

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOTECNOLOGIA

**COMUNIDADES BACTERIANAS ASSOCIADAS A  
COLÔNIAS DE ABELHAS AMAZÔNICAS SEM FERRÃO DA  
ESPÉCIE *MELIPONA SEMINIGRA*: DIVERSIDADE  
E POTENCIAL ENZIMÁTICO**

LORENA NACIF MARÇAL

MANAUS  
AGOSTO, 2017

LORENA NACIF MARÇAL

**COMUNIDADES BACTERIANAS ASSOCIADAS A COLÔNIAS DE  
ABELHAS AMAZÔNICAS SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *MELIPONA*  
*SEMINIGRA*: DIVERSIDADE E POTENCIAL ENZIMÁTICO**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva.

MANAUS  
AGOSTO, 2017

## Ficha Catalográfica

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

M313c Marcal, Lorena Nacif  
Comunidades bacterianas associadas a colônias de abelhas amazônicas sem ferrão da espécie *Melipona seminigra*: diversidade e potencial enzimático. / Lorena Nacif Marcal. 2017  
118 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Carlos Gustavo Nunes da Silva  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Abelhas nativas. 2. Pólen. 3. Microbiota. 4. Simbiose. I. Silva, Carlos Gustavo Nunes da II. Universidade Federal do Amazonas III.  
Título

LORENA NACIF MARÇAL

**COMUNIDADES BACTERIANAS ASSOCIADAS A COLÔNIAS DE ABELHAS  
AMAZÔNICAS SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *MELIPONA SEMINIGRA*:  
DIVERSIDADE E POTENCIAL ENZIMÁTICO**

Tese apresentada ao Programa Multi-  
Institucional de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal do  
Amazonas, como parte dos requisitos  
necessários para a obtenção do título de  
Doutor em Biotecnologia

**Aprovada em 29 de agosto de 2017.**

Banca examinadora:

Prof. Dr. Adolfo José Mota  
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Daniel Saito  
Universidade do Estado do Amazonas

Profa. Dra. Gislene A. Carvalho Zilse  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho  
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva, Presidente  
Universidade Federal do Amazonas

Este trabalho foi realizado nas dependências laboratoriais do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil, e no Departamento de Genômica populacional de animais de criação (*Livestock Genomic Population*) da Universidade de Hohenheim, Stuttgart, Alemanha.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas bênçãos e força concedida durante toda a minha jornada acadêmica.

Aos meus amados pais, Marçal e Solange, pelo amor e dedicação, por compreenderem a minha carreira acadêmica, que nos distancia geograficamente. Grandes incentivadores da educação dos filhos, vocês são a fonte da minha força e determinação. A vocês, todo meu amor e gratidão.

Às minhas irmãs e amigas Lorraine, Fernanda e Thaís, obrigada por serem meus amuletos da sorte. Aos meus queridos sobrinhos, Larissa, Marcelo, Clara Elis e Vinícius, baixinhos que enchem a minha vida de orgulho e alegria. Amo vocês!

Ao meu amor Bruno, pela cumplicidade e apoio incondicional, pelo incentivo constante e paciência nos momentos difíceis. Por vibrar pelas minhas conquistas. Por compartilhar sonhos. Obrigada por ser meu parceiro de vida.

Ao meu querido orientador, Professor Doutor Carlos Gustavo Nunes da Silva, minha sincera gratidão. Obrigada por todos os ensinamentos, conversas inspiradoras e motivadoras ao longo destes quatro anos de convivência. Sinto-me uma pessoa de sorte por ter lhe conhecido e ter a honra de ser orientada por você. Obrigada por confiar no nosso trabalho e por me guiar com leveza e entusiasmo pelo maravilhoso mundo das abelhas!

Ao estimado Professor Doutor Spartaco Astolfi-Filho, por ter aberto as portas do CAM e me recebido tão bem em seu grupo. Obrigada pela inspiração diária e pelo privilégio de conviver e aprender com o senhor.

Ao supervisor do meu doutorado sanduíche, Professor Doutor Martin Hasselmann pela oportunidade concedida e pela excelente recepção em Hohenheim. Obrigada por todas as idéias e conhecimentos compartilhados. *Danke schön!*

À Andressa Cristina Barroso e Yasmin Cabral Moreira, queridas abelhudinhas, pela grande ajuda nos experimentos deste trabalho. Tivemos momentos de muito trabalho, mas também de muita alegria e parceria. Muito obrigada por tudo.

Às queridas Biotecas, Anita, Eliane, Pâmella, Suellen, Évelyn e Belle, pelo aprendizado compartilhado e pela convivência diária regada a bolos, brownies, lanches e muita risada.

À todos os colegas de trabalho do “bloco G/CAM”, pela convivência e solidariedade marcante do grupo.

À Doutora. Enedina Nogueira pela colaboração em várias etapas deste trabalho e pelo zelo constante pelo nosso local de trabalho.

Ao Grupo de Pesquisa Microbiologia de Insetos e Biotecnologia – MIB- pelo suporte científico e pessoal, especialmente à Enide Luciana Belmont pela amizade e solicitude.

Ao Grupo de Pesquisas em Abelhas do Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas (GPA-INPA), especialmente à professora doutora Gislene Almeida Carvalho Zilse por nos receber de braços abertos e fornecer todo o material necessário para a execução dessa tese. Meus sinceros agradecimentos aos técnicos Diego Albuquerque e Hélio Vilas Boas pelo empenho e ajuda com a coleta das amostras.

À Doutora Maria do Carmo Queiroz Fialho por nos dar o privilégio de contar com sua maestria nas dissecações dos intestinos das abelhas utilizados nesta tese.

À Doutora Tainá Raiol, pela inestimável colaboração com as análises de bioinformática. Obrigada pela parceria e amizade.

Ao Professor Doutor Fabrício Baccaro pela valiosa colaboração com as análises estatísticas.

Ao Professor Doutor Adolfo Mota pela imensa solicitude e generosidade. Obrigada pelas ajudas e conselhos científicos.

À doutora Andrea Ghelfi pelas contribuições científicas a este trabalho.

À Sandra Hernández e José Gregorio Martínez pelo apoio e super ajuda com os sequenciamentos no Ion Torrent.

Aos doutores avaliadores da qualificação deste projeto Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse, Dr. Edmar Vaz de Andrade e Dr. Daniel Saito.

À Nilma Fernandes, mineira que o destino me fez encontrar na Amazônia, obrigada pelas conversas, aconselhamentos e amizade.

Às amigas viçosenses Anna Gabriella Guimarães, Ana Paula Motta, Déborah Romaskevis, Marcela Notini e Renata Pirani pela amizade, torcida e trocas científicas maravilhosas. Vamos dominar o mundo juntas minhas biólogas caras!

Às amigas Drummondianas, Juliana Martins, Ana Luisa Bretas, Amanda Bretas e Aline Lage, por acompanharem todo o meu crescimento de perto (mesmo quando geograficamente distantes), pelo amor e apoio ao longo de todas essas décadas de amizade.

À Universidade Federal do Amazonas e ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia pela minha formação e por proporcionarem toda a estrutura e suporte necessários para a realização deste trabalho.

Ao *Food Security Center* (FSC) da Universidade de Hohenheim, Stuttgart, Alemanha, pela bolsa de doutorado sanduíche concedida e todo suporte durante minha estadia em Hohenheim.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro para a realização de parte dessa tese (Universal 030/2013). E à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo fomento a Pós-Graduação.



*“Human beings are amazed to find that an insect colony is able to function as a unit although human society finds it difficult to live in harmony...”*

**J.C. BIESMEIJER.**

## RESUMO

Nacif-Marçal, L. 2017. Comunidades bacterianas associadas a colônias de abelhas amazônicas sem ferrão da espécie *Melipona seminigra*: diversidade e potencial enzimático. Tese (Doutorado), Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas.

As abelhas, assim como outros insetos sociais, apresentam complexas interações simbióticas com microrganismos, que vão desde o nível do indivíduo (abelha) até os diferentes microambientes do ninho/colônia. Estas relações afetam diretamente a imunidade e o potencial nutricional das abelhas bem como influenciam processos produtivos dentro da colônia, como a produção e armazenamento de alimentos. Considerando que: i) são escassos os estudos sobre a microbiota de abelhas silvestres, sendo grande parte da literatura voltada para as abelhas exóticas *Apis mellifera*; ii) o conhecimento dos microrganismos simbióticos contribui para o entendimento das relações ecológicas que garantem a homeostase da colônia bem como fornece ferramentas para a prospecção de produtos de interesse biotecnológico; iii) a produção fermentativa do pólen, principal alimento da colônia, é um processo pouco conhecido embora fundamental para o desenvolvimento das colônias de abelhas sociais; o objetivo deste trabalho foi elucidar as comunidades bacterianas associadas às provisões alimentares à base de pólen da abelha amazônica *Melipona seminigra* e ao seu intestino, com a finalidade de se conhecer melhor os microrganismos associados à esta abelha e ao armazenamento e preservação do pólen na colônia, vislumbrando aplicações biotecnológicas. Os experimentos deste trabalho foram realizados em três fases, iniciando-se com a descrição da microbiota bacteriana presente em potes e células de alimento da abelha *Melipona seminigra*, por meio de métodos independentes de cultivo (sequenciamento direto de DNA microbiano das amostras) e métodos dependentes de cultivo (cultivo bacteriano). Os isolados bacterianos obtidos pelo cultivo do pólen e alimento larval foram avaliados quanto ao seu potencial de produção de enzimas hidrolíticas e, por fim, realizou-se o estudo da microbiota bacteriana intestinal, a partir da clonagem gênica e sequenciamento do gene 16S rRNA. Foram identificados 26 gêneros bacterianos associados às provisões polínicas de *Melipona seminigra*, muitos dos quais são de origem ambiental e relacionados com processos fermentativos naturais e/ou industriais. Mudanças na composição bacteriana do pólen, desde a sua coleta até sua maturação sugerem que a produção deste alimento é mediada por um processo de sucessão microbiana. Grande parte das bactérias isoladas do pólen produz lipases, amilases, proteases e celulases com altos índices enzimáticos, indicando o potencial dessas bactérias para a bioprospecção de enzimas de interesse industrial. Em relação à microbiota intestinal, demonstrou-se que as populações bacterianas colonizam diferencialmente as partes morfofuncionais do intestino, sendo a maior diversidade de bactérias encontradas nos intestinos médios e posteriores. Este trabalho resultou em dados inéditos acerca da microbiota associada a abelhas *M. seminigra*, que contribuem para o melhor entendimento das complexas e fascinantes relações simbióticas entre abelhas sociais e microrganismos.

## ABSTRACT

Nacif-Marçal, L. 2017. Bacterial communities associated to the stingless amazonian bees *Melipona seminigra*: diversity and enzymatic potential. Thesis (PhD), Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas.

Bees, as other social insects, present complex symbiotic interactions with microorganisms, ranging from the individual level (bee) to the different microenvironments of the nest/ colony. These relationships can directly affect the nutritional potential and immunity of bees as well as influence productive processes within the colony, such as food storage and production. Considering that: i) there are few studies on the microbiota of wild bees, in contrast with the available literature of exotic bees *Apis mellifera*; ii) the knowledge about the symbiotic microorganisms contribute to the understanding of the ecological relationship that guarantee the colony homeostasis and it also provides tools for the prospection of products of biotechnological interest; iii) the fermentative production of bee pollen, the main food of the colony, is a little known process regardless its fundamental importance to the social colonies development; the objective of this work was to elucidate the bacterial communities associated with the bee gut and food supplies based on pollen of the Amazonian bee *Melipona seminigra*, with the purpose of knowing better the microorganisms associated to this bee and the process of storage and preservation of the bee pollen in the colony, glimpsing biotechnological applications. The experiments were carried out in three phases, starting with the description of the bacterial microbiota present in the pollen supply of *Melipona seminigra* bee, using independent culture methods (direct sequencing of microbial DNA samples) and culture-dependent methods ( Bacterial culture). Bacterial isolates obtained by pollen and larval food cultivation were evaluated for their hydrolytic enzyme production. Finally, the study of the *Melipona seminigra* gut microbiota was carried out based on cloning and sequencing of the 16SrRNA gene. It was identified 26 bacterial genera associated to pollen provisions of *Melipona seminigra*, many of which are of environmental in origin and related to natural and / or industrial fermentation processes. Changes in the bacterial composition of pollen from its collection until maturation suggest that the production of this food is mediated by a microbial succession process. Most of the bacteria isolated from pollen produce lipases, amylases, proteases and cellulases with high enzymatic indexes, indicating the potential of them for the bioprospection of enzymes of industrial interest. Regarding to the gut microbiota it was demonstrated that the bacterial populations colonize differentially the morphofunctional parts of gut, being the greater diversity of bacteria found in the middle and posterior intestines. This work resulted in unprecedented data on *M. seminigra* microbiota, which largely contribute to a better understanding of the complex and fascinating symbiotic relationships between social bees and microorganisms.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fluxograma da divisão metodológica da tese e organização dos resultados em artigos científicos.....	04
<b>Figura 2.</b> Ninho de abelha <i>Melipona seminigra</i> .....	07
<b>Figura 3.</b> Vista frontal e lateral do meliponário do Grupo de Pesquisa em Abelhas (GPA) instalado no INPA (Manaus-AM).....	18
<b>Figura 4.</b> Meliponário rural do ramal do Brasileirinho, sítio Renascer, proprietário Sr. José Carvalho Coutinho, Manaus-AM.....	19
<b>Figura 5.</b> Esquema da coleta de material biológico de colônias de <i>Melipona seminigra</i> do meliponário do Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA-INPA), Manaus-AM.....	21
<b>Figura 6.</b> Esquema do desenho experimental utilizado para o estudo da microbiota intestinal de operárias de <i>Melipona seminigra</i> de colônias mantidas em meliponário urbano (GPA-INPA) e rural ( Ramal do Brasileirinho), Manaus-AM.....	22
<b>Figura 7.</b> <i>Primers</i> para a amplificação parcial do gene 16S rRNA bacteriano, desenhados para seqüenciamento em plataforma Ion Torrent.....	25
<b>Figura 8.</b> Representação da metodologia utilizada para o cultivo bacteriano do pólen e alimento larval de seis colônias de <i>Melipona seminigra</i> mantidas no meliponário GPA-INPA, Manaus-AM.....	28

## ARTIGO 1

<b>Fig.1.</b> Alpha Diversity indexes for richness (Chao1) and diversity (Shannon).....	44
<b>Fig.2.</b> Heatmap of the 23 most abundant bacterial phylotypes –OTUs- (row) by sample (column).....	45
<b>Fig.3.</b> Phylogenetic tree of the 23 most abundant bacterial phylotypes found in pollen provisions.....	46
<b>Fig.4.</b> Histogram of the 8 most abundant bacterial phylotypes.....	47
<b>Fig.5.</b> Bacterial communities similarities of pollen provisions of <i>Melipona seminigra</i> .....	48
<b>Fig.6.</b> Relative proportions of bacterial isolates obtained from stored pollen and larval food from <i>Melipona seminigra</i> nests.....	49
<b>Fig.S1.</b> Rarefaction curves of the number of observed OTUs from samples clustered by condition/type.....	55

## ARTIGO 2

<b>Fig.1.</b> Qualitative enzymatic assay.....	77
<b>Fig. 2</b> Production of hydrolytic enzymes by bacteria isolated from food provisions of colonies of <i>Melipona seminigra</i> .....	78
<b>Fig. 3</b> Comparison of the enzymatic activity of bacteria isolated from pollen of pots and from larval food of colonies of <i>Melipona seminigra</i> bees.....	78
<b>Fig.S1.</b> Distribution of the bacteria isolates from stored pollen in pots and from larval food of <i>Melipona seminigra</i> bee according to the number of classes of hydrolytic enzymes Produced.....	83

## ARTIGO 3

<b>Fig2.</b> Location map of the two meliponaries accessed for bee sampling.....	88
<b>Fig S1.</b> Morphology of the gut of <i>Melipona seminigra</i> bee.....	88
<b>Fig.2.</b> Spatial organization of the gut bacteria in <i>Melipona seminigra</i> bees at genus taxonomic level.....	96
<b>Fig.3.</b> Spatial organization of the gut bacteria in <i>Melipona seminigra</i> bees at family taxonomic level.....	97
<b>Fig.4.</b> Heterogeneity of bacterial composition of the morphofunctional parts of <i>Melipona seminigra</i> gut.....	98
<b>Fig. S2.</b> Spatial organization of the gut bacteria in <i>Melipona seminigra</i> bees in Phylum, Class and Order taxonomic levels.....	98
<b>Fig.S3.</b> Heterogeneity of bacterial composition of the morphofunctional parts of <i>Melipona seminigra</i> gut in Phylum, Class, Order and Family taxonomic levels.....	99

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Bactérias dominantes da microbiota intestinal da abelha *Apis mellifera*.....13

**Tabela 2.** Volume e concentração dos reagentes utilizados na PCR.....31

**Tabela 3.** Volume e concentração dos reagentes utilizados na PCR do DNA intestinal.....35

### ARTIGO 1

**Table 1.** Ion torrent sequencing summary.....43

**Table 2.** pH values of stored pollen and larval food samples of *Melipona seminigra* nests.....48

**Table 3.** Comparisons of genera detected by culture-dependent and culture-independent methods.....50

**Table S1.** Fusion primers used for 16S rRNA gene amplification and deep sequencing.....55

**Table S2.** Taxonomic assignments of bacteria isolated from pollen and larval food of *Melipona seminigra* nests.....56

### ARTIGO 2

**Table I.** Highest Enzymatic Indexes (EI) detected in bacteria isolates from food provisions of *Melipona seminigra*.....77

**Table SI.** Enzymatic production of the bacteria isolated from stored pollen in pots and larval food of *Melipona seminigra* bee.....80

### ARTIGO 3

**Table 1.** Summary of np-MANOVA results of *M.seminigra* bacterial composition at different different taxonomical levels as a factor of meliponary site and gut part.....95

**Table 2.** Summary of PERMDISP results of *M.seminigra* overall bacterial heterogeneity at different taxonomical levels.....97

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	01
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	05
<b>2.1. Abelhas nativas sem ferrão</b> .....	05
<b>2.2. Pólen: da flor para a colônia</b> .....	08
<b>2.3. Relações simbióticas entre abelhas e microrganismos</b> .....	10
2.3.1. Bactérias associadas ao pólen e alimento larval.....	11
2.3.2. Bactérias associadas ao intestino.....	12
<b>2.4. Métodos de estudo da diversidade bacteriana</b> .....	15
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	17
<b>3.1. Objetivo geral</b> .....	17
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	17
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
<b>4.1. Área de estudo</b> .....	18
<b>4.2. Coleta do material biológico</b> .....	19
<b>4.3. Análise da diversidade bacteriana do pólen e alimento larval</b> .....	23
4.3.1. Extração de DNA microbiano total .....	23
4.3.2. Preparo da biblioteca de <i>amplicons</i> .....	24
4.3.3. Purificação e quantificação das bibliotecas de <i>amplicons</i> .....	25
4.3.4. Sequenciamento na plataforma <i>Ion Torrent PGM</i> .....	25
4.3.5. Análises de bioinformática.....	26
<b>4.4. Cultivo bacteriano do pólen e alimento larval</b> .....	27
4.4.1. Preparo das diluições seriadas e plaqueamento.....	27
4.4.2. Medição da temperatura e pH .....	29
4.4.3. Contagem de bactérias.....	29
4.4.4. Isolamento de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) .....	29
4.4.5. Preservação das bactérias .....	29
4.4.6. Extração de DNA genômico bacteriano .....	30
4.4.7. Reação de amplificação do gene codificador do 16S rRNA.....	30
4.4.8. Sequenciamento automático de nucleotídeos .....	31
4.4.9. Análises de bioinformática.....	31

<b>4.5. Ensaio enzimáticos</b> .....	31
4.5.1. Amilases .....	32
4.5.2. Celulasas (endoglucanases).....	32
4.5.3. Lipases.....	32
4.5.4. Proteases.....	33
4.5.5. Determinação semi-quantitativa da atividade enzimática.....	33
4.5.6. Análises estatísticas.....	33
<b>4.6. Análise da microbiota intestinal da abelha</b> .....	34
4.6.1. Dissecção dos intestinos e extração de DNA .....	34
4.6.2. Reação de amplificação do gene codificador do 16S rRNA e clonagem dos <i>amplicons</i> em vetor pGEM-T.....	34
4.6.3. Seleção de clones recombinantes e extração plasmidial .....	35
4.6.4. Sequenciamento automático de nucleotídeos e bioinformática .....	36
4.6.5. Análises estatísticas.....	36
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
<b>ARTIGO 1</b> .....	37
Comunidades bacterianas associadas às provisões de pólen da abelha amazônica sem ferrão <i>Melipona seminigra</i> .....	37
<b>ARTIGO 2</b> .....	64
Bioprospecção em ninhos de abelha nativas sem ferrão: potencial hidrolítico de bactérias associadas ao alimento larval e pólen armazenado da abelha amazônica <i>Melipona seminigra</i> .....	64
<b>ARTIGO 3</b> .....	84
Composição bacteriana do intestino da abelha amazônica sem ferrão <i>Melipona seminigra</i> .....	84
<b>6. CONCLUSÃO GERAL</b> .....	105
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	107
<b>APÊNDICES</b> .....	111



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Quando o poeta inglês John Donne postulou “Nenhum homem é uma ilha, isolado em si mesmo...” talvez não imaginasse a abrangência de sua frase não somente para a espécie humana como para todos os seres vivos que habitam o planeta terra. Nenhuma espécie vive sozinha, pelo contrário, há diferentes tipos de associações e interações biológicas entre as espécies e essas relações podem trilhar a evolução biológica das mesmas. O termo simbiose, ou “viver junto”, criado em 1879 por Anton de Bary (De BARY, 1879, apud HUGUES et al., 2008) resume bem o conjunto das relações próximas e duradouras entre espécies diferentes, normalmente recíprocas e benéficas (mutualismo).

Microrganismos são protagonistas de relações simbióticas complexas e diversas que podem afetar diretamente a saúde, nutrição, imunidade e processos vitais dos hospedeiros aos quais estão relacionados. Em abelhas, a importância das relações simbióticas com microrganismos já é bem reconhecida, embora o conhecimento sobre a composição e função desses microrganismos seja ainda escasso em muitos grupos de abelhas, como os da tribo Meliponini (Apinae: Apidae: Apoidea: Hymenoptera). Abelhas da tribo Meliponini são insetos verdadeiramente sociais de ampla distribuição no Brasil. Essas abelhas são comumente chamadas de abelhas sem ferrão e dentre elas se destacam as do gênero *Melipona*: abelhas exclusivamente neotropicais cuja maior diversidade é encontrada na bacia amazônica (SILVEIRA et al., 2002; CAMARGO; PEDRO, 2013). As abelhas sem ferrão do gênero *Melipona* estão entre os principais polinizadores da flora nativa ocupando uma posição chave nos diferentes ecossistemas do bioma amazônico (KERR et al. 1996; KERR et al., 2001). Além de sua importância ecológica, as melíponas são fontes de produtos alimentícios e medicinais e, portanto, fonte de renda para as populações locais, que praticam a meliponicultura (CARVALHO-ZILSE; NUNES-SILVA, 2012).

Abelhas meliponas, assim como outras abelhas sociais, apresentam complexas interações simbióticas com microrganismos, que vão desde em nível do indivíduo (abelha) até os diferentes microambientes do ninho/colmeia (ENGEL; MORAN, 2013). Especialmente, a produção e armazenamento dos alimentos dentro do ninho ocorrem com a participação de microrganismos, além de enzimas e secreções glandulares das abelhas. O pólen coletado pelas abelhas é a principal fonte de proteínas e lipídios para a colônia sendo também rico em outros macro e micronutrientes (ROUSTON; CANE, 2000; REBELO et al. 2016). Apesar de fornecer praticamente todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento e manutenção

da colônia, o pólen normalmente não é consumido em seu estado bruto: a maturação do pólen dentro dos potes de cerume do ninho parece ser necessária para a adequada alimentação das abelhas e homeostase da colônia (GILLIAM et al., 1990; VOLLET-NETO et al., 2016). Os mecanismos que culminam na maturação do pólen não são completamente conhecidos, mas presume-se que os mesmos dependam de transformações metabólicas mediadas por microrganismos que vivem em simbiose com as abelhas (GILLIAM et al., 1979; VÁSQUEZ; OLOFSSON, 2009; ANDERSON et al., 2011). Não é claro, no entanto, se esses simbiontes atuam diretamente na biodisponibilização e/ou conversão metabólica dos nutrientes do pólen ou se atuam na preservação de suas propriedades químicas e nutricionais ou ainda em todas essas funções (HERBERT & SHIMANUKI, 1978; FERNANDES-DA-SILVA & SERRÃO, 2000; ANDERSON *et al.*, 2011; ANDERSON et al., 2014; VOLLET-NETO et al., 2016).

Existem muitas lacunas no conhecimento acerca dos papéis desempenhados pelos microrganismos associados à maturação do pólen dentro dos ninhos de abelhas sociais. Mas, no contexto de abelhas sem ferrão da Amazônia, há primariamente uma defasagem de dados relacionados à composição microbiana de suas provisões alimentares e outros elementos do ninho. São também incipientes os trabalhos envolvendo a descrição da microbiota da própria abelha. Assim como na maioria dos animais, nas abelhas as comunidades microbianas são mais abundantes no trato digestório e podem afetar o seu potencial nutricional e imunológico, bem como outros aspectos fisiológicos (ENGEL & MORAN, 2013). A microbiota intestinal das abelhas pode também exercer funções extracorpóreas, uma vez que a produção dos alimentos na colônia ocorre a partir da inoculação de secreções e microrganismos do trato digestório das abelhas nos recursos coletados (néctar e pólen) (LEE *et al.*, 2015).

A elucidação da diversidade de microrganismos que vivem em simbiose com abelhas sem ferrão é importante para o melhor entendimento das relações ecológicas que mantêm o equilíbrio das populações nativas e de seus processos vitais na colônia. Igualmente, essa diversidade de microrganismos também atrai atenção do ponto de vista biotecnológico, para a prospecção de produtos bioativos de interesse médico e industrial. Nas últimas décadas, a elucidação de simbioses microbianas na natureza culminou no reconhecimento crescente de que produtos naturais isolados de plantas e animais são na maioria das vezes produtos metabólicos derivados de seus microrganismos co-existentes (CHALLINOR; BODE, 2015; CRAWFORD; CLARDY, 2011).

A Amazônia e sua vasta biodiversidade são um *hot-spot*, ainda pouco explorado, para a busca de novos bioprodutos. Insetos sociais como os meliponíneos da Amazônia proveem

muitos recursos para seus microrganismos simbióticos: ninhos perenes, alta densidade de indivíduos dentro dos ninhos, calor e umidade durante todo o ano, alimento compartilhado etc. Notadamente, o pólen como uma fonte complexa de compostos orgânicos deve abrigar microrganismos capazes de utilizar diversos tipos de substratos como fonte de nutrientes e que, conseqüentemente, podem apresentar um elaborado sistema enzimático. Os microrganismos associados ao pólen constituiriam um interessante repertório de biomoléculas para a indústria alimentícia (enzimas hidrolíticas) e/ou para produção de combustíveis (degradação de biomassa vegetal) (BODE, 2011; CHALLINOR; BODE, 2015).

Neste estudo, objetivou-se explorar e identificar sistematicamente a microbiota bacteriana associada às provisões alimentares da colônia (pólen e alimento larval – definições no Apêndice A) e ao trato alimentar da abelha amazônica sem ferrão *Melipona seminigra* Friese, H (1903) (CAMARGO; PEDRO, 2013). Essa espécie é amplamente distribuída na Amazônia central e possui grande valor social e econômico na meliponicultura (CARVALHO-ZILSE; NUNES-SILVA, 2012). Propõe-se aqui, por meio da tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS), descrever a diversidade das comunidades bacterianas associadas aos diferentes estágios do pólen após sua coleta pela abelha e analisar como essas variam ao longo do processo de armazenamento, maturação e distribuição do pólen nas células de cria, bem como acessar a viabilidade das bactérias em cultura e seu potencial biotecnológico (enzimas hidrolíticas). Essa fase do trabalho foi realizada nas dependências laboratoriais do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas.

