



Volume 1 | Número 4
2021

ISSN: 2763-6887

Sobre os Autores:

Nayara Alves Reis é Bióloga/UFRB, Mestre em Microbiologia Agrícola/UFRB e Doutora em Ciências Agrárias/UFRB.

Geni da Silva Sodré é Engenheira Agrônoma/UFBA, Mestre em Ciências (Entomologia)/USP e Doutor em Ciências (Entomologia)/USP.

Carlos Alfredo L. de Carvalho é Engenheiro Agrônomo/UFBA, Mestre em Ciências Agrárias/UFBA e Doutor em Ciências (Entomologia)/USP.

Boletim Técnico-Científico Insecta

Publicação do Grupo de Pesquisa Insecta do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO DO TRATO GASTROINTESTINAL DE ABELHAS E DOS PRODUTOS DA COLMEIA

Nayara Alves Reis

Geni da Silva Sodré

Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

**Sobre o Grupo de
Pesquisa Insecta:**

Ainda no período compreendido entre 1992 e 1999, outros grupos taxonômicos foram estudados pelo GP Insecta, como as formigas, besouros e abelhas. Nos estudos sobre formigas se destacaram os projetos sobre análise faunística de comunidades de formigas epigeias (Hymenoptera, Formicidae) e hábitos de nidificação e alimentares de *Ectatoma quadridens* (Fabricius, 1793). Já os estudos sobre os besouros coprófagos (Coleoptera, Scarabaeidae) se destacaram os estudos sobre análise faunística de coleópteros coprófagos em área de pastagem; influência dos fatores climáticos na flutuação populacional de coleópteros coprófagos em área de pastagem; e espécies de Dynastinae, Melolonthinae e Rutelinae coletados em armadilhas luminosa no Recôncavo Baiano. Também nesse período foram iniciadas as pesquisas com abelhas, com o projeto: Abelhas (Hymenoptera: Apoidea) em Cruz das Almas-Bahia. Nesta primeira década do GPI (1992 a 2002) o lastro de pesquisa foi consolidado e a formação de recursos humanos foi uma marca importante na identidade e reconhecimento do Grupo de Pesquisa. Além disso, a consolidação de parcerias estratégicas, com pesquisadores de diferentes instituições também marcou esse período, que se revelou estratégico para as próximas duas décadas do GPI (2003 a 2012 e 2013 a 2022). Nomes como Antônio Nascimento (Embrapa), Nilton Sanches (Embrapa), Jacques Delabie (Ceplac), Max Menezes (Ceplac), Edilberto Giannotti (Unesp), Nivar Gobbi (Unesp), Luciano Queiroz (UEFS), Luis Marchini (USP), Augusta Moreti (IZ/SP) e Monika Barth (Fiocruz/RJ), contribuíram de forma decisiva para as várias pesquisas ao longo da primeira década do GPI.

Apresentação O Boletim Técnico Científico Insecta tem por objetivo divulgar técnicas e informações científicas de aplicação na entomologia e áreas afins, de maneira clara e objetiva, contribuindo para suprir lacunas da literatura brasileira ou ampliando as informações disponíveis sobre temas específicos, focando no estudo dos insetos, seus produtos ou nas suas relações com outras áreas do conhecimento.

Pretende-se colaborar na divulgação de técnicas e ferramentas que ajudem na execução de ensaios técnicos e científicos, assim como, revisões e impressões sobre temas específicos da entomologia e áreas correlatas.

Neste número é abordado o tema ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO DO TRATO GASTROINTESTINAL DE ABELHAS E DOS PRODUTOS DA COLMEIA, uma importante contribuição para os interessados no desenvolvimento de produtos e subprodutos biotecnológicos das abelhas.

Conselho Editorial

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO DO TRATO GASTROINTESTINAL DE ABELHAS E DOS PRODUTOS DA COLMEIA

Nayara Alves Reis^{1}, Geni da Silva Sodré² & Carlos Alfredo Lopes de Carvalho³*

1 Egressa do Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas-BA. <https://orcid.org/0000-0003-1539-480X>

2 Docente da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas-BA. <http://orcid.org/0000-0002-6184-4720>.

3 Docente da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas-BA. <http://orcid.org/0000-0002-3306-3003>

* Autor correspondente: nayaraalves_bio@hotmail.com

Os probióticos são micro-organismos vivos capazes de promover o equilíbrio da microbiota intestinal quando ingeridos em quantidades adequadas. Têm sido utilizados principalmente para diminuir a inflamação intestinal restaurando o equilíbrio da microbiota. A presença de probióticos no trato gastrointestinal do hospedeiro pode inibir a sobrevivência de micro-organismos patogênicos mediante exclusão competitiva por nutrientes, espaço e sítios de adesão às células do epitélio intestinal, por modular a atividade imunológica, por inibirem a ação de toxinas e pela produção de substâncias antimicrobianas (ATASSI; SERVIN, 2010; FONTANA et al., 2013).

