diptera: Tephritidae) to *Pantoea* (Enterobacter) agglomerans. *Environmental entomology*, v. 38, n. 1, p. 116–120, 2009.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. *Microbiologia de Brock*. 14ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A, 2016.
- MAHNIC, A.; BRESKVAR, M.; DZEROSKI, S.; SKOK, P.; PINTAR, S.; RUPNIK, M. Distinct Types of Gut Microbiota Dysbiosis in Hospitalized Gastroenterological Patients Are Disease Non-related and Characterized With the Predominance of Either Enterobacteriaceae or *Enterococcus*. *Frontiers in microbiology*, v. 11, n. 120, p. 1-10, 2020.
- MANERO, A., BLANCH, A. R. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Applied and environmental microbiology*, v. 65, n. 10, p. 4425–4430, 1999.
- MARTINSON, V. G.; DANFORTH, B. N.; MINCKLEY, R. L.; RUEPPELL, O.; TINGEK, S.; MORAN, N. A. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular ecology*, v. 20, n. 3, p. 619–628, 2011.
- MCFREDERICK, Q. S.; CANNONE, J. J.; GUTELL, R. R.; KELLNER, K.; PLOWES, R. M.; MUELLER, U. G. Specificity between lactobacilli and hymenopteran hosts is the exception rather than the rule. *Applied and environmental microbiology*, v. 79, n. 6, p. 1803–1812, 2013.
- MEEHAN, C.; BJOURSON, A. J.; MCMULLAN, G. *Paenibacillus azoreducens* sp. nov., a synthetic azo dye decolorizing bacterium from industrial wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol.*, v. 51, p. 1681–1685, 2001.
- MMA. Bioma Amazônia. Ministério do Meio Ambiente, 2019. Disponível em: <www.mma.gov.br/biomas/amaz%C3%B4nia>. Acesso em 29 nov. 2021.
- MORAN, N. A.; HANSEN, A. K.; POWELL, J. E.; SABREE, Z. L. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PloS one*, v. 7, n. 4, p. 1-10, 2012.

MORÁN, N. A.; HANSEN, A. K.; POWELL, J. E.; SABREE, Z. L. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLoS ONE*, v. 7, n. 4, p. 1-10, 2012.

NACIF-MARÇAL, L. *Comunidades bacterianas associadas a colônias de abelhas amazônicas sem ferrão da espécie Melipona seminigra: diversidade e potencial enzimático*. 2017. 134 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.

OLIVEIRA, S. J. *Microbiologia Veterinária, Guia Bacteriológico Prático*. Canoas: ULBRA, 2a Edição, 2000.

PILLA, R.; SUCHODOLSKI, J. S. The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. *Frontiers in veterinary science*, v. 6, n. 498, p. 1-12, 2020.

ONCARIC, I.; HEIGL, H.; LICEK, E. *et al.* Typing of *Pantoea agglomerans* isolated from colonies of honey bees (*Apis mellifera*) and culturability of selected strains from honey. *Apidologie*, v. 40, p. 40–54, 2009.

PORRINI, C.; MUTINELLI, F.; BORTOLOTTI, L.; GRANATO, A.; LAURENSEN, L.; ROBERTS, K.; GALLINA, A.; SILVESTER, N.; MEDRZYCKI, P.; RENZI, T.; SGOLASTRA, F.; LODESANI, M. The status of honey bee health in Italy: results from the nationwide bee monitoring network. *PLoS One*, v. 11, n. 5, p. 1-22, 2016.

POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER O.; KUNIN, W. E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol Evol.*, v. 25, p. 345–353, 2010.

PRAET, J.; MEEUS, I.; CNOCKAERT, M.; HOUF, K.; SMAGGHE, G.; VANDAMME, P. Novel lactic acid bacteria isolated from the bumble bee gut: *Convivina intestini* gen. nov., sp. nov., *Lactobacillus bombicola* sp. nov., and *Weissella bombi* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 107, n. 5, p. 1337–1349, 2015.

PRESCOOT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. *Microbiology 6th edition*. Published by McGraw-Hill Science/Engineering/Math Hardcover Unknown Binding – March 2, 2004

RAYMANN, K.; COON, K. L.; SHAFFER, Z.; SALISBURY, S.; MORAN, N. A. Pathogenicity of *Serratia marcescens* Strains in Honey Bees. *mBio*, v. 9, n. 5, p. 1-15, 2018.

RAYMANN, K.; MORAN N. A. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current opinion in insect science*, v. 26, n. 97–104, 2018.

RIBIÈRE, C.; HEGARTY, C.; STEPHENSON, H.; WHELAN, P.; O'TOOLE, P.W. Gut and whole-body microbiota of the honey bee Separate thriving and non-thriving hives. *Microb. Ecol.*, v. 78, p. 195–205, 2019.

ROMERO, S. *et al.* The honey bee gut microbiota: strategies for study and characterization. *Insect Molecular Biology*, v. 28, n.4, p. 455-472, 2019.

ROTHMAN, J. A.; CARROLL, M. J.; MEIKLE, W. G.; ANDERSON, K. E.; MCFREDERICK, Q. S. Longitudinal effects of supplemental forage on the honey bee (*Apis mellifera*) microbiota and inter- and intra-colony variability. *Microb. Ecol.*, v. 76, n. 3, p. 814–824, 2018.

- ROUX, V.; FENNER, L.; RAOULT, D. *Paenibacillus provencensis* sp. nov., isolated from human cerebrospinal fluid, and *Paenibacillus urinalis* sp. nov., isolated from human urine. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 58, n. 3, p. 682–687, 2008.
- SABREE, Z. L.; HANSEN, A. K.; MORAN, N. A. Independent studies using deep sequencing resolve the same set of core bacterial species dominating gut communities of honey bees. *PloS one*, v. 7, n. 7, p. 1-10, 2012.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v. 4, p. 406-425, 1987.
- SHAPIRO, B. J.; POLZ, M. F. Ordering microbial diversity into ecologically and genetically cohesive units. *Trends in microbiology*, v. 22, n. 5, 235–247, 2014.
- SHIN, N. R.; JUNG, M. J.; KIM, M. S.; ROH, S. W.; NAM, Y. D.; BAE, J. W. *Corynebacterium nuruki* sp. nov., isolated from an alcohol fermentation starter. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 61, n. 10, p. 2430–2434, 2011.
- SOOD, P.; NATH, A. Bacteria associated with *Bactrocera* sp. (Diptera:Tephritidae) - isolation and identification. *Pest Management and Economic Zoology*, v. 10, n. 1, p.1-9, 2002.
- STAVRINIDES, J.; NO, A.; OCHMAN, H. A single genetic locus in the phytopathogen *Pantoea stewartii* enables gut colonization and pathogenicity in an insect host. *Environmental microbiology*, v. 12, n. 1, p. 147–155, 2010.
- TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. v. 101, n. 30, p. 11030–11035, 2004.
- UEDA, J.; YAMAMOTO, S.; KUROSAWA, N. *Paenibacillus thermoaerophilus* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from compost. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 63, n. 9, 3330–3335, 2013.
- VINCENT, J.M. *A manual for practical study of root nodule bacteria*. IBP Handbook N. 15. Blackwell Scient. Publ. 1970. 140p.
- WAGNER, K. S.; WHITE, J. M.; LUCENKO, I.; MERCER, D.; CROWCROFT, N. S.; NEAL, S.; EFSTRATIOU, A.; DIPHTHERIA SURVEILLANCE NETWORK. Diphtheria in the postepidemic period, Europe, 2000-2009. *Emerging infectious diseases*, v. 18, n. 2, p. 217–225, 2012.
- WALTERSON, A. M.; STAVRINIDES, J. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae, *FEMS Microbiology Reviews*, v. 39, n. 6, p. 968–984, 2015.
- WU, Y.; ZHENG, Y.; CHEN, Y.; WANG, S.; CHEN, Y.; HU, F.; ZHENG, H. Honey bee (*Apis mellifera*) gut microbiota promotes host endogenous detoxification capability via regulation of P450 gene expression in the digestive tract. *Microbial biotechnology*, v. 13, n. 4, p. 1201–1212, 2020.

YOON, J. H.; KANG, S. J.; YEO, S. H.; OH, T. K. *Paenibacillus alkaliterrae* sp. nov., isolated from an alkaline soil in Korea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 55, n. 6, p. 2339–2344, 2005.

YUN, J. H.; ROH, S. W.; WHON, T. W.; JUNG, M. J.; KIM, M. S.; PARK, D. S.; YOON, C.; NAM, Y. D.; KIM, Y. J.; CHOI, J. H.; KIM, J. Y.; SHIN, N. R.; KIM, S. H.; LEE, W. J.; BAE, J. W. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. *Applied and environmental microbiology*, v. 80, n. 17, p. 5254–5264, 2014.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; FREIRE FILHO, G.R.; NEVES, M.C.P. *Levantamento de rizóbios isolados de nódulos de caupi cultivado em amostras de solos do Cerrado do Estado do Piauí*. Seropédica: Embrapa Agrobiologi. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 125), 2000. 23p.

CAPÍTULO II

Atividade enzimática de bactérias intestinais de abelha de sem ferrão
Scaptotrigona polysticta (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).

CAPITULO II: Atividade enzimática de bactérias intestinais de abelha de sem ferrão
***Scaptotrigona polysticta* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).**

Suziane P. Rodrigues¹, Lorena Nacif-Marçal¹, Luiz A. Oliveira², Carlos Gustavo N. da Silva¹.

1 Universidade Federal do Amazonas, Manaus-Brasil.

2 Laboratório de Microbiologia de solo, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus-Brasil.

RESUMO

Uma fonte de obtenção enzimática ainda pouco explorada é microbiota intestinal de insetos. As abelhas abrigam a maior parte da comunidade bacteriana na seção distal de seu intestino, essa microbiota é adquirida principalmente através de interações sociais e estão envolvidas nos processos conversão, fermentação e/ou preservação o mel. O objetivo desse capítulo é verificar o potencial de produção de enzimas hidrolíticas por isolados bacterianos obtidos do intestino de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta*. Assim, as bactérias obtidas no capítulo I foram testadas para produção de proteases, amilases, lipases e celulasas, através do índice enzimático. Dos 76 isolados bacterianos, 26 apresentaram produção de enzimas. Proteases e amilases foram as enzimas mais produzidas, sendo selecionadas 17 bactérias promissoras para produção de enzimas hidrolíticas. As abelhas sem ferrão *S. polysticta* possuem uma microbiota intestinal capaz de produzir enzimas hidrolíticas, no entanto são necessários mais estudos para compreender melhor como estas atuam, sendo indispensável à otimização das condições de cultivo para melhor produção dessas enzimas.

Palavras-chave: Enzimas, potencial de produção, abelha sem ferrão, biotecnologia.

ABSTRACT

An unexplored source of enzymatic obtainment is the intestinal microbiota of insects. Bees harbor most of the bacterial community in the distal section of their intestine, this microbiota is acquired mainly through social interactions and are involved in the processes of conversion, fermentation and/or honey preservation. The aim of this chapter is to verify the potential of hydrolytic enzyme production by bacterial isolates obtained from the intestine of stingless bees *Scaptotrigona polysticta*. Thus, the bacteria obtained in Chapter I were tested for the production of proteases, amylases, lipases and cellulases, through the enzymatic index. Of the 76 bacterial isolates, 26 showed enzyme production. Proteases and amylases were the most produced enzymes, with 17 promising bacteria being selected for the production of hydrolytic enzymes. *S. polysticta* stingless bees have an intestinal microbiota capable of producing hydrolytic enzymes, however further studies are needed to better understand how they work, being essential to optimize the cultivation conditions for better production of these enzymes.

Keywords: Enzymes, production potential, stingless bee, biotechnology.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a maior parte das enzimas utilizadas é importada, embora possua uma enorme potencial para produzi-las. Potencialidade essa, demonstrada por sua grande diversidade biológica pouco estudada, que possibilitaria a obtenção de novos organismos de interesse biotecnológico e pela quantidade de matéria orgânica que poderia ser utilizada como substrato de baixo custo para as fermentações (BON *et al.*, 2008).

Uma dessas fontes de obtenção enzimática são os microrganismos provenientes da microbiota intestinal de insetos. Esses microrganismos apresentam características únicas no sentido de que podem prosperar no ambiente hostil do intestino, resistindo a extremos de pH e composição iônica, características essas importantes para a produção de enzimas (CASH; HOOPER, 2005).

Esses microrganismos contribuem para a reprodução de insetos, nutrição, produção de feromônios, degradação de pesticidas, desintoxicação de aleloquímicos vegetais e exclusão competitiva, possuindo propriedades metabólicas que estão ausentes nos insetos (KHAN *et al.*, 2020; LUNDGREN; LEHMAN, 2010). Nos cupins, por exemplo, foi observado que a microbiota bacteriana intestinal secreta celulases e lignases que fornecem glicose e ácidos graxos ao hospedeiro como fonte de energia (BREZNAK; BRUNE, 1994). Em insetos como *Helicoverpa armígera* foi observado a existência de *Bacillus subtilis* RTSBA 6, isolados do intestino, produtor de proteases que podem estar, provavelmente, auxiliando o hospedeiro na digestão de alimentos proteicos e adaptação a inibidores de protease de plantas hospedeiras (SHINDE *et al.*, 2012).

As abelhas, assim como na maioria dos animais, abrigam a maior parte da comunidade bacteriana na seção distal do intestino (íleo e reto), isso se dá devido à presença abundante de alimentos não digeridos pelo hospedeiro, depositados nessa região, tornando-se fontes acessíveis de energia, carbono e nitrogênio disponíveis para a microbiota, formando o lar de uma comunidade relativamente simples, porém altamente específica (BONILLA-ROSSO; ENGEL, 2018). Estes microrganismos utilizam principalmente carboidratos complexos com substrato para a sua sobrevivência, sendo o pólen e o néctar os principais componentes da dieta das abelhas e principal fonte de aminoácidos, gordura, vitaminas e minerais (FRIAS *et al.*, 2016). A maioria desses nutrientes é absorvida no intestino médio do hospedeiro, deixando

apenas os compostos complexos para serem digeridos pela comunidade microbiana intestinal no intestino posterior (ZHENG *et al.*, 2018).

Os microrganismos intestinais são adquiridos principalmente através de interações sociais, através da alimentação boca a boca, boca ânus, contato com fezes frescas, forrageamento e contato com material da colmeia (ONCHURU *et al.*, 2018; KHAN *et al.*, 2020). Dessa forma esses microrganismos intestinais também estão presentes no ambiente de colmeia, e envolvidos nos processos fermentativos do mel. GILLIAM *et al.* (1990), observou que esses microrganismos presentes no mel de abelhas sem ferrão *Melipona fasciata* conseguiam secretar enzimas proteolíticas, glicolíticas e lipolíticas, sendo responsáveis por converter, fermentar e/ou preservar o mel. Dessa forma, crê-se que microrganismos intestinais também possuam a capacidade de produção de enzimas.