A microbiota da abelha também foi investigada por meio da clonagem molecular de sequências gênicas de bactérias associadas ao intestino de *Melipona seminigra*, em suas três partes morfofuncionais: o intestino anterior ou papo/estômago social, o intestino médio e o intestino posterior. Essa última abordagem foi desenvolvida na Universidade de Hohenheim, Stuttgart, Alemanha, sob a supervisão do Prof. Dr. Martin Hasselmann, do Instituto de Ciência Animal, Departamento de Genômica populacional (*Institute of Animal Science, Livestock Population Genomics- 460h*), no âmbito de um estágio de doutorado sanduíche de curta duração apoiado e financiado pelo Centro de Segurança Alimentar - *Food security Center* – FSC da mesma universidade.

Os resultados dessa tese estão divididos em três partes, as quais foram organizadas em formato de artigos científicos (**Figura 1**). Cada artigo está organizado de acordo com as regras do periódico científico escolhido para a submissão do trabalho, obedecendo o idioma

requerido pela revista, com fins de otimizar e facilitar a divulgação em amplo alcance dos resultados da tese.

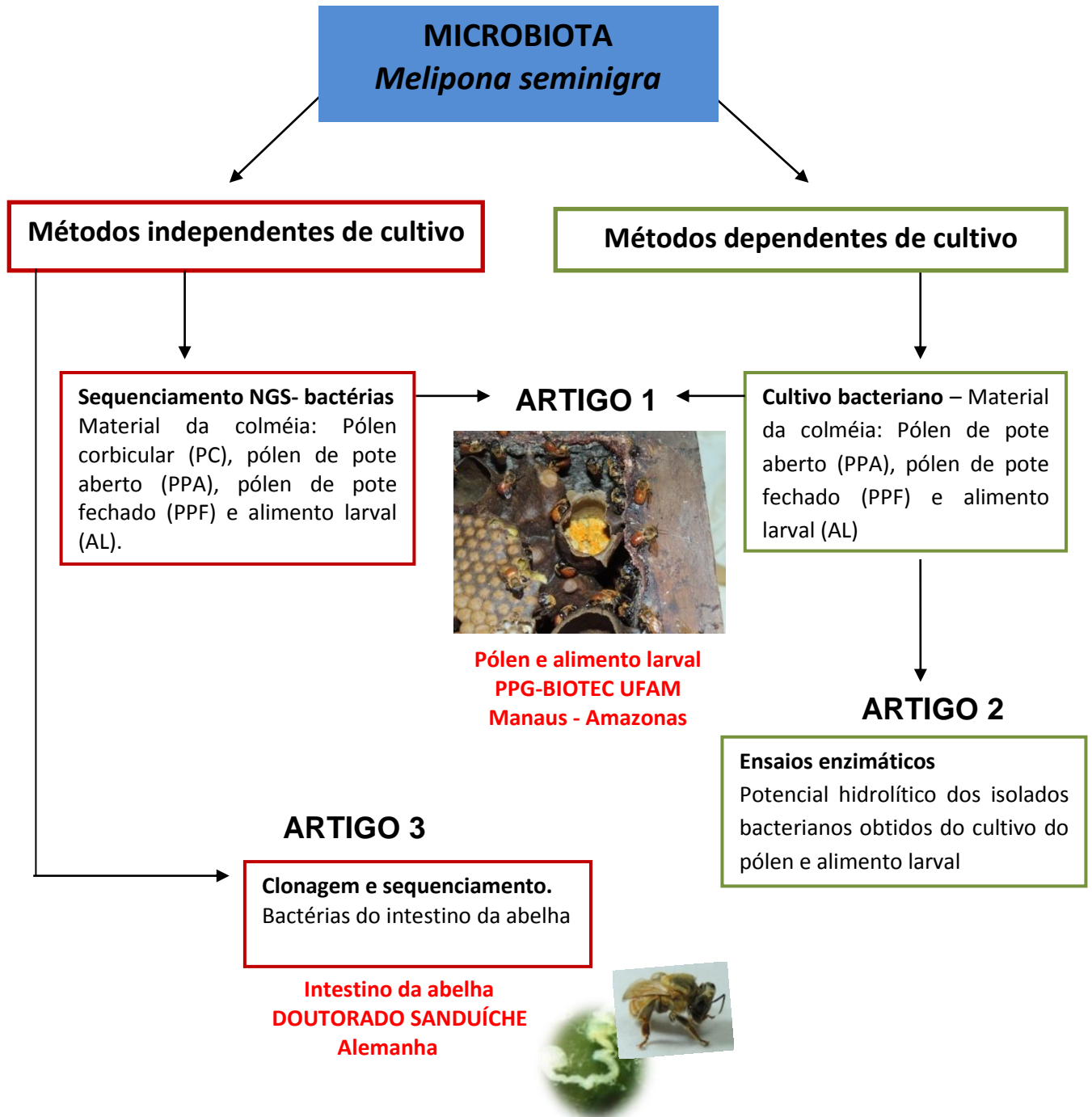


Figura 1. Fluxograma da divisão metodológica da tese e organização dos resultados em artigos científicos.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Abelhas nativas sem ferrão

As abelhas juntamente com as vespas e formigas compõem a ordem Hymenoptera da grande classe Insecta (Filo Arthropoda). A função ecológica mais importante desempenhada pelas abelhas é a atividade polinizadora, que garante a perpetuação das espécies vegetais, e, do ponto de vista econômico, garante a sustentabilidade de sistemas agrícolas para a produção de alimentos e outros produtos (MICHENER, 2007). Existem mais de 20 mil espécies de abelhas documentadas e todas estão reunidas taxonomicamente na superfamília Apoidea, que por sua vez é constituída por diversas famílias de abelhas - sete, segundo Michener (2007). Além de hábitos solitários, que é o predominante na maioria das espécies, as abelhas podem apresentar vários níveis de socialidade, desde o mais primitivo (colônias comunais ou semissociais) até o mais avançado (eussociais). As abelhas eussociais estão situadas dentro da família Apidae (Apoidea: Hymenoptera: Insecta) e caracterizam-se por apresentar colônias com divisão de trabalho e de esforço reprodutivo (castas), e sobreposição de gerações (MICHENER, 2007; HUGUES et al., 2008).

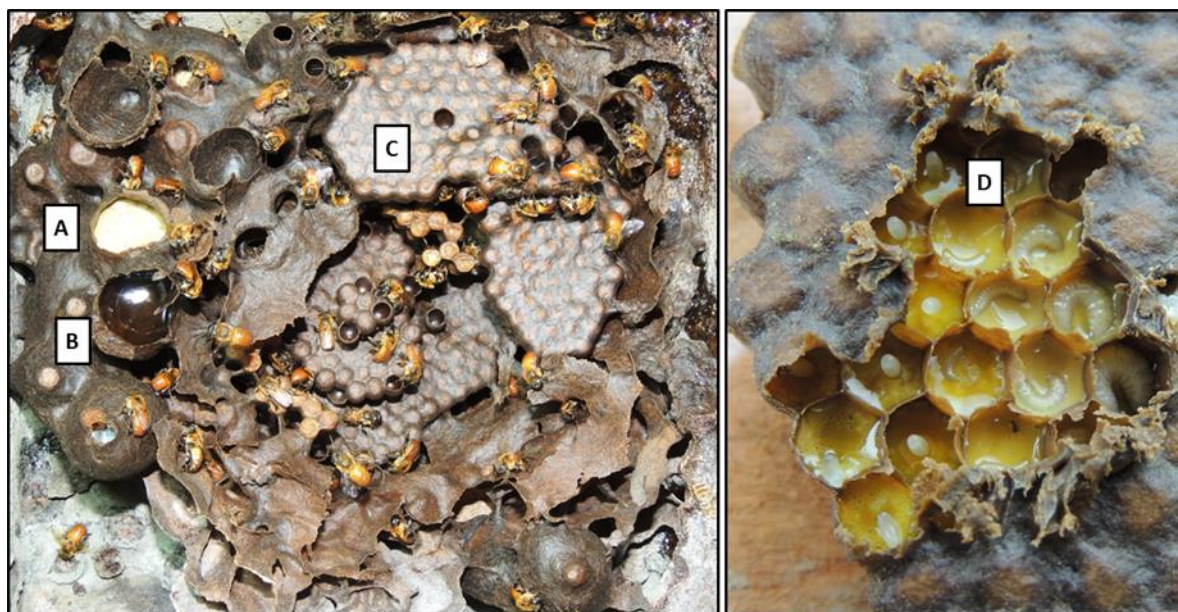
De acordo com Michener (2007) a família Apidae é dividida em três subfamílias (Apinae, Nomadinae e Xylocopinae), sendo a subfamília Apinae a mais diversificada. Dentre as diferentes tribos que compõem a subfamília Apinae, quatro delas (Apini, Bombini, Euglossini e a Meliponini) se destacam pela presença de uma estrutura denominada corbícula – modificação morfológica nas pernas posteriores das fêmeas para o transporte do pólen- e essas abelhas são chamadas de corbiculadas. As abelhas corbiculadas são as mais popularmente conhecidas, tanto pela sua importância econômica na polinização de sistemas agrícolas e naturais, quanto pela produção do mel e pólen (MARTINSON et al., 2011).

As abelhas nativas sem ferrão (*stingless bees*) são abelhas corbiculadas e eussociais de distribuição pantropical. O nome “abelhas sem ferrão” remete ao fato das fêmeas desse grupo apresentarem um ferrão atrofiado e, portanto, não funcional (NOGUEIRA-NETO, 1997). Pertencem a tribo Meliponini Lapeletier, 1836, (Apinae: Apidae: Hymenoptera: Insecta) e, juntamente com as abelhas da tribo Apini (Apinae: Apidae: Hymenoptera: Insecta), representam o nível mais avançado de socialidade em abelhas (MICHENER, 2007). As abelhas sem ferrão apresentam colônias “permanentes”, que podem apresentar de dezenas a centenas de milhares de indivíduos; as fêmeas são divididas em duas castas com base na diferenciação morfológica e comportamental: a rainha, pertencente à casta reprodutora, e a operária, pertencente à casta responsável por todas as outras funções da colônia. Os machos

não são considerados uma casta (MICHENER, 2007) e possuem como principal função a de cópula e podem participar da produção de cera e desidratação do néctar (KERR et al. 1997).

A dificuldade em se catalogar e classificar toda a diversidade existente de meliponíneos (Tribo Meliponini), somado ao grande número de espécies crípticas, cria incertezas quanto ao número de táxons presentes no grupo. Camargo e Pedro (2013) reconhecem 33 gêneros válidos, dos quais o gênero *Melipona* Illiger, 1806 se destaca pelo maior número de espécies. Abelhas do gênero *Melipona* ocorrem em toda a região neotropical e apresentam maior diversidade de espécies na bacia amazônica (SILVEIRA et al., 2002). Dada a sua abundância de espécies e indivíduos na Amazônia, abelhas melíponas são consideradas polinizadores indispensáveis da vegetação nativa deste bioma (KERR et al., 1996). Além disso, abelhas *Melipona* podem atuar na dispersão de sementes e se destacam dentre as abelhas sem ferrão como boas produtoras de mel (BACELAR-LIMA et al., 2006; CARVALHO-ZILSE; NUNES-SILVA, 2012).

As abelhas do gênero *Melipona* são robustas (8-15mm) (MICHENER, 2007) e suas colônias são compostas por milhares de indivíduos. Os ninhos são construídos geralmente em cavidades ocas dos troncos de árvores; suas estruturas são feitas a partir de cerume - mistura da cera, produzida e secretada pela superfície dorsal das abelhas, com resina vegetal e/ou barro (KERR et al., 1996). Dentro dos ninhos, as abelhas armazenam os alimentos (mel e pólen) em potes de cerume, predominantemente de formato oval, e alojam suas crias em estruturas em discos (favos), formados pelo agrupamento de células individuais de cerume (alvéolos) (**Figura 2**). Não há “células reais”, ou seja, os machos, operárias e rainhas se desenvolvem dentro de células de igual tamanho e recebem a mesma quantidade de alimento; não há evidências de que as rainhas recebam alimentação especial para o seu desenvolvimento, visto que a diferenciação de castas parece estar relacionada com um limiar da quantidade de alimento juntamente com fatores genéticos (HARTFELDER et al., 2006; BRITO et al., 2015). As células de cria são, portanto, igualmente aprovisionadas com o alimento larval (mistura de pólen, mel e secreções glandulares das abelhas) e, após a ovoposição pela rainha, essas células são lacradas e permanecem fechadas até a eclosão dos indivíduos adultos (KERR et al., 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997; VIT et al., 2013).



**Figura 2. Ninho de abelha *Melipona seminigra*.** Vista interna do ninho com destaque para: (A) pote de pólen, (B) pote de mel, (C) disco de cria (favo) e (D) disco de cria, com células de cria propositalmente abertas para a visualização do alimento larval, ovos e larvas. Fotos: Diego Cunha de Albuquerque.

Toda a dieta das abelhas melíponas baseia-se no néctar e pólen coletados dos recursos florais. As abelhas sugam o néctar das flores com sua longa língua até o “papo” ou “estômago de mel” (dilatação do intestino anterior do trato digestório da abelha), onde o néctar será acumulado e transportado de volta para a colônia. Na colônia, o néctar é entregue a outras abelhas que o desidratam e o acumulam em potes de cerume, até atingir a concentração de 70 a 80 % de açúcar, caracterizando assim o mel propriamente dito (KERR et al., 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997; VIT et al., 2013).

Os grãos de pólen são coletados das flores e transportados nas corbículas das abelhas campeiras até a colônia, onde são depositados e acumulados nos potes de cerume. As abelhas realizam a compactação do pólen no pote amassando-o com a cabeça e manipulando-o com as mandíbulas. Durante esse processo são acrescentadas secreções das glândulas mandibulares e hipofaríngeas das abelhas, além de néctar que pode ser regurgitado sobre o estoque de pólen (NOGUEIRA-NETO, 1997). Geralmente, o pote de pólen é preenchido em todo o seu volume antes de ser fechado pelas abelhas e, após fechado, pode permanecer de dias a semanas nessa condição (VIT et al., 2013). O pólen armazenado nos potes de cerume fechados é fermentado e adquire uma consistência mais pastosa, formando uma verdadeira “massa” de pólen ou Saburá, como é popularmente denominado nas regiões norte e nordeste do Brasil (KERR et al., 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997; VIT et al., 2013). O saburá (pólen

maturado) além de alimentar as abelhas jovens da colônia é o elemento principal do alimento larval e, portanto, é a base alimentar para a continuidade das gerações de abelhas. O **Apêndice A** traz um resumo das definições das nomenclaturas utilizadas nesta tese em relação ao pólen.

## **2.2. Pólen: da flor para a colônia**

O grão de pólen é o gametófito masculino, ou seja, é a estrutura que gera os gametas masculinos da planta. As características morfológicas do grão de pólen, como o tamanho, forma, ornamentações e cor, variam muito de uma espécie de planta para outra e, em consequência, a análise dessas características é uma ferramenta muito utilizada para a identificação taxonômica (ARRUDA et al., 2013).

De um modo geral, um grão de pólen é composto por três partes: o citoplasma e duas camadas externas, a intina e a exina. O envoltório externo do grão de pólen é resistente e durável e oferece uma grande proteção às duas células que residem internamente no seu interior: a célula do tubo, que acabará por se tornar o tubo polínico, e uma célula generativa, que contém os núcleos espermáticos masculinos necessários para a fertilização (RAVEN et al., 2001). A exina é a camada mais externa do grão de pólen e é rica em uma substância denominada esporopolenina. A composição da esporopolenina é incerta; trata-se de uma mistura complexa de biopolímeros, impermeáveis e resistentes à deterioração (ROULSTON;CANE, 2000). A exina é normalmente perfurada por poros que levam à camada mais interna, a intina. A intina é rica em celulose e pectina e forma a última barreira antes do rico citoplasma do grão de pólen (ROULSTON;CANE, 2000). Em plantas polinizadas majoritariamente por insetos, o grão de pólen é normalmente produzido com uma camada externa adicional, o *pólenkitt*, que apresenta propriedades adesivas e é composta basicamente por lipídeos (PACINI; HESSE, 2005).

O transporte dos grãos de pólen da parte masculina (estames) de uma flor para a parte feminina (estigma) da mesma ou de outra flor é chamado de polinização (RAVEN et al., 2001). Por garantir a polinização ou, reprodução sexuada de muitas plantas, as abelhas são fundamentais para a conservação e perpetuação de diferentes ecossistemas naturais. Em contrapartida, como polinizadores, as abelhas se beneficiam dos nutrientes do grão de pólen para sua alimentação e crescimento da colônia (PASQUALE et al., 2013).

O pólen (aglutinação de grãos de pólen) é um alimento de alto valor nutricional devido a sua riqueza de constituintes, que incluem proteínas, aminoácidos, lipídeos, carboidratos, sais



minerais, vitaminas e flavonóides (SOUZA et al., 2004; ALMEIDA-MURADIAN, 2005; SILVA et al., 2006; VANDERPLANCK et al., 2014; REBELO et al., 2016;). A composição nutricional de um dado pólen varia fortemente com a espécie da planta de origem e sua localização geográfica, além de depender de outros fatores como condições climáticas e tipos de solo (ROULSTON;CANE, 2000; FÉAS et al., 2012). O pólen é altamente recomendado como suplemento alimentar da dieta humana e algumas de suas propriedades terapêuticas já foram evidenciadas em estudos científicos, tais como a antioxidante e a antimicrobiana (KROYER; HEGEDUS, 2001; SILVA et al., 2006; FÉAS et al., 2012).

Apesar de o pólen fornecer praticamente todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento e manutenção das colônias das abelhas, ele normalmente não é consumido em seu estado bruto, sendo primeiramente maturado dentro do ninho (GILLIAM et al., 1990; HUMAN; NICOLSON, 2006; VOLLET-NETO et al., 2016). A transitoriedade das flores frente às estações do ano é um fator crucial para a estocagem e consequente maturação do pólen nos ninhos (ANDERSON et al., 2011) e, além disso, algumas hipóteses justificam a necessidade da transformação química e armazenamento do pólen, como por exemplo, a resistência da parede celular do pólen à digestão ou a conveniência de se misturar previamente grãos de pólen de origens variadas para se obter maior diversidade nutricional (MATTILA et al., 2012; ECKHARDT et al., 2013).

A maturação do pólen dentro da colônia da abelha é visualmente notada pela alteração de suas características físico-químicas (sabor, odor, cor e textura). Em alguns casos as diferenças entre o pólen coletado da planta e o pólen maturado também se expressam em termos nutricionais e químicos, com variações nas concentrações de lipídeos, açúcares, e proteínas bem como alterações de pH e umidade (HERBERT & SHIMANUKI, 1978; LOPER et al., 1980; STANDIFER et al., 1980; HUMAN & NICOLSON, 2006). Mas, nem sempre a maturação do pólen parece ser acompanhada de um incremento nutricional do produto estocado ou do aumento da sua digestibilidade (HERBERT & SHIMANUKI, 1978; FERNANDES-DA-SILVA & SERRÃO, 2000, ANDERSON et al., 2014).

É proposto que no processo de maturação do pólen em saburá microrganismos sejam os responsáveis pela conversão, biodisponibilização e/ou preservação dos nutrientes do pólen, principalmente por meio de processos fermentativos. Esses microrganismos podem ter origem ambiental e/ou serem inoculados pelas abelhas, por meio da saliva e néctar regurgitado (GILLIAM *et al.*, 1979; LOPER *et al.*, 1980; GILLIAM *et al.*, 1990; GILLIAM, 1997; VÁSQUEZ & OLOFSSON, 2009; ANDERSON *et al.*, 2011; MATILLA *et al.*, 2012). Em

abelhas *Apis mellifera* (Apini; Apinae; Apidae; Apoidea; Hymenoptera; Insecta), Vásquez e Olofsson (2009) sugerem que as Bactérias do Ácido Láctico (BAL) exercem um papel chave neste processo. Adicionalmente às BAL, outros grupos bacterianos já foram descritos como associados ao pólen estocado de *A. mellifera*, como por exemplo, Actinobacterias e bactérias entéricas (MATTILA et al., 2012; ANDERSON et al., 2013; ANDERSON et al., 2014).

Em trabalhos pioneiros, Gilliam e colaboradores (1979; 1990) já relatavam a importância de fungos e bactérias do gênero *Bacillus* na produção do pólen, inclusive para a abelha sem ferrão *Melipona fasciata*. No entanto, a maioria dos estudos são focados nas abelhas do gênero *Apis* e, se considerarmos as abelhas do gênero *Melipona*, há uma grande defasagem de dados referentes à composição microbiológica do alimento polínico e de outros elementos do ninho. Fato que nos alerta para a necessidade de estudos voltados para este grupo tão importante para os ecossistemas brasileiros (CARVALHO-ZILSE; NUNES-SILVA, 2012). O conhecimento da microbiota associada ao pólen de *Melipona* além de auxiliar no entendimento do processo de maturação do mesmo, que é importante para a manutenção e desenvolvimento das colônias, tem implicações diretas no manejo, controle e conservação dessas abelhas.

### **2.3. Relações simbióticas entre abelhas e microrganismos**

Microrganismos são protagonistas de relações simbióticas complexas e diversas que podem afetar diretamente os processos vitais dos hospedeiros aos quais estão relacionados. O dueto formado por insetos e microrganismos exemplifica bem a magnitude das relações simbióticas: a classe Insecta compreende o maior e mais abrangente grupo de animais na Terra e, estima-se que de 15% a 20% de todas as espécies de insetos mantêm associações persistentes com microrganismos simbioss (FELDHAAR; GROSS, 2009). Estes simbioss permitem que os insetos ampliem seu potencial nutricional e/ou mecanismos de defesa e possibilitam melhores respostas fisiológicas às adversidades do meio ambiente (DILLON; DILLON, 2003; FELDHAAR; GROSS, 2009). Essa variedade de interações parece ser a chave para o enorme sucesso adaptativo dos insetos a incontáveis ecossistemas (ALCAIDE et al., 2015; FLÓREZ-PATINO et al., 2015; SALEM et al., 2015).

As relações simbióticas mediadas por microrganismos são normalmente classificadas em função do tipo de interação com seu hospedeiro: intracelular ou extracelular, obrigatória ou facultativa (KIKUCHI, 2009), extracorpórea (ectosimbioss) ou pelas formas especializadas de simbiose, como os sistemas de “agricultura” (SCHULTZ; BRADY, 2008;

YUKI et al., 2015). O estudo dessas relações normalmente é focado nos dois integrantes da interação: o simbiote e o seu “hospedeiro”. Em insetos sociais, no entanto, as interações simbióticas são mais complexas e devem ser analisadas em um contexto mais amplo: o da colônia/ninho. As colônias de insetos sociais sediam organismos intimamente ligados a um complexo e dinâmico sistema de interações entre fatores bióticos e abióticos, de forma a proteger as futuras gerações e preservar e/ou processar estoques de alimento (TURNER, 2000; HUGHES et al., 2008; ANDERSON et al., 2011). As colônias de insetos sociais e seus (micro) organismos podem ser caracterizados, neste contexto, como uma unidade ou um “super organismo” (TURNER, 2000), um conceito que nos permite entender e explicar as organizações de insetos sociais em nível da colônia e não somente do indivíduo (BIESMEIJER, 1997).

Os tópicos a seguir trazem informações baseadas, em sua maioria, nas abelhas do gênero *Apis*, pois, como já comentado, grande parte dos estudos envolvendo microbiota de abelhas se concentra neste grupo.

### **2.3.1. Bactérias associadas ao pólen e alimento larval**

A presença de bactérias, especialmente do gênero *Bacillus*, bem como de fungos e leveduras, em provisões alimentares de colmeias de *Apis mellifera* foi inicialmente demonstrada nas décadas de 70 e 80, por métodos dependentes de cultivo (revisados em Gilliam, 1997). Estes trabalhos forneceram uma perspectiva importante sobre o mundo microbiano da colméia, mas, nos anos subsequentes, o advento e aprimoramento de técnicas independentes de cultivo (clonagem, tecnologias de sequenciamento) possibilitaram uma melhor elucidação da microbiota da abelha e da colônia (MATTILA et al., 2012).

De um modo geral, o pólen corbicular de abelhas do gênero *Apis* possui grupos bacterianos tipicamente encontrados em sedimentos, solos, flores e raízes, como Gammaproteobacteria, Actinomicetos e Enterobacterias (MATTILA et al., 2012; ANDERSON et al., 2013; CORBY-HARRIS et al., 2014), enquanto o pólen armazenado nas colônias é especialmente abundante em bactérias do ácido-láctico (BAL) como as do gênero *Lactobacillus* (destaque para a espécie *Lactobacillus kunkeei*) (VÁSQUEZ; OLOFSSON, 2009; ANDERSON et al., 2013; ANDERSON et al., 2014). A presença de bactérias acidofílicas no pólen armazenado na colônia é um reflexo – senão a causa- da acidez típica do pólen pós maturação (pH entre 3,0 e 4,0) (ANDERSON et al., 2011; REBELO et al., 2016). Outros grupos de bactérias encontrados no pólen, como Bradyrhizobiaceae e

Xanthomonadaceae, não possuem origem definida e podem refletir os vários microambientes visitados pela abelha ou ainda serem oriundos da própria abelha (ANDERSON et al., 2014). Bactérias derivadas do trato digestório de abelhas *A. mellifera* também são normalmente encontradas nas comunidades bacterianas do pólen armazenado e do pólen corbicular, mas suas respectivas proporções nessas comunidades ainda não são bem definidas e variam entre diferentes amostras e locais de coleta (VÁSQUEZ; OLOFSSON, 2009; ANDERSON et al., 2014; CORBY-HARRIS et al., 2014).

Analogamente, para abelhas sem ferrão as primeiras evidências para a presença de bactérias no pólen foram obtidas por métodos dependentes de cultivo (MACHADO, 1971). Bactérias do grupo *Bacillus* foram detectadas em estoques de pólen e de alimento larval de *Melipona quadrifasciata* e no alimento larval de outras treze espécies de abelhas sem ferrão (MACHADO, 1971). Espécies de *Bacillus* foram também reportadas em provisões alimentares (mel, pólen e alimento larval) de *Melipona fasciata* (GILLIAM et al., 1990). No entanto, os estudos acerca das bactérias associadas às abelhas sem ferrão e seus ninhos não avançaram muito desde então (VIT et al., 2013).

### **2.3.2. Bactérias associadas ao intestino**

Estudos independentes mostram que o intestino da abelha operária da espécie *Apis mellifera* apresenta um conjunto consistente de oito a dez *clusters* (grupos) de bactérias (**Tabela 1**) (JEYAPRAKASH et al., 2003; COX-FOSTER et al., 2007; BABENDREIER et al., 2007; SABREE et al., 2012; MARTINSON et al., 2011; CORBY-HARRIS et al., 2014; ENGEL et al., 2016), as quais estão sendo melhor investigadas quanto aos seus efeitos na saúde e doença das populações de abelhas *Apis* sp. Estes *clusters* estão presentes na grande maioria dos indivíduos de *Apis mellifera* e representam de 95 a 99,9% da comunidade bacteriana intestinal (MORAN et al., 2012) - embora as proporções dos diferentes *clusters* variem entre indivíduos (SABREE et al., 2012).

Entende-se por *Cluster de espécies* ou filotipos grupos que contenham cepas ou espécies de bactérias filogeneticamente relacionadas (monofiléticas), as quais desempenham o mesmo nicho ecológico (KWONG; MORAN, 2016), visto que o conceito de “espécie” em procariotos é de difícil consenso. Em estudos taxonômicos baseados no 16S rDNA, estes *clusters* normalmente compartilham 97 % ou mais de identidade entre suas sequências e são agrupadas nas chamadas Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) (KWONG; MORAN, 2016).

**Tabela 1. Bactérias dominantes da microbiota intestinal da abelha *Apis mellifera*.**

<b>Bactéria</b>	<b>Filo</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Características</b>
<i>Snodgrassella alvi</i>	Proteobacteria	<i>Apis, Bombus</i>	Abundante. Forma biofilmes
<i>Gilliamella apicola</i>	Proteobacteria	<i>Apis, Bombus</i>	Abundante. Fermentadores.
<i>Lactobacillus spp. Firm-4</i>	Firmicutes	<i>Apis, Bombus, Meliponini</i>	Abundante. Fermentadores.
<i>Lactobacillus spp. Firm-5</i>	Firmicutes	<i>Apis, Bombus, Meliponini</i>	Abundante. Fermentadores.
<i>Frischella perrara</i>	Proteobacteria	<i>Apis</i>	Raras. Filogeneticamente próxima à <i>Gilliamella</i> .
<i>Bartonella apis</i>	Proteobacteria	<i>Apis</i>	Raras.
<i>Parasaccharibacter apium</i>	Proteobacteria	<i>Apis, Bombus</i>	Raras. Podem crescer na geléia real.
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Actinobacteria	<i>Apis, Bombus, Meliponini</i>	Raras. Fermentadores.
Espécies do grupo <i>Gluconobacter (Alpha 2.1.)</i>	Proteobacteria	<i>Apis</i>	Raras.