Dentre as diversas fontes onde podem ser isoladas bactérias probióticas, as abelhas e os produtos da colmeia têm demonstrado grande potencial devido a presença de bactérias lácticas com capacidade para produzir substâncias antimicrobianas. As bactérias lácticas apresentam propriedades atrativas para a indústria alimentícia e da saúde, alguns estudos têm demonstrado seu uso na conservação de alimentos e controle de patógenos, devido a produção de metabólitos com propriedades antimicrobianas (SAADATA et al., 2019).

Considerando a importância cada vez maior dos probióticos, este boletim técnico tem como objetivo descrever técnica de isolamento de bactérias lácticas da microbiota do trato gastrointestinal e dos produtos da colmeia (mel e pólen) de abelhas sociais e avaliar suas propriedades probióticas. Na primeira etapa, os isolados provenientes da microbiota do trato gastrointestinal e produtos da colmeia são selecionados quanto à morfologia celular, coloração de Gram e teste de catalase. Na segunda etapa, as culturas lácticas selecionadas são então testadas quanto as suas propriedades probióticas por meio de testes de resistência a baixos níveis de pH, presença de sais biliares, ação antagônica frente a patógenos de interesse alimentar e resistência a antimicrobianos.

Para as diferentes etapas são apresentados esquemas e fluxogramas a seguir:

ETAPA 1

1.1. Coleta e desinfecção das abelhas

- As amostras devem ser acondicionadas em recipientes estéreis e transportadas imediatamente para o laboratório dando início aos experimentos.
- As abelhas devem ser transportadas em álcool 70%.
- As amostras devem ser processadas separadamente, analisadas e manipuladas de forma asséptica para evitar contaminação.
- Para evitar a coleta de grandes quantidades de amostras de abelhas, mel e pólen é feito um cálculo proporcional a quantidade de diluente X amostra na etapa da diluição.
- A sugestão é que sejam utilizados cinco tratos gastrointestinais por colmeia e 10 g ou mL para cada amostra do mel “verde” e de pólen.
- As amostras do trato gastrointestinal devem ser maceradas em tubo do tipo Eppendorf com 1 mL de água peptonada a 0,1%.

Os tópicos descritos na coleta e desinfecção das abelhas estão representados na Figura 1.