Assim, apesar da grande variedade existente de enzimas e seus substratos no mercado mundial, é necessária a realização de estudos que busquem novas enzimas com diversas aplicabilidades. Desta forma, o objetivo desse capítulo é identificar enzimas produzidas por isolados bacterianos obtidos do intestino de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Ensaio Enzimático Semiquantitativo

Os cento e vinte e um isolados bacterianos obtidos no capítulo 1, foram avaliados quanto ao potencial de produção das seguintes classes de enzimas hidrolíticas: proteases, amilases, celulasas e lipases. Para a verificação do potencial enzimático, os isolados bacterianos foram repicados em meio Lúria Bertani e incubados a 35 °C, até o aparecimento de células bacterianas. Todas as bactérias foram cultivadas em aerobiose a fim de verificar a tolerância a oxigênio das bactérias anaeróbicas e microaerofílicas. Cada ensaio enzimático foi realizado em quadruplicata e a produção enzimática foi considerada positiva quando houve a formação de halos ao redor das colônias.

Os halos e as colônias foram medidos com o auxílio de um paquímetro digital (mm) e aqueles que apresentaram Índice Enzimático (I.E) > 2,0 foram considerados como tendo potencial biotecnológico. Para o cálculo do I.E, o diâmetro médio dos halos de degradação (dh)

foi dividido pelo diâmetro médio das colônias (d_c), representado na equação $I.E = dh/dc$ (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975; LEALEM; GASHE, 1994).

2.1.1 Proteases

A avaliação da produção de proteases por isolados bacterianos intestinais de abelhas foi realizada a partir do crescimento das mesmas em placas de Petri contendo meio de cultura à base de leite em pó desnatado 2 g/L (Itambé®) e gelatina sem sabor 1 g/L (ROYAL®), como fontes proteicas, 2 g/L de extrato de levedura e 15 g/L de ágar, com pH 7. (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas e a atividade enzimática foi visualizada a olho nu pela formação de halo de degradação dos polímeros, o qual gera um contraste de cor ao redor da colônia.

2.1.2 Amilases

A atividade amilolítica foi verificada por meio do crescimento dos isolados bacterianos em placas de petri contendo meio ágar-LB modificado composto por 2,5 g/L de peptona, 1,25 g/L de extrato de levedura, 1,25 g/L de NaCl, 15 g/L de ágar, enriquecido com 10 g/L de amido solúvel, pH 7.0. As placas foram incubadas a 35 °C por 48h, sendo a atividade enzimática verificada por meio da formação de halos de degradação do polímero, revelados por coloração com vapor de iodo (modificado de ASTOLFI-FILHO *et al.*, 1986).

2.1.3 Lipase

Para a produção de lipases foi usado meio cultura composto por 3 g/L de peptona, 2 g/L de extrato de levedura, 2 g/L fosfato de potássio dibásico, 2 g/L cloreto de cálcio, 1 g/L Sulfato de magnésio, 10 g/L polissorbato, 80, 2 mg/L de rodamina B, 18 g/L de ágar e 20 g/L de Azeite de Oliva Extra Virgem (Terrano®), pH 8. As placas foram incubadas durante 7 dias e a avaliação do surgimento de halos de inibição enzimática foram avaliadas a olho nu (KOUKER; JAEGER, 1987).

2.1.4 Celulase

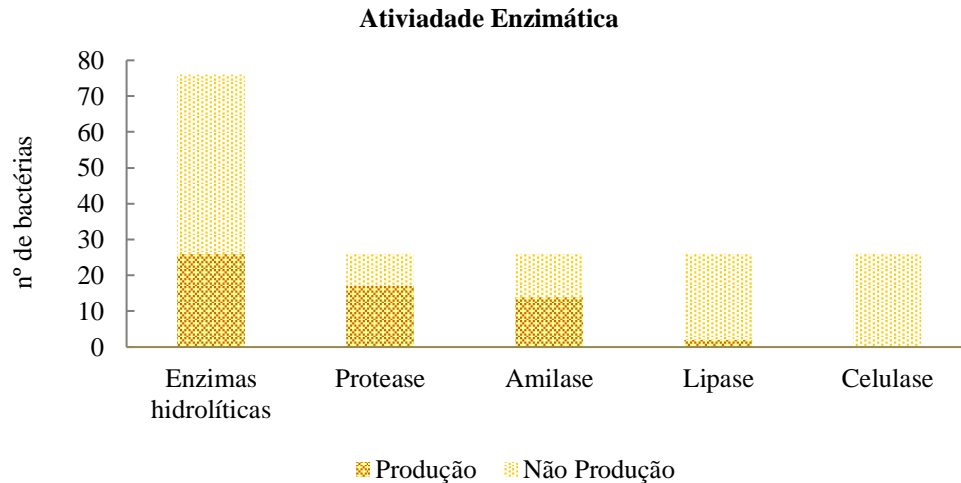
A atividade celulolíticas foi avaliada em meio de cultura LB modificado composto por 1,7g/L de peptona, 0,8 g/L de extrato de levedura, 0,8 g/L de NaCl, 15 g/L de ágar, enriquecido com 10 g/L de carboximetilcelulose (CMC, ACRÔS ORGANIC), pH 7. As placas foram inoculadas e incubadas a 35 °C por 7 dias, após esse período a formação dos halos de degradação enzimática foi avaliada. A revelação do halo de degradação do polímero foi realizada a partir da incubação das placas cotendo 10 mL de solução corante de vermelho Congo (1%) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0, após 30 min a solução foi descartada e as culturas bacterianas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M, por 5 min (TEATHER; WOOD, 1982).

3 RESULTADOS

O potencial de produção de enzimas hidrolíticas (proteases, amilases, lipases e celulases), dos 76 isolados bacterianos foi avaliado a partir da visualização de halos de degradação de polímeros. Os resultados obtidos demonstram que 26 dos isolados realizaram ao menos dois tipos de atividade enzimática, enquanto que 50 isolados não apresentou qualquer potencial enzimático.

Dos isolados bacterianos que se repetem em duas das quatro enzimas hidrolíticas investigadas encontram-se: *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11, *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26, *Bacillus* sp. C2M1D2AE 66, *Bacillus* sp. C3M1D2MI 68, *Bacillus infantis* C3M2D4AE 73, *Enterococcus faecalis* C3M4D1AE 76 (protease e amilase) e *Staphylococcus epidermidis* C3M3D2AE 74 (protease e lipase). Assim, do total de 26 isolados bacterianos que apresentaram produção de enzimas, 52% deles exibiram atividades proteolíticas, 42% amilolíticas, 6% lipídicas e nenhum demonstrou a habilidade de degradar celulose (Figura 20).

Figura 20. Potencial de produção de enzimas hidrolíticas por isolados bacterianos analisados.



Fonte: Elaborada pela autora.

A produção geral de enzimas extracelulares pelos isolados é apresentada na Tabela 7. Proteases e amilases foram as enzimas mais produzidas e com maiores índices enzimáticos (I.E), enquanto que a produção de lipases foi menor (I.E < 2,0).

Nos resultados apresentados na Tabela 7, observa-se que as bactérias testadas exibiram variação quanto ao potencial de produção enzimática, destacando-se a atividade proteolítica, que apresentou maior número de isolados com índices $\geq 2,00$, sendo eles: *Enterococcus faecalis* C3M4D1AE 76 com I.E = 5,30; *Enterococcus faecalis* C2M5D3MI 48 e *Enterococcus faecalis* C2M4D1MI 51 I.E = 4,18; *Enterococcus faecalis* C2M2D4MI 44 I.E = 4,11; *Enterococcus faecalis* C2M2D3AE 54 I.E = 4,06; *Enterococcus faecalis* C2M5D3AN 41 I.E = 4,04; *Escherichia coli* C2M3D2MI 45 I.E = 4,01; *Enterococcus faecalis* C2M5D3AE 59 I.E = 3,78; *Enterococcus faecalis* C2M3D2AE 56 I.E = 3,53; *Weissella paramesenteroides* C2M4D2AE 63 I.E = 3,46; *Enterococcus faecalis* C2M2D2AN 33 I.E = 3,00; *Bacillus infantis* C3M2D4AE 73 I.E = 2,45; *Bacillus* sp. C3M1D2MI 68 I.E = 2,32; *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26 I.E = 2,29; *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11 I.E = 2,21 e *Staphylococcus epidermidis* C3M3D2AE 74 I.E = 2,02. Verificou-se ainda que o isolado *Bacillus* sp. C2M1D2AE 66, apresentou produção enzimática (I.E = 1,45), não conseguindo alcançar o I.E >2,00.

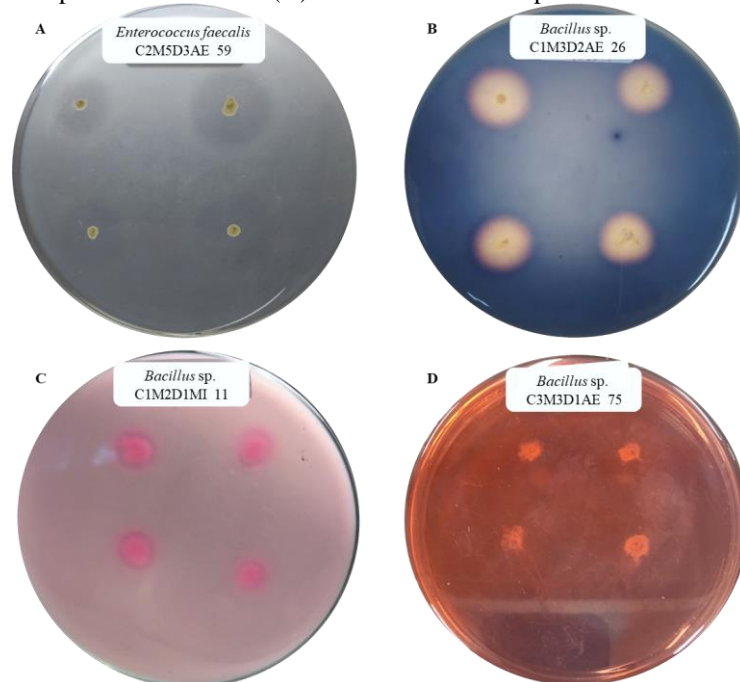
Quanto ao potencial de produção de amilases, destacaram-se os isolados (I.E $\geq 2,00$): *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26 I.E = 4,39; *Paenibacillus* sp. C1M1D5AN 2 I.E = 4,30; *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11 I.E = 2,17 e *Enterococcus faecalis* C3M4D1AE 76 I.E = 2,04. Os isolados *Bacillus infantis* C3M2D4AE 73 I.E = 1,77; *Escherichia coli* C2M1D3AE 53 I.E = 1,76; *Micrococcus luteus* C2M3D3AE 58 I.E = 1,67 e *Escherichia coli* C2M5D3AN 39 I.E = 1,63,

apresentaram índices enzimáticos intermediários apresentando valores muito próximos a 2,00, porem não são considerados considerados como potenciais produtores de enzima e, *Micrococcus* sp. C3M1D1AE 72, *Bacillus* sp. C3M1D2MI 68, *Enterobacter* sp. C1M1D2AE 21, *Bacillus* sp. C3M3D1AE 75, *Bacillus* sp. C2M1D2AE 66 e *Escherichia* sp. C2M2D3AE 55 se demonstraram produção enzimática inferior, variando de 1,34 a 0,82 (I.E).

Já os dois isolados que apresentaram atividade enzimática para lipase: *Staphylococcus warneri* C1M2D1AN 4 I.E = 1,75 e *Staphylococcus epidermidis* C3M3D2AE 74 I.E = 1,56, embora também tenham apresentado valores intermediários, não alcançaram o o valor determinado como critério do índice enzimático.

Com exceção de alguns isolados bacterianos que não cresceram em meios de cultura específicos: *Bacillus licheniformis* C3M1D1AN 67 (protease), *Bacillus* sp. C3M1D2MI 68 (celulase), *Salmonella* sp. C3M2D2MI 69 (amido, protease e celulase) e *Bacillus licheniformis* C3M5D1MI 71 (protease, lipase e celulase), todos os demais isolados cresceram nos quatro diferentes meios de cultura, porém não produziram halos de degradação. Sugerindo que produziram apenas a quantidade necessária da enzima para o seu crescimento no meio de cultura. Na Figura 21, é possível observar as colônias crescidas nas quatro diferentes fontes enzimática e a produção de halos de degradação para protease, amilase e lipase.

Figura 21. Teste semiquantitativo de produção de enzimas hidrolíticas pelas bactérias isoladas de intestinos de abelhas sem ferrão: (A) protease = *Enterococcus faecalis* C2M5D3AE 59; (B) amilase = *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26 (C) lipase = *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11e (D) celulase = *Bacillus* sp. C3M3D1AE 75.



Fonte: Elaborada pela autora.

Conforme os resultados expostos, foi possível selecionar 16 isolados bacterianos com potencial biotecnológico para produção de proteases (*Enterococcus faecalis* C3M4D1AE 76, *Enterococcus faecalis* C2M5D3MI 48 e *Enterococcus faecalis* C2M4D1MI 51, *Enterococcus faecalis* C2M2D4MI 44, *Enterococcus faecalis* C2M2D3AE 54, *Enterococcus faecalis* C2M5D3AN 41, *Escherichia coli* C2M3D2MI 45, *Enterococcus faecalis* C2M5D3AE 59, *Enterococcus faecalis* C2M3D2AE 56, *Weissella paramesenteroides* C2M4D2AE 63, *Enterococcus faecalis* C2M2D2AN 33, *Bacillus infantis* C3M2D4AE 73, *Bacillus* sp. C3M1D2MI 68 *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26, *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11 e *Staphylococcus epidermidis* C3M3D2AE 74) e, quatro isolados com potencial para produção de amilases (*Bacillus* sp. C1M3D2AE 26, *Paenibacillus* sp. C1M1D5AN 2, *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11 e *Enterococcus faecalis* C3M4D1AE 76). Os isolados *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26, *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11 e *Enterococcus faecalis* C3M4D1AE 76 foram os de maior diversificação enzimática, produzindo simultaneamente, I.E $\geq 2,00$ para protease e amilase. Ao todo foram selecionadas 17 bactérias que serão mais detalhadamente estudadas no Capítulo 3, deste trabalho.

Tabela 7. Teste semiquantitativo de produção de enzimas hidrolíticas pelas bactérias isoladas de intestinos de abelhas sem ferrão.