KWONG; MORAN, 2013; KWONG; MORAN, 2016; ENGEL et al., 2016.

A descrição da microbiota presente no intestino da *A.mellifera* foi corroborada por diferentes estudos envolvendo abelhas melíferas de várias partes do mundo (BABENDREIER et al., 2007). Essa consistência na composição bacteriana sugere que as abelhas *Apis mellifera* coevoluiram simbioticamente com algumas ou todas as bactérias dominantes de seu intestino e, que, essas associações são principalmente mantidas e transferidas entre gerações de abelhas e não adquiridas do meio ambiente (MARTINSON et al., 2011). Corroborando essa hipótese, as bactérias dominantes do intestino de *A.mellifera* são majoritariamente anaeróbias facultativas ou microaerófilas; ou seja, dificilmente habitam os ambientes da colônia e provavelmente dependem das interações sociais para serem transmitidos de hospedeiro para hospedeiro (KWONG; MORAN, 2016). Estudos metagenômicos e metatranscriptômicos revelam que esses microrganismos intestinais possuem genes envolvidos com a digestão do pólen (ex. pectinases), biossíntese de nutrientes, neutralização de toxinas e imunidade contra patógenos (ENGEL et al., 2012; LEE et al., 2015). Grande parte da microbiota intestinal de *A.mellifera* carrega genes envolvidos com a fermentação de carboidratos, condizente com a dieta dessas abelhas (néctar, mel e pólen) (TAMARIT et al., 2015; KWONG; MORAN, 2016).

A microbiota intestinal de *Apis mellifera* segue uma distribuição específica ao longo do trato digestório (revisado por KWONG; MORAN, 2016). A porção anterior do intestino ou

papo de mel (lugar onde a abelha transporta e armazena o néctar) apresenta poucas bactérias, principalmente espécies membros da família Enterobacteriaceae e as espécies *Lactobacillus kunkeei* e *Parasaccharibacter apium* tipicamente encontradas nos microambientes da colmeia. Da mesma forma, o intestino médio é pouco colonizado por bactérias, as quais se encontram principalmente na região de transição entre o intestino médio e intestino posterior (píloro). A maior parte da comunidade bacteriana intestinal das abelhas *Apis* concentra-se no intestino posterior (íleo e reto): aproximadamente 99% de todas as bactérias da abelha adulta residem no intestino posterior (KWONG; MORAN, 2016).

Enquanto certos grupos de bactérias intestinais parecem ser restritos ao seu hospedeiro *A. mellifera*, tais como a *Bartonella apis* e a *Frischella perrara* (KWONG; MORAN, 2016), outros *clusters* bacterianos também estão presentes em abelhas corbiculadas, como demonstrado para as abelhas do gênero *Bombus* (Bombini; Apinae; Apidae; Hymenoptera; Insecta) (KOCH; HEMPEL, 2011). Em contraste, abelhas solitárias e abelhas sociais não-corbiculadas parecem não compartilhar dessa microbiota especializada; ao contrário, apresentam uma microbiota intestinal composta basicamente por bactérias de origem ambiental (MARTINSON et al., 2011; MCFREDERICK et al., 2012; MCFREDERICK et al., 2014). Tais diferenças sugerem que o grupo das abelhas corbiculadas compartilha de uma história evolutiva comum, também no que diz respeito à aquisição e manutenção de sua microbiota intestinal (MARTINSON et al., 2011; MCFREDERICK et al. 2014). No entanto, não há informação suficiente sobre a microbiota da maioria dos grupos de abelhas existentes para que as relações filogenéticas sejam exploradas também sob a ótica microbiológica.

Até o momento, poucos trabalhos abordaram, de alguma perspectiva, a microbiota intestinal de abelhas sem ferrão da tribo Meliponini: CRUZ-LANDIM, 1996- *Melipona quadrifasciata*, VASQUEZ et al., 2012 – *Melipona Beecheii*, KOCH et al., 2013 - *Melipona panamica*, *Meliponula bocandei* LEONHARDT; KALTENPOTH 2014- *Tetragnula carbonaria*, *Tetragonula hockingsii* e *Austroplebeia australis* e DÍAZ et al., 2016 – *Melipona quadrifasciata* (ocorre no Brasil). Em março deste ano (2017), um estudo pioneiro apresentou uma abordagem comparativa da microbiota intestinal de abelhas corbiculadas de diferentes continentes (KWONG et al., 2017). O estudo abrangeu dez espécies de abelhas da tribo Meliponini, sendo duas de ocorrência no Brasil, pertencentes ao gênero *Trigona*. Permanecem escassos, para não dizer inexistentes, os registros de microbiota intestinal para as abelhas sem ferrão nativas da Amazônia, região que abriga a maior diversidade de meliponíneos do mundo.

## 2.4. Métodos de estudo de diversidade bacteriana

O estudo da composição e estrutura de comunidades microbianas não é uma questão trivial. As metodologias disponíveis para identificação taxonômica de microrganismos sejam elas baseadas em métodos dependentes ou independentes de cultivo possuem limitações. Em termos de cultivo bacteriano, é ainda difícil prover todas as condições apropriadas para indução do crescimento de microrganismos fastidiosos (SUENAGA, 2012). Estima-se que apenas de 1 a 10% dos microrganismos ambientais já tenham sua forma de cultivo determinada (RAPPE; GIOVANNONI, 2003; HANDELSMAN, 2004; SINGH et al., 2009).

O desenvolvimento de técnicas independentes de cultivo ultrapassou a necessidade de isolamento prévio do microrganismo representando um grande avanço para os estudos de diversidade microbiana, inaugurando a era metagenômica (SUENAGA, 2012; MATTILA et al., 2012). O termo metagenômica, ou análise genômica de uma população de microrganismos, refere-se à análise de material genético obtido a partir de uma mistura de populações microbianas de origem ambiental, das quais o DNA ou RNA extraído é representativo do coletivo de microrganismos ali presentes (HANDELSMAN et al., 1998). A clonagem do DNA microbiano total de um dado ambiente em vetores plasmidiais permitiu o acesso a informações funcionais e filogenéticas de comunidades microbianas até então não estudadas (HANDESLMAN, 2004). De grande importância neste cenário, os trabalhos pioneiros de Carl Woese evidenciando os genes codificadores do RNA ribossomal como “cronômetros moleculares” foram fundamentais para a sistematização dos métodos de identificação e classificação bacteriana (FOX et al., 1977).

Recentemente, as tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração (SNG) revolucionaram os estudos de diversidade microbiana com a possibilidade de se analisar milhões de fragmentos de DNA. A alta cobertura dessas tecnologias permite que a estrutura microbiana de uma dada amostra ambiental seja revelada minuciosamente, incluindo os microrganismos menos abundantes (MARDIS, 2008). Ainda assim, os métodos moleculares de estudo de diversidade microbiana utilizados para o SNG, como a amplificação do gene 16SrRNA utilizando *primers* universais, podem incluir viés nos resultados que culminem em distorções na identificação da comunidade microbiana analisada (MAO et al., 2012). Além disso, as sequências obtidas por NGS são pequenas em extensão (até 400pb no máximo) e algumas vezes insuficientes para a resolução taxonômica.

Trabalhadas em conjunto, as abordagens de identificação microbiana se completam e permitem uma caracterização mais consistente da diversidade de microrganismos de um dado

material, bem como de seu potencial biotecnológico. Nesta perspectiva, as comunidades bacterianas associadas às abelhas podem ser acessadas por meio da associação do isolamento/cultivo com o SNG. Enquanto o sequenciamento permite a elucidação taxonômica da diversidade dos grupos bacterianos presentes, o método de isolamento possibilita o acesso às características bioquímicas e fisiológicas dos grupos cultiváveis, bem como o acesso às moléculas bioativas produzidas por esses microrganismos.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

O objetivo deste projeto foi elucidar as comunidades bacterianas associadas às provisões alimentares à base de pólen e ao intestino da abelha amazônica *Melipona seminigra*, com a finalidade de se conhecer melhor os microrganismos envolvidos com a dinâmica de produção e preservação do pólen na colônia, vislumbrando aplicações biotecnológicas.

#### 3.2. Objetivos específicos

1. Descrever a diversidade das comunidades bacterianas associadas ao pólen e ao alimento larval de *Melipona seminigra*.
2. Testar se há uma sucessão microbiana ao longo do processo de armazenamento e maturação do pólen na colônia.
3. Acessar a culturabilidade, isolar e identificar as bactérias associadas ao pólen de potes abertos e fechados da colônia e ao alimento larval de *Melipona seminigra*.
4. Avaliar o potencial de produção de enzimas hidrolíticas das bactérias cultivadas.
5. Selecionar os isolados bacterianos com melhor atividade enzimática.
6. Elucidar a microbiota bacteriana associada ao intestino da abelha *Melipona seminigra* e comparar a composição bacteriana das três partes do intestino (anterior médio e posterior).
7. Verificar se a composição bacteriana do intestino de *Melipona seminigra* é afetada pela localização geográfica do meliponário (área urbana *versus* área natural).
8. Verificar se existe uma relação entre a microbiota do intestino da abelha com a microbiota associada ao pólen armazenado dentro da colônia.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Área de estudo

As amostras de pólen, alimento larval e abelhas utilizadas neste trabalho foram provenientes de colônias de abelhas da espécie *Melipona seminigra* mantidas no meliponário urbano do Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) (Manaus-AM, Brasil, 03° 05' 50.91''S, 59° 59' 06.32''W). O meliponário está situado no Bosque da Ciência – campus sede do INPA, Manaus-AM- que compõe um fragmento florestal urbano de mata secundária com 130 mil m<sup>2</sup> (<http://bosque.inpa.gov.br/>); o meliponário conta com 28 colônias de *Melipona seminigra* dispostas lado a lado numa área de 12.25 x 7.4 metros (**Figura 3**). O meliponário possui também 52 caixas de abelhas da espécie *Melipona interrupta*. Há outra área de fragmento florestal situado próximo ao meliponário: a área da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), com 6,7 milhões de metros quadrados - o terceiro maior fragmento verde em área urbana do mundo e o primeiro do país. Nela são encontradas várias espécies da fauna - como preguiças, pacas, sauins-de-coleira - e da flora, em meio a uma grande porção de mata virgem (<http://www.ufam.edu.br>).

Amostras de abelhas da espécie *Melipona seminigra* foram também coletadas de um meliponário rural situado no Ramal do Brasileirinho, na propriedade do Sr. José Carvalho Coutinho, Sítio Renascer S/N (Manaus-AM, Brasil, 03° 00' 27.20'' S; 59° 51' 49.23''W) (**Figura 4**). A comunidade do Brasileirinho encontra-se no limite da cidade com as bordas da floresta Amazônica e é formada por propriedades agroflorestais (sítios) circundadas por áreas de floresta primária e secundária. Nas propriedades são encontradas diversas espécies nativas, como açaí, mamão, pupunha e cupuaçu, além de plantações de espécies exóticas como manga, banana e jambo.



**Figura 3. Vista frontal e lateral do meliponário do Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA) instalado no INPA (Manaus-AM).**



**Figura 4. Meliponário rural do ramal do Brasileirinho (Manaus-AM), Sítio Renascer, proprietário Sr. José Carvalho Coutinho.**

#### **4.2. Coleta do material biológico**

No meliponário do GPA-INPA, amostras de pólen corbicular (PC), de pólen armazenado (saborá) em potes abertos (PPA) e fechados (PPF) e de alimento larval (AL) foram coletadas de 10 colônias/caixas de *Melipona seminigra* (**Figura 5 e Apêndice A e Apêndice B**).

O pólen corbicular foi coletado manualmente, com uso de luvas de procedimento, a partir da interceptação de abelhas vindas do forrageamento, na entrada de cada colônia. Uma

tela de aço com pequenos furos foi colocada na entrada da colônia para atrasar a entrada da abelha e facilitar a interceptação da mesma (**Figura 5, PC**). O pólen armazenado nos potes dentro das colônias foi coletado a partir de duas condições: A) pote aberto com preenchimento de pólen até a metade do volume do mesmo (PPA) e B) pote fechado (PPF). O pólen foi amostrado do pote por meio de duas a três inserções verticais de ponteiras de 1000uL estéreis de pontas cortadas, a fim de coletar pólen de todas as camadas no pote (**Figura 5, PPA e PPF**). Para a coleta do alimento larval, discos de cria foram removidos de cada colônia e os alvéolos de cria foram abertos em fluxo laminar para recolhimento do alimento larval (**Figura 5, AL**). O alimento larval (composto por pólen, néctar e secreções) foi removido das células com auxílio de pipeta automática, sendo os ovos primeiramente removidos com uma pinça estéril.

A amostragem do material biológico baseou-se na coleta de aproximadamente 2,0g de cada tipo de material por colônia, com agrupamento de material de diferentes potes ou células de cria (1 *pool* para cada tipo de material por colônia). Para o pólen corbicular, um total de abelhas operárias suficientes para a coleta de aproximadamente 1,0g de pólen foi interceptado por colônia. O material coletado foi acondicionado em tubos plásticos estéreis, no gelo, até a abertura em câmara de fluxo laminar para homogeneização dos *pools* e divisão do material em microtubos. Os microtubos contendo as amostras foram imediatamente encaminhados para as análises ou armazenados em freezer a -80°C até o momento do uso. As coletas do material biológico foram realizadas na estação chuvosa, entre os meses de dezembro de 2014 e janeiro de 2015, com exceção do pólen corbicular, cuja coleta se estendeu até agosto de 2015.

Para a obtenção dos intestinos das abelhas, foram coletados cinco indivíduos de abelhas campeiras de cada colônia, total de cinco colônias por localidade (Ramal do Brasileirinho e GPA), somando um total de 50 abelhas, as quais foram dissecadas para a remoção do intestino. O desenho experimental do estudo da microbiota intestinal está esquematizado na **Figura 6**. As abelhas foram coletadas no mês de junho de 2016.



Figura 5. Esquema da coleta de material biológico de colônias de *Melipona seminigra* do meliponário do Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA-INPA, Manaus-AM). As abelhas de cada colônia são mantidas em caixas padronizadas, as quais são formadas por módulos de madeira e subdivididas em alças denominadas melgueira, sobreninho, ninho e lixeira.

**Desenho experimental:**

**MELIPONÁRIO GPA-INPA (ambiente urbano)**

N= 5 colônias de *Melipona seminigra*

5 abelhas coletadas -> 1 *pool* de cada parte do intestino por colônia

3 *pools* por colônia (anterior/médio/posterior) X 5 colônias = 15 amostras

**RAMAL DO BRASILEIRINHO (ambiente agroflorestral):**

N= 5 colônias de *Melipona seminigra*

5 abelhas coletadas -> 1 *pool* de cada parte do intestino por colônia

3 *pools* por colônia (anterior/médio/posterior) X 5 colônias = 15 amostras

**TOTAL: N = 10 colônias: 30 amostras**

**10 intestino anterior/ 10 intestino médio/ 10 intestino posterior**

**Procedimentos:**

1°. Coleta de cinco abelhas por colônia

2°. Dissecação de cada abelha individualmente, remoção do trato intestinal e divisão em três partes (intestino anterior, intestino médio e intestino posterior).

3°. Agrupamento das partes do intestino por colônia: *pool* de cinco intestinos anteriores, *pool* de cinco intestinos médios e *pool* de cinco intestinos posteriores.

4°. Encaminhamento para a extração de DNA metagenômico.

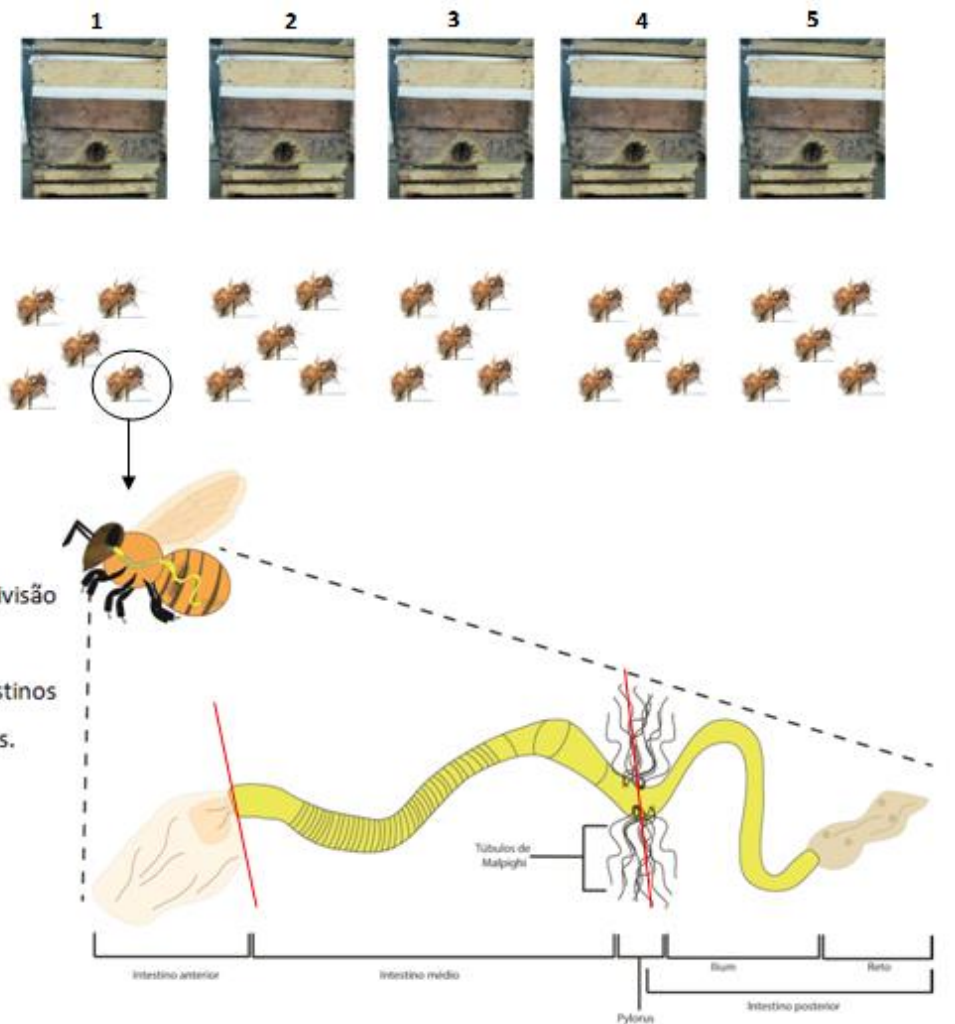


Figura 6. Esquema do desenho experimental utilizado para o estudo da microbiota intestinal de operárias de *Melipona seminigra*, de colônias mantidas em meliponário urbano (GPA-INPA) e rural (Ramal do Brasileirinho), Manaus-AM.

### 4.3. Análise da diversidade bacteriana do pólen e do alimento larval por NGS

Para elucidar a diversidade de microrganismos associados ao pólen (PC, PPA e PPF) e alimento larval (AL) de *Melipona seminigra*, foi utilizado o método de sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*), o qual tem potencial de revelar com profundidade as sequências microbianas de uma dada amostra. Nesta abordagem, as amostras de pólen e alimento larval foram diretamente submetidas a extrações de DNA microbiano, sem passar por cultivo prévio. Foram utilizadas dez colônias e as quatro condições coletadas de cada colônia (PC/ PPA/ PPF/ AL), com exceção do pólen corbicular (PC), para o qual foram utilizadas amostras de apenas três colônias, pois não se obteve massa suficiente para a extração de DNA das outras colônias e/ou as extrações não renderam DNA de qualidade.

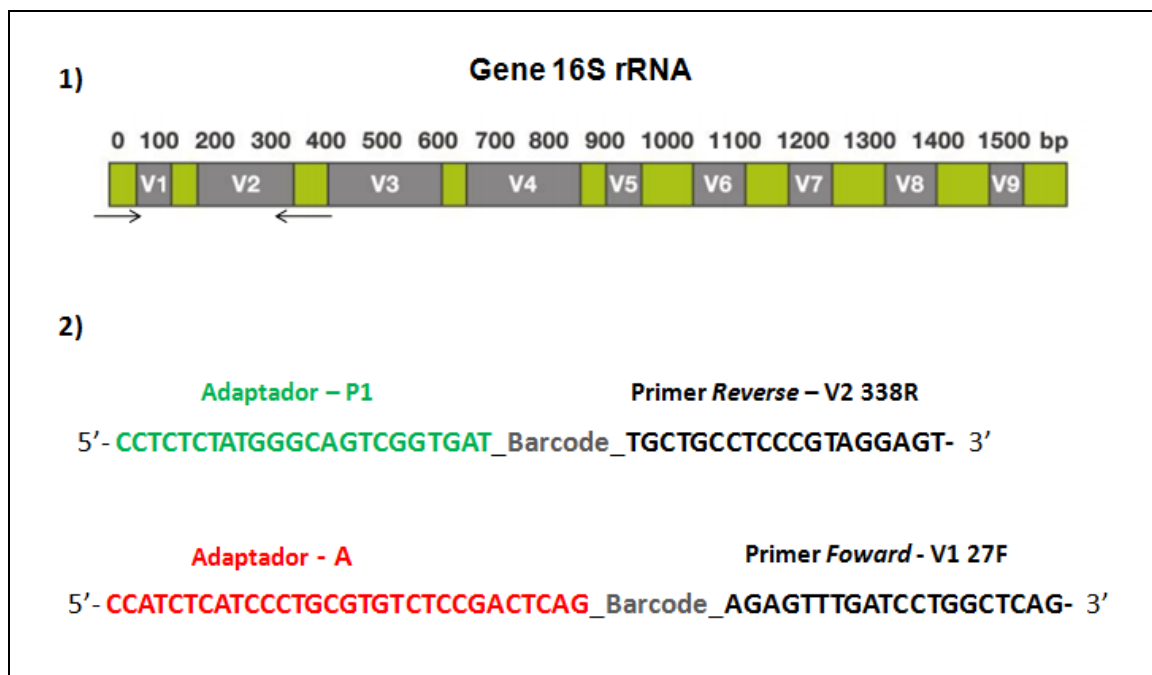
#### 4.3.1 Extração de DNA microbiano total

Para a extração do DNA dos microrganismos associados aos polens corbicular e de pote e alimento larval, aproximadamente 0,4 g de cada amostra foi ressuscitado em 1 mL de tampão TEN (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1% tritonX-100 pH 8.0) e homogeneizado em vórtex por 3 minutos. As amostras foram então centrifugadas por 15 segundos em baixa velocidade (2500 g) e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5mL e centrifugado a 12.000 g, 4 °C por 20 minutos para a sedimentação das células bacterianas. A amostra foi submetida a quatro ciclos de lavagem em tampão TEN para aumentar o desprendimento das células bacterianas do pólen/alimento larval, de acordo com o proposto por Corby-Harris et al. (2014) e Anderson et al. (2014). Ao *pellet* celular obtido foram adicionados 350 uL de *beads* de vidro (Glass beads 0.5mm – cat# 11079.105) e TEN recuperado das lavagens e submetido a 20 minutos de vórtex para a lise celular. O sobrenadante dessa etapa foi recuperado em um novo tubo e centrifugado novamente a 12.000 g, 4 °C por 30 minutos, rendendo um *pellet* que foi submetido à extração do DNA pelo *kit Purelink™ Genomic DNA mini kit* (Invitrogen™) conforme protocolo para bactérias gram-positivas (adição de enzima lisozima). A qualidade e quantidade do DNA obtido foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8% e leituras no fluorímetro Qubit 2.0 (*Thermo Fisher™*) respectivamente.

#### 4.3.2. Preparo da biblioteca de *amplicons*

O DNA extraído das amostras foi amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase, a partir de oligonucleotídeos iniciadores de DNA (*primers*) desenhados com base nas sequências de nucleotídeos que compõem as regiões variáveis V1 e V2 do gene bacteriano 16S rRNA (ANDERSON et al., 2014; CORBY-HARRIS et al., 2014) (figura 7). Estes *primers* foram sintetizados de acordo com o método PCR de fusão (*fusion PCR method*), recomendado pelos protocolos do Ion Torrent (*ThermoFisher Scientific*<sup>TM</sup>). O PCR de fusão permite que os *amplicons* gerados possuam sequências adaptadoras “A e P1” necessárias para a reação de sequenciamento no Ion Torrent, além de sequências *barcodes* para a identificação das diferentes amostras. Esses adaptadores estão no terminal 5' adjacentes às sequências-alvo, nos *primers forward* (A) e *reverse* (P1) respectivamente (**Figura 7**). As reações de PCR foram montadas a partir da mistura de DNA total obtido de cada amostra com os *primers* de fusão, dNTPs e os reagentes do kit *Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity-ThermoFisher Scientific*<sup>TM</sup> (enzima 5U/uL, 10X High Fidelity Buffer- 600 mM Tris-SO<sub>4</sub>, pH 8.9, 180 mM NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> e 50 mM MgSO<sub>4</sub>). As condições de ciclagem foram as seguintes: 95 °C por 30 segundos, seguido por 28 ciclos de 94 °C por 15s, 61 °C por 15s e 68 °C por 30s, e extensão final a 68 °C por 5 minutos. Os fragmentos de DNA amplificados, esperados na faixa de 400pb, foram visualizados em gel de agarose a 1,0%.





**Figura 7. Primers para a amplificação parcial do gene 16S rRNA bacteriano desenhados para sequenciamento em plataforma Ion torrent. (1)** Esquema do gene 16S rRNA, onde as regiões conservadas estão em verdes e as variáveis em cinza. As setas indicam a região de anelamento dos *primers* utilizados no preparo da biblioteca de *amplicons*. **(2)** Par de *primers forward* e *reverse*, indicando as posições e seqüências dos adaptadores e regiões-alvo de anelamento.

#### 4.3.3. Purificação e quantificação das bibliotecas de *amplicons*

Os *amplicons* foram purificados dos resíduos da reação da PCR por meio do kit *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter™), o qual utiliza *beads* magnéticas para a purificação do DNA de interesse. As bibliotecas de *amplicons* purificadas foram quantificadas por fluorimetria no equipamento Qubit 2.0 (Thermo Fisher™) seguindo as recomendações do fabricante. Ao total 33 bibliotecas foram preparadas: 10 de PPA, 10 de PPF, 10 de AL e 3 de PC. Após quantificação, as diferentes bibliotecas foram misturadas (*pool*) em quantidades equimolares para o sequenciamento.

#### 4.3.4. Sequenciamento na plataforma *Ion Torrent PGM*

O sequenciamento na plataforma *Ion Torrent PGM* e toda preparação amostral que antecede o mesmo, foram feitos de acordo com os protocolos e recomendações do fabricante (*Ion torrent- ThermoFisher Scientific*). Em síntese, o *pool* de bibliotecas combinadas (denominada *template*) é amplificado pelo método da PCR em emulsão (amplificação clonal),

o qual se baseia em um sistema formado por milhões de micro reatores em uma emulsão de óleo. Esses reatores contém todos os reagentes necessários para uma reação de PCR e pequenas esferas (*IonSheres™*) cobertas com a sequência complementar ao adaptador “A”- presente no primer fusion- , o qual servirá para fixação da sequência de interesse, enquanto o adaptador P1 servirá de iniciador para a reação da PCR. Após a amplificação clonal, há uma etapa de enriquecimento, para eliminação de esferas vazias sem fragmentos amplificados, no instrumento *Ion OneTouch (Ion Torrent™/ ThermoFisher)*. O *template* enriquecido é então submetido a uma corrida no sequenciador *Ion torrent (Ion PGM™ System, ThermoFisher)*, seguindo os parâmetros recomendados pelo fabricante.