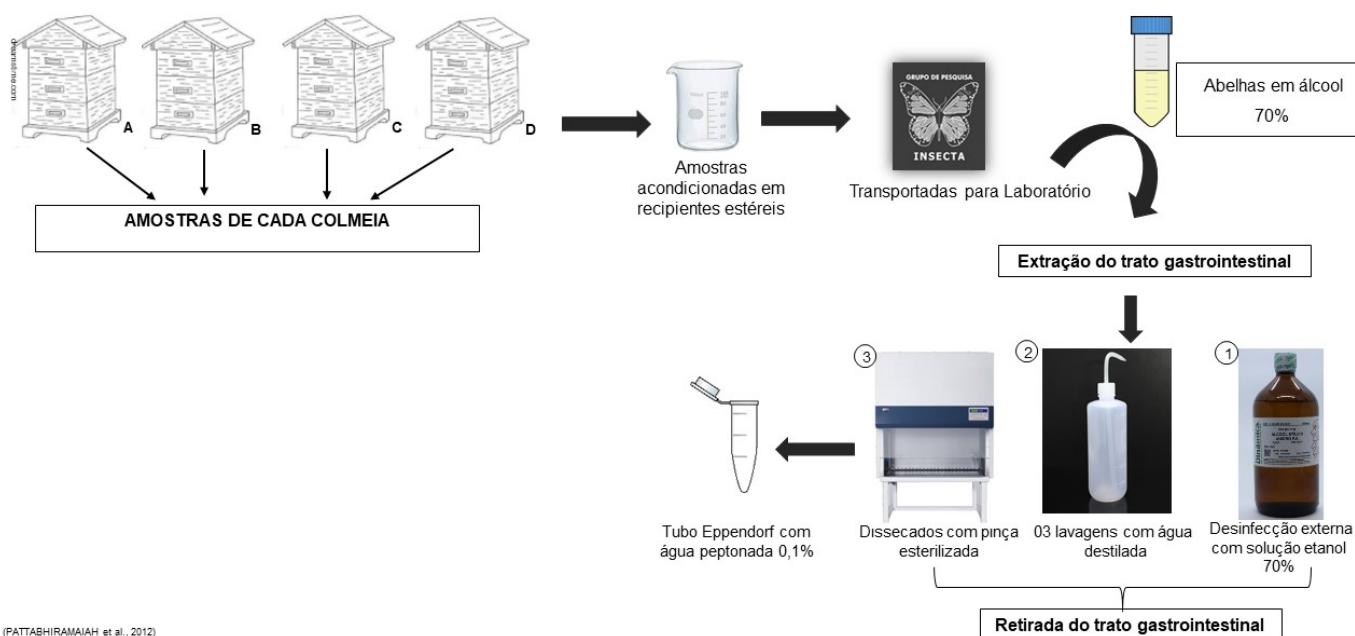


Figura 1. Fluxograma para coleta e desinfecção das abelhas.

1.2. Isolamento de bactérias lácticas

- As amostras (mel e pólen) devem ser homogeneizadas em 100 mL (para 10 g ou mL da amostra) de água peptonada (0,1%) e diluídas sucessivamente (até 10^{-6}) utilizando o mesmo diluente.
- As amostras do trato gastrointestinal devem ser diluídas em microtubos tipo Eppendorf com 900 μ L do diluente.
- As amostras devem ser plaqueadas em ágar MRS (De Man Rogosa e Sharpe - KASVI) acrescido de 0,004% de púrpura de bromocresol, 0,5% de carbonato de cálcio e incubadas em microaerofilia a 37 °C por 48 horas (RENGPIPAT et al., 2008; OLOFSSON et al., 2014).
- As colônias típicas de bactérias lácticas (cor amarela), devem ser selecionadas e avaliadas quanto à coloração de Gram e teste de catalase (usar solução de 3% de peróxido de hidrogênio H_2O_2) (COEURET et al., 2003).
- As colônias Gram + e catalase negativa devem ser subcultivadas em ágar MRS nas mesmas condições descritas acima e estriadas para obtenção de culturas puras.

Os tópicos descritos no isolamento de bactérias lácticas estão representados nas Figuras 2 e 3.