Identificação Bacteriana	Protease			Amilase			Lipase			Celulase		
	***dh	**dc	*I.E	Dh	dc	I.E	dh	Dc	I.E	dh	dc	I.E
<i>Enterobacter cancerogenus</i> C1M1D2AN 1	0,00	6,02 ± 0,99	0,00	0,00	4,21 ± 0,30	0,00	0,00	6,24 ± 0,92	0,00	0,00	6,71 ± 0,71	0,00
<i>Paenibacillus</i> sp. C1M1D5AN 2	0,00	5,03 ± 0,47	0,00	18,71 ± 1,82	4,35 ± 0,61	4,30	0,00	4,52 ± 0,38	0,00	0,00	5,46 ± 0,34	0,00
<i>Enterobacter hormaechei</i> C1M2D1AN 3	0,00	22,10 ± 10,07	0,00	0,00	5,32 ± 0,11	0,00	0,00	14,97 ± 6,28	0,00	0,00	33,52 ± 5,99	0,00
<i>Staphylococcus warneri</i> C1M2D1AN 4	0,00	7,23 ± 2,24	0,00	0,00	4,44 ± 0,37	0,00	16,41 ± 0,25	9,36 ± 0,67	1,75	0,00	10,42 ± 1,49	0,00
<i>Kluyvera ascorbata</i> C1M2D1AN 5	0,00	11,19 ± 3,03	0,00	0,00	5,86 ± 0,35	0,00	0,00	11,95 ± 3,96	0,00	0,00	16,65 ± 1,46	0,00
<i>Enterobacter</i> sp. C1M3D2AN 6	0,00	9,57 ± 4,24	0,00	0,00	3,50 ± 0,30	0,00	0,00	12,18 ± 4,75	0,00	0,00	14,54 ± 3,40	0,00
<i>Pantoea dispersa</i> C1M3D2AN 7	0,00	11,14 ± 2,83	0,00	0,00	6,09 ± 1,02	0,00	0,00	11,37 ± 1,59	0,00	0,00	16,49 ± 1,92	0,00
<i>Enterobacter</i> sp. C1M3D2AN 8	0,00	7,92 ± 2,06	0,00	0,00	4,97 ± 0,42	0,00	0,00	6,90 ± 1,23	0,00	0,00	12,17 ± 2,55	0,00
<i>Enterobacter hormaechei</i> C1M3D2AN 9	0,00	7,90 ± 1,48	0,00	0,00	5,61 ± 0,34	0,00	0,00	6,60 ± 0,90	0,00	0,00	7,76 ± 1,54	0,00
<i>Paenibacillus taichungensis</i> C1M5D1AN 10	0,00	8,17 ± 1,08	0,00	0,00	8,98 ± 0,50	0,00	0,00	7,46 ± 0,78	0,00	0,00	8,43 ± 1,09	0,00
<i>Bacillus</i> sp. C1M2D1MI 11	32,99 ± 1,29	14,92 ± 0,82	2,21	14,71 ± 1,29	6,79 ± 0,81	2,17	0,00	8,93 ± 0,46	0,00	0,00	8,95 ± 0,46	0,00
<i>Serratia marcescens</i> C1M2D1MI 12	0,00	5,65 ± 0,21	0,00	0,00	5,19 ± 0,21	0,00	0,00	5,50 ± 0,15	0,00	0,00	5,80 ± 0,16	0,00
<i>Enterobacter hormaechei</i> C1M2D2MI 13	0,00	7,67 ± 0,67	0,00	0,00	8,72 ± 0,35	0,00	0,00	8,17 ± 0,24	0,00	0,00	7,92 ± 0,74	0,00
<i>Paenibacillus</i> sp. C1M3D1MI 14	0,00	5,20 ± 0,39	0,00	0,00	14,68 ± 5,41	0,00	0,00	4,95 ± 0,37	0,00	0,00	4,95 ± 0,39	0,00
<i>Enterococcus</i> sp. C1M3D1MI 15	0,00	3,12 ± 0,43	0,00	0,00	2,99 ± 0,34	0,00	0,00	3,63 ± 0,24	0,00	0,00	2,87 ± 0,31	0,00
<i>Enterobacter hormaechei</i> C1M3D1MI 16	0,00	17,20 ± 2,32	0,00	0,00	14,68 ± 1,84	0,00	0,00	14,71 ± 2,60	0,00	0,00	19,28 ± 0,26	0,00
<i>Bacillus licheniformis</i> C1M5D1MI 17	0,00	9,20 ± 0,14	0,00	0,00	9,20 ± 0,14	0,00	0,00	9,09 ± 0,23	0,00	0,00	9,11 ± 0,24	0,00
<i>Paenibacillus</i> sp. C1M5D1MI 18	0,00	2,60 ± 0,14	0,00	0,00	2,60 ± 0,14	0,00	0,00	2,64 ± 0,12	0,00	0,00	2,58 ± 0,10	0,00

<i>Lactococcus lactis</i> C1M1D1AE 19	0,00	14,23 ± 0,37	0,00	0,00	14,23 ± 0,37	0,00	0,00	14,55 ± 0,32	0,00	0,00	14,43 ± 0,30	0,00
<i>Pantoea dispersa</i> C1M2D2AE 20	0,00	1,54 ± 0,12	0,00	0,00	1,80 ± 0,36	0,00	0,00	1,70 ± 0,05	0,00	0,00	12,80 ± 0,65	0,00
<i>Enterobacter</i> sp. C1M1D2AE 21	0,00	5,73 ± 1,20	0,00	4,29 ± 1,45	3,66 ± 0,15	1,17	0,00	5,81 ± 1,15	0,00	0,00	7,99 ± 0,25	0,00
<i>Kluyvera ascorbata</i> C1M2D1AE 22	0,00	6,70 ± 1,30	0,00	0,00	4,01 ± 0,27	0,00	0,00	6,76 ± 1,37	0,00	0,00	9,81 ± 0,86	0,00
<i>Enterococcus</i> sp. C1M2D2AE 23	0,00	2,47 ± 0,44	0,00	0,00	1,74 ± 0,21	0,00	0,00	2,67 ± 0,52	0,00	0,00	3,44 ± 0,53	0,00
<i>Kluyvera ascorbata</i> C1M2D2AE 24	0,00	6,89 ± 1,52	0,00	0,00	4,62 ± 0,23	0,00	0,00	6,41 ± 1,28	0,00	0,00	9,33 ± 0,62	0,00
<i>Enterococcus termitis</i> C1M3D1AE 25	0,00	2,24 ± 0,22	0,00	0,00	1,88 ± 0,12	0,00	0,00	2,74 ± 0,53	0,00	0,00	2,99 ± 0,45	0,00
<i>Bacillus</i> sp. C1M3D2AE 26	31,48 ± 0,52	13,76 ± 0,76	2,29	17,17 ± 0,44	3,92 ± 0,59	4,39	0,00	3,62 ± 0,75	0,00	0,00	5,12 ± 0,95	0,00
<i>Microbacterium imperiale</i> C1M3D2AE 27	0,00	5,04 ± 0,83	0,00	0,00	4,52 ± 0,09	0,00	0,00	6,10 ± 0,80	0,00	0,00	7,37 ± 0,18	0,00
<i>Corynebacterium nuruki</i> C1M3D2AE 28	0,00	5,25 ± 0,43	0,00	0,00	5,27 ± 0,39	0,00	0,00	5,28 ± 0,14	0,00	0,00	5,46 ± 0,39	0,00
<i>Pantoea dispersa</i> C1M5D2AE 29	0,00	7,76 ± 1,81	0,00	0,00	4,95 ± 0,20	0,00	0,00	7,50 ± 1,59	0,00	0,00	11,20 ± 0,68	0,00
<i>Morganella morganii</i> C2M1D2AN 30	0,00	5,87 ± 0,19	0,00	0,00	5,79 ± 0,36	0,00	0,00	11,46 ± 0,59	0,00	0,00	11,53 ± 0,14	0,00
<i>Escherichia coli</i> C2M1D3AN 31	0,00	8,53 ± 0,47	0,00	0,00	7,99 ± 0,34	0,00	0,00	15,80 ± 0,95	0,00	0,00	10,23 ± 0,10	0,00
<i>Bacillus licheniformis</i> C2M2D2AN 32	0,00	2,16 ± 0,23	0,00	0,00	2,40 ± 0,30	0,00	0,00	1,43 ± 0,21	0,00	0,00	1,98 ± 0,18	0,00
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M2D2AN 33	19,28 ± 0,97	6,44 ± 0,74	3,00	0,00	5,88 ± 0,24	0,00	0,00	10,97 ± 0,92	0,00	0,00	12,20 ± 0,38	0,00
<i>Escherichia coli</i> C2M2D2AN 34	0,00	8,42 ± 0,49	0,00	0,00	7,84 ± 0,28	0,00	0,00	14,34 ± 1,04	0,00	0,00	12,80 ± 2,64	0,00
<i>Morganella morganii</i> C2M2D3AN 35	0,00	5,46 ± 0,21	0,00	0,00	6,58 ± 0,29	0,00	0,00	11,44 ± 0,48	0,00	0,00	11,88 ± 0,66	0,00
<i>Bacillus</i> sp. C2M3D3AN 36	0,00	1,48 ± 0,48	0,00	0,00	2,77 ± 0,60	0,00	0,00	1,42 ± 0,07	0,00	0,00	1,73 ± 0,29	0,00
<i>Escherichia coli</i> C2M3D3AN 37	0,00	8,22 ± 0,34	0,00	0,00	6,26 ± 0,37	0,00	0,00	18,95 ± 1,91	0,00	0,00	9,63 ± 0,33	0,00
<i>Escherichia coli</i> C2M3D3AN 38	0,00	9,40 ± 0,75	0,00	0,00	7,37 ± 0,24	0,00	0,00	11,86 ± 1,75	0,00	0,00	10,12 ± 0,40	0,00
<i>Escherichia coli</i> C2M5D3AN 39	0,00	7,34 ± 0,45	0,00	9,31 ± 0,91	5,71 ± 0,61	1,63	0,00	13,99 ± 1,67	0,00	0,00	11,03 ± 0,32	0,00

<i>Escherichia coli</i> C2M5D3AN 40	0,00	7,84 ± 0,42	0,00	0,00	8,86 ± 0,70	0,00	0,00	20,80 ± 2,44	0,00	0,00	12,49 ± 0,47	0,00
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M5D3AN 41	12,33 ± 0,72	3,06 ± 0,30	4,04	0,00	3,30 ± 0,10	0,00	0,00	16,84 ± 12,06	0,00	0,00	5,14 ± 0,61	0,00
<i>Weissella paramesenteroides</i> C2M4D2MI 42	0,00	2,50 ± 0,41	0,00	0,00	2,26 ± 0,35	0,00	0,00	3,68 ± 0,30	0,00	0,00	2,08 ± 0,04	0,00
<i>Escherichia coli</i> C2M2D2MI 43	0,00	5,25 ± 0,75	0,00	0,00	7,88 ± 0,69	0,00	0,00	6,57 ± 1,09	0,00	0,00	3,58 ± 0,32	0,00
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M2D4MI 44	17,29 ± 0,73	4,21 ± 0,18	4,11	0,00	12,72 ± 3,02	0,00	0,00	5,23 ± 0,56	0,00	0,00	36,28 ± 4,27	0,00
<i>Escherichia coli</i> C2M3D2MI 45	16,02 ± 0,51	4,00 ± 0,24	4,01	0,00	3,99 ± 0,60	0,00	0,00	5,04 ± 0,36	0,00	0,00	4,59 ± 0,25	0,00
<i>Escherichia coli</i> C2M3D2MI 46	0,00	8,60 ± 0,78	0,00	0,00	7,24 ± 0,38	0,00	0,00	16,68 ± 1,27	0,00	0,00	10,38 ± 0,52	0,00
<i>Klebsiella oxytoca</i> C2M5D3MI 47	0,00	5,71 ± 0,28	0,00	0,00	7,12 ± 0,39	0,00	0,00	15,93 ± 2,53	0,00	0,00	12,98 ± 0,77	0,00
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M5D3MI 48	14,02 ± 0,70	3,36 ± 0,23	4,18	0,00	4,23 ± 0,76	0,00	0,00	5,12 ± 0,45	0,00	0,00	6,13 ± 0,12	0,00
<i>Weissella paramesenteroides</i> C2M5D3MI 49	0,00	7,92 ± 0,57	0,00	0,00	6,44 ± 0,40	0,00	0,00	14,79 ± 0,67	0,00	0,00	13,21 ± 0,28	0,00
<i>Weissella paramesenteroides</i> C2M4D1MI 50	0,00	2,21 ± 0,12	0,00	0,00	1,90 ± 0,16	0,00	0,00	1,96 ± 0,26	0,00	0,00	3,15 ± 0,08	0,00
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M4D1MI 51	15,90 ± 0,62	3,80 ± 0,26	4,18	0,00	2,59 ± 0,36	0,00	0,00	6,04 ± 0,61	0,00	0,00	4,80 ± 0,38	0,00
<i>Bacillus</i> sp. C2M1D3AE 52	0,00	3,60 ± 0,45	0,00	0,00	2,34 ± 0,25	0,00	0,00	4,86 ± 0,45	0,00	0,00	4,18 ± 0,02	0,00
<i>Escherichia coli</i> C2M1D3AE 53	0,00	7,62 ± 0,71	0,00	16,28 ± 0,48	9,23 ± 0,99	1,76	0,00	16,02 ± 0,66	0,00	0,00	11,60 ± 0,64	0,00
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M2D3AE 54	15,37 ± 0,26	3,79 ± 0,54	4,06	0,00	3,82 ± 0,54	0,00	0,00	4,46 ± 0,54	0,00	0,00	4,89 ± 0,29	0,00
<i>Escherichia</i> sp. C2M2D3AE 55	0,00	8,05 ± 0,30	0,00	7,78 ± 4,53	9,52 ± 1,15	0,82	0,00	14,83 ± 2,61	0,00	0,00	11,22 ± 0,31	0,00
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M3D2AE 56	14,65 ± 0,72	4,15 ± 0,34	3,53	0,00	4,41 ± 0,28	0,00	0,00	13,77 ± 2,18	0,00	0,00	4,53 ± 0,20	0,00
<i>Klebsiella oxytoca</i> C2M3D2AE 57	0,00	8,02 ± 0,45	0,00	0,00	6,94 ± 0,11	0,00	0,00	15,33 ± 0,61	0,00	0,00	11,67 ± 0,45	0,00
<i>Micrococcus luteus</i> C2M3D3AE 58	0,00	4,27 ± 0,44	0,00	7,04 ± 0,79	4,21 ± 0,23	1,67	0,00	6,12 ± 0,68	0,00	0,00	2,67 ± 0,25	0,00
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M5D3AE 59	19,58 ± 1,23	5,18 ± 0,56	3,78	0,00	3,18 ± 0,23	0,00	0,00	9,42 ± 2,09	0,00	0,00	4,77 ± 0,23	0,00