#### **4.3.5. Análises de bioinformática**

As análises de bioinformática foram realizadas em colaboração com a Dra. Tainá

Raiol, pesquisadora da FIOCRUZ, unidade Brasília, Brasil. As sequências foram avaliadas por qualidade e presença de adaptadores por meio do programa FastQC v0.11.2 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e sequências com tamanho inferior a 100 pb e média de valores de qualidade PHRED <20 foram removidas com uso do programa PRINSEQ. Scripts na linguagem de programação Perl foram desenvolvidos para a separação das sequências por amostra e remoção de barcodes. A identificação destes foi feita por *matches* exatos entre cada sequência analisada e as sequências de ambos os *barcodes*. A análise de diversidade foi realizada utilizando o programa QIIME v1.8 - Quantitative Insights Into Microbial Ecology (CAPORASO et al., 2010). As sequências que atenderam aos critérios de classificação e qualidade foram alinhadas contra as sequências disponíveis no banco de dados Greengenes pelo método PyNAST (CAPORASO et al., 2009). As sequências válidas foram classificadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) assumindo-se 97% como valor limite de similaridade pelo método UCLUST. Curvas de rarefação foram geradas para avaliação da riqueza de espécies por meio de amostragens de igual tamanho de cada amostra e verificação do aumento no número de UTOs únicas por condição experimental. Os dados obtidos foram submetidos à análise de diversidade alfa pelos índices de Shannon e Chao1. Além disso, medidas de diversidade beta foram calculadas usando a técnica de jackknife, que consiste na reamostragem de um subconjunto de dados de profundidade referente a 75% da menor amostra, sendo produzidas 10 reamostragens (repetições) para cada amostra. As matrizes de distância para cada conjunto de dados foram calculadas com o método UniFrac com peso (weighted-UniFrac) e sem peso (unweighted-UniFrac), sendo em

seguida utilizadas como base para o agrupamento hierárquico com UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) e componentes de PCoA (*Principal Coordinates Analysis*), para avaliar o grau de variação entre as repetições e diferentes tipos de amostra, exibida por elipses de confiança. Empregou-se o teste T para verificar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Para esta análise, as amostras foram agrupadas por condição, alimento larval, pote aberto, pote fechado e corbicular. O pacote phyloseq do R (McMurdie & Holmes, 2013) foi utilizado para as análises complementares em diferentes níveis taxonômicos e representação gráfica dos resultados obtidos.

#### **4.4. Cultivo bacteriano dos pólenes de pote e do alimento larval**

Para acessar a fração cultivável da microbiota do pólen e do alimento larval de colônias de *Melipona seminigra*, realizou-se o cultivo bacteriano do pólen obtido de potes abertos e fechados e do alimento larval obtidos de seis colônias. O pólen corbicular não foi incluído nesses procedimentos, por ser obtido em pequenas quantidades. Anteriormente ao cultivo das amostras, realizou-se um estudo piloto para padronização das seguintes condições de cultivo: (1) proporção pólen/volume do veículo (salina 0,9% NaCl m/v), (2) número de diluições seriadas a serem adotadas e (3) temperatura de incubação. Os resultados dos ensaios pilotos não estão apresentados na tese, mas serviram como direcionamento para as condições de cultivo aqui adotadas, descritas a seguir.

##### **4.4.1. Preparo das diluições seriadas e plaqueamento**

De cada colônia (N=6) utilizou-se um grama (1 g) do material homogeneizado de cada condição (pólen de pote aberto/ pólen de pote fechado/ alimento larval), o que gerou um total de 18 amostras. Cada 1 g de amostra foi ressuspenso em 10 mL de solução salina estéril (0.9% NaCl m/v) e homogeneizado em vórtex por dois minutos (**Figura 8**). A partir da solução-mãe obtida, diluições seriadas foram feitas até a ordem de  $10^{-5}$ , das quais 100  $\mu$ L foram semeados pela técnica de *spread plate* em placas de petri contendo os meios de cultura de uso geral Ágar TSA (*Tryptone soy Agar*), Ágar BHI (*Brain Heart Infusion*), Ágar Nutriente com concentração reduzida a 50% e o meio de cultura Ágar MRS (*Man Rogosa Sharpe*), seletivo para *Lactobacillus* sp. As fórmulas dos meios de cultura utilizados estão descritas no apêndice C. As placas de petri de 20 cm de diâmetro (288 unidades) foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C e foram monitoradas em intervalos de 24h para observação do crescimento bacteriano.

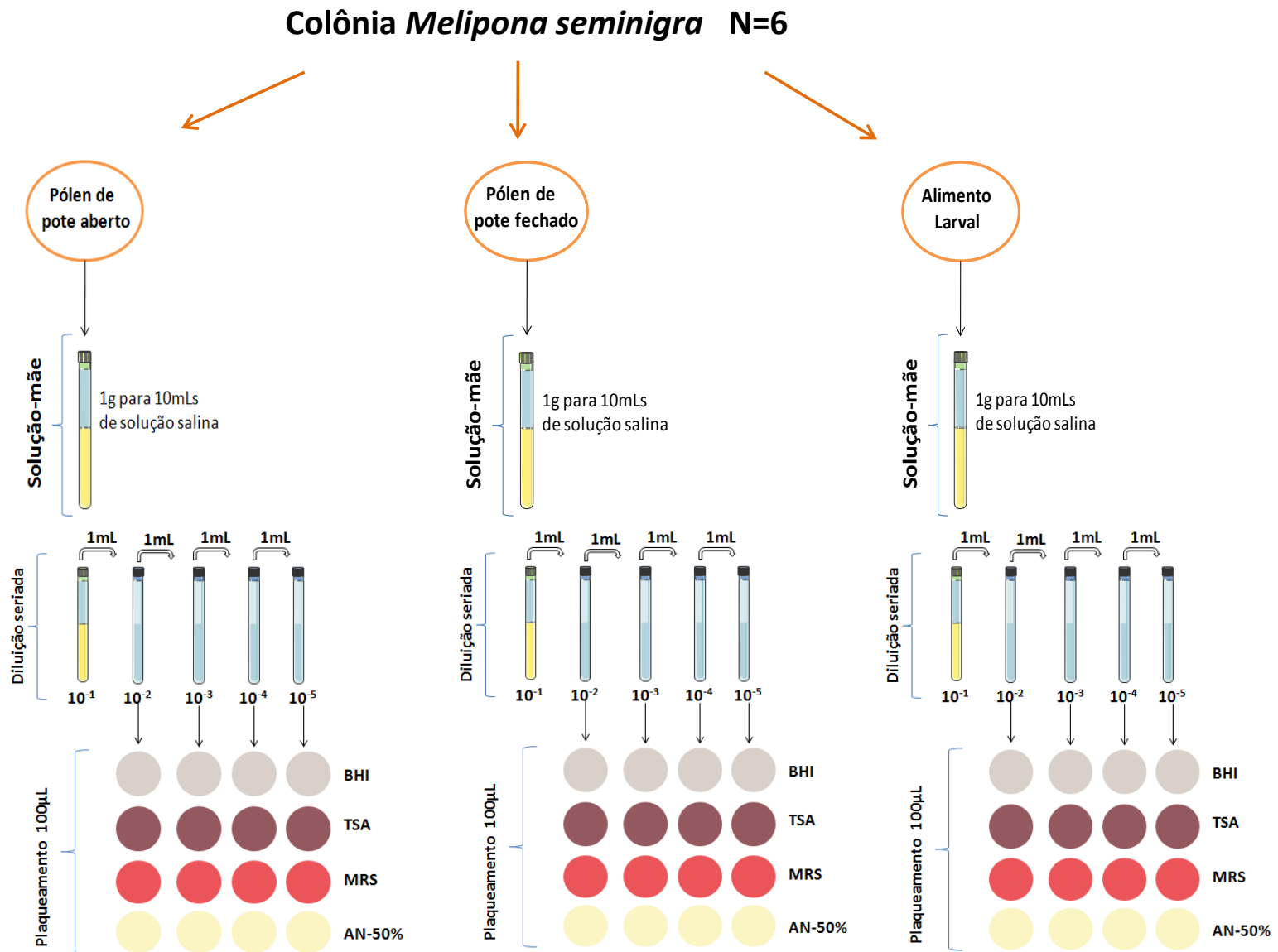


Figura 8. Representação da metodologia utilizada para o cultivo bacteriano do pólen e alimento larval de seis colônias de *Melipona seminigra* mantidas no meliponário GPA-INPA, Manaus-AM.

#### **4.4.2. Medição da temperatura e pH**

A temperatura das amostras de pólen e alimento larval foram medidas por meio de Termo-higrômetro digital com sensor duplo (Incoterm<sup>®</sup>). A aferição do pH foi realizada por meio da inserção de eletrodo nas soluções-mãe das diluições seriadas (item 3.3.2), com pHmetro modelo PHS-3D – pH meter, Sanxin.

#### **4.4.3. Contagem de bactérias**

Transcorrido o tempo de incubação das culturas bacterianas (de 48 a 72 horas por placa), 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), considerando o intervalo de 15 a 150 UFC como os limites de precisão e repetibilidade. Seguiu-se a seguinte fórmula para os cálculos: “[UFC/g] = UFC observadas x fator de diluição da placa x fator de correção do volume plaqueado (mL) (fator=10)”, sendo o resultado expresso em potência de 10. Como critério de contagem, adotou-se a média das duas menores diluições de placas contendo o meio BHI ágar ou, em caso de valores abaixo dos limites de precisão, adotou-se a contagem da menor diluição de placa BHI. Em raras exceções, por ausência de crescimento em placas BHI, adotou-se a placa de menor diluição de meio TSA. O meio BHI foi escolhido para contagem por ter apresentado o melhor crescimento bacteriano entre as colônias.

#### **4.4.4. Isolamento de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)**

Os clones bacterianos morfológicamente distintos de cada placa cultivada foram selecionados e subcultivados para a obtenção de clones isolados. O isolamento foi realizado por meio de estrias compostas e /ou de esgotamento do clone em placas de petri contendo o mesmo meio de cultura de onde o clone foi originalmente obtido. As placas foram incubadas de 24 a 72 horas a 30 °C. Após o isolamento, confirmado por coloração de Gram, os repiques de rotina passaram a ser realizados em meio de cultura Luria Bertani (LB). Os isolados foram também analisados a olho nu para documentação das suas características morfológicas tais como: borda, diâmetro, brilho, elevação e superfície, textura e cromogênese.

#### **4.4.5. Preservação das bactérias**

Os isolados bacterianos obtidos foram submetidos a séries de preservação em meio soft (meio LB com Agar reduzido em 50%), em tubo inclinado (meio LB Agar em tubo falcon

de 15 mL) e criopreservados em freezer à -80 °C, em solução de meio LB com glicerol diluído a 25%.

#### **4.4.6. Extração de DNA genômico bacteriano**

Para extração de DNA genômico, os isolados bacterianos foram inoculados em 5 mL de meio LB líquido e mantidos em incubadora com agitação à 30 °C e 150 rpm. Após a turbidez do meio, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 12.000 g por 2 minutos e os *pellets* celulares obtidos foram submetidos à extração de DNA pelo método Fenol-clorofórmio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), com a adição de enzima Lisozima para a lise da parede de bactérias Gram-positivas. A qualidade e quantidade do DNA obtido foram analisadas respectivamente por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % e por espectrofotometria (*Bio Spectrometer*, Eppendorf).

#### **4.4.7. Reação de amplificação do gene codificador do 16S rRNA**

O gene codificador da subunidade menor do cistron ribossômico (16S rRNA) do DNA extraído dos isolados bacterianos foi amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a partir dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) **530F** (5'-TGA CTG ACT GAG TGC CAG CMG CCG CGG -3' e **1492R** (5'-TGA CTG ACT GAG AGC TCT ACC TTG TTA CGM YTT-3') recomendados por Borneman e Triplett (1997), os quais amplificam o gene entre as regiões variáveis V3 e V9 e originam fragmentos de aproximadamente 1000 pares de bases. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos de 95 °C por 60s, 59 °C por 40s e 72 °C por 90s, e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os reagentes e suas respectivas concentrações na reação estão descritos na **Tabela 2**. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose a 0,8% e em seguida purificados com o kit Agencourt Ampure XP (beckman Coulter™) de acordo com as recomendações do fabricante.

**Tabela 2. Volume e concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR.**

Reagentes/ concentração inicial	Quantidade na reação	Concentração final
Taq DNA polimerase - Platinum® 5U/ $\mu$ L	0,15 $\mu$ L	1U/reação
Tampão 10X	2,5 $\mu$ L	1X
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1.0 $\mu$ L	2,0 mM
mix dNTPs 5,0mM	0,5 $\mu$ L	0,1 mM de cada
Primer <b>530F</b> 5 $\mu$ M	0,5 $\mu$ L	0,1 $\mu$ M
Primer <b>1492R</b> 5 $\mu$ M	0,5 $\mu$ L	0,1 $\mu$ M
DNA bacteriano 10ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L	0,4 ng/ $\mu$ L
Água	18.85 $\mu$ L	Para completar volume final
	<b>25<math>\mu</math>L</b>	

#### 4.4.8. Sequenciamento automático de nucleotídeos

O DNA purificado foi utilizado para o sequenciamento de DNA pelo método de Terminação de cadeia (SANGER et al., 1977), utilizando o kit BigDye Terminator v3.1. As sequencias foram determinadas em plataforma *Applied Biosystems® 3500 e 3500xL Genetic Analyzers (Life Technologies)*, seguindo as recomendações do equipamento.

#### 4.4.9. Análises de bioinformática

As sequências obtidas foram analisadas e processadas por meio de ferramentas disponíveis no programa *CLC main workbench 7.6.4. (QIAGEN™)*. As sequências foram avaliadas quanto à qualidade das bases (*trimming*) e em seguida o consenso das sequências 5'-3' de cada isolado bacteriano foi montado, a partir do alinhamento das sequências obtidas pelos primers *foward* e *reverse* no sequenciamento. O alinhamento comparativo das sequências consenso foi realizado contra o banco de dados de nucleotídeos *GenBank* por meio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Searching Tool) do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* e paralelamente as sequências foram também comparadas com o banco de dados do “Ribossomal Database Project” (RDP) para a classificação taxonômica.

#### 4.5. Ensaios enzimáticos

Cento e treze isolados bacterianos (obtidos pelo item 4.4.4.) foram avaliados quanto ao potencial de produção das seguintes classes de enzimas hidrolíticas: proteases, amilases,

celulases e lipases. Anteriormente ao início dos ensaios de atividade, os isolados bacterianos foram repicados, para ativação, em meio LB ágar e incubados a 30 °C até o aparecimento de massa celular. Cada ensaio enzimático foi realizado em triplicata, para cada isolado bacteriano, sendo a bactéria avaliada quanto à produção da enzima (positivo) ou não produção da enzima (negativo). O resultado final foi tomado como àquele que apareceu em pelo menos duas repetições do ensaio. Do total de cento e treze bactérias, dezenove foram isoladas do cultivo de amostras de alimento larval e noventa e quatro bactérias foram originadas do cultivo de pólen armazenado em potes abertos e fechados dentro das colônias.

#### **4.5.1. Amilases**

A atividade amilolítica foi verificada por meio do crescimento dos isolados bacterianos em placas de petri contendo meio LB ágar, reduzido em 1/4 dos seus componentes e suplementado com amido de milho 1%, pH 7.0. As placas foram incubadas a 30 °C por 48h e a atividade enzimática foi 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).

#### **4.5.2. Celulases (endoglucanases)**

A produção de enzimas celulases da classe endoglucanases foi avaliada a partir do crescimento dos isolados bacterianos em placas de petri contendo meio LB ágar reduzido em 1/6 dos seus componentes e suplementado com carboximetilcelulose a 1% (CMC, sigma<sup>TM</sup>), pH 7.0 (modificado de GHOSE, 1987). As placas foram incubadas a 30 °C por sete dias. A atividade enzimática foi verificada pela formação de halos de degradação do polímero, os quais foram revelados a partir da incubação das placas em solução Vermelho Congo 0,1%, pH 8,0, por 30 minutos e posterior lavagem em solução de NaCl 0,5 M por 5 minutos (TEATHER; WOOD, 1982).

#### **4.5.3. Lipases**

A produção de enzimas lipases foi verificada por meio do crescimento dos isolados bacterianos em placas de petri contendo meio de cultura a base de azeite de oliva comercial (marca Gallo) (3g/L Peptona, 2g/L extrato de levedura, 2g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2g/L CaCl<sub>2</sub>, 1g/L MgSO<sub>4</sub>, 10g/L Tween 80, 20g/L Azeite de oliva, 0,002g/L rodamina B e 18g/L ágar, pH 8-8,5) (modificado de KOUKER; JAEGER, 1987). As placas foram incubadas a 30 °C por sete



dias. A atividade enzimática foi verificada pela formação de halos de degradação do polímero, os quais podem ser visualizados a olho nu pelo contraste gerado entre o halo e o corante rosa rodamina B (KOUKER; JAEGER, 1987).

#### **4.5.4. Proteases**

A avaliação da produção de proteases pelos isolados bacterianos foi feita a partir do crescimento dos mesmos em placas de petri contendo meio de cultura à base de leite em pó 0.2% (marca Molico) e gelatina 0.1% como fontes proteicas (Extrato de levedura 2g/L, gelatina 1 g/L, Leite molico 2 g/L e ágar 15 g/L, pH 7.0) (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). As placas foram incubadas a 30°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 do clone.

#### **4.5.5. Determinação semi-quantitativa da atividade enzimática**

A atividade enzimática dos isolados bacterianos selecionados como positivos pelo método qualitativo foi determinada pelo método de Hankin e Anagnostakis (1975), por meio da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação (dh) e o diâmetro médio da colônia bacteriana (dc), expresso como Índice Enzimático (I.E= dh/dc) (LEALEM; GASHE, 1994). Os diâmetros dos halos e das colônias foram medidos com auxílio de um paquímetro, em milímetros (mm). As bactérias que apresentaram um I.E maior que 2,0 foram consideradas potencialmente úteis para aplicações biotecnológicas (LEALEN; GASHE, 1994; FLORENCIO et al., 2012).

#### **4.5.6. Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas no programa BioEstat® *for Windows* versão 5.0. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Lilliefors. Para testar diferenças significativas na produção enzimática dos isolados bacterianos, realizou-se uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Além disso, realizou-se o teste T de Student para verificar se o tipo de provisão alimentar (pólen armazenado em potes ou alimento larval) afeta a produção enzimática da microbiota associada. Em todos os testes foi considerado o nível de significância 0,05 ( $\alpha=0,05$ ).

#### **4.6. Análise da microbiota intestinal**

A composição bacteriana do intestino da abelha *Melipona seminigra* foi explorada por meio da técnica da clonagem molecular. Para tal, foram utilizadas amostras de intestino de abelhas coletadas no meliponário urbano do GPA-INPA e no meliponário de área agroflorestal do ramal do Brasileirinho, a fim de se ter uma melhor amostragem da comunidade bacteriana intestinal da espécie e verificar se a mesma varia em função do ambiente. No total, foram utilizados cinco *pools* de cada parte do intestino (anterior, médio e posterior para cada localidade, somando um total de trinta amostras, como representado na **Figura 6**. A maioria dos procedimentos aqui descritos foi realizada na Universidade de Hohenheim, Stuttgart, Alemanha, sob a supervisão do prof. Dr. Martin Hasselmann, no contexto do meu doutorado sanduíche.

##### **4.6.1. Dissecção dos intestinos e extração do DNA genômico total**

A dissecção dos intestinos foi realizada pela profa. Dra Maria do Carmo Fialho, no laboratório de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas. Abelhas de localidades diferentes foram dissecadas em dias diferentes, para evitar contaminação cruzada entre as localidades. As abelhas foram lavadas em álcool 70% e dissecadas com kit de dissecção entomológica, cujos instrumentos foram inicialmente esterilizados em luz U.V e depois, a cada troca de amostra, em álcool 70%. O intestino obtido de cada abelha foi hidratado em solução tampão PBS e dividido nas três partes morfofuncionais: intestino anterior ou papo de mel, intestino médio e intestino posterior e posteriormente agrupados por parte para cada colônia (**Figura 6**). Cada *pool* de intestino foi submetido à extração de DNA utilizando o kit *Genomic DNA from soil NucleoSpin*<sup>®</sup> (Macherey-Nagel). A qualidade do DNA obtido foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

##### **4.6.2. Reação de amplificação do gene codificador do 16S rRNA e clonagem dos amplicons em vetor pGEM-T**

O DNA extraído das amostras foi amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a partir de oligonucleotídeos iniciadores de DNA (*primers*) desenhados com base nas sequências de nucleotídeos que compõem as regiões variáveis V1 e V9 do gene bacteriano 16S rRNA (27F-5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'; 1492R-5'-TACCTTGTTAYGYCTT-3') e que geram fragmentos de aproximadamente 1500 pares de bases (**Tabela 3**). As

condições de ciclagem foram as seguintes: 95 °C por 2 minutos seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 52 °C por 30 segundos, 60 segundos a 72 °C e extensão final a 72 °C por 4 minutos. Os produtos obtidos da PCR foram purificados com O kit MiniElute™ PCR purification (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante, e em seguida utilizados para a reação de ligação em vetor plasmidial pGEM-T (pGEM®-T Vector System I-Promega). O produto dessa reação de ligação foi utilizado para a transformação de bactérias tipo competentes *E.coli* JM109, as quais foram plaqueadas em meio LB ágar contendo antibiótico ampicilina (100 ug/ml), IPTG (80 ug/ml) e X-Gal (80 ug/ml). As placas foram incubadas a 37 °C por aproximadamente vinte horas.

**Tabela 3. Volume e concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR do DNA intestinal.**

Reagentes/ concentração inicial	Quantidade na reação	Concentração final
Dream Taq DNA polimerase ( 5U/μL)	0,25 μL	1,25U/reação
Tampão 10X	5,0 μL	1X
mix dNTPs 2,0mM	5,0 μL	0,2 mM de cada
Primer 27F 10μM	2,5 μL	0,5 μM
Primer 1492R 10μM	2,5 μL	0,5 μM
DNA bacteriano	2μL	*
Água	32.75	Para completar a reação
	<b>50μL</b>	

#### 4.6.3. Seleção de clones recombinantes e extração plasmidial

Após a incubação das placas, os clones bacterianos foram monitorados quanto à incorporação ou não dos plasmídeos recombinantes por meio da técnica de PCR, com a utilização dos *primers* M13 *Forward* e M13 *Reverse*, que se ligam em sítios flanqueadores do inserto recombinante no plasmídeo pGEM-T. As colônias recombinantes foram submetidas ao isolamento plasmidial pelo kit *PeqGold Plasmid miniprep Kit I* (VWR®). Foram selecionados dez clones recombinantes de cada amostra para envio ao sequenciamento, somando um total de 300 plasmídeos.

#### **4.6.4. Sequenciamento automático de nucleotídeos e bioinformática**

Os plasmídeos recombinantes selecionados foram enviados para a empresa *Eurofins Genomics* (Ebersberg, Alemanha), para sequenciamento pelo método de Terminação de cadeia (SANGER et al., 1977). As sequências obtidas foram analisadas e processadas por meio de ferramentas disponíveis no programa *CLC main workbench 7.6.4*. (QIAGEN™). As sequências foram avaliadas quanto à qualidade das bases e as sequências plasmidiais foram removidas (*trimming*), bem como excluídas as sequências correspondentes à DNA de origem vegetal (cloroplastos). Em seguida, o consenso das sequências 5'-3' foi montado, a partir do alinhamento das sequências obtidas pelos primers *forward* e *reverse* no sequenciamento. O alinhamento comparativo das sequências consenso foi realizado contra o banco de dados de nucleotídeos *GenBank* por meio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Searching Tool) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e paralelamente as sequências foram também comparadas com o banco de dados do “Ribossomal Database Project” (RDP) para a classificação taxonômica.

#### **4.6.5. Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas em colaboração com o prof. Dr. Fabrício Baccaro, do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Amazonas. Para se analisar o efeito de (1) diferentes meliponários e (2) e das partes morfofuncionais do intestino na composição bacteriana intestinal foram realizadas análises de variância permutativa multivariada (np-MANOVA), com base nas distâncias de Bray-Curtis. A heterogeneidade das comunidades bacterianas das partes morfofuncionais do intestino foi analisada por meio da análise de homogeneidade das dispersões multivariadas (PERMDISP). As diferenças significativas foram calculadas por meio do teste Tukey's Honest. As probabilidades estatísticas de np-MANOVA e PERMDISC foram baseadas em 999 permutações para cada teste. Diagramas de Venn foram construídos no programa R 3.4.0 (R Core Team 2017) para visualização gráfica do número de táxons compartilhados entre as partes intestinais.

## ARTIGO 1

### **Comunidades bacterianas associadas às provisões de pólen da abelha amazônica sem ferrão *Melipona seminigra***

---

Nacif-Marçal, Lorena et al. *Bacterial communities associated to pollen provisions of the amazonian stingless bee *Melipona seminigra**. Manuscrito preparado de acordo com as normas da revista PLoS ONE.

## Introduction

Stingless bees from Amazon forest and their perennial nests are an interesting example of how life cannot take a break in the biggest tropical forest of the world. In Amazon, bees have to deal with different challenges for keeping their colony alive, healthy and protected from pathogens. The Amazon region concentrates hundreds of native species of eusocial bees that are grouped in the Meliponini tribe (Meliponini: Apinae: Apidae: Apoidea: Hymenoptera) [1]. These bees are named “stingless bees” due the absence of a functional sting and among them the *Melipona* genus stands out by its great diversity in the Amazon basin and its important ecological roles in this biome [2].

The diet of *Melipona* bees is entirely based on processing nectar and pollen collected from plants. These resources are stored inside their nests/hives where the nectar is matured in honey, a primary source of carbohydrates, and the pollen is processed as well. Pollen is the main source of proteins and lipids being rich in other macro and micronutrients [3,4]. Even though the floral pollen provides virtually all the nutrients necessary for the development and maintenance of the colony, the maturation of pollen inside the nests seems to be necessary for bee feeding and colony homeostasis [5,6]. Many hypotheses explain the need for storage and maturation of floral pollen, such as the resistance of the pollen cell wall to digestion and the convenience of mixing and accumulating pollen grains of different origins in order to obtain greater nutritional diversity [7–9]. The seasonality of pollen resources is also an important factor for long-term storage [10].

The pollen maturation is linked to metabolic activity of microorganisms that live in symbiosis with bees [5,7,10–12]. From a functional viewpoint, there has been considerable debate about the roles played by the microorganisms associated to pollen and its effects on bee feeding quality [10–17]. In short, pollen microbiota could be responsible for the cycling, conversion and/or preservation of the pollen nutrients, mainly by means of fermentative processes. These aspects have been recently discussed for honey bees [18] and for the stingless bees, *Scaptotrigona* aff. *depilis* [6] and *Melipona seminigra* (Nacif-Marçal et al. 2017, unpublished).

Although there are many gaps in the knowledge about the roles of microbiota associated to bee pollen, for stingless bees it is primarily important to consider the paucity of data related to the microbial composition of food provisions, nest niches or even the individuals. For honey bees this topic has been extensively explored in the last years,

revealing the main bacterial groups associated to pollen (bee bread) [12,19–21] and bee gut reviewed by Kwong et al.: [22]. Despite the fact that stingless bees share many similarities with honey bees (*Apis mellifera*), they comprise a diverse group with many particularities in its geographical distribution, cycle of life and biological aspects [23,24]. However one of the most striking features of *Melipona* bees is their complex interactions with their habitat: they have co-evolved in a tropical biodiversity-rich environment, achieving strategies to allocate resources and keep it away from harmful opportunistic forms [2]; *Meliponas* should rely on a resilient symbiotic microbiota that ensures the maintenance of food quality inside the nests while also benefiting from this shelter and rich food stock. From an ecological scale, the microbiota of nests may also act as an interface bee-plants [25,26]: nests' microbiota can harbor a subtle trait of the co-evolution of amazonian plants and its pollinators.

In this study, we aimed to explore and to identify the bacterial microbiota associated to pollen provisions of the stingless bee *Melipona seminigra* Friese, H (1903) [1], a specie representative from the *Melipona* genus. We combined two approaches - culturing and non-culturing NGS methods- to characterize the bacterial microbiota in four stages of the pollen's route inside the nest: (1) first contact with bees – corbicular pollen, (2) during accumulation in pots - stored pollen in open pots, (3) fermentative process- stored pollen in closed pots and finally (4) after maturation, composing the larval food, a mixture of pollen, honey, royal jelly and salivary secretions; This study was hypothesis-driven that there is a microbial succession in pollen maturation.