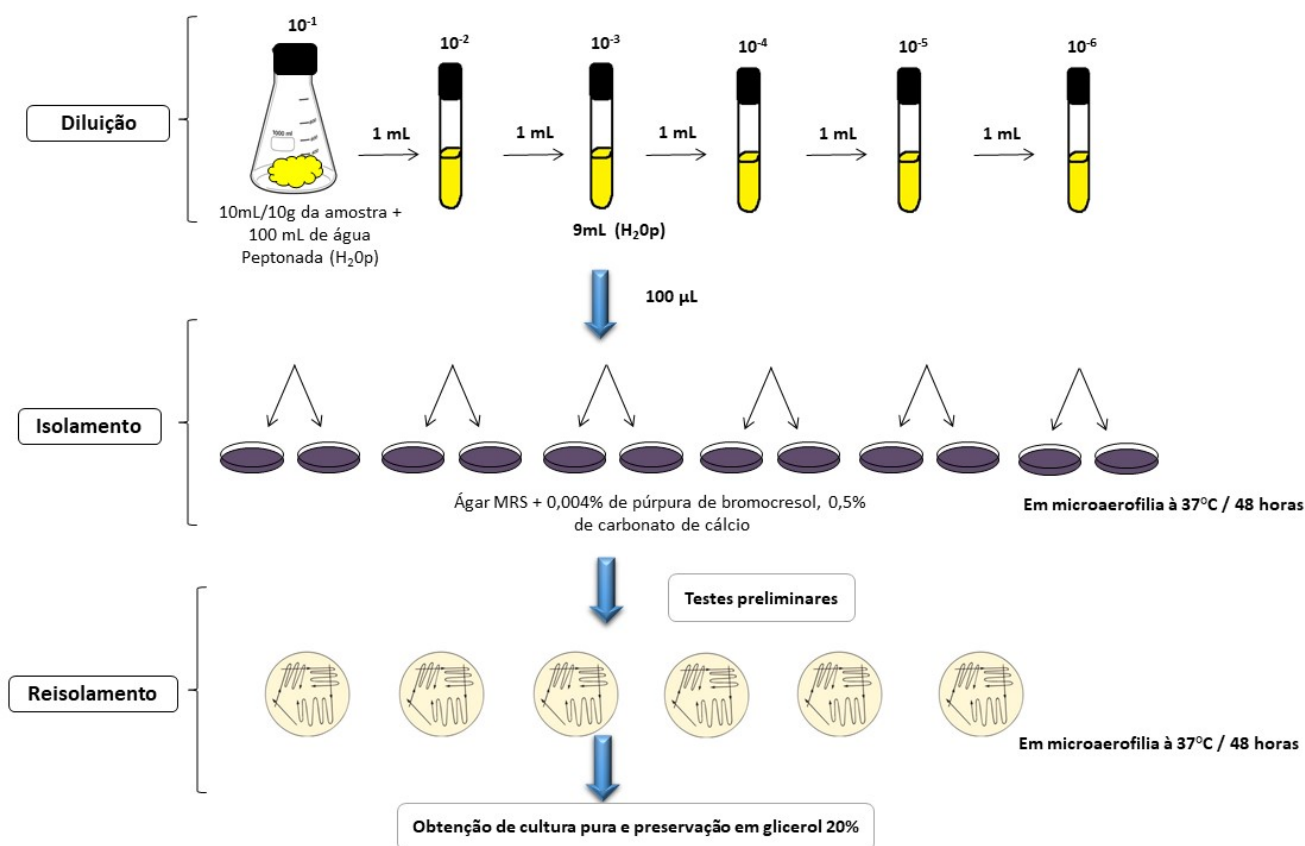


Figura 2. Fluxograma para isolamento de bactérias lácteas.

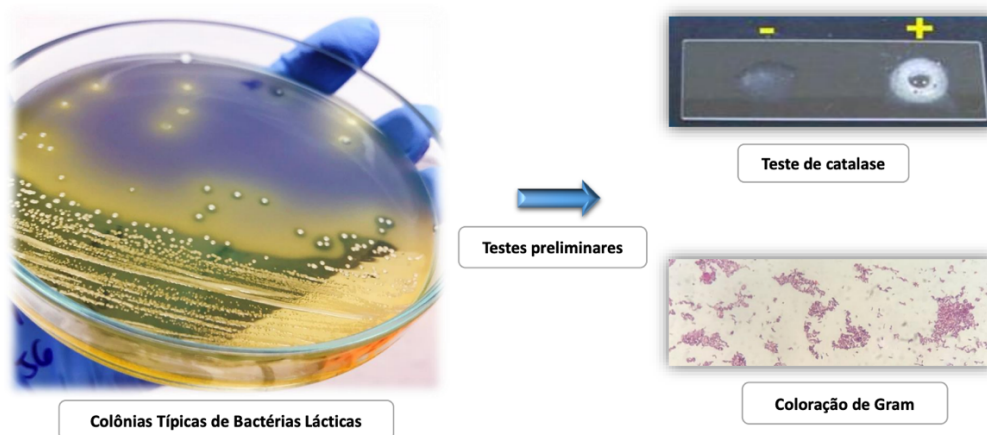


Figura 3. Fluxograma para obtenção de culturas lácticas.

1.3. Preservação de culturas lácticas

- As culturas lácticas devem ser estriadas em ágar MRS para realização de um novo teste de Gram para confirmação da cultura pura.
- As culturas puras devem ser inoculadas em caldo MRS, incubadas a 37 °C.
- O material deve ser centrifugado e então o pellet homogeneizado junto com o glicerol 20% estéril e caldo MRS.
- O material deve ser imediatamente incubado em freezer entre -80°C e -20 °C.

Os tópicos descritos na preservação de culturas lácticas estão representados na Figura 4.

