

POTENCIAL ANTAGONISTA DE BACTERIAS DO GÊNERO *Bacillus* ISOLADAS DE NINHOS DE *Trigona spinipes* SOBRE BACTERIAS PATOGÊNICAS

Maísa F. dos S. Barbosa^{1*}, Hélio F. de Melo², Rogério de A. Saraiva³

1. Estudante de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da UFRPE (Universidade Federal Rural de Pernambuco) e bolsista FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco)

2. Professor Adjunto da UFRPE

3. Professor Adjunto da UFRPE / Orientador

Resumo:

Diversos metabólitos com importantes propriedades farmacológicas têm sido isolados de bactérias e se deve aos antibióticos grande parte do interesse nesse setor.

O objetivo do presente estudo foi isolar bactérias do gênero *Bacillus* associadas ao mel e ao pólen de *Trigona spinipes* e testar o potencial antagonista dos isolados frente às bactérias patogênicas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus*.

Para testar o potencial antagonista utilizamos o método *in vitro* qualitativo conhecido como Bloco de Gelose. Entre as bactérias isoladas, 11 apresentaram resultados positivos no ensaio de antagonismo, com halos de inibição que variaram de 1 a 3 mm.

Estes resultados indicam que o mel e o pólen dos ninhos de *T. spinipes* são reservatórios naturais de *Bacillus* sp. com potencial antagonista sobre bactérias patogênicas associadas a infecções em seres humanos e outros animais.

Palavras-chave: Bactérias; Abelhas; Antibióticos naturais.

Apoio financeiro: FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco)

Introdução:

Como estratégias de sobrevivência, os micro-organismos excretam uma série de produtos finais no meio que são metabolizados a partir de nutrientes do seu hábitat (MADIGAN et al., 2004). Esses produtos finais têm demonstrado grande potencial nas últimas décadas, com novas entidades químicas ativas e padrões moleculares originais que, aliados à biotecnologia, às técnicas de elucidação estrutural e ao fracionamento químico, entre outras tecnologias, podem permitir o desenvolvimento de novos protótipos bioativos e por isto vêm ganhando a atenção da

indústria e dos pesquisadores em produtos naturais (VIEGAS JR. et al., 2006).

Vale ressaltar que se deve aos antibióticos e as drogas cancerígenas a maior parte do interesse pelas fontes naturais (CALIXTO, 2005), sendo isolados de bactérias e fungos diversos metabólitos com propriedades farmacológicas de suma importância (BARREIRO, 2009).

Segundo Lanna-Filho, Ferro e Pinto (2010), *Bacillus subtilis* é capaz de colonizar todos os órgãos vegetativos de plantas, sendo utilizada no controle biológico de bactérias e fungos fitopatogênicos por produzir substâncias antagonistas e ser um eliciador do fenômeno de resistência sistêmica induzida em plantas.

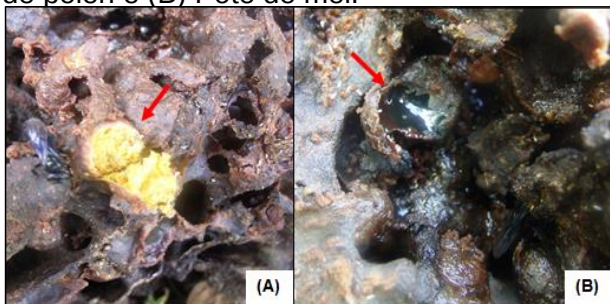
Já foi demonstrado que existe uma forte relação entre bactérias do gênero *Bacillus* e abelhas sem ferrão, onde as abelhas fornecem o meio adequado para o seu crescimento e estas por sua vez ajudam impedindo o crescimento de outros micro-organismos responsáveis pela deterioração dos potes de estocagem de alimento através da produção de compostos antimicrobianos (GILLIAM, ROUBIK e LORENZ, 1990). Um estudo mais recente demonstra a atividade antimicrobiana dos ninhos de *Trigona spinipes* (FERNANDES JR. et al. 2001), mas os mecanismos envolvidos nesta atividade ainda não são bem compreendidos e, além disso, a maioria das pesquisas se limitam a determinar a presença de micro-organismos contaminantes nas colônias e no mel das abelhas.