## **Material and Methods**

### **Pollen and larval food sampling**

Pollen and larval food were collected from colonies of *Melipona seminigra* bees established in the urban meliponary of the Research Group on Bees (Grupo de Pesquisas em Abelhas- GPA) in the National Institute of Amazonian Research (INPA) (Manaus-AM, Brazil, 03 05 '50.91 "S, 59.59' 06.32" W). The meliponary has 28 nests of *Melipona seminigra* arranged side by side in an area of 12.25 x 7.4 meters. There are two forest fragments around the meliponary which serve as foraging area for the bees. Corbicular pollen (CP) was manually collected at the entrance of each nest by the interception of bees coming from the foraging. The pollen stored in the cerumen pots was collected from two conditions: a) open pot with half of the volume filled with pollen (stored pollen in open pot **SPO**) and b) closed pot (stored pollen in closed pot – **SPC**). Pollen was sampled from the pot using a

sterile precut 1mL-pipette tip, which collected pollen from the top to the bottom of the pot. For larval food (LF) collection, the entire brood discs were removed from each nest and its cells were opened in a laminar flow hood. The larval food (composed of pollen, nectar and bee secretions) was aspirated from the cells using an automatic pipette, but first the eggs were removed (all brood cells contained eggs). Sampling of pollen and larval food was based on the collection of approximately three grams of each type of material per colony/nest, and a total of 10 nests were sampled (n=10), except for the corbicular pollen that was composed by the material of three nests, because of the difficulty of obtaining large masses of it. Corbicular pollen was used only for next generation sequencing experiments and enough material was collected from 3 nests (n=3). The collections were carried out during the rainy season (between December 2014 and January 2015). Corbicular pollen collection was extended from January 2015 to August 2015. Since all the samples contain pollen as the main constituent, they were collectively called as pollen provisions along the text.

### **DNA extraction and amplicon sequencing**

The samples collected from different colonies were processed separately. About 0,4 grams of each type of material per colony were used for DNA extractions, a total of 33 samples (CP- 3 samples, SPO - 10 samples, SPC-10 samples and LF-10 samples). We followed the extraction methods proposed by [18] and [21], but using PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (ThermoFisher) following the protocol for gram-positive bacteria. Partial 16S rRNA gene sequences were PCR amplified from the bacterial communities using a Taq DNA Polymerase High Fidelity™ (ThermoFisher) and universal primers for V1-V2 region fitted with Ion Torrent sequencer adaptors and unique barcodes for samples' identification (Table S1). The PCRs were done in triplicates for each sample. Amplicons libraries were sequenced using Ion Torrent Personal Genome Machine (ThermoFisher) and its recommended protocols.

### **Data analysis**

The sequences were evaluated according to quality and presence of adapters through the program FastQC v0.11.2 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) and sequences with size less than 100bp and mean values of PHRED quality <20 were removed using the PRINSEQ program. Scripts in the Perl programming language were developed for sample separation and removal of barcodes. Microbial diversity analysis was performed using the QIIME v1.8 program [27]. Sequences were aligned against the sequences available in the



Greengenes database by the PyNAST method. The valid sequences were classified in Operational Taxonomic Units (OTUs) assuming 97% as the limit of similarity by the UCLUST method. Rarefaction curves were generated to evaluate the sampling effort. Data were submitted to the analysis of alpha diversity using the indices of Shannon and Chao1. In addition, beta diversity measurements were calculated using the jackknife resampling technique. The distance matrices for each data set were calculated using the UniFrac method (weighted-UniFrac and unweighted-UniFrac), and then it was used as the basis for hierarchical grouping with UPGMA (Unweighted Pair Group with Arithmetic Mean) and Principal Coordinate Analysis (PCoA) of the UniFrac distance matrixes. The T-test was used to verify statistically significant differences between the groups with 95% of confidence. For this analysis, the samples were pooled by condition, i.e., larval food, open pot, closed pot and corbicular. The phyloseq package of R was used for the complementary analyzes and graphical representation of the obtained results. In R program, we removed the OTUs that did not meet the following criterion for graphical representations: (1) being present as at least 3 sequences in at least 10% of the samples, (2) being present with variance higher than 0.00001.

### **Bacterial Culturing and isolation**

We cultured bacteria from samples of six colonies (6 colonies X 3 types of material = 18 samples). About 1g of each sample of SPO, SPC and LF were serially diluted to  $10^{-5}$  in sterile physiological saline (0,9 % w/v NaCl) and 100  $\mu$ L of each dilution were plated on the general-purpose media Brain Heart Infusion (BHI), Tryptic Soy Agar (TSA), and Nutrient Agar reduced in 50 % of its concentration and also in the selective medium Man Rogosa Sharpe (MRS), for Lactobacilli. Samples consisted of 288 total plates (18 samples X 4 media X 4 dilution factors). All the plates were incubated aerobically at 30 °C until visible growth was detected. To obtain pure isolates, bacterial colonies were picked up from the agar plates and re-cultivated in a new plate containing the same medium from the original plate (mother plate). We selected the colonies based on morphological differences (colony size, shape and color) and all the morphotypes of a single plate were subcultivated. Isolation was confirmed by Gram staining and the bacteria were stocked in Luria Bertani (LB) agar containing 15% (v/v) glycerol at -80 °C. We estimated the number of bacterial CFUs per gram of pollen and larval food according to standard protocols of the Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA, BRAZIL). We used the first dilution of the samples (mother solution) to

measure the pH of samples (PHS-2D, Saxin®). Values of pH of SPO, SPC and LF were compared by means of ANOVA followed by Tukey Test, at 95% of significance.

### **DNA extraction, PCR and Sanger Sequencing**

DNA was extracted from all the bacterial isolates using Phenol/Chloroform method [28]. The 16S rRNA gene was amplified by PCR using universal primers 530F (5'-TGA CTG ACT GAG TGC CAG CMG CCG CGG -3' e 1492R (5'-TGA CTG ACT GAG AGC TCT ACC TTG TTA CGM YTT-3') [29], which amplifies approximately 1000 pb of the gene (V3-V9 region). We used the following cycling procedures: initial denaturation of 94 °C for 60 s, 30 cycles of a 59 °C annealing temperature and 30 cycles of 94 °C for 60 s, 59 °C for 40 s, 72 °C for 90 s and one cycle of 72 °C for 5 min. PCR products were sequenced bidirectionally using an Applied Biosystems 35000 Genetic Analyzer (ThermoFisher).

### **Taxonomy of the bacterial isolates**

The Sanger sequences were processed with the use of CLC main workbench program 7.6.4. (Qiagen). Low-quality base calls from the start and end of the sequences were trimmed and consensus sequences were assembled from the two complimentary sequences derived from each bacterium. Taxonomic assignments of the consensus sequences were performed in two ways: (1) using BLASTn tool [30], against NCBI nucleotide database (accessed on January, 2017) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and (2) using Ribosomal Database Project (RDP) classifier and RDP version 16 training set (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier>) [31,32], with confidence threshold value of 80%. The results were manually checked, compared and the sequences were assigned to the genus level based on the criteria of  $\geq 95\%$  of identity.

## **Results**

### *Ion Torrent Sequencing summary*

A total of 4,397,561 reads were generated across the four sample types (CP- 3 libraries, SPO- 10 libraries, SPC- 10 libraries, LF- 10 libraries) and 1,346,085 reads remained after the quality and both barcodes trimming (Table 1). A total of 7735 Operational Taxonomic Units (OTUs) were resolved across the 33 libraries at the 97% level of similarity (Table 1). A large part of the OTUs were mitochondrial or chloroplast in origin (cpDNA) and this contamination reduced the number of available OTUs for bacterial taxonomic analysis. Individual libraries of the same type of material originated from different colonies were

pooled for rarefaction and other analyses. Rarefaction analysis indicated that the bacterial diversity of the samples were near completely sampled (Fig.S1).

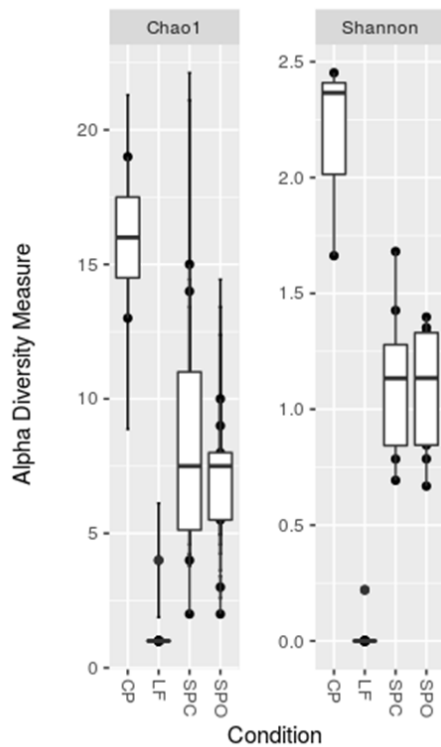
**Table 1.** Ion torrent sequencing summary

<b>Sample type</b>	<b>Total libraries*</b>	<b>Reads after trimming</b>	<b>Total OTUs</b>	<b>OTUs assigned to bacteria domain</b>
corbicular pollen	3	65316	944	248
stored pollen - open pots	10	440121	4761	113
stored pollen - closed pots	10	407355	4215	132
larval food	10	433293	3852	19

\*Each library represents a single colony.

#### *Alpha diversity*

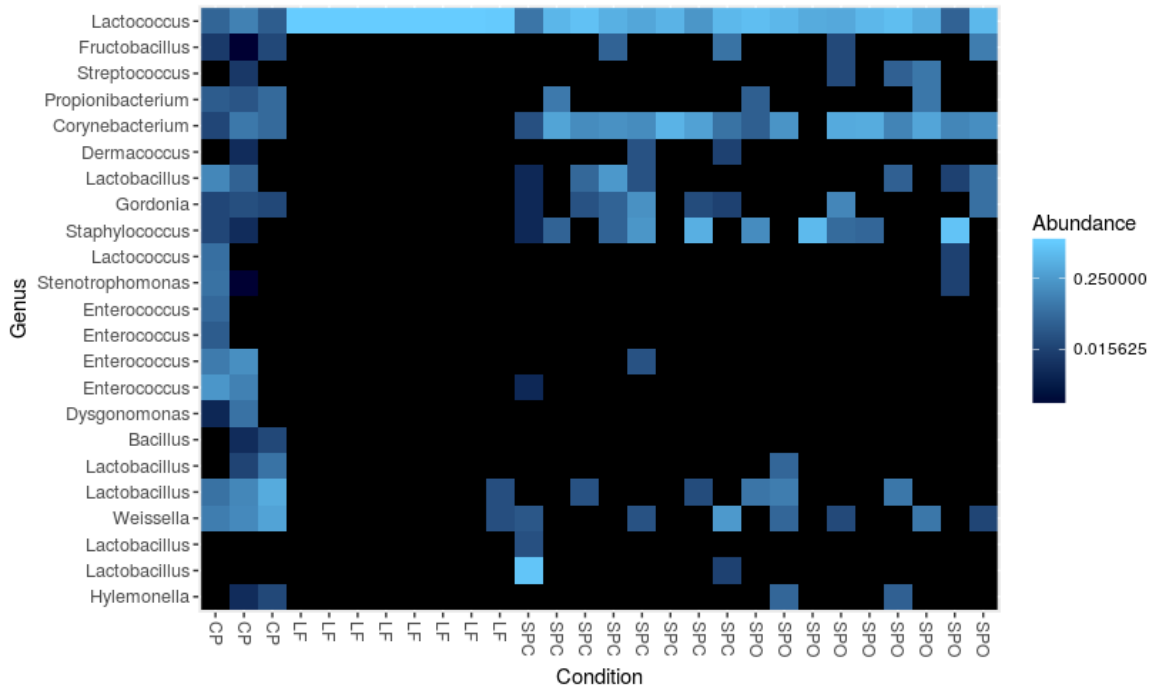
Chao1 estimates of species richness and Shannon index of diversity are shown in Fig.1. Both diversity and richness indexes were higher in corbicular pollen samples, followed by the stored pollen in closed pots (SPC) and stored pollen in open pots (SPO). Within sample type, however, there was high variation in OTU richness and diversity. The Larval food samples showed the lowest richness and diversity.



**Fig. 3. Alpha Diversity indexes for richness (Chao1) and diversity (Shannon).** Boxplot of the samples grouped by condition, as follows: CP = corbicular pollen, LF= larval food, SPC= stored pollen in closed pots, SPO= stored pollen in open pots. The median is a horizontal line within the white box and the outliers are shown as black circles.

A total of 39 OTUs met the criteria to be included in bacterial composition analysis and they were assigned into 15 genera across the samples and in many different OTUs/phylotypes for a same genus' type. The most abundant OTUs are shown for the different samples in fig.2. *Lactococcus* sp. (Streptococaceae; Lactobacillales) was the dominant bacterium of LF samples – being the unique OTU in the most of them, with one exception (Fig.2). It largely explains the low diversity of larval food samples (Fig.1). This *Lactococcus* phylotype was also abundant in the other samples, being the only one present across all the samples (Fig.2). Many of the other common bacteria also come from Lactic Acid Bacteria group (LAB) (Lactobacillales) and they were found in CP, SPO and SPC samples, such as *Lactobacillus*, *Fructobacillus*, *Enterococcus*, *Weissella* and *Streptococcus* (Fig.2). The ubiquitous bacteria *Staphylococcus* (Staphylococcaceae, Bacillales) and *Corynebacterium* (Corynebacteriaceae; Actinomycetales) were especially abundant in SPO and SPC samples. In general, SPO and SPC showed high variation in bacteria abundance along the samples. The CP, which presented the greatest diversity, exhibited representatives of all genera but with slight differences in bacteria abundance along the three samples. Some

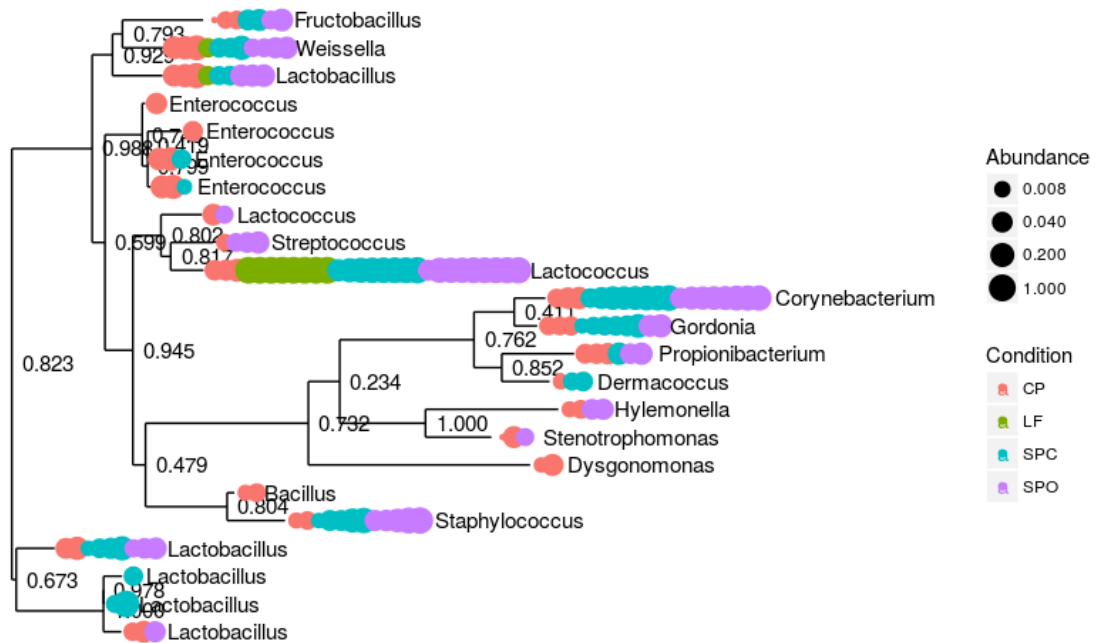
OTUs were detected exclusively in corbicular pollen samples: *Bacillus* spp. (Bacillaceae; Bacillales), *Dysgonomonas* spp. (Porphyromonadaceae; Bacteroidales) and some *Enterococcus* (Enterococcaceae; Lactobacillales) phylotypes (Fig.2).



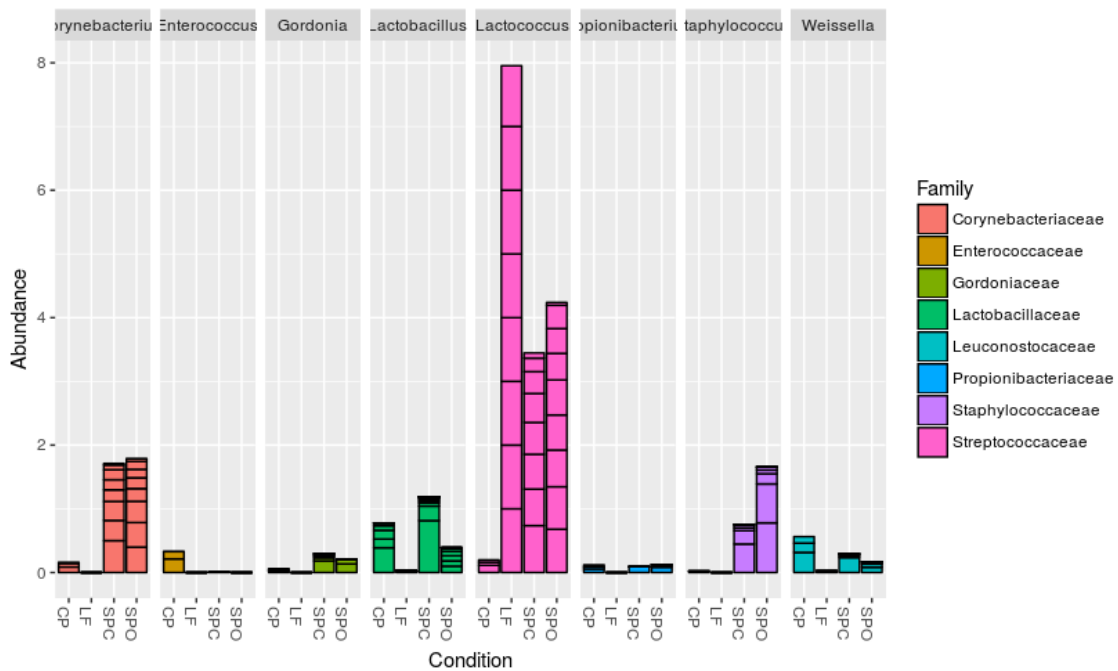
**Fig.2. Heatmap of the 23 most abundant bacterial phylotypes –OTUs- (row) by sample (column).** Relative abundance of the phylotype -at the genus level- in each sample is presented by color as indicated by the scale bar at the right side, with lighter color indicating greater relative abundance. The samples are coded as follows: CP = corbicular pollen, LF= larval food, SPC= stored pollen in closed pots, SPO= stored pollen in open pots).

A better panorama of how bacterial populations fluctuated during pollen collection, storage and maturation inside *M.seminigra* nests is seeing after pooling samples from the same category together (Fig.3 and Fig.4). The primary shift in bacterial composition is evident for *Lactococcus* spp. and it involved an increase in this OTU abundance from corbicular pollen to larval food (Fig.4); this pattern was the exception rather than the rule: the most OTUs had higher abundance in SPC and SPO than in LF (Fig.3 and Fig.4). In general, CP, SPC and SPO shared their OTUs but with differences in abundance, being common to observe an increase of the OTUs abundance from CP to stored pollen, well represented by the bacteria *Corynebacterium* sp., *Staphylococcus* sp., *Gordonia* sp., *Streptococcus* spp., and *Hylemonella* sp. (Fig.3 and Fig.4). These OTUs were not detected in LF (Fig.4). Different

phylotypes of *Lactobacillus* and *Enterococcus* were distinctly associated to the different conditions of the pollen (Fig.3).



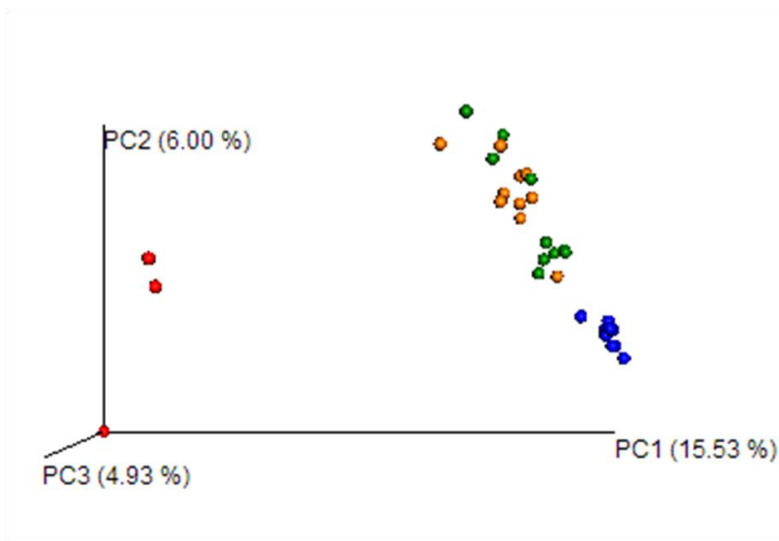
**Fig.3. Phylogenetic tree of the 23 most abundant bacterial phylotypes found in pollen provisions.** Relative abundance of the phylotype (OUT) in each sample is represented by the size of the circle as indicated by the abundance scale at the right side of the tree, with bigger circles indicating greater relative abundance. The samples are coded by color as follows: Pink -CP = corbicular pollen, Green-LF= larval food, Blue- SPC= stored pollen in closed pots, Purple- SPO= stored pollen in open pots).



**Fig.4. Histogram of the 8 most abundant bacterial phylotypes.** Normalized abundance of the phylotype in each sample is presented by the bars. Genera are specified by the name in the top of the histogram and its respective family assignment is represented by color as specified in the right side. The samples are coded as follows: CP = corbicular pollen, LF= larval food, SPC= stored pollen in closed pots, SPO= stored pollen in open pots).

#### *Beta diversity*

We performed Beta diversity analysis to test whether the microbial communities' composition differed according to the samples (CP/SPO/SPC/LF). PCoA ordination of UNIFRAC distance matrixes indicated that bacterial communities clustered by the type sample. Clustering of larval food samples was stronger than CP and storage pollen samples. One of the three CP samples was loosely clustered but there was a clear separation of the CP bacterial community from the in-hive pollen (SPO and SPC) and larval food bacterial communities. SPO and SPC samples showed the greatest compositional variation and they mixed as a single group. Statistical analysis supported these observations: (1) CP bacterial composition was significantly different from SPO ( $p=0.002$ ), SPC ( $p=0.001$ ) and LF ( $p=0.001$ ); (2) LF bacterial composition was significantly different from SPO and SPC bacterial communities ( $p= 0.001$ ); while (3) no significant differences were found between SPO and SPC microbiota ( $P= 0.353$ ).



**Fig.5. Bacterial communities' similarities of pollen provisions of *Melipona seminigra*.** PCoA ordination of UniFrac distance matrixes shows the bacterial composition similarities of corbicular pollen (red circles), storage pollen in open pots (green circles), storage pollen in closed pots (orange circles) and larval food (blue circles) samples.

#### *Culturable bacteria composition*

Samples of stored pollen and larval food of *Melipona seminigra* nests were cultivated in different rich media and in a selective medium designed to favour the growth of Lactobacilli. The pH values of stored pollen and larval food samples were measured using the mother dilution (1g of material to 10mLs of saline) and they are expressed in Table 2. LF is significantly more acidic than SPO and SPC. Bacterial colony-forming units (CFU) per gram were  $2,4 \times 10^4$  for SPO,  $1,4 \times 10^4$  for SPC and  $2,5 \times 10^3$  for LF samples.

**Table 2. pH values of stored pollen and larval food samples of *Melipona seminigra* nests.**

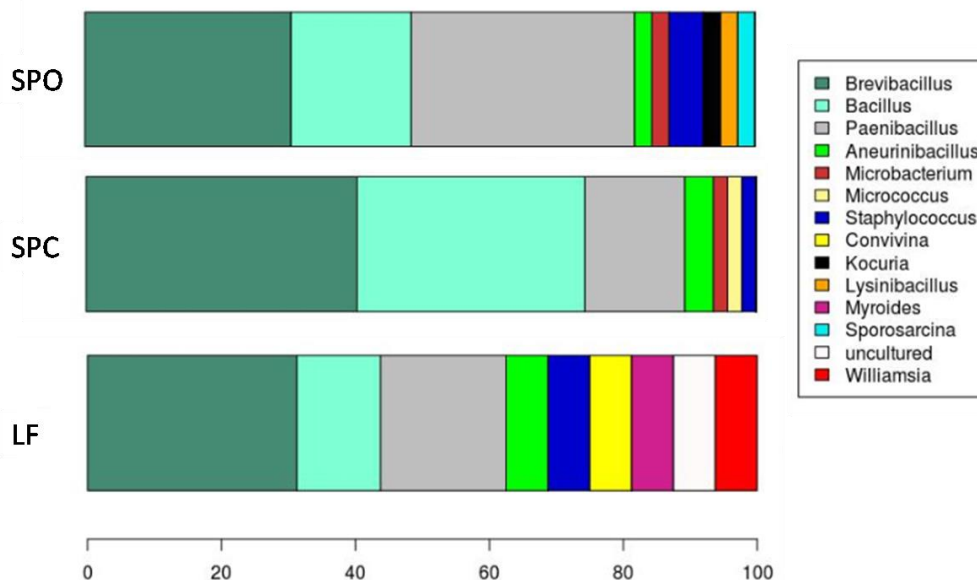
Colony	pH		
	SPO	SPC	LF
1	4,12	4,11	3,07
2	3,75	3,85	3,15
3	3,74	3,92	3,08
4	3,85	3,98	3,06
5	3,84	4,06	3,03
6	3,78	4,0	3,15
<b>Mean</b>	3,85*	3,99*	3,09**
<b>Standard deviation</b>	0.14	0.09	0.05

Asterisks represent significant statistical differences.

SPO= stored pollen in open pots, SPC= stored pollen in closed pots, LF= Larval food.



To access a variety of cultivable bacterial species, different morphotypes were selected for isolation and taxonomic identification. A total of 122 bacterial isolates were obtained from the samples being 21 originated from LF, 46 from SPO and 55 came from SPC. Fragments of the 16S rRNA gene of the isolates were sequenced in ABI platform and the sequences ranged from 460pb to 930 pb, with an average size of 781 pb. One hundred and two 16S rRNA gene sequences were assigned in genus taxonomic level (Table S2). The other 20 bacteria sequences showed controversy on taxonomic classification based on 16S rRNA gene and they were only assigned to family level. Bacteria isolates were mainly environmental Gram-positive bacteria, normally found in soil, water and rhizosphere (Fig.6). Both stored pollen and larval food were dominated by species of three bacillary gram-positive bacteria from Bacillales order: *Brevibacillus* (Paenibacillaceae), *Paenibacillus* (Paenibacillaceae) and *Bacillus* (Bacillaceae) (Fig.6). These bacteria accounted for 60% to 90% of the stored pollen and larval food microbiota. Other shared taxa between the samples included *Staphylococcus* sp and *Aneurinibacillus* sp. One isolate of *Convivina* sp (Leuconostocaceae, Lactobacillales) was obtained from larval food samples. *Convivina* was recently described as a new genus, first isolated from bumble bee gut [33]. Larval food also revealed an unidentified bacteria (just 91% of identity with an uncultured bacterium in both NCBI and RDP), perhaps a novel taxon.



**Fig.6. Relative proportions of bacterial isolates obtained from stored pollen and larval food from *Melipona seminigra* nests.** SPO= Stored pollen in open pots; SPC= Stored pollen in closed pots; LF= Larval food.

### Culturing versus deep sequencing

We used culture-dependent and culture-independent methods to more thoroughly characterize microbial diversity associated to *Melipona seminigra* food provisions, based on pollen, the main source of nutrients of bee colony. Since the methods have different principles and sampling efforts it is not adequate to compare abundances, therefore community differences were measured only as bacterial taxa present or absent among samples. Although the number of genera detected by the two approaches was similar – 15 in Ion torrent deep sequencing and 13 in bacterial culturing- their composition was quite distinct (Table 3). Just two genera were shared between the methods: *Bacillus* and *Staphylococcus* (Table 3). In both surveys we detected different isolates/OTUs assigned into a single genus and it could represent an additional criterion of differentiation of these samples (Fig.3 and TableS2).

**Table 3. Comparisons of genera detected by culture-dependent and culture-independent methods.** CP= corbicular pollen, LF= Larval food, SPC= stored pollen in closed pots, SPO= stored pollen in open pots.