<i>Corynebacterium nuruki</i> C2M5D3AE 60	0,00	3,85 ± 0,35	0,00	0,00	4,85 ± 0,37	0,00	0,00	3,57 ± 0,29	0,00	0,00	7,80 ± 0,31	0,00
<i>Morganella morganii</i> C2M5D3AE 61	0,00	5,79 ± 0,51	0,00	0,00	4,93 ± 0,51	0,00	0,00	14,14 ± 1,23	0,00	0,00	12,14 ± 0,50	0,00
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M4D2AE 62	0,00	3,88 ± 0,52	0,00	0,00	3,15 ± 0,33	0,00	0,00	3,71 ± 0,30	0,00	0,00	4,71 ± 0,10	0,00
<i>Weissella paramesenteroides</i> C2M4D2AE 63	13,87 ± 0,35	4,01 ± 0,20	3,46	0,00	4,04 ± 0,52	0,00	0,00	4,98 ± 0,38	0,00	0,00	4,45 ± 0,19	0,00
<i>Escherichia coli</i> C2M1D2AE 64	0,00	8,38 ± 0,46	0,00	0,00	7,75 ± 0,39	0,00	0,00	17,26 ± 1,15	0,00	0,00	10,89 ± 0,22	0,00
<i>Enterococcus</i> sp. C2M1D2AE 65	0,00	4,96 ± 0,25	0,00	0,00	4,09 ± 0,36	0,00	0,00	6,90 ± 1,04	0,00	0,00	4,39 ± 0,14	0,00
<i>Bacillus</i> sp. C2M1D2AE 66	41,21 ± 1,37	28,46 ± 1,28	1,45	28,01 ± 1,59	25,19 ± 0,63	1,11	0,00	27,57 ± 1,88	0,00	0,00	41,94 ± 9,45	0,00
<i>Bacillus licheniformis</i> C3M1D1AN 67	0,00	0,00	0,00	0,00	1,59 ± 0,26	0,00	0,00	1,63 ± 0,58	0,00	0,00	1,74 ± 0,19	0,00
<i>Bacillus</i> sp. C3M1D2MI 68	39,42 ± 1,02	16,97 ± 0,73	2,32	27,07 ± 0,27	22,12 ± 0,19	1,22	0,00	27,34 ± 0,63	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Salmonella</i> sp. C3M2D2MI 69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,38 ± 0,31	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Salmonella</i> sp. C3M2D2MI 70	0,00	0,68 ± 0,12	0,00	0,00	1,98 ± 0,75	0,00	0,00	1,38 ± 0,55	0,00	0,00	6,02 ± 0,57	0,00
<i>Bacillus licheniformis</i> C3M5D1MI 71	0,00	0,00	0,00	0,00	1,88 ± 0,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Micrococcus</i> sp. C3M1D1AE 72	0,00	7,61 ± 0,55	0,00	8,85 ± 1,17	6,58 ± 0,75	1,34	0,00	12,33 ± 1,49	0,00	0,00	5,29 ± 0,20	0,00
<i>Bacillus infantis</i> C3M2D4AE 73	9,51 ± 0,68	3,87 ± 0,41	2,45	10,40 ± 0,25	5,86 ± 0,49	1,77	0,00	3,90 ± 1,13	0,00	0,00	36,92 ± 2,46	0,00
<i>Staphylococcus epidermidis</i> C3M3D2AE 74	10,55 ± 0,35	5,24 ± 0,31	2,02	0,00 ± 0,00	4,17 ± 0,10	0,00	10,83 ± 0,41	6,96 ± 0,25	1,56	0,00	0,89 ± 0,35	0,00
<i>Bacillus</i> sp. C3M3D1AE 75	0,00	17,30 ± 1,15	0,00	29,34 ± 1,08	25,93 ± 0,43	1,13	0,00	22,14 ± 1,27	0,00	0,00	1,55 ± 0,22	0,00
<i>Enterococcus faecalis</i> C3M4D1AE 76	24,80 ± 0,77	4,68 ± 0,41	5,30	8,28 ± 0,73	4,07 ± 0,31	2,04	0,00	6,13 ± 1,00	0,00	0,00	0,33 ± 0,19	0,00

Valores de *I. E (índice enzimático) > 2 apresentam potencial biotecnológico, **dc (diâmetro médio das colônias) ± erro padrão da média, ***dh (diâmetro médio do halo de degradação) ± erro padrão da média.

Fonte: Elaborada pela autora.

4 DISCUSSÃO

A habilidade de microrganismos produzirem enzimas extracelulares com elevado potencial, em meio sólido, é avaliada através de diferentes metodologias. Entre elas, o índice enzimático é uma ferramenta simples que avalia a degradação de macromoléculas, uma vez que há uma relação direta entre tamanho do halo e capacidade de degradação realizada pelos microrganismos (LIN; CHANG; SHEN, 1991; TEN *et al.*, 2004).

Autores como Santos; Filho e Teixeira (2016), ao estudarem somente o potencial de produção de protease, isolaram 30 bactérias de solo, gênero *Bacillus* spp., e determinaram que 46,7% delas apresentaram alta atividade proteolítica. E Araujo; Guabertto e Silva (2012), ao estudarem sete bactérias da rizosfera de *Brachiaria brizantha* (capim-marandu), também pertencentes ao gênero *Bacillus*, observaram que 100% dessas foram capazes de produzir proteases.

Quanto a atividade amilolítica, Oliveira *et al.* (2007) obteve sete (36,8%) de um total de 19 isolados de rizóbios com I.E $\geq 2,1$ em meio YMA modificado, o que permite considerá-los bons produtores de amilase, sendo que o isolado INPA R-926 alcançou o maior índice enzimático com I.E= 3,1. Ao comparar os resultados obtidos com o presente estudo, embora a quantidade de isolados que produziram amilase seja menor, a produção enzimática foi superior para as bactérias *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26 e *Paenibacillus* sp. C1M1D5AN 2, I.E = 4,39 a 4,30, respectivamente.

Ao analisar a produção de enzimas hidrolíticas por 113 bactérias isoladas de provisões alimentícias de colônias de abelhas sem ferrão *Melipona seminigra*, Nacif-Marçal (2017), obteve atividades enzimáticas semelhantes ao presente estudo, de 42% para protease e 9% amilase e também observou altos índices para celulase (35%) e lipase (9%). Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira *et al.* (2006), ao analisar 64 isolados de rizóbios, 35,9% destes foram produtores de proteases, 29,7% de amilase e 4,9% de lipases, em diferentes pHs.

Ao considerar os isolados que apresentaram maior quantidade de I.E $\geq 2,00$. O gênero *Enterococcus* que foi predominante dentre as bactérias com potencial para produção de proteases, com índices enzimáticos (I.E variando de 3,00 a 5,30). O que pode ser explicado por sua multiplicação rápida e a capacidade de se desenvolver em temperaturas de 10 a 45 °C em pH 9,6 (PARADELLA; KOGA-ITO; JORGE, 2007). Além disso, Giazzi *et al.* (2020), ao analisar isolados dos gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus* que apresentaram atividade

proteolítica, observou que a temperatura na qual o experimento foi incubado (20 °C e 37 °C), pode ter contribuído com a atividade da enzima realizada.

Já o gênero *Bacillus* é comumente capaz de produzir altos rendimentos de enzimas proteolíticas e amilolíticas neutras e alcalinas com especialidades como: elevada estabilidade a temperaturas extremas, pH, solventes orgânicos, detergentes e compostos oxidantes (RAO *et al.*, 1998; PANDEY *et al.*, 2000; CONTESINI; MELO; SATO, 2018).

Quanto a não produção de celulases bacterianas no presente estudo, pode ter si devido a possível existencia de celulases endógenas, pois segundo Kunieda *et al.* (2006) abelhas possuem o gene GHF9, o qual mostra semelhanças impressionantes com as endo-beta 1,4-glucanases de cupins, que contribuem com a degradação de celulases presentes no intestino destes indivíduos provenientes de sua alimentação rica em celulases.

As enzimas hidrolíticas podem ser produzidas por várias espécies de microrganismos, sendo frequentemente utilizadas por sua diversidade bioquímica, possibilidades de manipulação genética e, suas vantagens econômicas e técnicas (LAXMAN *et al.*, 2015), podendo oferecer uma alta variedade de compostos para biocatálises. No entanto, fatores como composição de meio, pH, temperatura, aeração, entre outros são essenciais para a que os microrganismos expressem sua potencialidade enzimática (ABIDI *et al.*, 2011).

Assim sendo, as abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta* possuem uma microbiota intestinal capaz de produzir enzimas hidrolíticas, no entanto são necessários mais estudos para compreender melhor como esta microbiota atua, sendo indispensável à otimização das condições de cultivo para melhor produção das enzimas desejadas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram das 76 bactérias, 52% deles exibiram atividades proteolíticas, 42% amilolíticas e 6% lipídicas, com o maior número de isolados com esses perfis enzimáticos sendo dos gêneros *Enterococcus* e *Bacillus*.

Foram selecionados 17 isolados com I.E $\geq 2,00$, *Enterococcus faecalis* C3M4D1AE 76, *Enterococcus faecalis* C2M5D3MI 48 e *Enterococcus faecalis* C2M4D1MI 51, *Enterococcus faecalis* C2M2D4MI 44, *Enterococcus faecalis* C2M2D3AE 54, *Enterococcus faecalis* C2M5D3AN 41, *Escherichia coli* C2M3D2MI 45, *Enterococcus faecalis* C2M5D3AE 59, *Enterococcus faecalis* C2M3D2AE 56, *Weissella paramesenteroides* C2M4D2AE 63,

Enterococcus faecalis C2M2D2AN 33, *Bacillus infantis* C3M2D4AE 73, *Bacillus* sp. C3M1D2MI 68 *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26, *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11 e *Staphylococcus epidermidis* C3M3D2AE 74) exibiram os maiores índices proteolíticos, enquanto que os isolados *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26, *Paenibacillus* sp. C1M1D5AN 2, *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11 e *Enterococcus faecalis* C3M4D1AE 76 exibiram os maiores índices amilolíticos.

Os isolados *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26, *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11 e *Enterococcus faecalis* C3M4D1AE 76 foram os de maior diversificação enzimática, produzindo protease e amilase, com I.E \geq 2,00.

Os isolados obtidas da microbiota intestinal de *Scaptotrigona polysticta* são capazes de produzir elevados índices enzimáticos, no entanto são necessários mais estudos para compreender melhor como estas agem nas abelhas.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABIDI, F.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T.; MARZOUKI, M. N. Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. *Process Biochemistry*, v. 46. n.12, p. 2301-2310, 2011.

ARAÚJO F.F.; GUABERTTO, L.M.; SILVA, I.F. Bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em *Brachiaria brizantha*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v41, n. 3, p 521-527. 2012.

ASTOLFI-FILHO, S., GALEMBECK, E.V., FARIA, J.B., FRASCINO, A.C.S. Stable Yeast Transformants that Secrete Functional α -Amylase Encoded by Cloned Mouse Pancreatic cDNA. *Nature Biotechnology*, v. 4, p. 311-315, 1986.

BON, E. P. S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Editora *Interciência*, 506p, 2008.

BONILLA-ROSSO, G.; ENGEL, P. Functional roles and metabolic niches in the honey bee gut microbiota. *Current opinion in microbiology*, v. 43, p. 69-76, 2018.

BREZNAK, J. A.; BRUNE, A. Role of microorganisms in termite digestion of lignocellulose. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 39, p. 453-487, 1994.

CASH, H.; HOOPER, L. Commensal bacteria shape the development of the intestinal immune system. *ASM News*, v. 71, n. 2, p. 77-83, 2005.

- CONTESINI F.J, MELO R.R, SATO H.H. An overview of Bacillus proteases: from production to application. *Crit Rev Biotechnol.*, v. 38, n.3, p. 321-334, 2018.
- FRIAS, B. E. D; BARBOSA, C. D.; LOURENÇO, A. P. Pollen nutrition in honey bees (*Apis mellifera*): impact on adult health. *Apidologie*, v. 47, p. 15-25, 2016.
- GIAZZI, A.; TOSONI, N.F.; MORAES, M.L.; FURLANETO-MAIA, L.; KATSUDA, M. S. Propriedades tecnológicas das bactérias ácido lácticas isoladas na região norte do Paraná. *Brazilian Journal of Development.*, Curitiba, v. 6, n. 4, p. 18861-18877, 2020.
- GILLIAM, M.; ROUBIK, D. W.; LORENZ, B. J.; Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie*, v. 21, p. 89–97, 1990.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, v.67, p. 597-607, 1975.
- KHAN, K. A.; AL-GHAMDI, A. A.; GHRAH, H. A.; ANSARI, M. J.; ALI, H.; ALAMRI, S. A.; AL-KAHTANI, S. N.; ADGABA, N.; QASIM, M.; HAFEEZ, M. Structural diversity and functional variability of gut microbial communities associated with honey bees. *Microbial pathogenesis*, v. 138, p. 1-12, 2020.
- KOUKER, G.; JAEGER, K. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, n. 1, p. 211–213, 1987.
- KUNIEDA, T.; FUJIYUKI, T.; KUCHARSKI, R.; FORET, S.; AMENT, S. A.; TOTH, A. L.; OHASHI, K.; TAKEUCHI, H.; KAMIKOUCHI, A.; KAGE, E.; MORIOKA, M.; BEYE, M.; KUBO, T.; ROBINSON, G. E.; MALESZKA, R. Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honey bee genome. *Insect Mol Biol.*, v.15, n. 5, p. 563-576, 2006.
- LAXMAN, R. S.; SONAWANE, A. P.; MORE, S. V.; RAO, B. S.; RELE, M. V.; JOGDAND, V. V.; DESHPANDE, V., V.; RAO, M. B. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3152-3158, 2015.
- LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a Gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eragrostis tef*). *Journal of Applied Bacteriology*, v. 77, n. 3, p. 348–352, 1994.
- LIN, J.E.; CHANG, D.C.N.; SHEN, G.J. Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. *Biotechniques*, v. 5, n. 4, p. 275-280, 1991.
- LUNDGREN, J. G.; LEHMAN, R. M. Bacterial Gut Symbionts Contribute to Seed Digestion in an Omnivorous Beetle. *PLoS ONE*, v. 5, n. 5, p. 1-10, 2010.
- NACIF-MARÇAL, L. *Comunidades bacterianas associadas a colônias de abelhas amazônicas sem ferrão da espécie Melipona seminigra: diversidade e potencial enzimático*. 2017. 134 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.

- OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JÚNIOR, A. F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 27, n.1, p. 61-66, 2007
- OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JÚNIOR, A.F. Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central crescendo em diferentes níveis de acidez. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 26, n.1, p. 204-210, 2006.
- ONCHURU, T. O.; JAVIER MARTINEZ, A.; INGHAM, C. S.; KALTENPOTH, M. Transmission of mutualistic bacteria in social and gregarious insects. *Current opinion in insect science*, v. 28, p. 50–58, 2018.
- PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 31, n. 2, p. 135-152, 2000.
- PARADELLA T.C, KOGA-ITO C.Y, JORGE A.O.C. *Enterococcus faecalis*: clinical and microbiological considerations. *Rev. Odontol. UNESP*, v. 36, n. 2, p. 163-68, 2007.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.
- SANTOS, J.G.; FILHO, R.F.C.; TEIXEIRA, M.F. S. Produção e caracterização de proteases de bacilos da Amazônia com potencial fibrinolítico *Scientia Amazonia*, v. 5, n.1, p.15-21, 2016.
- SHINDE, A. A.; SHAIKH, F. K.; PADUL, M. V.; KACHOLE, M. S. *Bacillus subtilis* RTSBA6 6.00, a new strain isolated from gut of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) produces chymotrypsin-like proteases. *Saudi journal of biological sciences*, v. 19, n. 3, p. 317–323, 2012.
- TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine Rument. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 43, n. 4, p. 777–780, 1982.
- TEN L.N, IM W.T, KIM M.K, KANG M.S, LEE S.T. Development of a plate technique for screening of polysaccharide-degrading microorganisms by using a mixture of insoluble chromogenic substrates. *J Microbiol Methods*, v. 56, n. 3, p. 375-82. 2004.
- ZHENG, H.; STEELE, M. I.; LEONARD, S. P.; MOTTA, E.; MORAN, N. A. Honey bees as models for gut microbiota research. *Lab animal*, v. 47, n. 11, p. 317–325, 2018.

CAPÍTULO III

Determinação da atividade amilolítica e proteolítica de bactérias intestinais de abelha de sem ferrão *Scaptotrigona polysticta* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

CAPITULO III: Determinação da atividade amilolítica e proteolítica de bactérias intestinais de abelha de sem ferrão *Scaptotrigona polysticta* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Suziane P. Rodrigues¹, Lorena Nacif-Marçal¹, Luiz A. Oliveira², Carlos Gustavo N. da Silva¹.

1 Universidade Federal do Amazonas, Manaus-Brasil.

2 Laboratório de Microbiologia de solo, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus-Brasil.

RESUMO

A produção de enzimas é um vasto campo de estudo quando se trata de processos biotecnológicos, devido à sua especificidade para as reações que catalisam. Entre as enzimas encontram-se as proteases e as amilases, enzimas multifuncionais, com diversas aplicabilidades, com grande mercado industrial que estima crescer a uma taxa anual de 6,3%. Dessa forma a procura por fontes enzimáticas vem se intensificando, tornando-se fundamental a busca por novas fontes produtoras de enzimas de interesse comercial com aplicabilidade em diversas áreas da indústria biotecnológica. Com isso o objetivo deste capítulo é a quantificação enzimática de proteases e amilases produzidas a partir de bactérias intestinais de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta* que obtiveram halo de degradação enzimática >2, no capítulo II. Foram selecionadas 17 bactérias com potencial para produção enzimática e a metodologia constituiu-se no crescimento bacteriano em meio líquido suplementado com 10% de amido para amilase e, 1% gelatina e 2% leite desnatado para protease, e inoculado a 150 rpm, na temperatura de 35 °C. A intervalos de tempo determinados (6h, 12h e a cada 24h até 120h para amilase e 24h, 48h e 72h para protease), foram retirados frascos contendo amostras para determinação de crescimento, enzimática e pH. A determinação da atividade enzimática foi realizada pelo método de Miller (1959) para amilase e, Leighton *et al.* (1973) para protease. Como resultados, das 17 bactérias selecionadas apenas 7 bactérias tiveram produção enzimática. *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26, apresentou maior produção de α -amilase com $7,677 \pm 0,111$ U/mL, e as cepas *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11, *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26 e *Bacillus* sp. C3M1D2MI 68 obtiveram maiores atividades proteolíticas com $11,700 \pm 0,002$ U/mL, $11,733 \pm 0,004$ U/mL e $12,067 \pm 0,001$ U/mL de proteases, respectivamente, não tendo diferença estatística entre si. Assim, concluímos que bactérias intestinais de abelhas sem ferrão *S. polysticta* possuem a capacidade de produção de enzimas amilolíticas e proteolíticas, sendo necessários mais estudos que busquem a otimização, caracterização, produção e purificação, além das possíveis aplicações que essas enzimas venham a ter.

Palavras-chaves: Protease, amilase, enzimas hidrolítica, bactérias intestinais.

ABSTRACT

The production of enzymes is a vast field of study when it comes to biotechnological processes, due to their specificity for the reactions they catalyze. Among the enzymes are proteases and amylases, multifunctional enzymes, with different applications, with a large industrial market that is estimated to grow at an annual rate of 6.3%. Thus, the search for enzymatic sources has been intensifying, making the search for new sources of enzymes of commercial interest with applicability in several areas of the biotechnology industry essential. Thus, the objective of this chapter is the enzymatic quantification of proteases and amylases produced from intestinal bacteria of stingless bees *Scaptotrigona polysticta* that obtained a halo of enzymatic degradation >2 , in chapter 2. 17 bacteria with potential for enzymatic production and the methodology consisted of bacterial growth in liquid medium supplemented with 10% starch for amylase, 1% gelatin and 2% skimmed milk for protease, and inoculated at 150 rpm, at a temperature of 35 °C. At determined time intervals (6h, 12h and every 24h up to 120h for amylase and 24h, 48h and 72h for protease), vials containing samples were removed for determination of growth, enzymatic and pH. The determination of enzymatic activity was performed by the method of Miller (1959) for amylase and, Leighton et al. (1973) for protease. As a result, of the 17 bacteria selected, only 7 bacteria had enzymatic production. *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26, showed the highest production of α -amylase with $7,677 \pm 0,111$ U/mL, and *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11, *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26 and *Bacillus* sp. C3M1D2MI 68 had higher proteolytic activities with $11,700 \pm 0,002$ U/mL, $11,733 \pm 0,004$ U/mL and $12,067 \pm 0,001$ U/mL of proteases, respectively, with no statistical difference between them. Thus, we conclude that intestinal bacteria from stingless bees *S. polysticta* have the capacity to produce amylolytic and proteolytic enzymes, requiring further studies that seek optimization, characterization, production and purification, in addition to the possible applications that these enzymes may have.

Keywords: Protease, amylase, hydrolytic enzymes, intestinal bacteria.

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são conhecidas industrialmente como biocatalisadores, sendo formadas por longas cadeias de aminoácidos com ligações peptídicas, sintetizadas por células vivas, atuando em quase todas as reações químicas do metabolismo dos organismos vivos; aceleram processos e convertem assim, uma substância conhecida como substrato, em outra denominada produto (CHAPMAN *et al.*, 2018).

A produção de enzimas é um vasto campo de estudo quando se trata de processos biotecnológicos, devido à sua especificidade para as reações que catalisam (SAYALI *et al.*, 2013). Elas constituem um dos mais importantes grupos de produtos biológicos de necessidade humana, possuindo várias aplicações nas mais diversas áreas de processos industriais e biotecnológicos, sendo ferramentas úteis em análises clínicas, análises de alimentos, análises químicas, de contaminação ou poluição de ambientes (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004).

Segundo relatório da BBC Research (2021), o mercado global de enzimas industriais deve crescer de US \$ 6,4 bilhões em 2021 para US \$ 8,7 bilhões em 2026, a uma taxa de 6,3% de crescimento anual para o período. Dessa forma, a procura por fontes enzimáticas vem se intensificando, tornando-se fundamental a busca por novas fontes produtoras de enzimas de interesse comercial com aplicabilidade em diversas áreas da indústria biotecnológica (SHELDON; VAN PELT, 2013).

Entre as enzimas encontram-se as proteases e as amilases, enzimas multifuncionais, com diversas aplicabilidades, sendo utilizadas frequentemente em indústrias de detergentes, couro, produtos farmacêuticos, alimentos e biotecnologia, têxteis, papel e outros (RAVEENDRAN *et al.*, 2018).

Essas enzimas podem ser obtidas de animais, plantas e microrganismos, sendo este último, um dos principais produtores devido às suas vantagens econômicas e técnicas, além de sua diversidade bioquímica e a possibilidade de manipulação genética (LAXMAN *et al.*, 2015). Para isso, os microrganismos devem apresentar as seguintes características: ser seguro do ponto de vista biológico; ter alta capacidade de síntese e excreção de enzima; suportar condições ambientais adversas (pH, temperatura, pressão, entre outras); ser tolerante a substâncias tóxicas que podem ser geradas nos processos de tratamento da matéria-prima ou pelo próprio metabolismo celular (BON *et al.*, 2008).

Com base no exposto, o objetivo deste capítulo é a quantificação enzimática de proteases e amilases produzidas a partir de bactérias intestinais de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta* que obtiveram halo de degradação enzimática >2, no capítulo 2.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Ensaio Enzimático Quantitativo

Os microrganismos que apresentaram potencial biotecnológico, Índice Enzimático (I.E) >2, no capítulo 2, foram avaliados quanto ao crescimento em meio líquido e determinação da atividade enzimática. Para isso, as colônias foram reativadas em meio ágar LB e incubadas a 35 °C, até seu crescimento.

2.1.1 Controle de crescimento em meio líquido

Após crescimento em placa, as bactérias foram transferidas para tubo de ensaio e padronizadas até a ordem 10^5 , de acordo com a escala de MacFarland e semeadas erlermayer contendo 100ml de caldo LB, pH 7, em triplicata, e inoculado em incubadora horizontal (SOLAB Cientifica) operando a 150 rpm, à temperatura de 35 °C. A intervalos de tempo determinados (6h, 12h e a cada 24h até 120h), foram retirados frascos contendo amostras para determinação do crescimento, pH.

A concentração celular foi medida por turbidimetria. A turbidez do meio foi medida em espectrofotômetro de microplacas iMark™ Microplate Reader (BIO-RAD), utilizando comprimento de onda de 595 nm.

2.2 Ensaio enzimático

As bactérias já crescidas, foram padronizadas a 10^5 de acordo com a escala de MacFarland e semeadas em triplicata, em erlermayer contendo 100 mL de caldo (2,5 g/L de peptona, 1,25 g/L de extrato de levedura, 1,25 g/L de NaCl, enriquecido com 10 g/L de amido solúvel, pH 7.0), para atividade amilolítica e caldo (leite em pó desnatado 2 g/L (Itambé®) e gelatina sem sabor 1 g/L (ROYAL®), 2 g/L de extrato de levedura, com pH 7), para atividade

proteolítica. E inoculado em incubadora horizontal (SOLAB Científica) operando a 150 rpm, à temperatura de 35 °C. A intervalos de tempo determinados (6h, 12h e a cada 24h até 120h para amilase e 24h, 48h e 72h para protease), foram retirados frascos contendo amostras para determinação de crescimento, enzimática e pH. E a concentração celular, para determinação do crescimento, foi medida por turbidimetria em espectrofotômetro de microplacas iMark™ Microplate Reader (BIO-RAD), a 595 nm.

2.2.1 Quantificação da produção enzimática em meio líquido

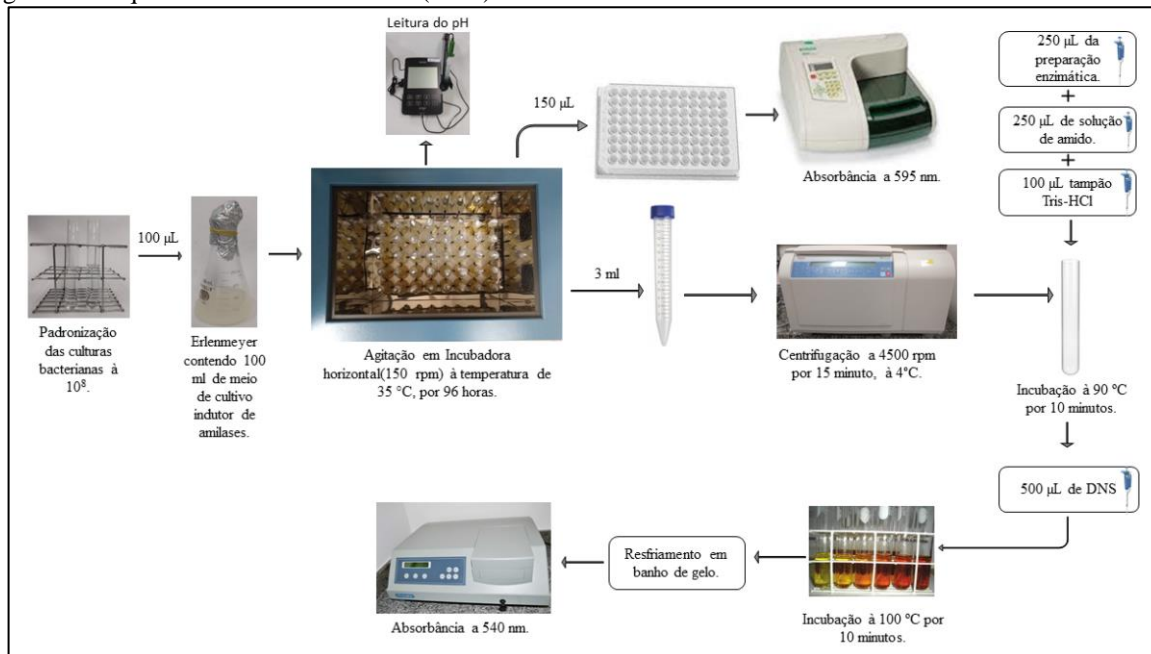
A determinação da produção enzimática de amilase e protease, foi realizada através da remoção das células do meio de cultura, por centrifugação a 4500 rpm por 15 minuto, a 4°C, em centrífuga modelo Heraeus Megafuge 16R Centrifuge (Thermo Scientific).

2.2.1.1 Amilase

A quantificação dos açúcares redutores (glicose) presente nas amostras, foram realizadas utilizando o método de Miller (1959). Foi realizada uma mistura contendo 250 µL da preparação enzimática (sobrenadante livre de células), 250 µL de solução de amido 5 g/L em tampão Tris-HCl (0,05 M) pH 8,5 e mais 100 µL do mesmo tampão Tris-HCl (0,05 M) pH 8,5, foi incubada a 90 °C por 10 minutos.

Em seguida, a reação foi paralisada pela adição de 500 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e colocadas incubada à 100 °C por 10 minutos e, em seguida, resfriada em banho de gelo. A absorvância da mistura foi medida em espectrofotômetro, Biospectro Espectrofotômetro SP-220, a 540 nm, de acordo com a figura 22. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, sendo o DNS adicionado juntamente com a solução de amido 5 g/L.