O objetivo do presente estudo foi isolar as bactérias do gênero *Bacillus* associadas ao mel e ao pólen de *T. spinipes* e testar o potencial antagonista dos isolados frente a bactérias patogênicas, a fim de contribuir para uma melhor compreensão da relação entre abelhas e micro-organismos e na identificação de linhagens selvagens de bacilos com potencial para a produção de substâncias antagonistas a micro-organismos patogênicos.

Metodologia:

Foram coletados ninhos de *T. spinipes*, esterilizados com álcool 70% e solução hipoclorito a 4% e lavados com solução salina 0,85% esterilizada. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 1ml e 1mg dos potes de mel e de pólen (Fig. 1 A e B), respectivamente. As amostras foram submetidas a diluição em série (10^{-1} a 10^{-3}) usando solução salina 0,85% esterilizada. Em seguida, 100µl de cada diluição foram semeados em Agar Nutriente (Himedia®) pelo método do espalhamento em placa e incubadas a 36 °C por 48hs. As UFCs (unidades formadoras de colônia) com os morfotipos mais frequentes foram purificadas e posteriormente inoculadas em caldo nutriente e incubadas a 36° C por 72hs.

Figura 1: Potes de estocagem de *T. spinipes* de onde as bactérias foram isoladas. (A) Pote de pólen e (B) Pote de mel.

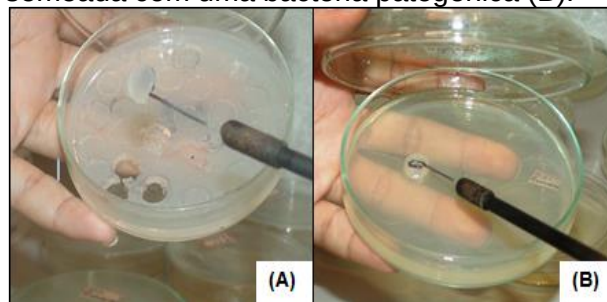


Os isolados do gênero *Bacillus* foram identificados de acordo com o manual de Bergey de sistemática bacteriológica. As células provenientes da cultura em Caldo Nutriente foram submetidas à hipertermia em banho-maria por 20 min. a 80 °C e posteriormente submetidas à coloração de esporos. Logo após, os isolados foram semeados em novo meio Caldo Nutriente e incubados por 48hs a 36 °C em condições aeróbias, objetivando isolar as bactérias aeróbicas esporulantes. Em seguida, os isolados foram submetidos à coloração de Gram para saber se realmente se tratavam de bactérias Gram positivas.

Para testar a hipótese da produção de compostos antimicrobianos as bactérias isoladas foram submetidas ao teste de antagonismo *in vitro* contra as bactérias patogênicas *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, utilizando o método qualitativo conhecido como “bloco de gelose”, adaptado de Stern *et. al.* (2006). Uma fração da colônia de cada bactéria isolada foi retirada com o auxílio de uma alça de platina e colocada em tubo de ensaio contendo solução salina 0,85%. Foram levadas ao vórtex por 3

min. para que as células ficassem em suspensão uniformemente na solução. Uma alíquota de 100µl foi retirada de cada solução com a ajuda de uma pipeta, semeada em placa de Petri contendo meio Agar nutriente e colocada para crescer a 36°C durante 24hs. Passadas 24hs discos de 0,5 cm de diâmetro foram retirados (Fig. 2 A) e colocados invertidos em placa Petri semeada com a bactéria patogênica (Fig. 2 B) em meio Agar Mueller-Hinton. Ao lado dos discos de Agar nutriente contendo a cultura do isolado, foram colocados discos sem a cultura, apenas com Agar nutriente, para servir como controle. As placas foram feitas em triplicata e incubadas por mais 48hs, posteriormente foram medidos os halos de inibição com o auxílio de um paquímetro. Os meios de cultura bem como a esterilização foram feitos de acordo com os padrões da ANVISA (2013).

Figura 2: Método Bloco de Gelose. (A) Retirada do disco de Ágar contendo a bactéria isolada e transferência para outra placa semeada com uma bactéria patogênica (B).