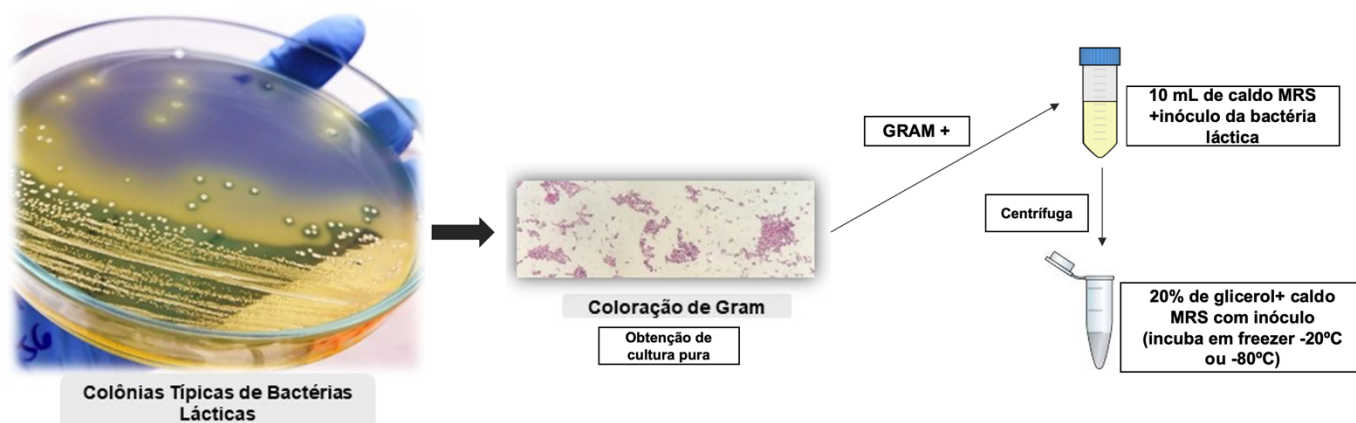


Figura 4. Fluxograma para preservação de culturas lácticas.

ETAPA 2**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO****Atividade antagonista à micro-organismo indicadores****Suscetibilidade a antimicrobianos mais utilizados na terapia humana****Sobrevivência a baixos valores de pH e diferentes concentrações de sais biliares****2.1. Atividade antagonista das bactérias lácticas**

- A atividade inibitória das bactérias lácticas é verificada conforme método descrito por Ryan et al. (1996).
- As culturas lácticas são ativadas em 5 mL de caldo MRS, incubadas por 24 horas a 37 °C.
- Microgotas de 5 µL de cada cultura láctica são inoculadas em placas contendo ágar MRS por 24 horas a 37 °C.
- Uma sobrecamada de agar BHI (BRAIN HEART INFUSION- KASVI) (0,7%), contendo separadamente os micro-organismos indicadores deve ser adicionada sob a superfície das placas e incubada por 24 horas a 37 °C.
- A atividade antimicrobiana será observada pela formação do halo de inibição pelas bactérias lácticas sobre os micro-organismos indicadores.
- O espectro de inibição pode ser medido com auxílio de um paquímetro e definido da seguinte forma: + fraca inibição (halos até 4 mm de diâmetro), ++ média inibição (halos de 5 a 9 mm de diâmetro) e +++ forte inibição (halos a partir de 10 mm de diâmetro) (CHIODA et al., 2007).

Os tópicos descritos em atividade antagonista das bactérias lácticas estão representadas na Figura 5.