Genus	Culture			Deep sequencing Ion Torrent			
	SPO	SPC	LF	CP	SPO	SPC	LF
<i>Brevivacillus</i>	x	x	x				
<b><i>Bacillus</i></b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>			
<i>Paenibacillus</i>	x	x	x				
<i>Aneurinibacillus</i>	x	x	x				
<i>Microbacterium</i>	x	x					
<i>Micrococcus</i>		x					
<b><i>Staphylococcus</i></b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	
<i>Convivina</i>			x				
<i>Kocuria</i>	x						
<i>Lysinibacillus</i>	x						
<i>Myroides</i>			x				
<i>Sporosarcina</i>	x						
<i>Williamsia</i>			x				
<i>Lactococcus</i>				x	x	x	x
<i>Fructobacillus</i>				x	x	x	
<i>Streptococcus</i>				x	x		
<i>Propionibacterium</i>				x	x	x	
<i>Corynebacterium</i>				x	x	x	
<i>Dermacoccus</i>				x		x	
<i>Lactobacillus</i>				x	x	x	x
<i>Weissella</i>				x	x	x	x
<i>Hylemonella</i>				x	x		
<i>Enterococcus</i>				x		x	
<i>Gordonia</i>				x	x	x	
<i>Stenotrophomonas</i>				x	x		
<i>Dysgonomonas</i>				x			

## Discussion

Microbial symbiosis in social bees may affect many aspects of bee homeostasis, from individual to colony level [10]. Food storage and production is one of the microorganism-mediated processes in hive and it represents a tiptop factor for the colony productivity and long-term fitness. Hive-stored pollen is the colony main source of proteins, lipids and minerals. From the time that pollen grains are collected from the flowers until its maturation inside of hive pots, pollen undergoes some notable physical changes: it goes from a granular to a pasty aspect besides acquiring acidic aroma and taste. The long term accumulation and storage of pollen- that can last from days to weeks- result in a fermented food widely used in colonies for brood and bee feeding. The Pollen fermentation is reported for many bee species but the features of this metabolic process is poorly understood or described [12,13,18,19,34]. As other fermented food, bee pollen production should rely on microbial metabolism [10].

In the current study we characterized the bacterial microbiota associated to *Melipona seminigra* pollen, since its collection and transportation – in the bee corbiculae- until your final destination composing larval food. Our results showed that the changes in pollen state are accompanied by shifts in bacterial composition. We detected three distinct bacterial communities along the samples, which were associated to (1) corbicular pollen, (2) stored pollen in pots and (3) larval food. We tried to capture two different moments in the pollen storage: an initial, by sampling pollen of open pots filled until half of its volume and a second, sampling closed pots, (a stage when there is no more bee processing). It is likely that the climax of pollen fermentation take place in these close microaerophilic pots; nevertheless the bacterial composition of stored pollen in open pots and closed pots did not differ significantly.

The microbial composition changes along pollen provisions samples were primarily characterized by a reduction in bacteria diversity from CP to LF samples. CP bacterial community was composed by ubiquitous aerobic or facultative anaerobic bacteria, broadly found in natural environments such as soil, water and plants [20]. Many of these genera have also clinical and opportunistic members, like *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Bacillus*. As CP samples came from foragers bees, its diversity could be a reflection from the set of plants and other resources visited by the bees [21,35] ; bees with different paths could also add up bacteria taxa in the pooled samples. Some OTUs commonly associated to bee gut were more abundant in CP samples than in the others materials, such as *Weissella*, and different phlotypes of *Lactobacillus* and *Enterococcus* [33,36]. These bacteria are probably inoculated

from the bee crop during the pollen grains collection, when bee regurgitate some secretions into the pollen to compact and stick it to the corbiculae [21].

CP bacterial diversity were almost entirely detected in stored pollen samples and it suggest that these bacteria can survive for extended periods associated to pollen, even under physic-chemical transitions. However, there was considerable variation in microbial composition of stored pollen libraries and only two CP phylotypes were consistently detected across all the samples. A possible explanation for this might be that the most of the bacteria may be occasionally brought to the nests, depending narrowly on the bee's forager activity, and their stay and successful colonization of the in-hive pollen may rely on natural niche competition. Otherwise, the high prevalence (and persistence) of the two phylotypes *Corynebacterium* sp. and *Lactococcus* sp in stored pollen samples suggests a possible role of these bacteria in pollen maturation, inside the hive.

*Lactococcus* is a gram-positive genus widely found in fermented foods and plant and animal materials [37,38]. It has a remarkable importance in industrial processes of food production, acting as starter cultures specially in milk-based fermentation products [39]. As other LAB bacteria, *Lactococcus* uses glucose or other sugar to obtain energy producing lactic acid as a byproduct. The lactic acid lowers the pH and preserves the product from the growth of unwanted bacteria and molds while other metabolites and enzymes produced by *Lactococcus* also contribute to special aromas and flavors. Similarly, the Gram-positive Corynebacteria form a diverse group found in a range of different ecological niches such as soil, vegetables, sewage, and skin. The genera include pathogens, such as *Corynebacterium diphtheria* and some fermentative species of valuable industrial importance, as *Corynebacterium glutamicum*, that grows aerobically on a variety of carbohydrates, and organic acids [40,41]. *C. glutamicum* is famous by glutamate (L-glutamic acid) production, a flavor enhancer and food additive. Actinobacteria as *Corynebacterium*, have also been reported in beebread (fermented pollen) of *Apis mellifera* [20,21].

The evidence of *Lactococcus* and *Corynebacterium* dominance in stored pollen suggests that they can orchestrate bee pollen fermentation and its physic-chemical changes promoting a preservative environment in pollen pots that assure pollen storage and nutritional quality; it reinforce the hypothesis that bees and other social hymenoptera have strong selective pressure to evolve protective symbiosis [21,42]. The fermentative properties of other LAB, specially *Lactobacillus* spp., have also been hypothesized to aid in the conversion of pollen to bee bread in honey bees hives and to protect it from spoilage [12]. Our data,

however, must be interpreted with caution, as *Lactococcus* origin seems to be environmental, coming along with corbicular pollen and probably reflecting the pollination environment microbiota. Reliance on environmental transmission may make the bacteria acquisition more unstable [43]. Sampling effort in different seasons and in distinct meliponaries could help in the identification of possible core bacteria in pollen fermentation or at least groups of bacteria functionally related.

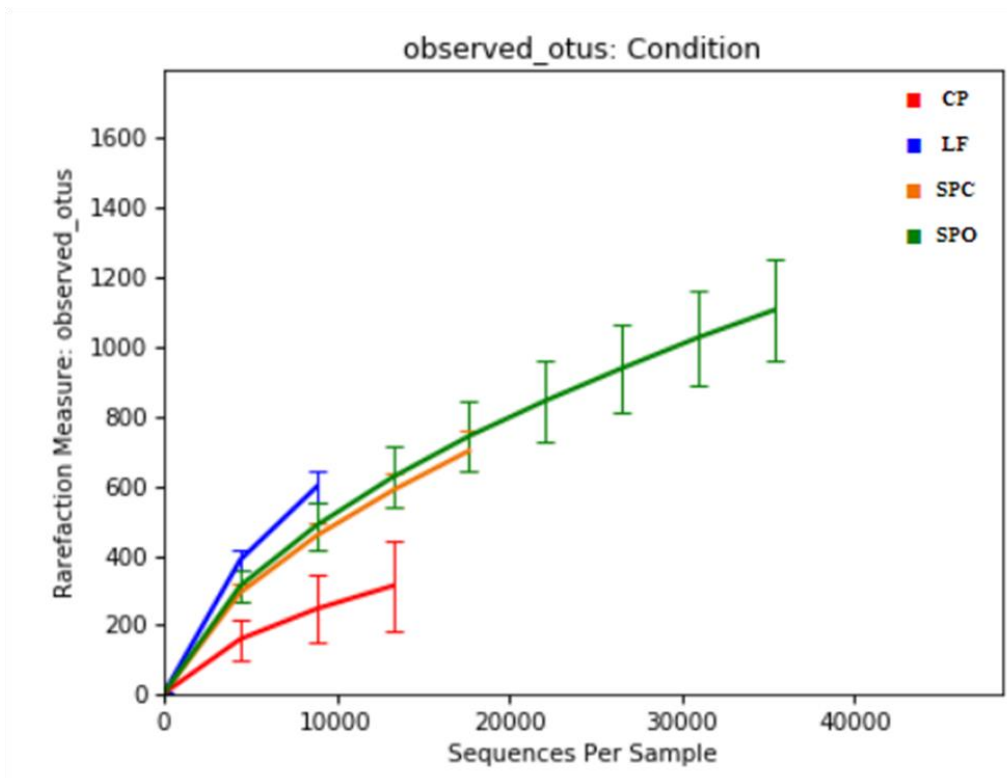
Here, the pH of larval food was significantly lower than pH of stored pollen. The acidity seems to be a natural property of the post fermentation final pollen product. Organic acids produced by the LAB bacteria, especially *Lactococcus* sp., had probably limited microbial growth in larval food, of which pollen is the major component. Therefore, larval food samples were entirely dominated by one OUT of *Lactococcus* sp.. Some *Lactococcus* species are acid tolerant and can prevent low pH damage [44,45].

Culture dependent and independent approaches revealed completely different bacterial taxa in stored pollen and larval food, which suggest that culturing may not adequately represent pollen and larval food bacterial microbiota. The difficulty of providing complex nutritional requirements limit culturing methods of representing bacterial community as a whole [46]; it provides otherwise access to the most readily culturable members of the community. In the same way, the bacterial isolates were not identified by Ion torrent sequencing, except for one OUT of *Bacillus* and one OUT of *Staphylococcus*. CFU per gram of pollen were between  $10^3$  and  $10^4$ , which indicates that the isolates abundance in pollen and larval food samples were probably below the abundance normally captured by deep sequencing [20,47].

Our culturing efforts revealed a dominance of bacillary bacteria in both stored pollen (SPO and SPC) and larval food, represented by *Brevibacillus*, *Bacillus* and *Paenibacillus*. These bacteria show a broad-spectrum antimicrobial activity and are good sources of industrial enzymes [48–50]. *Brevibacillus* and *Paenibacillus* were originally included within the genus *Bacillus* and then they were reclassified as separate genera in the mid 90's [51,52]. Our findings are in agreement with previous culture-based surveys, which systematically have reported bacillary bacteria in pollen samples [5,19,34], specially of *Bacillus* genus- at a time in which *Bacillus* was still a big and heterogeneous group.

The methods' differences in reporting microbial diversity still suggests that a complete representation of pollen provisions' microbiota may require the extended application of both culture-dependent and culture-independent approaches. Taken together our approach enabled

the elucidation of the bacterial diversity associated to the pollen production in *Melipona seminigra* nests. Stored pollen showed a small set of phylotypes, being the most of them probably acquired from the pollination environment and carried on pollen pellets in bees' corbiculae to the nests. Many of these bacteria are commonly found in various globally fermented food and beverages, such as milk products, sausages, meat (*Kocuria*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*), alkaline-fermented food (*Bacillus*) and cheese (*Propionibacterium*) [39]. Many fermentative representatives of the lactic acid bacteria (LAB), a dominant group in food and beverage industries, were detected here being *Lactococcus* the most abundant phylotype. Pollen fermentation may rely on the metabolic activity of these bacteria that may offer preservative properties as well organoleptic and nutritional attractives for food production inside the nest. Composition of microbiota and its development are important factors influencing fermentation and final product quality [53]. The microbiota compositional changes along the collection, storage and larval food preparation could represent a microbial succession that drives the successful system of food production in *M.semingra* nests.



**Fig.S1. Rarefaction curves of the number of observed OTUs from samples clustered by condition/type.** The samples are coded as follows: CP = corbicular pollen, LF= larval food, SPC= stored pollen in closed pots, SPO= stored pollen in open pots).

**Table S1. Fusion primers used for 16S rRNA gene amplification and deep sequencing.**

Identification fusion primers	Base pair	Sequence
		37
	38	Primer reverse v2 338R TGCTGCCTCCCGTAGGAGT
A1MF	64	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCACTTCGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
A2MF	64	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGGACAATGGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
A3MF	63	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGGCAATTGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
A4MF	63	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGAGACGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
A5MF	65	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCGGAGAATCGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
A6MF	65	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGGCAACGGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
A7MF	63	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCATTGGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
A8MF	65	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGAAGGCAGGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
A9MF	65	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTGCCATTCGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
A10MF	64	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAACCCACGGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
P11MR	56	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTTCCACTTCGCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P12MR	57	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTTCTGCTTACGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P13MR	57	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCTGCCATTCGCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P14MR	57	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCAGCCAATTCGATGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P15MR	57	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCTGGCAATCCTCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P16MR	56	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCTAGGAACCGCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P17MR	56	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTCCTGAATCTCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P18MR	57	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCGGAAGAACCTCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P19MR	56	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTCCTAGAACACGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P110MR	57	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCGGAGAATCGCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT

Brown - Adapter A / red- barcodes/ green- primer foward  
Pink\_IQN primer (P1) / red- barcodes/ blue-primer reverse

**Table S2. Taxonomic assignments of bacteria isolated from pollen and larval food of *Melipona seminigra* nests. Top matches of RDP classification are shown.**

Source*	RDP classification	% Identity
LF	S003616684 <i>Staphylococcus</i> sp. Ds20	99.73
LF	S004495628 <i>Bacillus pumilus</i>	99.78
LF	S004495000 <i>Bacillus licheniformis</i>	99.89
LF	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.87
LF	S003284609 <i>Williamsia serinedens</i>	96.05
LF	S004506309 <i>Convivina intestini</i>	99.08
LF	S000980678 <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	99.57
LF	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.86
LF	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.73
LF	S000497522 <i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	99.63
LF	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.88
LF	S004496335 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.81
LF	S004445717 <i>Myroides</i> sp. A21	99.57
LF	S004430418 <i>uncultured bacterium</i>	91.11
LF	S000996343 <i>Paenibacillus popilliae</i>	99.7
LF	S003807203 <i>Paenibacillus dendritiformis</i>	99.54
SPC	S004461075 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.79
SPC	S000980678 <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	99.89
SPC	S004461079 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.6
SPC	S004491139 <i>Bacillus chungangensis</i>	98.49
SPC	S000111445 <i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	99.46
SPC	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.58
SPC	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.73
SPC	S004044749 <i>Staphylococcus capitis</i> subsp. null	99.75
SPC	S001264210 <i>Bacillus chungangensis</i> (T)	98.72
SPC	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.87
SPC	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.6
SPC	S004491139 <i>Bacillus chungangensis</i>	98.15
SPC	S004491127 <i>Bacillus chungangensis</i>	98.05
SPC	S004491139 <i>Bacillus chungangensis</i>	98.1
SPC	S004491127 <i>Bacillus chungangensis</i>	98.12
SPC	S004531234 <i>Bacillus</i> sp. HC2(2014b)	99.36
SPC	S000131291 <i>Bacillus shackletonii</i> (T)	99.79
SPC	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.78
SPC	S004461075 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.68
SPC	S004461075 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.79
SPC	S000497522 <i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	100
SPC	S000352500 <i>Brevibacillus borstelensis</i>	100
SPC	S002446594 <i>Paenibacillus</i> sp. 3504BRRJ	99.85
SPC	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.87
SPC	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.71
SPC	S003718622 <i>Paenibacillus dendritiformis</i>	98.05



SPC	S000980678 <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	99.25
SPC	S004461079 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.6
SPC	S001264210 <i>Bacillus chungangensis</i> (T)	98.29
SPC	S000131211 <i>Paenibacillus azoreducens</i> (T)	97.55
SPC	S004502093 <i>Micrococcus</i> sp. SK66	99.54
SPC	S004461075 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.79
SPC	S000131211 <i>Paenibacillus azoreducens</i> (T)	97.56
SPC	S004491139 <i>Bacillus chungangensis</i>	98.32
SPC	S004049476 <i>Bacillus pichinoty</i>	95.15
SPC	S003263682 <i>Bacillus bataviensis</i>	100
SPC	S002957970 <i>Brevibacillus reuszeri</i>	99.57
SPC	S000437737 <i>Bacillus sporothermodurans</i>	97.2
SPC	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.74
SPC	S004491139 <i>Bacillus chungangensis</i>	98.66
SPC	S004461079 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.5
SPC	S004502832 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99
SPC	S003919004 <i>Paenibacillus</i> sp. NUG2-9	99.33
SPC	S004461079 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.54
SPC	S004482810 <i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	97.55
SPC	S000131291 <i>Bacillus shackletonii</i> (T)	99.4
SPC	S004490263 <i>Bacillus megaterium</i>	100
SPO	S000996343 <i>Paenibacillus popilliae</i>	99.73
SPO	S000366497 <i>Paenibacillus cineris</i> (T)	99.79
SPO	S002234122 <i>Bacillus subtilis</i>	100
SPO	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.78
SPO	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.73
SPO	S004531234 <i>Bacillus</i> sp. HC2(2014b)	99.34
SPO	S004461075 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.79
SPO	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	100
SPO	S003919004 <i>Paenibacillus</i> sp. NUG2-9	99.53
SPO	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	100
SPO	S004506724 <i>Paenibacillus</i> sp. GM2	99.75
SPO	S004508635 <i>Microbacterium oxydans</i>	99.87
SPO	S004531234 <i>Bacillus</i> sp. HC2(2014b)	98.68
SPO	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.72
SPO	S001291905 <i>Paenibacillus abekawaensis</i>	98.07
SPO	S003264343 <i>Sporosarcina koreensis</i>	99.74
SPO	S004063249 <i>Staphylococcus pasteurii</i> SP1	99.68
SPO	S004081195 <i>Staphylococcus warneri</i>	99.89
SPO	S004491127 <i>Bacillus chungangensis</i>	98.18
SPO	S004491139 <i>Bacillus chungangensis</i>	98.46
SPO	S001576234 <i>Paenibacillus</i> sp. R2	99.13
SPO	S001264210 <i>Bacillus chungangensis</i> (T)	99.68
SPO	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.86
SPO	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.71
SPO	S004461078 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	100

SPO	S004461075	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.78
SPO	S001576234	<i>Paenibacillus sp. R2</i>	99.14
SPO	S004507433	<i>Lysinibacillus sp. Vr42</i>	99.87
SPO	S001576234	<i>Paenibacillus sp. R2</i>	99.16
SPO	S001264889	<i>Bacillus mycoides</i>	99.88
SPO	S000008149	<i>Kocuria rhizophila (T)</i>	99.67
SPO	S000485012	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	100
SPO	S000497522	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	99.89
SPO	S004496335	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.42
SPO	S003919004	<i>Paenibacillus sp. NUG2-9</i>	99.59
SPO	S000996343	<i>Paenibacillus popilliae</i>	99.61
SPO	S000892101	<i>Paenibacillus popilliae</i>	99.13
SPO	S003807203	<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	99.58
SPO	S003919004	<i>Paenibacillus sp. NUG2-9</i>	99.49

---

\* LF= Larval food, SPC= stored pollen in closed pots, SPO= stored pollen in open pots

## REFERENCES

1. J. M. F. Camargo & S. R. M. Pedro. Moure's Bee Catalogue [Internet]. 2013 [cited 17 May 2017]. Available: <http://moure.cria.org.br/catalogue?id=34135>
2. Carvalho-Zilse, G.A. Nunes-Silva C. Threats to stingless. 2012.
3. Roulston TH, Cane JH. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Syst Evol.* 2000;222: 187–209. doi:10.1007/BF00984102
4. Rebelo KS, Ferreira AG, Carvalho-Zilse GA. Physicochemical characteristics of pollen collected by Amazonian stingless bees. *Ciência Rural.* 2016;46: 927–932. doi:10.1590/0103-8478cr20150999
5. Gilliam M. Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. 1990;
6. Vollet-Neto A, Ilva CMAIA, Enezes CM, Lucia V, Onseca IM. Newly emerged workers of the stingless bee *Scaptotrigona aff. depilis* prefer stored pollen to fresh pollen. 2016; doi:10.1007/s13592-016-0464-4
7. Mattila HR, Rios D, Walker-Sperling VE, Roeselers G, Newton ILG. Characterization of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse. *PLoS One.* 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0032962
8. Eckhardt M, Haider M, Dorn S, Müller A. Pollen mixing in pollen generalist solitary bees: A possible strategy to complement or mitigate unfavourable pollen properties? *J Anim Ecol.* 2014;83: 588–597. doi:10.1111/1365-2656.12168
9. Ueira-Vieira C, Nunes-Silva CG, Absy ML, da Costa Pinto M de FF, Kerr WE, Bonetti AM, et al. Pollen diversity and pollen ingestion in an Amazonian stingless bee, *Melipona seminigra* (Hymenoptera, Apidae). *J Apic Res.* 2013;52: 173–178. doi:10.3896/IBRA.1.52.3.09
10. Anderson KE, Sheehan TH, Eckholm BJ, Mott BM, DeGrandi-Hoffman G. An emerging paradigm of colony health: Microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Soc.* 2011;58: 431–444. doi:10.1007/s00040-011-0194-6
11. Gilliam M. MICROBIOLOGY OF POLLEN AND BEE BREAD: THE GENUS *BACILLUS*. Springer Verlag; 1979;10: 269–274.
12. Vásquez A, Olofsson TC. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J Apic Res.* 2009;48: 189–195. doi:10.3896/IBRA.1.48.3.07
13. Herbert EW, Shimanuki H. OF BEE-COLLECTED AND BEE-STORED POLLEN

- nutrient status of the plant , methods of pollen extraction , and storage . Also this large physiological effects ( M ODD and B. 1978;
14. Loper. Biochemistry and microbiology of bee collected almond pollen and bre bread. *Apidologie*. 1980;11: 63–732.
  15. Vásquez A, Forsgren E, Fries I, Paxton RJ, Flaberg E, Szekely L, et al. Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS One*. 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0033188
  16. Lee FJ, Rusch DB, Stewart FJ, Mattila HR, Newton ILG. Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. *Environ Microbiol*. 2015;17: 796–815. doi:10.1111/1462-2920.12526
  17. McFrederick QS, Wcislo WT, Taylor DR, Ishak HD, Dowd SE, Mueller UG. Environment or kin: Whence do bees obtain acidophilic bacteria? *Mol Ecol*. 2012;21: 1754–1768. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05496.x
  18. Anderson KE, Carroll MJ, Sheehan T, Mott BM, Maes P, Corby-Harris V. Hive-stored pollen of honey bees: Many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. *Mol Ecol*. 2014;23: 5904–5917. doi:10.1111/mec.12966
  19. Gilliam M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiol Lett*. 1997;155.
  20. Anderson KE, Sheehan TH, Mott BM, Maes P, Snyder L, Schwan MR, et al. 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*. 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0083125
  21. Corby-Harris V, Maes P, Anderson KE. The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLoS One*. 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0095056
  22. Kwong WK, Moran NA. Gut microbial communities of social bees. *Nat Rev Microbiol*. Nature Publishing Group; 2016;14: 374–384. doi:10.1038/nrmicro.2016.43
  23. Kerr WE, Carvalho G. A., Nascimento V. A., Bego LR. Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação. 1996; 1–157. Available: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=BIBA.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=008586>
  24. Leonhardt SD, Kaltenpoth M. Microbial communities of three sympatric Australian stingless bee species. *PLoS One*. 2014;9: e105718. doi:10.1371/journal.pone.0105718

25. Aizenberg-Gershtein Y, Izhaki I, Halpern M. Do Honeybees Shape the Bacterial Community Composition in Floral Nectar? *PLoS One*. 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0067556
26. McFrederick QS, Rehan SM. Characterization of pollen and bacterial community composition in brood provisions of a small carpenter bee. *Mol Ecol*. 2016; doi:10.1111/mec.13608
27. CAPORASO. Access: QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data: *Nature Methods* [Internet]. [cited 25 Jun 2017]. Available: <http://www.nature.com/nmeth/journal/v7/n5/full/nmeth.f.303.html>
28. Evans GA. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Second edition. Volumes 1, 2, and 3. *Current protocols in molecular biology*. Volumes 1 and 2. Cell. Elsevier; 1990;61: 17–18. doi:10.1016/0092-8674(90)90210-6
29. Borneman J, Triplett EW. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63: 2647–2653.
30. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215: 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
31. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73: 5261–5267. doi:10.1128/AEM.00062-07
32. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, et al. Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*. 2014;42: 633–642. doi:10.1093/nar/gkt1244
33. Praet J, Meeus I, Cnockaert M, Houf K, Smaghe 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, Int J Gen Mol Microbiol*. 2015;107: 1337–1349. doi:10.1007/s10482-015-0429-z
34. Gilliam M, Prest DB, Lorenz BJ. Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds. *Apidology*. 1989;20: 53–68. doi:10.1051/apido:19890106
35. McFrederick QS, Thomas JM, Neff JL, Vuong HQ, Russell KA, Hale AR, et al. Flowers and Wild Megachilid Bees Share Microbes. *Microbial Ecology*. 2016. doi:10.1007/s00248-016-0838-1

36. Kwong WK, Medina LA, Koch H, Sing K-W, Soh EJY, Ascher JS, et al. Dynamic microbiome evolution in social bees. *Sci Adv.* 2017;3: 1–17. doi:10.1126/sciadv.1600513
37. Golomb BL, Marco ML. *Lactococcus lactis* metabolism and gene expression during growth on plant tissues. *J Bacteriol. American Society for Microbiology (ASM);* 2015;197: 371–81. doi:10.1128/JB.02193-14
38. Chen Y, Ootoguro M, Lin Y, Pan S, Ji S, Yu C, et al. *Lactococcus formosensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from yan-tsai-shin (fermented broccoli stems). doi:10.1099/ijfs.0.052811-0
39. Tamang JP, Watanabe K, Holzapfel WH. Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Front Microbiol. Frontiers Media SA;* 2016;7: 377. doi:10.3389/fmicb.2016.00377
40. Burkovski A. *Corynebacteria: genomics and molecular biology* [Internet]. Caister Academic; 2008. Available: <http://www.caister.com/cory>
41. Polen T, Schluesener D, Poetsch A, Bott M, Wendisch VF. Characterization of citrate utilization in *Corynebacterium glutamicum* by transcriptome and proteome analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;273: 109–119. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00793.x
42. Turnbull C, Hoggard S, Gillings M, Palmer C, Stow A, Beattie D, et al. Antimicrobial strength increases with group size: implications for social evolution. *Biol Lett.* 2011;7: 249–252. doi:10.1098/rsbl.2010.0719
43. Graystock P, Rehan SM, McFrederick QS. Hunting for healthy microbiomes: determining the core microbiomes of *Ceratina*, *Megalopta*, and *Apis* bees and how they associate with microbes in bee collected pollen. *Conserv Genet. Springer Netherlands;* 2017;18: 701–711. doi:10.1007/s10592-017-0937-7
44. Rallu F, Gruss A, Ehrlich SD, Maguin E. Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals. *Mol Microbiol. Blackwell Science Ltd;* 2002;35: 517–528. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01711.x
45. Alemayehu D, O’Sullivan E, Condon S. Changes in acid tolerance of *Lactococcus lactis* during growth at constant pH. *Int J Food Microbiol.* 2000;55: 215–221. doi:10.1016/S0168-1605(00)00174-4
46. Suenaga H. Targeted metagenomics: A high-resolution metagenomics approach for specific gene clusters in complex microbial communities. *Environ Microbiol.* 2012;14: 13–22. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02438.x

47. Sabree ZL, Hansen AK, Moran NA. Independent studies using deep sequencing resolve the same set of core bacterial species dominating gut communities of honey bees. *PLoS One*. 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0041250
48. Schallmeyer M, Singh A, Ward OP. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol*. 2004;50: 1–17. doi:10.1139/w03-076
49. Panda AK, Bisht SS, DeMondal S, Senthil Kumar N, Gurusubramanian G, Panigrahi AK. *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2014;105: 623–639. doi:10.1007/s10482-013-0099-7
50. Grady EN, MacDonald J, Liu L, Richman A, Yuan Z-C. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb Cell Fact*. 2016;15: 203. doi:10.1186/s12934-016-0603-7
51. Ash C, Priest FG, Collins MD. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek*. Kluwer Academic Publishers; 1994;64: 253–260. doi:10.1007/BF00873085
52. SHIDA O, TAKAGI H, KADOWAKI K, KOMAGATA K. Proposal for Two New Genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol*. Microbiology Society; 1996;46: 939–946. doi:10.1099/00207713-46-4-939
53. Rodríguez H, Curiel JA, Landete JM, de las Rivas B, de Felipe FL, Gómez-Cordovés C, et al. Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2009;132: 79–90. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.025

## ARTIGO 2

### **Bioprospecção em ninhos de abelhas nativas sem ferrão: potencial hidrolítico de bactérias associadas ao alimento larval e pólen armazenado da abelha amazônica *Melipona seminigra*.**

---

Nacif-Marçal et al. Bacteria associated to nests of the Amazonian *Melipona seminigra* stingless bee show a broad repertoire of hydrolytic enzymes. Manuscrito submetido para a revista *Journal of Biotechnology* (Anexo 1).