Resultados e Discussão:

Foram isoladas 16 bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, sendo 14 a partir do pólen e 2 do mel. Este é o primeiro estudo com bactérias associadas a potes de estocagem de alimento de *T. spinipes*.

Entre as bactérias isoladas, 11 apresentaram resultados positivos no ensaio de antagonismo *in vitro* (Tabela 1), com halos de inibição que variaram de 1 a 3 mm (Fig. 3). Estes resultados anuam com a hipótese de que existe uma forte relação entre bactérias do gênero *Bacillus* produtoras de compostos antimicrobianos e a abelha *Trigona spinipes*.

B. circulans, *B. megaterium* e *B. alvei* já foram encontradas no mel, no pólen e no alimento das larvas de *Melipona fasciata*, produzindo enzimas digestivas que atuavam na pré-digestão do alimento estocado e na produção de substâncias antagonistas a micro-organismo competidores, principalmente ácidos orgânicos e antibióticos (GILLIAM, ROUBIK e LORENZ, 1990).

Os resultados indicam que pode haver uma dependência por parte das abelhas da presença dessas bactérias para evitar a contaminação por micro-organismos que deterioram o alimento estocado no ninho.

Por outro lado, a inibição de *E. coli*, o principal bioindicador de contaminação fecal dos alimentos e da água, e a não inibição de *S. aureus*, uma bactéria envolvida em infecções em seres humanos, pode mascarar a presença desta última no substrato, uma vez que as operárias de *T. spinipes* visitam diversos locais em busca de alimento, inclusive aqueles envolvidos por atividades humanas. Nesse contexto, embora *T. spinipes* seja um reservatório natural de bactérias esporogênicas com potencial antagonista a outros micro-organismos, ela pode ser um vetor de micro-organismos indesejáveis, reforçando a hipótese que essas abelhas dependem de bactérias que produzam substâncias antimicrobianas para manter a saúde da colônia.

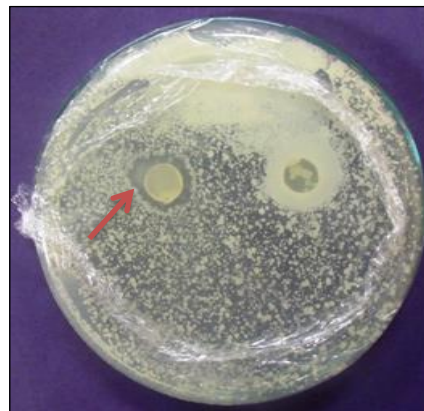
O isolado Mel 2 apresentou o maior espectro de inibição, sendo antagonista a três das cinco bactérias patogênicas testadas (Tabela 1). Resultado semelhante foi obtido por Silva et al. (2016) com um isolado de *Bacillus* sp. obtido a partir do mel de *Melipona asilvai*, que foi capaz de inibir *in vitro* o crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp., *S. aureus* e *Klebsiella* sp.

Tabela 1: Resultado do teste de antagonismo *in vitro* Bloco de Gelose com as bactérias isoladas pertencentes ao gênero *Bacillus*.

Morfotipo	E.c.	S.a.	S.s.	P.a.	B.c.
Pólen 1	+	-	-	-	-
Pólen 2	-	-	-	-	-
Pólen 3	+	-	-	-	-
Pólen 4	+	-	-	-	-
Pólen 5	-	-	-	-	-
Pólen 6	+	-	-	-	-
Pólen 7	+	-	-	-	-
Pólen 8	-	-	-	-	-
Pólen 9	+	-	-	-	-
Pólen 10	+	+	-	-	-
Pólen 11	+	-	-	-	-
Pólen 12	+	-	-	-	-
Pólen 13	-	-	-	-	-
Pólen 14	+	-	-	-	-
Mel 1	-	-	-	+	+
Mel 2	+	-	-	+	+

(+) Positivo; (-) Negativo; (E.c.) *Escherichia coli*; (S.a.) *Staphylococcus aureus*; (S.s.) *Salmonella* sp.; (P.a.) *Pseudomonas aeruginosa*; (B.c.) *Bacillus cereus*.