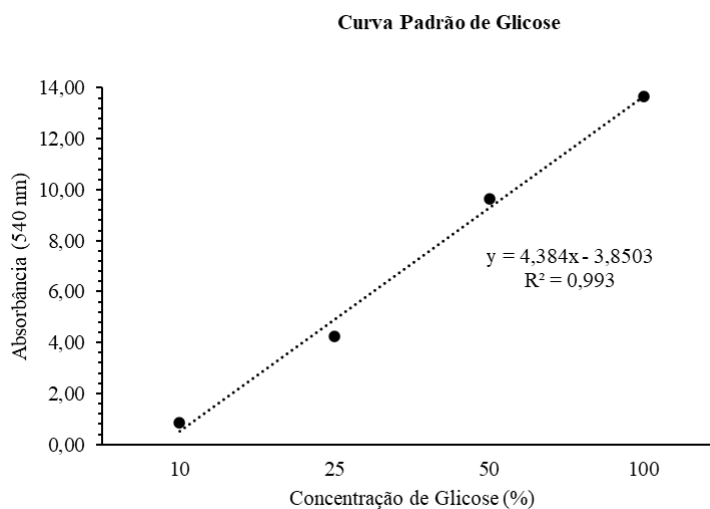
Figura 22. Esquema da técnica de Miller (1959).



Fonte: Elaborada pela autora.

Uma curva padrão de calibração glicose foi realizada para a determinação de açúcares redutores nas concentrações de 100, 50, 25 e 10%, onde meu 100% equivale a 10 g/L, com o coeficiente de determinação (R^2) maior do que 0,99, onde U (Unidade da atividade da enzima) foi definida como foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de açúcar redutor por minuto a partir do amido solúvel, nas condições do ensaio (Figura 23).

Figura 23. Curvas padrão de calibração com glicose de Miller (1959) em espectrofotômetro a 540 nm.

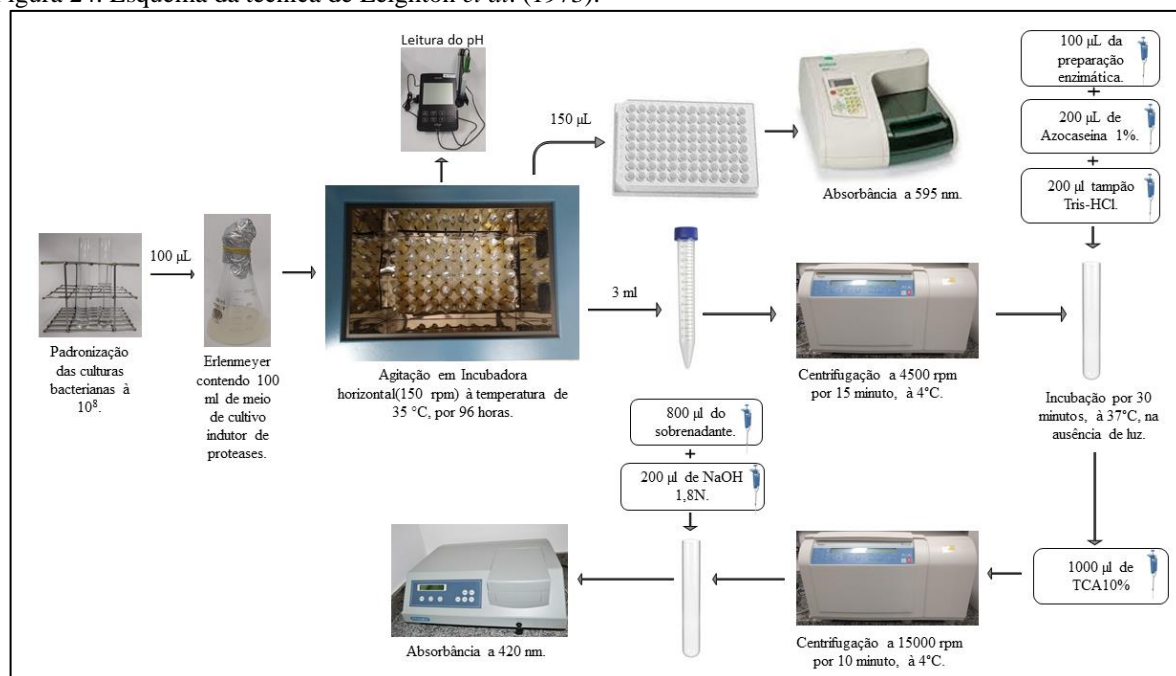


Fonte: Elaborada pela autora.

2.2.1.2 Protease

A atividade proteolítica foi determinada utilizando substrato de azocaseína, seguindo o método de Leighton *et al.* (1973). Foram adicionados 100 µl da preparação enzimática à 200 µl de azocaseína 1%, e 200 µl tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2, encubando-as em 37 °C, por 30 minutos, na ausência de luz. A reação foi interrompida pela adição de 1000 µl de ácido tricloroacético 10% (TCA) (p/v) e, em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, 15000 rpm a 4 °C, para precipitação das proteínas. Posteriormente, homogeneizou-se o sobrenadante em 200 µl de NaOH 1,8 N. Em espectrofotômetro, leu-se a absorbância das amostras a 420 nm, figura 24. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento de abs 0,01 a 420 nm nas condições de tempo e temperatura de incubação. Um controle para cada amostra foi realizado preparando da mesma forma que a amostra reacional, porém o TCA foi imediatamente adicionado à reação, bloqueando a atividade enzimática. Realiza-se a leitura da absorbância de 420 nm.

Figura 24. Esquema da técnica de Leighton *et al.* (1973).



Fonte: Elaborada pela autora.

3 ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão, com medições independentes e foram tratados com o programa IBM SPSS *Statistics*, versão 27.0.1. Os resultados obtidos foram submetidos a um teste de homogeneidade das variâncias por meio do teste de Levene, seguido da verificação da normalidade com o teste de Shapiro-Wilk. Utilizou-se uma análise de variância de uma via (ANOVA) com os dados e uma análise post hoc de Tukey com nível de significância de 95%.

4 RESULTADOS

As bactérias selecionadas neste capítulo são provenientes do capítulo 2, com índice enzimático $> 2,0$. Um total de 17 bactérias foram escolhidas, sendo 4 com potencial amilolítica e 16 com potencial proteolítica.

O controle de crescimento em meio líquido Lúria Bertani, tabela 8, na absorvância de 595nm, foi observada *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26 obteve maior crescimento celular nas primeiras 6 horas de incubação, seguido de *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11, os demais microrganismos embora apresentem diferença estatística obtiveram baixo crescimento celular, enquadrando-se fase de latência.

Já em 12 horas de crescimento, ao compararmos com as primeiras 6 horas, esses começaram a se desenvolver, já adaptados ao meio de cultura, dando início a sua fase exponencial. As demais horas, 24, 48 e 72, a maioria dos microrganismos enquadraram-se na fase estacionária e 96 e 120 horas o declínio celular.

Quando comparamos ao pH das amostras, nas primeiras 12h o pH manteve-se estável, entre 6,6 a 7,4, mostrando pouca variação entre microrganismos, crescendo em um pH mais neutro. No decorrer das horas, as bactérias *Enterococcus faecalis* C2M5D3AN 41, *Enterococcus faecalis* C2M2D4MI 44, *Escherichia coli* C2M3D2MI 45, *Enterococcus faecalis* C2M5D3MI 48, *Enterococcus faecalis* C2M2D3AE 54, *Enterococcus faecalis* C2M3D2AE 56, *Enterococcus faecalis* C2M5D3AE 59, *Weissella paramesenteroides* C2M4D2AE 63, mantiveram-se crescendo em pH neutro de 6,0 a 7,0, as demais bactérias alteraram seu meio para um pH mais alcalino, tabela 9.

Tabela 8. Resultado dos ensaios de crescimento celular em meio de cultura líquido Lúria Bertani, usando comparações dos subconjuntos homogêneos.

Identificação Bacteriana	6 horas	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
<i>Paenibacillus</i> sp. C1M1D5AN 2	0,006 ± 0,001 gfe	0,449 ± 0,001 ih	0,439 ± 0,003 dc	0,738 ± 0,008 dc	0,706 ± 0,004 c	0,549 ± 0,003 d	0,634 ± 1,922 a
<i>Bacillus</i> sp. C1M2D1MI 11	0,349 ± 0,003 b	0,386 ± 0,002 i	0,412 ± 0,001 edc	0,526 ± 0,002 e	0,447 ± 0,001 ed	0,420 ± 0,001 e	0,393 ± 0,008 a
<i>Bacillus</i> sp. C1M3D2AE 26	0,429 ± 0,001 a	0,493 ± 0,028 hg	0,495 ± 0,004 c	0,749 ± 0,001 cd	0,518 ± 0,010 d	0,404 ± 0,003 e	0,399 ± 0,005 a
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M2D2AN 33	0,014 ± 0,003 gfedc	1,163 ± 0,010 a	0,935 ± 0,017 a	0,792 ± 0,003 c	0,732 ± 0,003 c	0,771 ± 0,042 e	0,668 ± 0,008 a
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M5D3AN 41	0,023 ± 0,001 dc	0,712 ± 0,023 cb	0,388 ± 0,010 fed	0,322 ± 0,022 g	0,307 ± 0,029 gf	0,283 ± 0,016 c	0,233 ± 0,024 a
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M2D4MI 44	0,017 ± 0,003 gfedc	0,583 ± 0,018 fe	0,371 ± 0,009 fed	0,317 ± 0,007 g	0,294 ± 0,015 gf	0,288 ± 0,005 f	0,193 ± 0,021 a
<i>Escherichia coli</i> C2M3D2MI 45	0,030 ± 0,001 c	0,665 ± 0,009 dc	0,354 ± 0,012 fed	0,289 ± 0,004 g	0,304 ± 0,021 gf	0,280 ± 0,007 f	0,223 ± 0,006 a
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M5D3MI 48	0,024 ± 0,003 dc	0,663 ± 0,004 dc	0,388 ± 0,013 fed	0,302 ± 0,006 g	0,296 ± 0,006 gf	0,341 ± 0,011 fe	0,272 ± 0,017 a
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M4D1MI 51	0,009 ± 0,005 gfed	0,512 ± 0,002 hgf	0,647 ± 0,039 b	1,155 ± 0,014 a	1,105 ± 0,048 a	0,971 ± 0,04 b	0,694 ± 0,004 a
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M2D3AE 54	0,016 ± 0,007 gfedc	0,245 ± 0,004 j	0,291 ± 0,005 f	0,469 ± 0,023 fe	0,308 ± 0,027 gf	0,275 ± 0,027 f	0,236 ± 0,012 a
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M3D2AE 56	0,022 ± 0,002 edc	0,546 ± 0,020 gfe	0,304 ± 0,012 f	0,308 ± 0,004 g	0,303 ± 0,008 gf	0,252 ± 0,021 f	0,249 ± 0,004 a
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M5D3AE 59	0,019 ± 0,001 fedc	0,609 ± 0,011 ed	0,324 ± 0,006 fe	0,314 ± 0,003 g	0,318 ± 0,008 gf	0,297 ± 0,007 f	0,246 ± 0,009 a
<i>Weissella paramesenteroides</i> C2M4D2AE 63	0,023 ± 0,006 dc	0,688 ± 0,015 cb	0,301 ± 0,009 f	0,293 ± 0,008 g	0,252 ± 0,009 g	0,246 ± 0,016 f	0,204 ± 0,004 a
<i>Bacillus</i> sp. C3M1D2MI 68	0,007 ± 0,003 gfed	0,741 ± 0,019 b	1,029 ± 0,004 a	0,904 ± 0,006 b	0,883 ± 0,009 b	1,113 ± 0,008 a	0,619 ± 0,005 a
<i>Bacillus infantis</i> C3M2D4AE 73	0,011 ± 0,002 g,f,e,d	0,013 ± 0,002 k	0,422 ± 0,009 edc	0,746 ± 0,021 d,c	0,819 ± 0,007 b	1,154 ± 0,035 a	0,641 ± 0,010 a
<i>Staphylococcus epidermidis</i> C3M3D2AE 74	0,003 ± 0,004 g	0,026 ± 0,013 k	0,440 ± 0,023 dc	0,421 ± 0,022 f	0,368 ± 0,014 fe	0,270 ± 0,014 f	0,152 ± 0,007 a
<i>Enterococcus faecalis</i> C3M4D1AE 76	0,005 ± 0,003 g,f	0,398 ± 0,009 i	0,678 ± 0,056 b	0,710 ± 0,011 d	0,842 ± 0,001 b	0,944 ± 0,003 b	0,742 ± 0,009 a

As médias dos tratamentos apresentados pela letra “a” (maior valor), as letras diferentes não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 9. Resultado da leitura de pH em meio de cultura líquido Lúria Bertani

Identificação Bacteriana	6 horas	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
<i>Paenibacillus</i> sp. C1M1D5AN 2	6,9	7,4	7,8	8,3	8,6	8,7	8,7
<i>Bacillus</i> sp. C1M2D1MI 11	6,6	7,4	7,6	8,4	8,5	8,3	8,5
<i>Bacillus</i> sp. C1M3D2AE 26	6,6	7,3	7,7	8,1	8,4	8,6	8,6
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M2D2AN 33	6,8	7,3	8,1	8,8	8,6	8,9	8,8
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M5D3AN 41	6,7	6,7	6,7	6,5	6,5	6,5	6,5
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M2D4MI 44	7,0	6,4	7,0	6,9	6,9	6,9	7,0
<i>Escherichia coli</i> C2M3D2MI 45	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M5D3MI 48	7,0	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	7,0
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M4D1MI 51	6,8	6,6	7,3	8,3	8,5	8,7	9,0
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M2D3AE 54	6,9	6,2	6,7	6,6	6,7	6,6	6,5
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M3D2AE 56	6,9	6,2	6,7	6,6	6,7	6,6	6,5
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M5D3AE 59	6,7	6,8	6,8	6,6	6,7	6,6	6,7
<i>Weissella paramesenteroides</i> C2M4D2AE 63	6,7	6,1	6,8	6,6	6,3	6,5	6,6
<i>Bacillus</i> sp. C3M1D2MI 68	6,9	7,0	7,5	8,0	8,6	8,6	8,8
<i>Bacillus infantis</i> C3M2D4AE 73	6,8	7,4	7,5	8,1	8,3	8,5	8,9
<i>Staphylococcus epidermidis</i> C3M3D2AE 74	6,9	6,8	7,5	8,0	8,0	8,0	8,4
<i>Enterococcus faecalis</i> C3M4D1AE 76	7,0	7,1	7,3	8,2	8,3	8,4	8,8

As médias dos tratamentos apresentados pela letra “a” (maior valor), as letras diferentes não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora

A maior atividade amilolítica ocorreu em 12 horas de incubação, de acordo com a tabela 10, com $7,677 \pm 0,111$ U/mL de amilase, produzida por *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26, com crescimento celular de $0,337 \pm 0,011$ UA em meio contendo 10% de amido, em uma pH de 5,6. A segunda maior produção enzimática foi por *Paenibacillus* sp. C1M1D5AN 2, em 120 horas, com $2,536 \pm 0,08$ U/mL, que apesar de não haver significância estatística ao nível de 95% de probabilidade quando comparamos aos demais tratamentos, esta obteve a maior diferença numérica em relação as demais isolados, com crescimento celular de $0,479 \pm 0,078$ UA, em pH 7,1. E a terceira atividade amilolítica foi por *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11, com $2,241 \pm 0,071$ U/mL de amilase, com crescimento celular de $0,394 \pm 0,012$ em pH de 5,4 (Tabela 11). Assim, é possível notar que a maiores produções enzimáticas de amilases ocorreram na fase exponencial e as bactérias *Bacillus* sp. modificaram o pH do meio de cultura de neutro para ácido (Tabela 12).