## ABSTRACT

As microbial biodiversity and bioprospecting are two inseparable themes in biotechnology, we search for microbial novelties in nests of social insect, which may unveil a great source of biomolecules for industrial process. We accessed the hydrolytic potential of a group of bacteria isolated from stored pollen and larval food of the nests of the amazonian bee *Melipona seminigra*. The bacteria were tested for the production of the enzymes amylases, cellulases, lipases, and proteases. The most of the bacteria isolated from both stored pollen and larval food were capable of using the organic substrates as energy source, and proteases and cellulases were the enzymes most produced by them. The versatility os using alternative carbon sources and the high indexes of the enzymatic activity of the bacteria associated to *Melipona seminigra* food provisions indicate the great potential of these bacteria for enzyme bioprospecting.

Keywords: symbiosis; enzymes; bee food; bioprospecting.

## 1. Introduction

Stingless bee nests harbor a diversity of microorganisms (Hughes et al., 2008), the majority of which are yet uncultivable and their interrelationships remains unclear. The nests provide a peculiar environment with high humidity (>70%) and relatively high temperatures (ranging from 30 to 32 Celsius degree), a ideal place for associated fauna (acari, small insects) and for a rich microbiota (Vit et al., 2012). Although microbiome studies have increased in bees over the last years (Kwong and Moran 2016), the nest-related microbiota data are still scarce being incipient even in *Apis* species. Stingless bees forage flowers to gather pollen and nectar as food source and collect other substrates to build up parts of their nests such as sap, resin and mud. Bees are not rarely seen visiting organic decaying matter, and animal faeces (Roubik et al., 2006). This input from external sources are very likely a inoculate route of microbial actors to their enclosed society (Corby-Harris et al., 2014; Vit et al., 2012).

The spatial and functional compartmentalization of the hive create unique and susceptible niches to the development of microbial interactions, which can affect directly the health, nutrition and immunity of the colony (Anderson et al., 2011; Engel and Moran, 2013). Among these potential microbial niches of social colonies the stored pollen and larval food draw attention. The pollen is a very rich source of nutrients, including proteins, sugars, vitamins and minerals (Souza et al., 2004). After being collected from flowers the pollen is clumped with nectar and glandular secretions of bees containing enzymes and microorganisms (Ueira-Vieira et al., 2013; Vit et al., 2012). This mixture remains stored in the hive for days to weeks, which culminates in its maturation. The maturation process is generally linked to metabolic activities of the microflora that is present in stored pollen, although there is still a lot of controversy about the impact of the associated microorganisms in this process (Anderson et al., 2014, 2011; Fernandes-da-Silva and Serrão, 2000; Gilliam, 1979; Herbert and Shimanuki, 1978; Loper, 1980; Mattila et al., 2012; Vásquez and Olofsson, 2009). After maturation, this pollen is mixed with honey, royal jelly and salivary secretions constituting the larval food that is provisioned in the brood cell to feed the immature ones during their development (Kerr et al., 1996; Nogueira-neto, 1997).

Associated with complex sources of substrate, such as pollen, microorganisms must display an enzymatic 'repertoire' capable of using various types of organic substrates as a source of nutrients. From the biotechnological perspective, microorganisms associated with the pollen may constitute potential sources of molecules for the food industries (hydrolytic

enzymes), pharmaceuticals (bioactives), biofuels (biomass degradation) and other industrial sectors (Bode, 2011; Challinor and Bode, 2015). Discovery of new molecules, especially enzymes, are welcome to the bio-industry. There is the need of new biocatalytic sources in order to substitute the usually environmental risky and expensive chemical catalysis, from food to biofuel producing, a billionaire global market (Polaina and MacCabe, 2007).

In this study we privileged the traditional bacterial culture with the aim of screening for function, exploring the hydrolytic potential of isolates obtained from larval food of brood cells and pollen stored in pots of the Amazonian stingless bee *Melipona seminigra* Friese, 1903 (Camargo and Pedro, 2013); we discuss our findings related to the possible biological functions of the microbiota associated with stingless bees.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Bacteria strains**

A total of one hundred and thirteen bacterial isolates were used in this work. The bacteria constitute a library that is maintained at Federal University of Amazonas, Manaus, Brazil, at the Laboratory of Molecular Biology of the Biological Sciences Institute (ICB-UFAM). The bacteria were obtained from the cultivation of stored pollen and larval food collected from colonies of *Melipona seminigra* bees (Nacif-Marçal et. al. 2017 unpubl. Data). The colonies are located at the meliponary of the Bee Research Group (Grupo de Pesquisas em Abelhas - GPA) at the National Institute of Amazon Research (INPA) (Manaus-AM, Brazil, 03° 05' 50.91''S, 59° 59' 06.32''W).

From the total of one hundred and thirteen bacteria, nineteen were obtained from the cultivation of larval food (isolates numbered of 1 to 19) and ninety four bacteria were originated from the cultivation of pollen stored in pots inside the colonies (isolates numbered of 20 to 113).

### **2.2. Enzymatic assays**

The bacterial isolates were qualitatively evaluated for the production of the following classes of hydrolytic enzymes: amylases, cellulases, lipases and proteases. Prior to enzymatic assays bacterial isolates were activated in Luria Bertani medium agar and incubated at 30 °C until the appearance of cell mass. Each enzyme assay was performed in triplicate for each bacterial isolate and the bacterium was evaluated for the production of the enzyme (positive) or not producing the enzyme (negative). The term “enzyme production” is used in this work

for both synthesis of the enzyme by the bacterium and/or the activity of the enzyme in the medium after it is produced (Hankin and Anagnostakis, 1975). The final result was taken as one that appeared in at least two repetitions of the test.

#### 2.2.1. Amylases

The amylolytic activity was verified by the growth of bacterial strains in Petri dishes containing LB medium agar reduced by 1/4 of its components and supplemented with corn starch 1 %, pH 7.0. Plates were incubated for 48h and enzyme activity was detected by the formation of polymer degradation halos revealed by staining with iodine vapor (Astolfi-Filho et al., 1986).

#### 2.2.2. Cellulase (endoglucanases)

The production of cellulase enzymes (endoglucanases class) was evaluated from the growth of bacterial strains in Petri dishes containing LB agar reduced by 1/6 of its components and supplemented with 1% carboxymethylcellulose (CMC, Sigma<sup>TM</sup>), pH 7.0 (modified from Ghose 1987). Plates were incubated at 30 °C up to seven days. Enzyme activity was verified by the formation of polymer degradation halos revealed with at 0.1 % Congo Red solution, pH 8.0, for 30 minutes and subsequent rinsing in 5 M NaCl solution for 5 minutes (Teather and Wood, 1982).

#### 2.2.3. Lipases

The lipase activity was detected by the growth of bacterial strains in Petri dishes containing culture medium with commercial olive oil as lipase substrate (3 g/L peptone, 2 g/L yeast extract, 2 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g/L CaCl<sub>2</sub>, 1 g/L MgSO<sub>4</sub>, 10 g/L Tween 80, 20 g/L olive oil, 0,002 g/L rhodamine B and 18 g/L agar, pH 8-8.5) (modified from Kouker and Jaeger 1987). The plates were incubated at 30 °C for seven days. Enzyme activity was visualized by the contrast formed between the whitish halo and the pink dye rhodamine B (Kouker and Jaeger, 1987).

#### 2.2.4. Proteases

Assessment of protease production by bacteria isolates was taken from its growth in Petri dishes containing culture medium with powdered milk and gelatin as protein sources (Yeast extract 2 g/L, gelatin 1 g/L, powdered milk 2 g/L and agar 15 g/L, pH 7.0) (Hankin

and Anagnostakis, 1975). A transparent region around the colony in contrast with the opaque surface of the medium indicated the proteolytic activity.

### 2.3. Semi-quantitative determination of enzymatic activity

The semi-quantitative determination of enzymatic activity of bacterial isolates selected as positive by the qualitative method was made by the relationship between the average diameter of the degradation halo ( dh ) and the average diameter of the bacterial colony ( dc), expressed as Enzymatic Index (EI = dh/dc) (Hankin and Anagnostakis, 1975; Lealem and Gashe, 1994). Bacteria that presented an EI above 2.0 were considered potentially useful for biotechnology use (Florencio et al., 2012; Lealem and Gashe, 1994). The diameters of halos and the colonies were measured using a caliper rule in millimeters (mm).

### 2.4. Statistical analysis

Statistical analyzes were performed on BioEstat® program version 5.0. Data normality was verified by Lilliefors test. To test for significant differences in the enzymatic production of the bacterial isolates it was performed a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. In addition, it was performed the Student T test to verify if the type of food provision (pollen stored in pots or larval food) affects the enzymatic production of its associated microbiota. The significance of all tests was considered at the 0.05 level ( $\alpha=0.05$ ).

## 3. Results

The ability of the bacterial isolates of using different substrates was evaluated by the visualization of the polymer degradation halos (Fig. 1). The bacteria (113 isolates) showed different nutritional versatility; while 16 % of it showed at least three types of enzyme activity, another 19 % of the total of bacteria did not show any enzymatic activity. However, most of the isolates (65 %) produced one or two types of hydrolytic enzymes, with the composition and/or combination of these enzymes being varied among bacterial isolates, as shown in the supplementary material 1 (Table S1 and Figure S1).

The overall production of extracellular enzymes by the isolates is reported in Fig. 2. Proteases and Cellulases were the enzymes most produced by the bacterial isolates whereas the production of amylases was less pronounced ( $F= 9.89/ gl= 448/ p < 0.0001$ ). The proportion of the enzyme producers that presented enzymatic index (EI) higher than 2.0 is highlighted in the Figure 2 for each class of enzyme. A high number of cellulolytic and

proteolytic bacteria can be selected as potential producers according to this enzymatic index criterion. Although the amylase and lipase producing bacteria with an  $EI \geq 2.0$  represent a smaller portion of the total of isolates, high values of EI were found for these enzyme's categories. Table I highlights the bacterial isolates with the highest indexes for each type of enzyme; it ranges from  $IE= 4,0$  (of a cellulolytic bacterium) to an  $EI= 15.2$  for a lipolytic bacterium (Table I).

The enzymatic production was also analyzed taking into account the source of the bacteria (isolated from pollen stored in pots or from larval food). The enzyme activity was compared inside each condition using ANOVA followed by Tukey test and there was only a significant difference in the enzymatic production of bacteria isolated from stored pollen: it indicates that proteases and cellulases are the most produced enzymes by the bacterial associated to the pollen stored in pots ( $F= 9.19/ gl= 372/ p < 0.0001$ ), whereas the bacteria isolated from larval food produced all the types of enzymes in the same level ( $p > 0.05$ ) (Fig. 3). The enzymatic production of the bacterial isolates seems not to be affected by the type of food provision: the enzymes were produced in the same level independently of the source of the bacteria (pollen of pots or larval food) ( $p > 0.05$ ) (Fig.3).

#### **4. Discussion**

Symbionts microorganisms of insects are normally related to host defense and/or nutrition. These functions are easily perceived in the context of microbial gut communities of termites or of the permanent actinobacterial mat present in the cuticle of leaf cutting ants (Douglas, 2011). On the other hand, in the context of colonies or nests of social insects, the symbiotic relationships become more complex in front of the multiple biotic and abiotic factors that can modulate microbial composition (Anderson et al., 2011; Hughes et al., 2008).

Pollen provisions are essential for the development of social bees. The association of microorganisms to pollen provisions of stingless bees was evidenced in the 70's with pioneering works of J.O. Machado (Machado, 1971). From that time, the stingless microbiota topic has evolved little and it is still not easy to understand the functional roles of the pollen microbiota in these bees. Even for honeybees, that concentrates much of the research, there are controversies regarding the role played by microorganisms in pollen storage and maturation (Anderson et al., 2014; Fernandes-da-Silva and Serrão, 2000; Herbert and Shimanuki, 1978; Vásquez and Olofsson, 2009).

In this work we corroborate the previous findings that pollen and larval food of stingless bees contain an active microbial community. We further provide for the first time evidences that within the food provisions of *M.seminigra* bacteria present a range of hydrolytic activity. We detected amylolytic, cellulolytic, lipolytic and proteolytic abilities in these bacteria (Fig. 1). Enzymatic activity was also showed by Gilliam et al. (1990) for bacteria isolated from food provisions (honey, pollen and brood provisions) of other stingless bee, the *Melipona fasciata*. The hydrolytic potential of bacteria associated to bees' food provisions enables some assumptions regarding to the biological functions of this microbiota and the bee-food-bacteria relationship.

At a first glance, it is plausible to consider that bacteria associated to pollen provisions use it as a nutrient source for a living. Not only the macro molecules like sugars, proteins and lipids but also minerals and vitamins of pollen could be used as nutrient source for these bacteria, since pollen is rich in these components (Almeida-Muradian et al., 2005; Rebelo et al., 2016). The hydrolytic capacity of bacteria associated to pollen however seems not to be related to nutrient conversion or predigestion of stored pollen (Anderson et al., 2014; Fernandes-da-Silva and Serrão, 2000; Vollet-Neto et al., 2016). In fact, the analysis of bacterial enzymatic activity showed that enzymes were similarly produced in the two stages of pollen – along the storage/maturation process in pots and in the post-maturation stage composing larval food (Fig. 3). If the hydrolytic activity would be a requirement for pollen digestion or processing, the pollen distributed in the cells of larval food should be in its 'ready-to-eat' state and additional hydrolytic activity would be no longer necessary - considering in this context that the final destination of matured pollen are the brood cells where the queen lays eggs.

Ueira-Vieira and colleagues (2013) also detected the presence of a range of enzymes in the larval food and stored pollen of *M. seminigra* bees but these enzymes were not directly associated to bacterial activity. Bees secrete enzymes and other glandular substances into the pollen provisions but it is also important to consider that microbial enzymes can also constitute the pool of enzymes found in the food provisions. The hydrolytic enzymes of bacteria associated to both bee pollen and larval food may affect it somehow, chemically or nutritionally. To what extent these microbial modifications are useful for bees still needs to be better investigated, but from a biotechnological standpoint these bacteria and their enzymes can be harnessed. They can offer a vast range of products for bioprospecting from new compounds to more efficient biocatalysis agents (Bode, 2011).

Bacteria isolated from food provisions of the amazonian *M. seminigra* were capable of using different organic substrates as carbon source, a versatility that points to the great potential of these bacteria for the prospecting of valuable hydrolytic enzymes. Proteases and cellulases were the enzymes most produced by the associated bacteria what it is understandable in the light of the composition of pollen: in spite of being rich in different organic and inorganic molecules its cell wall is composed mainly of cellulose and other carbohydrates (Roulston and Cane, 2000) and it also has a remarkable proteic content, about 20% (Souza et al., 2004). If we take into account that in industrial processes many steps are required for transforming plant material, the nests of bees and other insects that store and also process this type of material should be viewed as natural micro refineries. Here, our data show that the majority of the proteolytic and cellulolytic bacteria from *M. seminigra* nests fulfill the Enzymatic Index criterion ( $E.I \geq 2.0$ ) to be selected as a potential producer (Fig. 1). The enzymatic index is a simple and rapid tool to select strains that can efficiently degrade macromolecules (Ten et al., 2004), since there is a direct relationship between the halo size and the degradation activity of the bacteria. Proteases constitute over 60% of the global market for enzymes; they are used to produce pharmaceuticals, foods, detergents, leather, silk and agrochemical products (Adrio and Demain, 2014). Cellulases also have high demand in the enzyme market being mainly used in pulp, paper and textile industries (Adrio and Demain, 2014; Singh et al., 2016). Industrial enzymes market worth around hundreds of millions per year and it is expected to grow significantly in the next years (Singh et al., 2016). Consequently, the microbial enzymes obtained from bee food provisions can have added-value besides its biological functions (or consequences in bee nest); not ignoring the potential lipases and amylases enzymes that could also be obtained from these niches, as indicated by the high enzymatic indexes of the isolates 70 and 73 in table I.

In the last decades, the elucidation of microbial symbiosis in nature has culminated in the growing recognition that natural products isolated from plants and animals may in fact be the metabolic products of co-living microbes (Challinor and Bode, 2015; Crawford and Clardy, 2011). Social insects like the meliponines of Amazonia provide exclusive resources to symbiotic microorganisms such as perennial and warm nests all along the year, humidity, high density of individuals inside the nests and shared food. Therefore, we see the meliponines as a good model for the study of symbiotic relationships and besides they represent a rich source of microorganisms and products of industrial and medical interest. Here, for *M. seminigra* bee both pollen and larval food provisions were great source of



bacteria producing hydrolytic enzymes like proteases, cellulases, lipases, amylases, and they can be the first wellspring for enzymatic prospecting in stingless bees' nest.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Brazilian funding agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior in Programa Pesquisador Visitante Estrangeiro (CAPES- PVE Project # 099/2012) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (n° 310777 / 2015-7). L. Nacif-Marçal received PhD research fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. We also want to express our gratitude to Hélio Vilas Boas and Diego Cunha de Albuquerque for helping sampling the material used in this work.

### **Authors Contribution**

CGNS, SAF and LNM conceived this research and designed experiments; LNM, CGNS, MH and GACZ participated in the design and interpretation of the data; LNM and RAR performed experiments and analysis; LNM, CGNS, MH and GACZ wrote the paper and participated in the revisions of it. All authors read and approved the final manuscript.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no potential conflict of interest in relation to the study in this paper.

### **References**

- Adrio, J.L., Demain, A.L., (2014) Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, doi: 10.3390/biom4010117
- Almeida-Muradian, L.B., Pamplona, L.C., Coimbra, S., Barth, O.M., (2005) Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *J. Food Compos. Anal.*, doi: 10.1016/j.jfca.2003.10.008
- Anderson, K.E., Carroll, M.J., Sheehan, T., Mott, B.M., Maes, P., Corby-Harris, V., (2014) Hive-stored pollen of honey bees: Many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. *Mol. Ecol.*, doi: 10.1111/mec.12966

- Anderson, K.E., Sheehan, T.H., Eckholm, B.J., Mott, B.M., DeGrandi-Hoffman, G., (2011) An emerging paradigm of colony health: Microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Soc.*, doi: 10.1007/s00040-011-0194-6
- Astolfi-Filho, S., Galembeck, E.V., Faria, J.B., Frascino, A.C.S. (1986). Stable Yeast Transformants that Secrete Functional  $\alpha$ -Amylase Encoded by Cloned Mouse Pancreatic cDNA. *Nature Biotechnology*, doi: 10.1038/nbt0486-311
- Bode, H.B. (2011) Insect-Associated Microorganisms as a Source for Novel Secondary Metabolites with Therapeutic Potential, in: Vilcinska, A. (Ed), *Insect Biotechnology*. Springer, Netherlands, Dordrecht, pp. 77–93
- Camargo, J. M. F., Pedro, S. R. M. (2013). Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region* [online] <http://www.moure.cria.org.br/catalogue> (accessed on 16 May 2017)
- Challinor, V.L., Bode, H.B. (2015) Bioactive natural products from novel microbial sources. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, doi: 10.1111/nyas.12954
- Corby-Harris, V., Maes, P., Anderson, K.E. (2014) The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0095056
- Crawford, J.M., Clardy, J. (2011) Bacterial symbionts and natural products. *Chem. Commun. (Camb)*, doi: 10.1039/c1cc11574j
- Douglas, A.E. (2011) Lessons from studying insect symbioses. *Cell Host Microbe*, doi: 10.1016/j.chom.2011.09.001
- Engel, P., Moran, N.A. (2013) The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.*, doi: 10.1111/1574-6976.12025
- Fernandes-da-Silva, P.G., Serrão, J.E. (2000) Nutritive value and apparent digestibility of bee-collected and bee-stored pollen in the stingless bee, *Scaptotrigona postica* Latr. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Apidologie*, DOI: 10.1051/apido:2000100
- Florencio, C., Couri, S., Farinas, C.S. (2012) Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme Res.*, doi: 10.1155/2012/793708
- Ghose, T.K. (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59, 257–268
- Gilliam, M., Roubik, D.W., Lorenz, B.J. (1990) Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie* 21, 89-97
- Gilliam, M. (1979) Microbiology of pollen and bee bread: the genus *Bacillus*. *Apidologie* 10(3), 269–274

- Hankin, L., Anagnostakis, S.L. (1975) The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. *Mycologia* 67, 597–607
- Herbert, E.W., Shimanuki, H. (1978) Chemical composition and nutritive-value of bee-collected and bee-stored pollen. *Apidologie* 9(1), 33–40
- Hughes, D.P., Pierce, N.E., Boomsma, J.J. (2008) Social insect symbionts: evolution in homeostatic fortresses. *Trends Ecol. Evol.*, doi: 10.1016/j.tree.2008.07.011
- Kerr, W.E., Carvalho, G.A., Nascimento, V.A. (1996) Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação. Acangaú, Belo Horizonte
- Kwong, E.K., Moran, N.A. (2016) Gut microbial communities of social bees. *Nat. Rev. Microbiol.*, doi: 10.1038/nrmicro.2016.43
- Kouker, G., Jaeger, K.E. (1987) Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 211–213
- Lealem, F., Gashe, B.A. (1994) Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef. (*Eraglostis tef.*). *J. Appl. Bacteriol.* 77, 348-352
- Machado, J.O. (1971) Simbiose entre as abelhas sociais brasileiras (Meliponinae, Apidae) e uma espécie de bactéria. *Ciência e Cultura* 23, 625–633
- Mattila, H.R., Rios, D., Walker-Sperling, V.E., Roeselers, G., Newton, I.L.G. (2012) Characterization of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0032962
- Nogueira-Neto, P. (1997) Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão. Nogueirapis, São Paulo.
- Polaina, J., MacCabe, A.P. (2007) *Industrial Enzymes*. Springer, Netherlands, Dordrecht
- Rebello, K.S., Ferreira, A.G., Carvalho-Zilse, G.A. (2016) Physicochemical characteristics of pollen collected by Amazonian stingless bees. *Ciência Rural*, doi: 10.1590/0103-8478cr20150999
- Roubik, D.W. (2006) Stingless bee nesting biology. *Apidologie* 37,124–143
- Roulston, T.H., Cane, J.H. (2000) Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Syst. Evol.*, doi: 10.1007/BF00984102
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Mehta, P.K. (2016) Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech.*, doi: 10.1007/s13205-016-0485-8
- Souza, R.C.D.S., Yuyama, L.K.O., Aguiar, J.P.L., Oliveira, F.P.M. (2004) Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região Amazônica. *Acta Amaz.* 34, 333–336

- Teather, R.M., Wood, P.J. (1982) Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 777–780
- Ten, L.N., Im, W.T., Kim, M.K., Kanga, M.S., Lee, S.T. (2004) Development of a plate technique for screening of polysaccharide-degrading microorganisms by using a mixture of insoluble chromogenic substrates. *J. Microbiol. Methods*, doi: 10.1016/j.mimet.2003.11.008
- Ueira-Vieira, C., Nunes-Silva, C.G., Absy, M.L., Pinto, M.F.F.C., Kerr, W.E., et al. (2013) Pollen diversity and pollen ingestion in an Amazonian stingless bee, *Melipona seminigra* (Hymenoptera, Apidae). *J. Apic. Res.*, doi: 10.3896/IBRA.1.52.3.09
- Vásquez, A., Olofsson, T.C. (2009) The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J. Apic. Res.*, doi: 10.3896/IBRA.1.48.3.07
- Vit, P., Roubik, D.W., Pedro, S.R.M. (2012) *Pot-Honey: A legacy of stingless bees.* Springer, New York
- Vollet-Neto, A., Silva, C.M., Menezes, C., Imperatriz-Fonseca, V.L. (2016) Newly emerged workers of the stingless bee *Scaptotrigona* aff. *depilis* prefer stored pollen to fresh pollen. *Apidologie*, DOI: 10.1007/s13592-016-0464-4

**Fig. 1** Qualitative enzymatic assay. Representative amylolytic (a), cellulolytic (b), lipolytic (c) and proteolytic (c) activity of bacterial isolates 9, 21, 16 and 68 respectively. Photos by Andressa Cristina Barroso

**Fig. 2** Production of hydrolytic enzymes by bacteria isolated from food provisions of colonies of *Melipona seminigra*. Different letters indicate significant differences between enzymes groups (ANOVA  $p < 0.0001$ , Tukey test). The proportion of bacterial isolates that presented enzymatic index higher than 2.0 is striped in the bars for each enzyme class

**Fig. 3** Comparison of the enzymatic activity of bacteria isolated from pollen of pots and from larval food of colonies of *Melipona seminigra* bees. It was compared the enzymatic production of bacteria inside each condition and the enzymatic production was also compared between the two conditions (pollen from pots versus larval food), for each type of enzyme. Values followed by the same letter did not differ statistically (T test,  $p > 0.05$ ). Asterisks indicate the significant differences among the enzyme production of bacteria from pollen of pots (ANOVA  $p < 0.0001$ , Tukey test). There is no significant difference in the enzymatic production of the bacteria of larval food condition (ANOVA  $p > 0.05$ )

**Table I.** Highest Enzymatic Indexes (EI) detected in bacteria isolates from food provisions of *Melipona seminigra*

<b>Enzyme</b>	<b>Bacterium</b>	<b>Source of bacteria</b>	<b>EI</b>	<b>SD</b>
Amylase	Isolate 73	Pollen in pots	5.1	1.1
Cellulase	Isolate 1	Larval food	4.0	0.4
Cellulase	Isolate 101	Pollen in pots	4.0	0.6
Lipase	Isolate 70	Pollen in pots	15.2	1.2
Protease	Isolate 2	Larval food	6.8	0.2

EI: Enzymatic Index; SD: Standard Deviation. The EI is the mean value of three independent experiments.

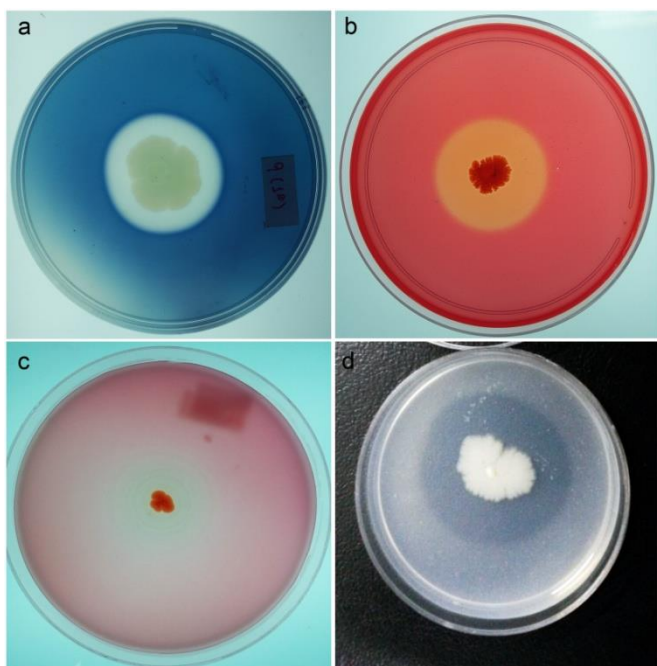


Fig.1

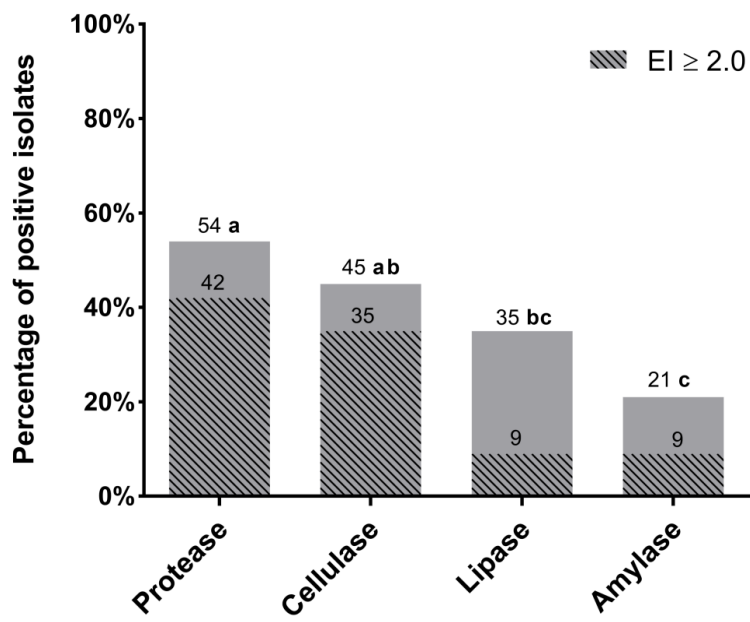


Fig.2

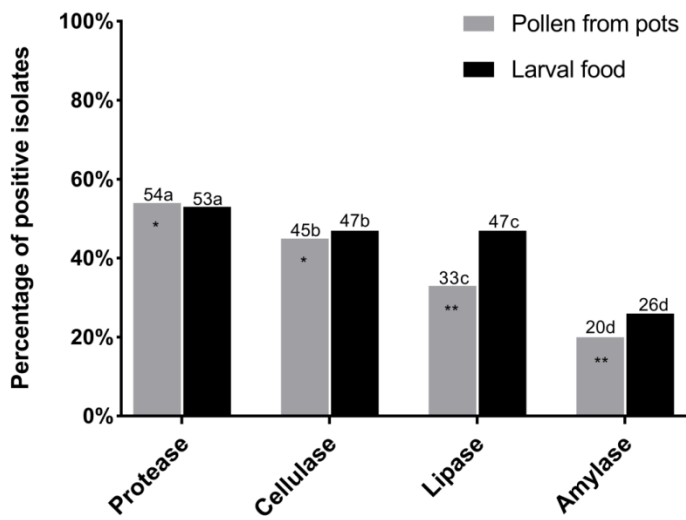


Fig.3.