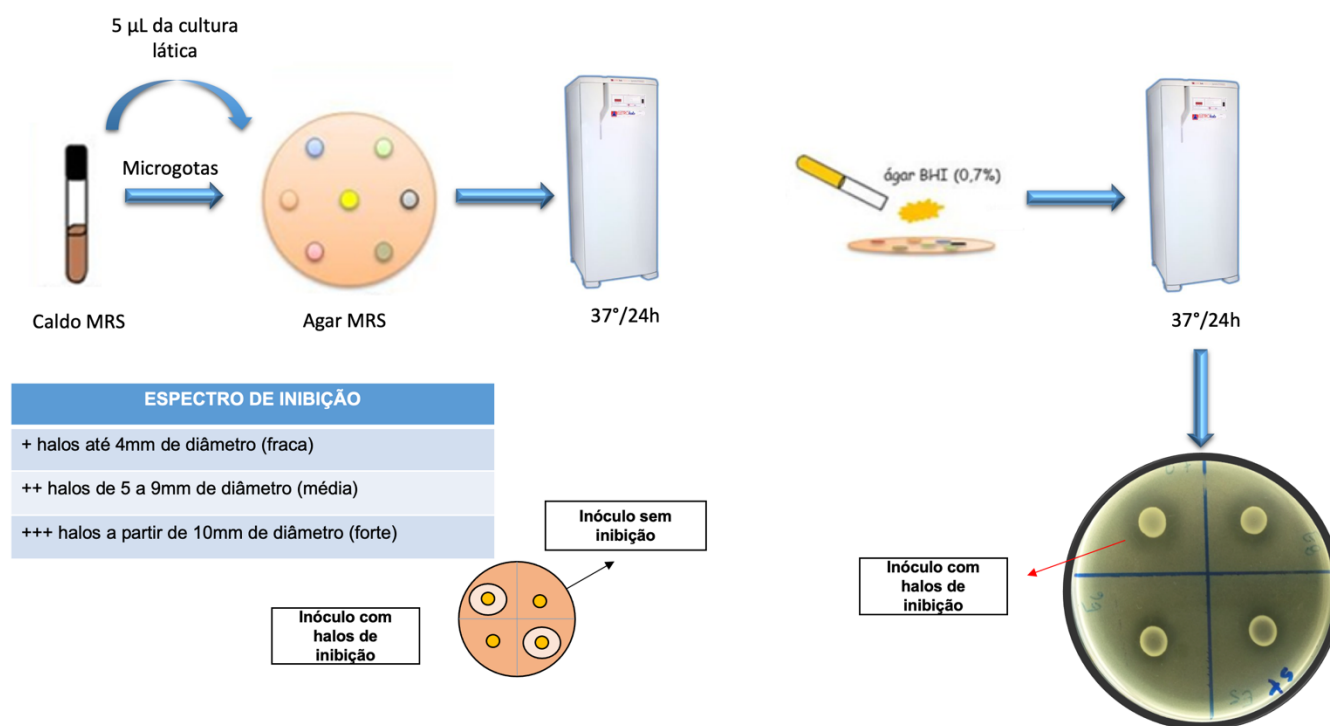


Figura 5. Fluxograma para análise da atividade antagonista das bactérias lácticas.

2.2. Suscetibilidade a antimicrobianos

- A suscetibilidade das bactérias lácticas aos antimicrobianos é avaliada pela metodologia de difusão de discos em ágar proposto pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) com algumas modificações.
- Os antimicrobianos testados são escolhidos de acordo com a literatura científica e com base no uso em terapias humanas e/ou animal.
- Para realização dos testes as culturas lácticas inoculadas em 5 mL de caldo MRS devem ser padronizadas para uma densidade óptica (D.O) 0,08 a 0,10 (10^8 UFC/mL) a 625 nm.
- É utilizado um swab de algodão estéril na suspensão ajustada, e então a cultura láctica é inoculada em placa com ágar MRS para a aplicação dos discos antimicrobianos (CLSI, 2012).
- O diâmetro do halo de inibição deve ser medido, com o auxílio de um paquímetro, e o resultado interpretado e comparado de acordo com a tabela fornecida pelo fabricante dos discos de antimicrobianos, tornando possível classificar as bactérias lácticas em resistentes, moderadamente sensível ou sensível.

Os tópicos descritos em suscetibilidade a antimicrobianos estão representados na Figura 6.