Tabela 10. Resultado da quantificação amilolítica em meio líquido suplementado com 1% de amido, usando comparações dos subconjuntos homogêneos.

Identificação Bacteriana	6 horas	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
<i>Paenibacillus</i> sp. C1M1D5AN 2	0,000 a	0,000 c	0,098 ± 0,027 b	0,806 ± 0,386 a	0,739 ± 0,186 a	1,501 ± 0,080 a	2,536 ± 0,080 a
<i>Bacillus</i> sp. C1M2D1MI 11	0,000 a	2,241 ± 0,071 b	0,000 b	1,650 ± 0,199 a	0,911 ± 0,069 a	0,394 ± 0,097 a	0,023 ± 0,084 a
<i>Bacillus</i> sp. C1M3D2AE 26	0,000 a	7,677 ± 0,111 a	0,656 ± 0,022 a	0,598 ± 0,205 a	1,841 ± 0,274 a	1,273 ± 0,085 a	0,372 ± 0,059 a
<i>Enterococcus faecalis</i> C3M4D1AE 76	0,000 a	0,000 c	0,000 b	0,000 a	0,000 a	0,534 ± 0,534 a	0,000 a

As médias dos tratamentos apresentados pela letra “a” (maior valor), as letras diferentes não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 11. Crescimento celular em meio líquido suplementado com 1% de amido, usando comparações dos subconjuntos homogêneos.

Identificação Bacteriana	6 horas	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
<i>Paenibacillus</i> sp. C1M1D5AN 2	0,154 ± 0,011 c	0,198 ± 0,008 b	0,116 ± 0,023 b	0,257 ± 0,074 b	0,438 ± 0,113 a	0,421 ± 0,036 b	0,479 ± 0,078 b
<i>Bacillus</i> sp. C1M2D1MI 11	0,321 ± 0,018 a	0,394 ± 0,012 a	0,430 ± 0,057 a	0,634 ± 0,031 a	0,684 ± 0,051 a	0,746 ± 0,034 a	0,803 ± 0,072 a
<i>Bacillus</i> sp. C1M3D2AE 26	0,229 ± 0,002 b	0,337 ± 0,011 a	0,422 ± 0,012 a	0,552 ± 0,015 a	0,561 ± 0,019 a	0,655 ± 0,011 a	0,638 ± 0,020 ab
<i>Enterococcus faecalis</i> C3M4D1AE 76	0,067 ± 0,002 d	0,171 ± 0,001 b	0,377 ± 0,002 a	0,174 ± 0,009 b	0,118 ± 0,006 b	0,040 ± 0,034 c	0,146 ± 0,027 c

As médias dos tratamentos apresentados pela letra “a” (maior valor), as letras diferentes não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 12. Resultado da leitura de pH do crescimento celular em meio líquido suplementado com 1% de amido pH 7,0.

Identificação Bacteriana	6 horas	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
<i>Paenibacillus</i> sp. C1M1D5AN 2	6,9	7,8	7,5	7,5	7,6	7,3	7,1
<i>Bacillus</i> sp. C1M2D1MI 11	6,3	5,4	5,3	6,2	6,2	6,8	7,3
<i>Bacillus</i> sp. C1M3D2AE 26	7,2	5,6	5,3	6,1	6,8	6,2	6,2
<i>Enterococcus faecalis</i> C3M4D1AE 76	7,5	7,0	7,2	7,5	7,0	7,1	7,2

As médias dos tratamentos apresentados pela letra “a” (maior valor), as letras diferentes não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

Quanto a produção de proteases bacteriana, as bactérias de mais produziram foram as do gênero *Bacillus*, em 48 horas de incubação, com $12,067 \pm 0,001$ U/mL por *Bacillus* sp. C3M1D2MI 68, $11,733 \pm 0,004$ U/mL por *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26 e $11,700 \pm 0,002$ U/mL *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11, que estatisticamente não diferiram entre si. E a segunda maior produção foi por *Enterococcus faecalis* C2M2D2AN 33, em 72 horas, com $9,633 \pm 0,004$ U/mL de protease (Tabela 13).

Tabela 13. Resultado da quantificação proteolítica com Azocaseína 1% em meio líquido suplementado com gelatina 1% e leite desnatado 2%, usando comparações dos subconjuntos homogêneos.

Identificação Bacteriana	24 horas	48 horas	72 horas
<i>Bacillus</i> sp. C1M2D1MI 11	$1,567 \pm 0,003$ c	$11,700 \pm 0,002$ a	$7,333 \pm 0,001$ c,b
<i>Bacillus</i> sp. C1M3D2AE 26	$8,833 \pm 0,005$ b,a	$11,733 \pm 0,004$ a	$6,967 \pm 0,004$ c
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M2D2AN 33	$8,600 \pm 0,001$ b	$8,700 \pm 0,001$ b	$9,633 \pm 0,004$ a
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M5D3AN 41	0,000 d	0,000 d	0,000 e
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M2D4MI 44	$0,500 \pm 0,002$ d,c	$0,267 \pm 0,001$ d	0,000 e
<i>Escherichia coli</i> C2M3D2MI 45	0,000 d	0,000 d	0,000 e
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M5D3MI 48	0,00 d	0,000 d	0,000 e
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M4D1MI 51	0,000 d	$7,933 \pm 0,002$ c	$7,700 \pm 0,001$ b
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M2D3AE 54	0,000 d	0,000 d	0,000 e
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M3D2AE 56	0,000 d	0,000 d	0,000 e
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M5D3AE 59	0,000 d	0,000 d	0,000 e
<i>Weissella paramesenteroides</i> C2M4D2AE 63	0,000 d	0,000 d	0,000 e
<i>Bacillus</i> sp. C3M1D2MI 68	$9,967 \pm 0,007$ a	$12,067 \pm 0,001$ a	$5,933 \pm 0,002$ d
<i>Bacillus infantis</i> C3M2D4AE 73	0,000 d	0,000 d	0,000 e
<i>Staphylococcus epidermidis</i> C3M3D2AE 74	0,000 d	0,000 d	0,000 e
<i>Enterococcus faecalis</i> C3M4D1AE 76	0,000 d	0,000 d	0,000 e

As médias dos tratamentos apresentados pela letra “a” (maior valor), as letras diferentes não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

O comportamento celular das bactérias *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11 e *Bacillus* sp. C3M1D2MI 68 foram semelhantes, apresentando maior crescimento celular e enzimático em 48 horas, por sua vez, *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26 apresentou maior crescimento celular em 72 horas. Quanto a *Enterococcus faecalis* C2M2D2AN 33 apresentou maior crescimento celular em 24 horas de incubação e produção enzimática já no declínio celular (Tabela 14).

Tabela 14. Crescimento celular em meio líquido suplementado com gelatina 1% e leite desnatado 2%, usando comparações dos subconjuntos homogêneos.

Identificação Bacteriana	24 horas	48 horas	72 horas
<i>Bacillus</i> sp. C1M2D1MI 11	$0,478 \pm 0,023$ b	$0,763 \pm 0,005$ b	$0,731 \pm 0,011$ b
<i>Bacillus</i> sp. C1M3D2AE 26	$0,212 \pm 0,040$ c	$0,524 \pm 0,007$ c	$0,601 \pm 0,015$ c
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M2D2AN 33	$0,548 \pm 0,014$ b	$0,466 \pm 0,004$ c	$0,444 \pm 0,003$ d
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M5D3AN 41	$0,251 \pm 0,022$ c	$0,194 \pm 0,013$ f,e	$0,072 \pm 0,011$ f

<i>Enterococcus faecalis</i> C2M2D4MI 44	0,185 ± 0,007 c	0,089 ± 0,006 g,h	0,094 ± 0,004 f
<i>Escherichia coli</i> C2M3D2MI 45	0,247 ± 0,012 c	0,244 ± 0,021 e	0,105 ± 0,028 f
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M5D3MI 48	0,188 ± 0,023 c	0,059 ± 0,008 h	0,091 ± 0,016 f
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M4D1MI 51	0,230 ± 0,008 c	0,326 ± 0,004 d	0,248 ± 0,002 e
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M2D3AE 54	0,166 ± 0,021 c	0,095 ± 0,004 g,h	0,098 ± 0,007 f
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M3D2AE 56	0,201 ± 0,004 c	0,103 ± 0,007 g,h	0,090 ± 0,008 f
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M5D3AE 59	0,246 ± 0,015 c	0,131 ± 0,021 f,g	0,105 ± 0,019 f
<i>Weissella paramesenteroides</i> C2M4D2AE 63	0,220 ± 0,023 c	0,116 ± 0,016 g,h	0,122 ± 0,024 f
<i>Bacillus</i> sp. C3M1D2MI 68	0,768 ± 0,077 a	0,865 ± 0,011 a	0,809 ± 0,004 a
<i>Bacillus infantis</i> C3M2D4AE 73	0,165 ± 0,017 c	0,100 ± 0,025 g,h	0,084 ± 0,017 f
<i>Staphylococcus epidermidis</i> C3M3D2AE 74	0,263 ± 0,009 c	0,130 ± 0,019 f,g	0,118 ± 0,004 f
<i>Enterococcus faecalis</i> C3M4D1AE 76	0,145 ± 0,016 c	0,133 ± 0,013 f,g	0,097 ± 0,12 f

As médias dos tratamentos apresentados pela letra “a” (maior valor), as letras diferentes não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

Quanto as mudanças de pH, as bactérias *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11, *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26, *Bacillus* sp. C3M1D2MI 68 e *Enterococcus faecalis* C2M2D2AN 33, variaram o pH entre 7,2 a 7,8, tabela 15.

Tabela 15. Resultado da leitura de pH do crescimento celular em meio líquido suplementado com gelatina e leite desnatado, pH 7,0.

Identificação Bacteriana	24 horas	48 horas	72 horas
<i>Bacillus</i> sp. C1M2D1MI 11	7,6	7,7	7,5
<i>Bacillus</i> sp. C1M3D2AE 26	7,2	7,5	7,7
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M2D2AN 33	7,5	7,2	7,4
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M5D3AN 41	7,1	7,0	7,2
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M2D4MI 44	7,2	7,6	7,5
<i>Escherichia coli</i> C2M3D2MI 45	7,0	7,2	7,1
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M5D3MI 48	7,0	7,1	7,1
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M4D1MI 51	6,9	7,1	7,5
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M2D3AE 54	7,2	7,6	7,5
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M3D2AE 56	7,1	6,2	7,0
<i>Enterococcus faecalis</i> C2M5D3AE 59	7,5	7,2	7,3
<i>Weissella paramesenteroides</i> C2M4D2AE 63	7,1	6,9	7,0
<i>Bacillus</i> sp. C3M1D2MI 68	7,3	7,4	7,8
<i>Bacillus infantis</i> C3M2D4AE 73	7,3	7,6	7,4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> C3M3D2AE 74	7,2	7,5	7,8
<i>Enterococcus faecalis</i> C3M4D1AE 76	7,6	7,5	7,6

As médias dos tratamentos apresentados pela letra “a” (maior valor), as letras diferentes não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

As bactérias *Enterococcus faecalis* C2M5D3AN 41, *Enterococcus faecalis* C2M5D3MI 48, *Enterococcus faecalis* C2M2D3AE 54, *Enterococcus faecalis* C2M3D2AE 56, *Enterococcus faecalis* C2M5D3AE 59, *Escherichia coli* C2M3D2MI 45, *Weissella paramesenteroides* C2M4D2AE 63, *Bacillus infantis* C3M2D4AE 73 e *Staphylococcus epidermidis* C3M3D2AE 74 não obtiveram produção enzimática neste estudo.

5 DISCUSSÃO

As bactérias do gênero *Bacillus* sp. são produtores de enzimas extracelulares específicas, como proteases, amilases, fosfatases, lipases e esterases. Essas enzimas são importantes nos ciclos biogeoquímicos de nutrientes e também têm potenciais aplicações industriais e biotecnológicas (GEETHANJALI; SUBASH 2011; MANDIC-MULEC; STEFANIC; VAN ELSAS, 2015; MOHAMMAD *et al.*, 2017). São considerados biofábricas, devido à capacidade de resistir a condições físicas extremas, possuindo 50 a 60% do mercado global de enzimas, com excelente capacidade de produção de enzimas hidrolíticas (SCHALLMEY *et al.*, 2004; KIRAN *et al.*, 2015; DASH *et al.*, 2015; GHAZALA *et al.*, 2016; MA *et al.*, 2016).

Neste estudo, o gênero *Bacillus* sp. apresentou maior atividade enzimática, quando comparados a outros gêneros estudados, os quais produziram pouco ou nenhuma atividade amilolítica e/ou proteolítica. A cepa *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26 apresentou maior produção às 12 horas de α -amilase, $7,677 \pm 0,111$ U/mL, quando comparados a *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11, *Paenibacillus* sp. C1M1D5AN 2 e *Enterococcus faecalis* C3M4D1AE 76. Por outro lado, no estudo conduzido por Rajesh e Gummadi (2020), que quantificou α -amilase de *Bacillus* sp. PM06, foi notada uma maior produção que as observadas nesse estudo ($31 \pm 1,15$ U/mL, em 48 horas). Já no estudo de Apun, Jong e Salleh (2000), foi observado resultados inferiores na quantificação da atividade de α -amilase produzida por *Bacillus amyloliquifaciens*, isolado do resíduo medular da Palmeira-sagu, 2,30 IU/mL, em 72 horas, quando comparado a *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11, *Paenibacillus* sp. C1M1D5AN 2 e *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26 e superiores a *Enterococcus faecalis* C3M4D1AE 76.

O gênero *Bacillus* é um importante produtor de proteases industriais e neste estudo *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11, *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26 e *Bacillus* sp. C3M1D2MI 68 obtiveram maiores atividades proteolíticas em 48 horas, com $11,700 \pm 0,002$ U/mL, $11,733 \pm$

0,004 U/mL e $12,067 \pm 0,001$ U/mL de proteases, respectivamente. Esses valores são inferiores ao estudo conduzido por Lima *et al.*, (2015) com atividade de 64,29 U/mL após 24 horas de fermentação, que a partir da otimização enzimática obteve 86,27 U/mL de proteases, semelhante ao estudo de Moorthy e Baskar que também aumentaram sua produção após otimização, de 470,35 U / mL para 2.992,75 U / mL de proteases. Desta forma, crê-se que se tivéssemos otimizado nossa produção poderíamos obter maiores atividades da enzima, ao até, as cepas que não obtiveram produção quando quantificados, mas apresentaram halos no capítulo 2, conseguissem produzir enzimas a fim de quantificarmos.