Figura 3: Ilustração do halo de inibição do isolado Mel 2 frente a *E. coli*.



Embora o fenômeno de antagonismo seja uma indicação da produção de substâncias bioativas por essas bactérias, são necessários estudos mais detalhados para investigar a natureza química dos compostos produzidos por elas, bem como a atividade antimicrobiana destes componentes isoladamente.

Freitas et al. (2008) investigou a composição química do extrato etanólico de ninhos inteiros de *T. spinipes* e encontrou como compostos majoritários os triterpenos cicloartanos ácido magniferólico e ácido 3 β -hidroxi-24-metilenocicloartano-26-óico e os flavonóides 3'-metil-quercetina, sakuranetina, éter 7-metil campferol, tricetina e éter 7-metil aromadendrina. Embora essas substâncias tenham algum potencial antagonista a micro-organismos contaminantes do ninho de *T. spinipes*, não há evidências concretas de que tenham sido produzidas por *Bacillus* sp. De qualquer forma, sabe-se que as bactérias desse gênero são capazes de produzir substâncias voláteis que induzem a resposta sistêmica em plantas, como observado por Ryu et al. (2004) em *B. subtilis* que induziu a resposta sistêmica em plantas de *Arabidopsis* contra o patógeno *Pectobacterium carotovorum*.

No entanto, serão necessários novos estudos que investiguem a natureza química dos compostos produzidos por estas bactérias, bem como a atividade antimicrobiana destes componentes isoladamente.

Conclusões:

As colônias da abelha eussocial *T. spinipes* são reservatórios naturais de *Bacillus* sp, presentes principalmente no pólen estocado, com um bom potencial antagonista a bactérias patogênicas associadas a infecções em seres humanos e outros animais, e candidatas a produção de substâncias bioativas de interesse farmacêutico.

A presença de *Bacillus* spp nas colméias pode ser fundamental para a manutenção da qualidade microbiológica do pólen estocado, a principal fonte de proteína para as abelhas.

Referências bibliográficas

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Manual de Microbiologia Clinica para o Controle de Infeccao Relacionada a Assistencia a Saude. Modulo 5: Tecnologias em Servicos de Saude: descricao dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos. Brasília: **Anvisa**, 2013.

BERGEY. Manual de Bergey de Sistemática Bacteriológica. Disponível em: < <http://www.bergeys.org/>>

BARREIRO, E. J. Biodiversidade: Fonte Potencial para a Descoberta de Novos Fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.679-688, 2009.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.1-2, p.131-134, 2005.

FERNANDES JR. A.; LEOMIL, L.; FERNANDES A.A.H.; SFORCIN, J.M.The Antibacterial Activity of Propolis Produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian Stingless Bees.**J. Venom. Anim. Toxins**, v.7 .2, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-79302001000200003>

FREITAS, M.O.; PONTE, F.A.F.; LIMA, M.A.S.; SILVEIRA, E.R. Flavonoids and Triterpenes from the Nest of the Stingless Bee *Trigona spinipes*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 19, n. 3, p.532-535, 2008.

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.

LANNA-FILHO,R.; FERRO, H. M.;PINTO, R. S. N. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. v. 4, n. 2, p. 12-20. 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER,

J. **Microbiologia de Brock**. 10ª Ed. Trad. Cynthia Maria Kyam & Andréia Queiroz Maranhão (Col.). Pearson Education Brazil: São Paulo, 2004. 608 p.

RYU, C.M.; FARAG, M.A.; HU, C.-H.; REDDY, M.S.; KLOPPER, J.W.; PARÉ, P.W. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.134, p.1017–1026, 2004.

SILVA, K. D. N.; BARBOSA, R. N.;OLIVEIRA, P. A.; CAVALCANTE M. C.; MELO, H. F. Inhibitos of pathogens by sporogenic bactéria isolated from honey of *Melipona* sp. (APIDAE: APINAE: MELIPONINI). **Rev. Caatinga**, v. 4, n. 29. p. 1021-1027, 2016.

VIEGAS JR. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p.326-337, 2006.