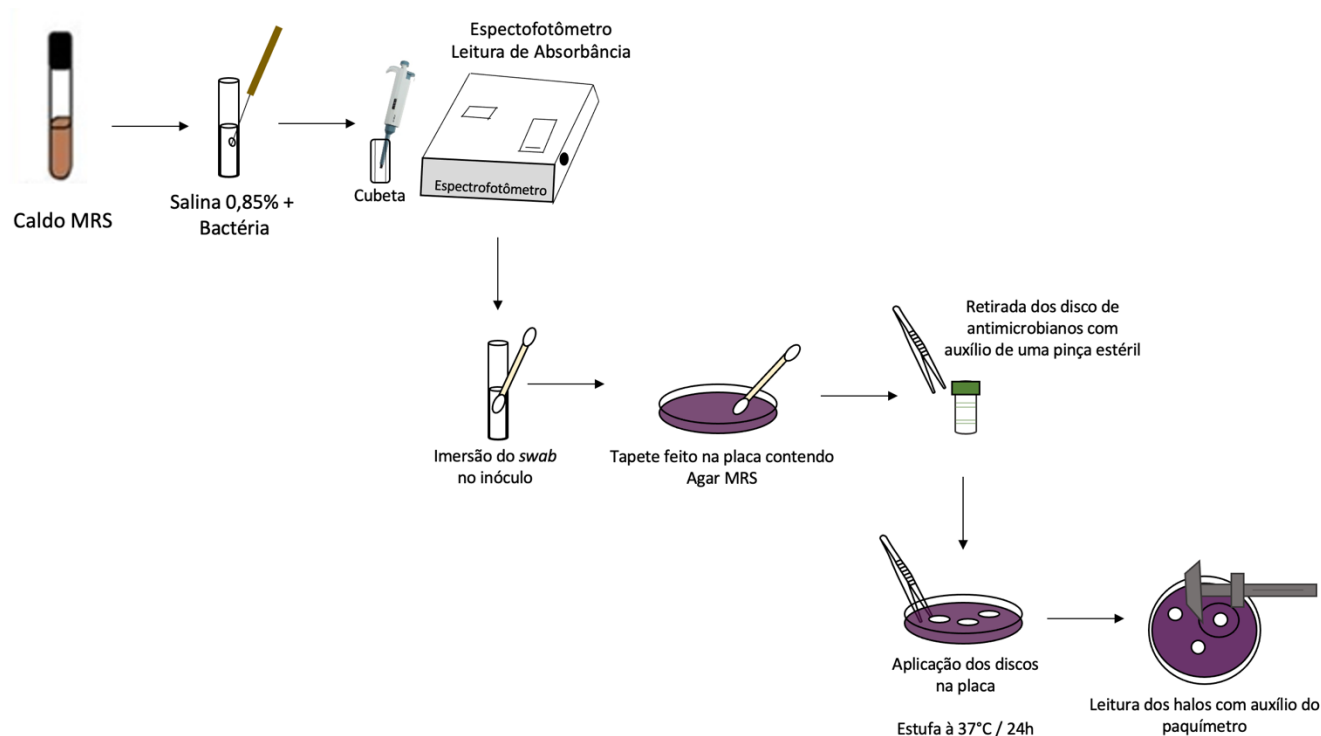


Figura 6. Fluxograma para determinação da suscetibilidade a antimicrobianos.

2.3. Sobrevivência das bactérias lácticas as condições de acidez e diferentes concentrações de sais biliares

- As culturas lácticas são ativadas em 5mL de caldo MRS. Após incubação à 37 °C por 24 horas, as amostras devem ser centrifugadas e o pellet utilizado para os diferentes tratamentos.
- Para verificar a resistência a acidez, as culturas lácticas (D.O 0,6 a 600 nm) são inoculadas, separadamente, em caldo MRS com diferentes valores de pH (7 - controle; 2,0; 2,5; 3,0) ajustados com HCl (0,2 M) e incubadas a 37 °C por 3 horas.
- Alíquotas de cada cultura deve ser coletada após o período de 3 horas, diluídas em solução salina (0,85%) e plaqueadas em agar MRS (microgotas com 20 µL)
- A sobrevivência dos isolados nessas condições é verificada pelo crescimento das colônias após 24 horas de incubação a 37 °C (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000; PENNACCHIA et al., 2004).
- A verificação da viabilidade das culturas lácticas a diferentes concentrações de sais biliares (p/v) segue a metodologia anterior utilizando os seguintes tratamentos: 0,0% (controle); 0,05%; 0,1% e 0,5% (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000; PENNACCHIA et al., 2004).

Os tópicos descritos em sobrevivência das bactérias lácticas às condições de acidez e diferentes concentrações de sais biliares estão representados na Figura 7.