Apesar de saber que a otimização enzimática poder aumentar significativamente o rendimento das enzimas produzidas, este estudo objetivou apenas quantificar a enzima a partir dos meios enriquecidos com gelatina e leite para proteases e amido para amilase, com isso, são necessários mais estudos que possam nos dizer se há aumento enzimático e/ou produção se mudarmos as fontes de carbono e nitrogênio, temperatura, pH, substrato enzimático, entre outros.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As cepas selecionadas para a realização deste capítulo, um total de dezessete bactérias, apenas sete destas apresentou produção enzimática. As bactérias *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26, apresentou maior produção de α -amilase, $7,677 \pm 0,111$ U/mL, e as cepas *Bacillus* sp. C1M2D1MI 11, *Bacillus* sp. C1M3D2AE 26 e *Bacillus* sp. C3M1D2MI 68 obtiveram maiores atividades proteolíticas com $11,700 \pm 0,002$ U/mL, $11,733 \pm 0,004$ U/mL e $12,067 \pm 0,001$ U/mL de proteases, respectivamente, não havendo diferença estatística entre si. Assim, concluímos que bactérias intestinais de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona polysticta* possuem a capacidade de produção de enzimas amilolíticas e proteolíticas, sendo necessários mais estudos que busquem a otimização, caracterização, produção e purificação, além das possíveis aplicações que essas enzimas venham a ter.

Estudos futuros, devem ser realizados para avaliar a inclusão de *Enterococcus faecales* em produção de enzimas de interesse biotecnológico, sua utilização e a influencia na qualidade de um produto final.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- APUN, K.; JONG, B. C.; SALLEH, M. A. Screening and isolation of a cellulolytic and amylolytic *Bacillus* from sago pith waste. *The Journal of general and applied microbiology*, v. 46, n. 5, p. 263–267, 2000.
- BBC Research, 2021. *Global markets for enzymes in industrial applications*. Disponível em: <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-forenzymes-in-industrial-applications.html>. Acesso em: 22 outubro 2021.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: *Editores Interciência*, 506p, 2008.
- CHAPMAN, J.; ISMAIL, A. E.; DINU, C. Z. Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, v. 8, n. 6, p. 2-26, 2018.
- DASH, B.K.; RAHMAN, M.M.; SARKER, P. K. Molecular identification of a newly isolated *Bacillus subtilis* BI19 and optimization of production conditions for enhanced production of extracellular amylase. *BioMed Res. Int.*, v. 2015, p. 1-9, 2015.
- GEETHANJALI, S.; SUBASH, A. Optimization of protease production by *Bacillus subtilis* isolated from mid gut of freshwater fish *Labeo rohita*. *World J Fish Mar Sci*, v.3, p. 88–95, 2011.
- GHAZALA, I.; HADDAR, A.; ROMDHANE, M. B.; ELLOUZ-CHAANOUNI, S. Screening and Molecular Identification of New Microbial Strains for Production of Enzymes of Biotechnological Interest. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v. 59, p. 1-12, 2016.
- KIRAN, T.; ASAD, W.; SIDDIQUI, S.; AJAZ, M.; RASOOL, S. A. Industrially important hydrolytic enzyme diversity explored in stove ash bacterial isolates. *Pak J Pharm Sci.*, v. 28, n. 6, p. 2035-2040, 2015.
- LAXMAN, R. S.; SONAWANE, A. P.; MORE, S. V.; RAO, B. S.; RELE, M. V.; JOGDAND, V. V.; DESHPANDE, V., V.; RAO, M. B. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3152-3158, 2015.
- LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A.; KELLN, R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, v. 76, p. 103-122, 1973.
- LIMA, L. A.; CRUZ FILHO, R. F.; DOS SANTOS, J. G.; SILVA, W. C. Protease with collagenolytic activity produced by *Bacillus* sp. DPUA 1728 from Amazonian soil. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, v. 46, n. 4, p. 1217–1223, 2015.
- MA, Y.; SHEN, W.; CHEN, X.; LIU, L.; ZHOU, Z.; XU, F.; YANG, H. Significantly enhancing recombinant alkaline amylase production in *Bacillus subtilis* by integration of a novel mutagenesis-screening strategy with systems-level fermentation optimization. *J Biol Eng.*, v. 10, n. 13, p. 1-11, 2016.
- MANDIC-MULEC, I.; STEFANIC, P.; VAN ELSAS, J. D. Ecology of Bacillaceae. *Microbiology spectrum*, v. 3, n. 2, p.1-24, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 31, n.3, p. 426-428, 1959.

MOHAMMAD, B. T.; AL DAGHISTANI, H. I.; JAOUANI, A.; ABDEL-LATIF, S.; KENNES, C. Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes. *International journal of microbiology*, v. 2017, p. 1-12, 2017.

MOORTHY, I. M.; BASKAR, R. Statistical modeling and optimization of alkaline protease production from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* species BGS using response surface methodology and genetic algorithm. *Prep Biochem Biotechnol.*, v. 43, n. 3, p. 293-314, 2013.

RAJESH, R.; GUMMADI, S. N. α -Amylase and cellulase production by novel halotolerant *Bacillus* sp.PM06 isolated from sugarcane pressmud. *Biotechnology and applied biochemistry*, v. 0, n. 0, p. 1-11, 2020.

RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B; UMMALYMA, S. B.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; MADHAVAN, A.; PANDEY, A. Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technology and Biotechnology*, n. 56, n. 1, p. 16-30, 2018.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade de celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecologica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, v. 27, n.2, p.205-211, 2004.

SAYALI, K.; SADICHHA, P.; SUREKHA, S. Microbial esterases: an overview. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. v. 2, n. 7, p. 135-146, 2013.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.*, v. 50, p. 1-17, 2004.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013.

APÊNDICE

Apêndice A- Coloração de gram

Para realização do teste será adicionada uma gota de 10 μ L de solução salina (0,85%) em lâminas de vidro, com auxílio de uma alça bacteriológica será retirada uma colônia bacteriana de culturas crescidas em placa de Petri e em seguida cada colônia será friccionada para homogeneização sobre uma lâmina com solução. Posteriormente será feita a fixação por aquecimento do material em bico de Bunsen. Após a lâmina será tratada por 15 segundos com o reagente Violeta Genciana e em seguida deixar água destilada sobre a lâmina por 45 segundos. Na segunda etapa do processo as lâminas serão novamente cobertas por 1 minuto com o reagente Lugol Fraco e lavado com água destilada, em seguida descoradas com Solução descorante por aproximadamente 15 segundos seguido de lavagem em água destilada. E finalizando o processo, será adicionada solução de Fuccina sobre as lâminas durante 30 segundos, novamente as lâminas serão lavadas em água destilada e deixadas para secar em posição vertical em temperatura ambiente e visualizadas em microscópio óptico (CONJUNTO PARA COLORAÇÃO DE GRAM, 2009).

Referência: CONJUNTO PARA COLORAÇÃO DE GRAM. Responsável técnico: Elisa Hizuru Uemura. Pinhais: Laborclin, 2009. Bula de kit para coloração laboratorial.

Apêndice B- Receituário dos meios de cultura

- *Tryptic Soy Agar Difco™* (Tryptona de soja), pH 7,3 +/- 0,2.

TSA	
Componente	Concentração
Digestão pancreática da caseína	15,0 g/L
Digestão papaica da farinha de soja	5,0 g/L
Cloreto de sódio	5,0 g/L
Ágar	15,0 g/L

- *Lactobacillus MRS Agar Difco™* pH 6,2 +/- 0,2

MRS	
Componente	Concentração
Peptona	10,0 g/L
Extrato de carne	10,0 g/L
Extrato de levedura	5,0 g/L
Dextrose	20,0 g/L
Polisorbato 80	1,0 g/L
Citrato de amônio	2,0 g/L
Acetato de sódio	5,0 g/L
Sulfato de magnésio	0,1 g/L
Sulfato de manganês	0,05 g/L
Fosfato dipotássio	2,0 g/L
Ágar	15 g/L

- *Sabouraud Dextrose Agar Difco™*, pH de 5,6 ± 0,2

SDA	
Componente	Concentração
Hidrolisado pancreático de caseína	5,0 g/L
Hidrolisado péptico de tecido animal	5,0 g/L
Dextrose	40,0 g/L
Ágar	15,0 g/L

- *Lúria Bertani Agar*, pH 7,0 +/- 0,2

LB	
Componente	Concentração
Tryptona	10,0 g/L
NaCl	10,0 g/L
Extrato de levedura	5,0 g/L
Ágar	15,0 g/L

- *Brain Heart Infusion (BHI) Agar Difco™*, pH 7,4 +/- 0,2

BHI	
Componente	Concentração
Infusão cérebro-coração	8,0 g/L
Digestão péptica de tecido animal	5,0 g/L
Digestão pancreática da caseína	16,0 g/L
Cloreto de sódio	5,0 g/L
Dextrose	2,0 g/L
Fosfato disódio	2,5 g/L
Ágar	13.5 g/L

- *Ágar Amilase pH 7,0 +/- 0,2*

AMILASE	
Componente	Concentração
Triptona	2,5 g/L
NaCl	2,5 g/L
Extrato de levedura	1,25g/L
Amido de milho	10,0 g/L
Ágar	8,0 g/L

- *Ágar Protease pH 7,0 +/- 0,2*

PROTEASE	
Componente	Concentração
Gelatina	1,0 g/L
Leite desnatado	2,0 g/L
Extrato de levedura	2,0 g/L
Ágar	15,0 g/L

- *Ágar Celulase pH 7,0 +/- 0,2*

CELULASE	
Componente	Concentração
Triptona	1,66 g/L
NaCl	1,66 g/L
Extrato de levedura	0,83 g/L
Carboximetilcelulase	10,0 g/L
Ágar	8,0 g/L

○ **Ágar Lipase pH 8,0-8,5 +/- 0,2**

LIPASE	
Componente	Concentração
Triptona	3,0 g/L
Extrato de levedura	2,0 g/L
K ₂ HPO ₄	2,0 g/L
CaCl ₂	2,0 g/L
MgSO ₄	1,0g/L
Twen 80	10,0g/L
Azeite de oliva	20,0 g/L
Rondamina B	0,002g/L
Ágar	18,0 g/L

ANEXOS

Anexo 1: Protocolo extração de DNA (Kit QIAamp® DNA Mini Kit)

Quick-Start Protocol

April 2018

QIAamp® DNA Mini Kit

The QIAamp DNA Mini Kit (cat. nos. 51304 and 51306) can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 12 months.

Further information

- QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook: www.qiagen.com/HB-0329
- Safety Data Sheets: www.qiagen.com/safety
- Technical assistance: support.qiagen.com

Notes before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents. Refer to the handbook for required equipment and procedure.
- If a precipitate has formed in Buffer ATL or Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.
- Add ethanol to Buffer AW1 and Buffer AW2 concentrates, as indicated on the bottle.
- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat two water baths or heating blocks: one to 56°C for use in step 1 and one to 70°C for use in step 3.

Refer to the handbook for protocols for swabs, dried blood spots, cultured cells, fixed tissue, bacteria, yeast or other material.

1. Cut tissue (≤ 25 mg) into small pieces and place in a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add 180 μ l Buffer ATL and 20 μ l Proteinase K, mix by vortexing and incubate at 56°C until completely lysed (1–3 h). Vortex occasionally during incubation.
2. Add 200 μ l Buffer AL. Mix thoroughly by vortexing for 15 s.
3. Incubate at 70°C for 10 min. Briefly centrifuge the tube to remove drops from the lid.
4. Add 200 μ l ethanol (96–100%). Vortex for 15 s. Briefly centrifuge the tube to remove drops from the lid.
5. Pipet the mixture onto the QIAamp Mini spin column (in a 2 ml collection tube). Centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Discard the flow-through and collection tube.
6. Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube and add 500 μ l Buffer AW1. Centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Discard the flow-through and collection tube.
7. Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube and add 500 μ l Buffer AW2. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min. Discard the flow-through and collection tube.
8. **Recommended:** Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube (not provided) and centrifuge at full speed for 1 min. This eliminates the chance of possible Buffer AW2 carryover.
9. Place the QIAamp Mini spin column in a new 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), add 200 μ l Buffer AE or distilled water and incubate at room temperature for 1 min. Centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min to elute the DNA.
10. **Optional:** Repeat step 10 for increased DNA yield with a further 200 μ l Buffer AE or distilled water.



Scan QR code for handbook.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual.

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp® (QIAGEN Group), 1113198 04/2018 HS-2530-001 © 2018 QIAGEN, all rights reserved.

Anexo 2: Protocolo de Purificação do produto de PCR (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up)

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up

5 Protocols

5.1 PCR clean-up

The following protocol is suitable for PCR clean-up as well as DNA concentration and removal of salts, enzymes, etc. from enzymatic reactions (SDS < 0.1 %).

Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer NT3 was prepared according to section 3.

1 Adjust DNA binding condition

For very small sample volumes < 30 µL adjust the volume of the reaction mixture to 50–100 µL with water.



+ 2 vol NTI per
1 vol sample

It is not necessary to remove mineral oil.

Mix 1 volume of sample with 2 volumes of Buffer NTI (e.g., mix 100 µL PCR reaction and 200 µL Buffer NTI).

Note: For removal of small fragments like primer dimers dilutions of Buffer NTI can be used instead of 100 % Buffer NTI. Please refer to section 2.3.

2 Bind DNA

Place a NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column into a Collection Tube (2 mL) and load up to 700 µL sample.



Load sample

Centrifuge for 30 s at 11,000 x g. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.



11,000 x g
30 s

Load remaining sample if necessary and repeat the centrifugation step.

3 Wash silica membrane

Add 700 µL Buffer NT3 to the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column. Centrifuge for 30 s at 11,000 x g. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.



+ 700 µL NT3



11,000 x g
30 s

Recommended: Repeat previous washing step to minimize chaotropic salt carry-over and improve A_{260}/A_{230} values (see section 2.7 for detailed information).



+ 700 µL NT3



11,000 x g
30 s

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up

4 Dry silica membrane

Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g** to remove Buffer NT3 completely. Make sure the spin column does not come in contact with the flow-through while removing it from the centrifuge and the collection tube.



11,000 x g
1 min

Note: Residual ethanol from Buffer NT3 might inhibit enzymatic reactions. Total removal of ethanol can be achieved by incubating the columns for 2–5 min at 70 °C prior to elution.

5 Elute DNA

Place the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column into a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided). Add **15–30 µL Buffer NE** and incubate at **room temperature** (18–25 °C) for **1 min**. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.



+ **15–30 µL NE**

RT
1 min

11,000 x g
1 min

Note: DNA recovery of larger fragments (> 1000 bp) can be increased by multiple elution steps with fresh buffer, heating to 70 °C and incubation for 5 min. See section 2.6 for detailed information.