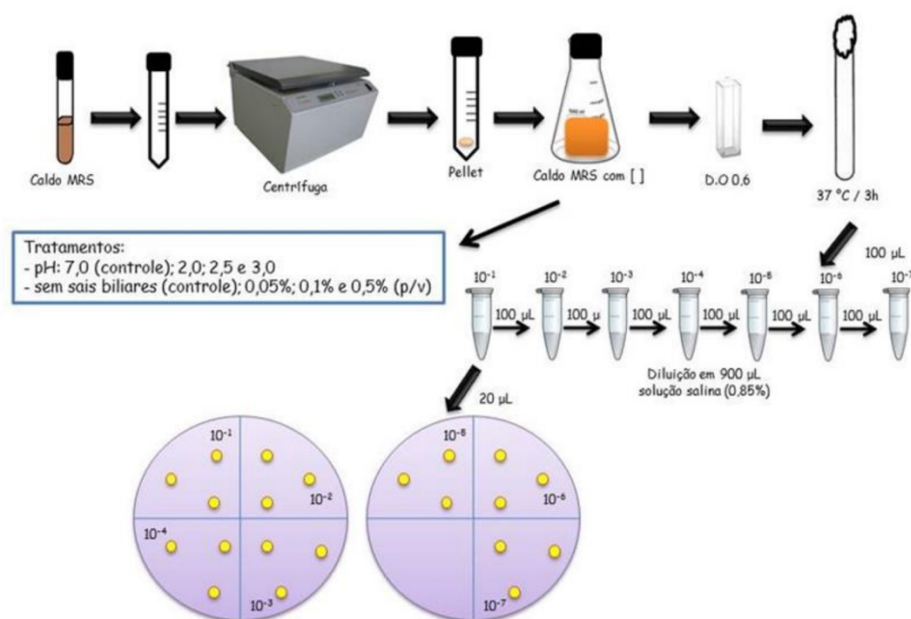


Figura 7. Fluxograma para determinar a sobrevivência das bactérias lácticas expostas as condições de acidez e as diferentes concentrações de sais biliares.

Agradecimentos

Aos Consultores *ad hoc* pelas contribuições no texto final. À CAPES pela bolsa de Doutorado concedida à NAR. Ao CNPq pela Bolsa PQ concedida à CALC.

Referências Bibliográficas

ATASSI, F.; SERVIN, A.L. Individual and co-operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain *Lactobacillus johnsonii* NCC933 and vaginal strain *Lactobacillus gasseri* KS120.1 against enteric, uropathogenic and vaginosis-associated pathogens. *FEMS Microbiology Letters*, v. 304, n. 1, p. 29-38, 2010.

CHIODA, T.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R., PIGATTO, C.P.; RIBEIRO, C.A.M.; RAGAZZANI, A.V.F. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo "Minas Frescal" por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência Rural*, v. 37, p. 583-585, 2007.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement. 31, 1- 186. Disponível em: file:///C:/Users/Nay/Downloads/previews_CLSI_M02A11E_M100S22E_pre.pdf. Acesso em 20 de maio de 2017.

COEURET, V.; DUBERNET, S.; BERNARDEAU, M.; GUEGUEN, M.; VERNOUX, J.P. Isolation, characterization and identification of *Lactobacilli* focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait*, v. 83, p. 269-306, 2003.

ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, v. 55, p. 97-300, 2000.

FONTANA, L.; BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DIAZ, J.; MUÑOZ-QUEZADA, S.; GIL, A. Sources, isolation, characterization and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, v. 109, n. 2, p. 35-50, 2013.

OLOFSSON, T.C.; BUTLER, E.; MARKOWICZ, P.; LINDHOLM, C.; LARSSON, L.; VÁSQUEZ, A. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees – an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. *International Wound Journal*, v. 13, p. 668-679, 2014.

PATTABHIRAMAIAH, M.; REDDY, M.S.; BRUECKNER, D. Detection of novel probiotic bacterium *Lactobacillus* spp. in the workers of Indian honeybee, *Apis cerana indica*. *Agris On-Line Papers in Economics and Informatics*, v. 2, p. 1135-1146, 2012.

PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; PEPE, O.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Science*, v. 67, p. 309-317, 2014.

RENGPIPAT, S.; RUEANGRUKLIKHIT, T.; PIYATIRATITIVORAKUL, S. Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*. *Aquaculture Research*, v. 39, p. 134-143, 2008.

RYAN, M.P.; REA, M.C.; HILL, C.; ROSS, R.P. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Applied Environmental Microbiology*, v. 62, p. 612-619, 1996.

SAADAT, Y. R.; KHOSROUSHAHIB, A. Y.; GARGARI, B. P. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v. 217, p.79-89, 2019.



**Boletim Técnico-Científico
Insecta, v.1, n. 4, 2021**

Esta publicação está disponível no
endereço:
<https://www.ufrb.edu.br/boletiminsecta>

1ª Edição
Versão eletrônica (2021)

Grupo de Pesquisa *Insecta*, CCAAB,
UFRB, Rua Rui Barbosa, 710 - Centro -
Cruz das Almas/BA - 44.380-000

Conselho Editorial:

Carlos Alfredo Lopes de Carvalho
Edilson Divino Araújo
Geni da Silva Sodré
Gilberto Marcos de Mendonça Santos
Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Reginaldo Barros
Yzila Liziane Farias Maia de Araújo
Zuleide Silva de Carvalho