**Journal of Biotechnology**

**Supplementary material\_1**

**Bacteria associated to nests of an Amazonian stingless bee show a broad repertoire of hydrolytic enzymes**

Lorena Nacif-Marçal, Martin Hasselmann, Rosemary Aparecida Roque, Spartaco Astolfi-Filho, Gislene Almeida Carvalho-Zilse, Carlos Gustavo Nunes-Silva\*

\* Corresponding author:

E-mail address: [cgustavo@ufam.edu.br](mailto:cgustavo@ufam.edu.br) (Carlos Gustavo Nunes-Silva).

Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia-PPGBIOTEC. ICB, Bloco M, Setor Sul, Manaus, AM, Brazil. +55 92 981225187.

**Table SI. Enzymatic production of the bacteria isolated from stored pollen in pots and larval food of *Melipona seminigra* bee.** The number 1 indicates presence of degradation halo (positive result) whereas the number 0 indicates absence of halo (negative result). The final result was taken as one that appeared in at least two repetitions of the qualitative enzymatic assay.

	<b>Bacteria*</b>	<b>Protease</b>	<b>Amylase</b>	<b>Lipase</b>	<b>Cellulase</b>	<b>Total of enzymes</b>
1	T.3.1.AL(1)	1	1	0	1	3
2	T.3.1.AL(2)	1	0	0	1	2
3	B.3.1.AL(1)	1	0	0	1	2
4	N.3.1.AL(1)	0	0	0	0	0
5	B.4.1.AL(1)	1	0	0	1	2
6	B.4.1.AL(2)	1	0	0	1	2
7	B.4.3.AL(1)	1	0	1	0	2
8	M.4.3.AL(1)	0	0	1	0	1
9	T.6.1.AL(1)	1	1	1	0	3
10	T.6.4.AL(1)	0	1	1	0	2
11	M.9.1.AL(1)	0	0	0	0	0
12	B.7.1.AL(1)	1	0	1	1	3
13	M.7.1.AL(1)	0	0	0	0	0
14	M.7.4.AL(1)	1	0	1	1	3
15	T.9.1.AL(1)	0	0	0	1	1
16	B.9.1.AL(1)	0	0	1	0	1
17	B.9.1.AL(2)	0	1	1	0	2
18	B.9.1.AL(3)	1	0	0	1	2
19	B.9.1.AL(4)	0	1	1	0	2
20	T.3.1.F(1)	1	0	0	1	2
21	T.3.1.F(2)	0	0	0	1	1
22	T.3.2.F(1)	1	0	0	1	2
23	B.3.1.F(1)	0	0	0	0	0
24	B.3.2.F(1)	0	0	0	0	0
25	N.3.1.F(1)	1	1	1	0	3
26	N.3.1.F(2)	1	0	0	1	2
27	N.3.2.F(1)	1	0	0	1	2
28	N.3.2.F(2)	0	0	0	0	0
29	T.4.1.F(1)	0	0	0	0	0
30	T.4.1.F(2)	1	0	0	1	2
31	B.4.1.F(1)	1	0	0	1	2
32	B.4.1.F(2)	0	0	1	0	1
33	B.4.1.F(3)	0	0	0	0	0
34	B.4.2.F(1)	0	0	0	0	0
35	B.4.2.F(2)	0	0	1	0	1
36	N.4.1.F(1)	0	0	1	0	1
37	N.4.1.F(2)	0	0	0	0	0
38	T.5.2.F(1)	1	0	0	1	2
39	B.5.1.F(1)	1	0	0	1	2
40	B.5.2.F(1)	1	0	0	0	1

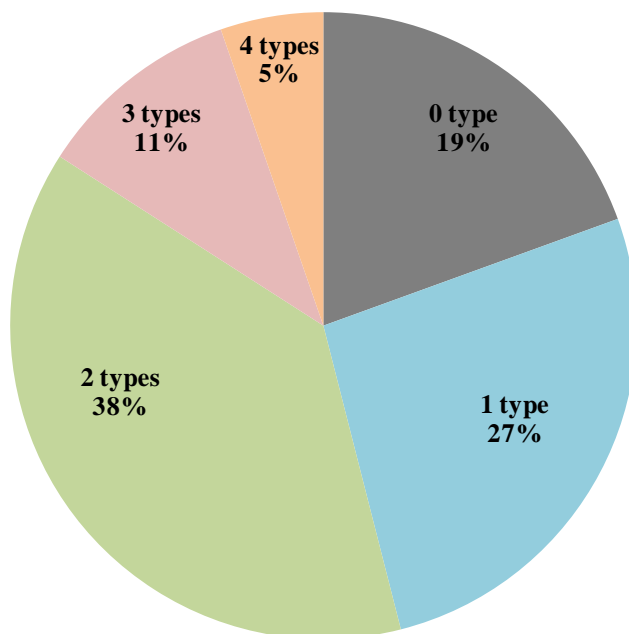


41	N.5.1.F(1)	1	0	1	1	3
42	N.5.1.F(2)	1	1	1	1	4
43	N.5.2.F(1)	1	0	0	1	2
44	T.6.1.F(1)	0	0	1	0	1
45	T.6.1.F(2)	1	0	0	1	2
46	T.6.2.F(1)	1	0	0	0	1
47	B.6.1.F(1)	0	0	1	0	1
48	B.6.1.F(2)	1	0	1	0	2
49	B.6.1.F(3)	0	0	1	0	1
50	B.6.2.F(1)	1	0	0	1	2
51	N.6.2.F(1)	1	0	0	1	2
52	T.7.1.F(1)	0	0	1	0	1
53	T.7.1.F(2)	1	0	0	1	2
54	T.7.2.F(1)	1	0	0	0	1
55	B.7.1.F(1)	0	0	0	0	0
56	B.7.1.F(2)	1	0	0	1	2
57	B.7.1.F(3)	0	1	0	1	2
58	B.7.2.F(1)	1	0	0	0	1
59	B.7.2.F(2)	1	0	0	1	2
60	T.9.1.F(1)	1	0	0	1	2
61	T.9.1.F(2)	0	0	0	0	0
62	T.9.2.F(1)	0	0	0	0	0
63	B.9.1.F(1)	0	0	0	0	0
64	B.9.1.F(2)	1	0	1	0	2
65	B.9.2.F(1)	0	1	0	0	1
66	N.9.1.F(1)	1	1	1	1	4
67	N.9.2.F(1)	0	0	1	0	1
68	T.3.1.A(1)	0	0	0	0	0
69	T.3.1.A(2)	1	0	0	1	2
70	T.3.1.A(3)	0	1	0	1	2
71	B.3.1.A(1)	1	0	0	0	1
72	B.3.1.A(3)	1	1	1	0	3
73	B.3.2.A.(1)	0	0	1	1	2
74	B.3.4.A(1)	0	0	0	0	0
75	B.3.4.A(2)	0	0	1	0	1
76	M.3.2.A(1)	1	1	1	0	3
77	T.4.1.A(1)	0	0	1	0	1
78	T.4.1.A(2)	1	1	1	1	4
79	T.4.1.A(3)	0	0	0	1	1
80	T.4.2.A(1)	0	0	1	0	1
81	B.4.1.A(1)	0	0	0	0	0
82	B.4.1.A(2)	1	0	0	1	2
83	B.4.1.A(3)	0	0	1	0	1
84	B.4.1.A(4)	1	1	0	1	3
85	B.4.2.A(1)	0	1	0	0	1
86	B.4.2.A(2)	1	0	0	1	2

87	B.5.1.A(1)	1	0	0	0	1
88	N.5.1.A(1)	1	0	1	1	3
89	N.5.1.A(2)	1	1	1	0	3
90	T.6.1.A(1)	1	0	1	0	2
91	T.6.1.A(2)	1	0	0	1	2
92	T.6.1.A(3)	0	1	0	0	1
93	B.6.1.A(1)	1	1	1	1	4
94	B.6.1.A(2)	0	1	0	1	2
95	B.6.1.A(3)	1	0	1	0	2
96	B.6.2.A(1)	0	0	0	0	0
97	B.6.2.A(2)	1	0	0	0	1
98	N.6.2.A(1)	0	1	0	1	2
99	T.7.1.A(1)	1	1	1	1	4
100	T.7.1.A(2)	1	0	0	1	2
101	T.7.2.A(1)	1	0	0	0	1
102	B.7.1.A(1)	0	0	1	0	1
103	B.7.1.A(2)	1	0	0	1	2
104	B.7.2.A(1)	1	0	0	1	2
105	M.7.4.A(1)	0	0	0	0	0
106	T.9.1.A(1)	1	0	1	1	3
107	T.9.2.A(1)	1	0	0	0	1
108	T.9.3.A(1)	0	0	0	0	0
109	B.9.1.A(1)	1	0	0	1	2
110	B.9.1.A(2)	0	0	0	0	0
111	B.9.2.A(1)	0	0	0	0	0
112	B.9.2.A(2)	0	1	0	1	2
113	N.9.1.A(2)	1	1	1	1	4
<b>Total</b>		<b>61</b>	<b>24</b>	<b>40</b>	<b>51</b>	<b>176</b>

\*Bacteria numbered from 1 to 19 were isolated from larval food collected from brood cells and bacteria numbered from 20 to 113 were isolated from pollen collected from cerumen pots.

**Figure S1. Distribution of the bacteria isolates from stored pollen in pots and from larval food of *Melipona seminigra* bee according to the number of classes of hydrolytic enzymes produced.** The percentages were calculated using the data of total of enzymes produced by each bacterium expressed in Table S1.



## ARTIGO 3

### **Composição bacteriana do intestino da abelha amazônica sem ferrão**

#### ***Melipona seminigra***

---

Nacif-Marçal, Lorena et al. *Insights into the gut bacterial composition of an amazonian stingless bee*. Manuscrito preparado de acordo com as normas da revista *Microbial Ecology*.

## Introduction

Species do not live alone. There are different types of associations and biological interactions between species and these relationships can drive the biological evolution of them. The duet insect-microorganism is a typical example of how the symbiotic associations can determine the species' natural history on Earth [1, 2]. Traditionally, microbial symbionts are related with the improvement of the nutritional state, the immune defense, and also the physiological responses of its hosts to the environment adversities [2, 3]. However symbiosis impacts on the individuals can be more complex and dynamic being not fair minimizing their benefits [4, 5], especially for elaborated societies of insects such as Apidae bees. For these social bees the symbiotic interactions should be analyzed in a broader context: considering both the individuals and the nest/colony [6, 7] and also thinking about how the sociality affects the maintenance and transmission of a specialized microbiota [8, 9].

In this context, the gut microbiota has been a keystone for microbiology studies in bees, firstly due to its expected importance in bee's health, resembling humans and other animals, but also because it has been revealing singular ecological and evolutionary signatures in symbiosis [10, 11]. The up to date knowledge about bee's gut microbiota is based on the eusocial honey bees (*Apis mellifera*) (Apini; Apinae; Apidae; Hymenoptera; Insecta), a worldwide crop pollinator that is widely used in agriculture and food production. The gut microbiota of honey bees has been best characterized in worker bees, which harbor a distinctive microbiota consisting of 8 to 10 bacterial phylotypes (bacteria with  $\geq 97\%$  16S rRNA sequence identity) [11]. The composition of the bacterial gut community of *A. mellifera* was endorsed by different studies involving honey bees from different parts of the world [12–17] suggesting that *A. mellifera* bees may have co-evolved with the, so called, core bacteria species of their gut [11]. These gut symbiotic associations are mainly maintained and transferred between the generations of bees (vertical inheritance), and they may depend largely on social interactions to be transmitted from host to host [10, 11, 18, 19].

While certain groups of gut bacteria seems to be restricted to their honey bee host, some bacterial clusters are also present in other corbiculate bees, as shown for bumble bees (Bombini; Apinae; Apidae; Hymenoptera; Insecta) [10, 17, 20] and stingless bees (Meliponini; Apinae; Apidae; Hymenoptera; Insecta) [21, 22]. In contrast, solitary bees and non-corbiculate social bees seem not to share this specific microbiota: they present a gut microbiota composed mainly of environmentally acquired microbes [8, 19, 23, 24]. These differences suggest that the group of eusocial corbiculate bees (Apini, Bombini, Meliponini)

could share a common evolutionary history also regarding the acquisition and maintenance of their gut microbiota. Indeed, as shown by Kwong et al. (2017), a core corbiculate bacterial community exists but there is also a clear distinction in the gut microbial composition between the three tribes, being the Meliponini the most heterogeneous group.

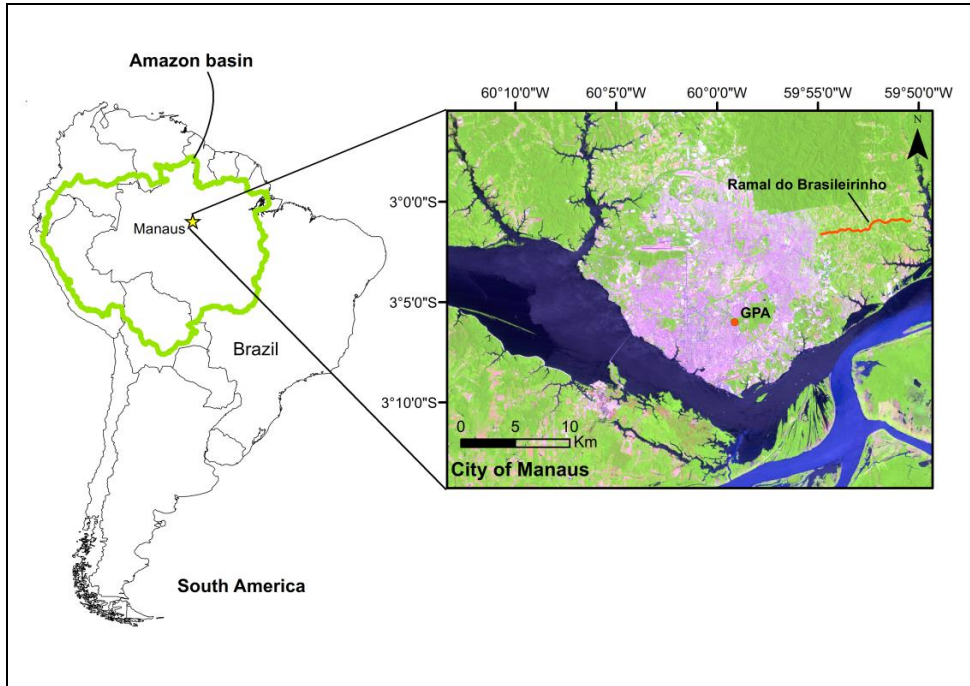
The Meliponini tribe comprises the exclusively tropical stingless bees whose highest diversity is found in the Amazon basin [25]. In Amazonia, the stingless bees are one of the most relevant pollinators for native plants and local crops [26]. Despite their great importance, we still have limited understanding about their microbiota. Together with honey bees, stingless bees represent the most advanced level of sociality in bees and it is expected that the social behavior could shape Meliponini microbiota as well it does in honey bees, resulting in the emergence and persistence of a distinctive gut community. Data are sparse, however, and the few available literature shows a variability in the microbial composition of these bees, which may also be a reflection of the taxonomic richness of this group opposed to the one-genus of both Apini (*Apis*) and Bombini (*Bombus*) tribes [10, 21, 22, 27, 28]. Considering only one Meliponini genus as *Melipona*, the microbiota's heterogeneity seems to be larger than in *Apis* spp. and *Bombus* spp. bees [21, 22]. In this case, the environment could have a significant influence on microbiota composition, even when it comes to a highly social bee group, as Meliponini. This lack of data highlight the importance to expand the Meliponini sampling and microbial research to achieve further insights into the gut microbiota structure and for better understanding of its phylogenetic relationships and sociality' traits from the microbiological standpoint [19, 21, 29]. Likewise, the environmental context must be considered to address the effects of the natural geography and anthropogenic modifications of it on the gut microbiota [29].

In this study we aimed to analyze the gut bacterial composition of the *Melipona seminigra* Friese, H (1903), an Amazonian stingless bee [25]. First we tested if different habitats – urban versus forestry system- affect the gut composition of *M. seminigra* bees. We choose an urban meliponary as a representative of some anthropogenic changes that could impact bee gut microbiota as pollutants as well the available resources for feeding and nest construction. A second meliponary constructed inside a fragment of Amazon forest was used as a semi-natural site. After that, we analyzed the bacterial composition throughout the bee gut, focusing on its morphofunctional distinction- crop (foregut), midgut and hindgut- to verify if there was any pattern of bacterial colonization in the *Melipona seminigra*'s gut.

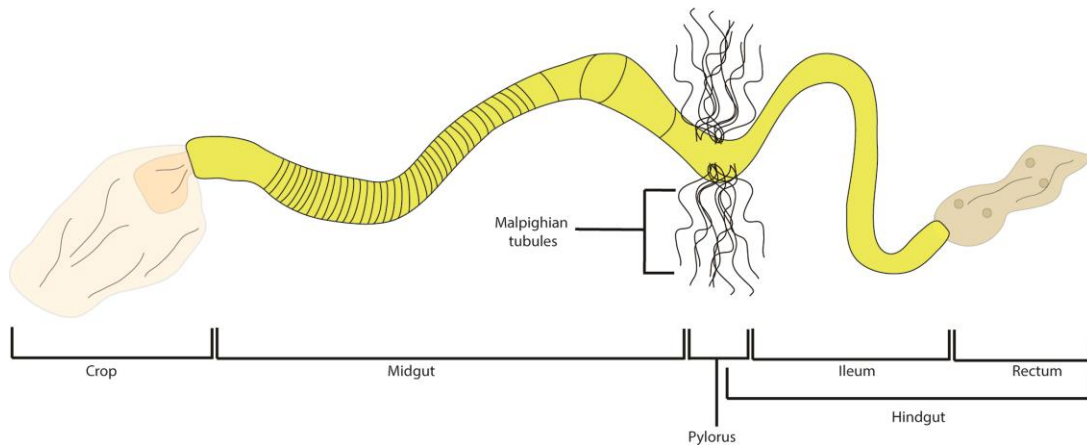
## Material and Methods

### Bee sampling and dissection

Adult worker bees (foragers) were obtained from two different meliponaries located in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. The collections were done in June, 2016. One of the meliponaries is located in an urban area of Manaus, in the Bee Research Group (*Grupo de Pesquisas em Abelhas - GPA*) of the National Institute for Amazonian Research (INPA) (03° 05' 50.91"S, 59° 59' 06.32"W). (**Fig. 1**). The second meliponary is located in an agroforestry community named *Ramal do Brasileirinho* (RB) (03° 00' 27.20"S; 59° 51' 49.23" W). This community is located on the western outskirts of the city in an area surrounded by primary and secondary tropical forest (**Fig. 1**). In each meliponary, 5 returning bee foragers were sampled from each of 5 colonies, for a total of 50 bees. The bees were placed in sterile falcons tubes and sent to the Molecular Biology Laboratory of the Federal University of Amazonas, Manaus, Brazil, for dissection. Whole guts from crops to the rectum were aseptically dissected from each bee and then the guts were divided in its 3 morph functional parts: crop (foregut), midgut and hindgut (**Fig.S1**). The gut parts of the bees collected from the same colony were pooled. In the final, we had 5 samples of pooled crop, 5 samples of pooled midgut and 5 samples of pooled hindgut for each location and a total of 30 samples.



**Fig4. Location map of the two meliponaries accessed for bee sampling.** The city of Manaus-Brazil is inside of the Amazon basin, in the confluence of *Negro* and *Solimões* rivers. A zoom of the city region is shown in the right side of the figure with the highlights for the sites of the urban GPA meliponary and for the agroforestry meliponary in the *Ramal do Brasileirinho* community.



**Fig S1. Morphology of the gut of *Melipona seminigra* bee.** This drawing was made on white paper from the visualization in a stereoscope of a dissected gut of a specimen of *Melipona seminigra* and then it was vectorized on Adobe® Illustrator CS6. The gut is divided into three anatomical and functional parts: anterior, middle and posterior. The anterior part or foregut is composed of a long tube (esophagus) that ends in a dilated region, the crop or honeycomb/social stomach, which is represented above. The proventricule valvule (highlighted inside the crop) divides the crop from the midgut. The insertion of the Malpighi excretory tubules divides the midgut from the hindgut (posterior) in the area of the pylorus



valve. The hindgut begins in an elongated tubular region, the ileum, and it ends in the enlarged rectum. Four rectal pads are differentiated in the figure above. Descriptions based on [30, 31].

### **DNA extraction, PCR and Cloning**

DNA was extracted from the pooled gut parts using Genomic DNA kit from soil NucleoSpin<sup>®</sup>(Macherey-Nagel). Partial 16S rRNA gene sequences were amplified from each DNA by the Polymerase Chain Reaction (PCR) using universal bacterial primers 27F (5'-AGAGTTTGTATYMTGGCTCAG-3') and 1492R (5' TACCTTGTTAYGYCTT-3') and the following cycling conditions: 95 °C for 2 minutes followed by 35 cycles of 95 °C for 30 seconds, 52 °C for 30 seconds, 60 seconds at 72 °C and final extension at 72 °C for 4 minutes. The PCR products were purified with the MiniElute<sup>™</sup> PCR purification kit (QIAGEN) and the purified DNA was cloned with the pGEM-T Vector System I (Promega) into electrocompetent *E.coli* JM109 competent cells. For each sample (N=30), 10 recombinant clones were sent for sequencing in both directions (M13Forward/Reverse primers) in the Eurofins Genomics Company (Ebersberg, Germany).

### **Bioinformatics**

The sequences were analyzed and assembled with the use of the CLC Main Workbench program 7.6.4. (QIAGEN). Sequences were analyzed for base quality and the remaining vector sequence was removed. Taxonomic assignments of the consensus sequences were performed in two ways: (1) using BLASTn tool [30], against NCBI nucleotide database (accessed on may, 2017) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and (2) using Ribosomal Database Project (RDP) classifier and RDP version 16 training set (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier>) [31, 32], with confidence threshold value of 80%. The results were manually checked, compared and the sequences were assigned to the finest taxonomic level possible based on the criteria of  $\geq 95\%$  of identity. Sequences that were not assigned to species level and all the sequences returned as chloroplast were removed, as well the sequences that didn't match the identity criterion for a specific taxon. Data was organized in a matrix spreadsheet for statistical analyses and Principal Coordinate Analyses (PCoA) visualizations.

## Statistical analysis

We ran separate tests for bacterial assemblage composition at different taxonomical level. We used a permutational multivariate analysis of variance (np-MANOVA), based on Bray-Curtis distances, to evaluate the effects of gut part (crop/foregut, midgut and hindgut) and the site of meliponaries (urban or natural site) on bacterial composition. In this design, we used “colony” as strata, so that randomizations occur only between colonies and not within colonies. This analysis allows simultaneous testing of multiple factors and covariates based on permutation tests. We also used pairwise np-MANOVAs of gut parts as *pos hoc* tests to better describe differences of bacterial assemblage composition between *M.seminigra* gut parts. We also tested whether the overall bacterial heterogeneity differed between gut parts, using analysis of homogeneity of multivariate dispersions (hereafter PERMDISP). PERMDISP is a multivariate analyses analogue of Levene’s test for homogeneity of variances, and the statistic (average distance of group members to the PCoA group centroid) is tested by permutation. Bray-Curtis distances of standardized compositional data were used. We also computed Tukey honest significant differences to investigate the differences between bacterial composition dispersion among gut parts. The statistical probabilities of np-MANOVA and PERMDISP were based in 999 permutations for each test. We also created Venn diagrams to illustrate the number of sharing taxa between gut parts. All analysis and plots were done in R 3.4.0 (R Core Team 2017).

## Results

### Data summary

A total of 300 recombinant plasmids were sequenced and 219 (73%) sequences were identified at genus level. Post-processing sequences length was between 1372 bp and 1662 bp. Most of the 219 sequences were assigned at genus level with 97-100% of identity except for 20 sequences of *Lactobacillus* that were recorded with 95-96% of identity. One sequence was low-quality, 5 sequences were of chloroplast in origin and the others 75 sequences couldn’t be classified in genus level using the criterion of  $\geq 95\%$  of identity. However, the assignments of these 75 sequences were gradually recovered for the higher taxonomic classifications, reaching 87% of assignment (260 sequences) in family level (similarity  $\geq 92\%$ ) until 100% of assignment in phylum level for  $\geq 85\%$  of identity. The majority of the taxonomic classifications were similar in NCBI and RDP databases, but in a few cases when a sequence had no taxonomic assignment in RDP (unclassified or identity  $\leq$  criterion) it had

conflicting classification in NCBI (e.g. two or three species/genus with the same indices of similarity). Discrepancies were then resolved based on RDP confidence and BLAST percentage identity.

## **Gut bacterial composition**

### *Analysis of environmental influence*

We performed a permutational multivariate analysis of variance (np-MANOVA) to test whether the *M. seminigra* gut bacterial composition differed according to bee colony's habitat (GPA and RB) and the gut part (crop/foregut, midgut and hindgut). No significant differences were found between the two sites (**Table 1**): the gut bacterial composition of *M.seminigra* bees at any taxonomic level was similar, independently of the colony of origin. An overview of the gut composition of *M. seminigra* bees shows a total of 13 different bacteria genera being the *Lactobacillus* the most dominant (highest number of clones) (**Fig.2**). The genera *Snodgrasella* and *Bifidobacterium*, commonly associated to corbiculate bees, were detected in similar relative abundance of the environmental bacteria *Pectinatus* and *Rosenbergiella*. Some genera were detected just once (1 sequence/clone): *Lactococcus*, *Tatumella*, *Anaplasma*, *Fructobacillus* and *Bombella* (**Fig.2**). Looking at family taxonomic level, for which there were more assigned sequences, we can observe again the preponderance of Lactobacillaceae members followed by Acetobacteraceae, Enterobacteriaceae and Bifidobacteriaceae respectively (**Fig.3**). Especially, there was an increase in Acetobacteraceae members, because they couldn't be assigned to genus level for  $\geq 95\%$  similarity (**Fig.3**). Sequences of Prevotellaceae bacteria were only detected in family taxon assignment and specifically in the hindgut samples (**Fig.3**).

### *Analysis of gut parts' bacterial colonization*

We tested if the bacterial colonization differed between the morphofunctional parts of the gut of *M. seminigra*: crop, midgut and hindgut. The ordination method of Principle Coordinates Analysis (PCoA) showed three distinct clusters in the gut's bacterial composition, which coincide with the morphofunctional separation of the gut (**Fig.2** and **Fig.3**). The np-MANOVA analysis supported these differences for all taxonomic levels (**Table 1**, **Fig. S2**) and the pairwise *post hoc* test pointed that the three gut parts differ from each other in terms of bacterial composition (**Table 1**). The Lactobacillaceae was the only taxa present across all the gut's parts samples and just one pooled sample of midgut did not present it (**Fig.3**). In

general, *Lactobacillus* genus – and Lactobacillaceae family -commonly occurred at high abundance in samples (**Fig.2** and **Fig.3**). Acetobacteraceae members were also found in all the gut's parts but not in all samples/colonies (**Fig.3**). The Honey bee core hindgut bacteria *Snodgrassella* was exclusively found in the hindgut samples of *M. seminigra*. The other honey bee core hindgut *Bifidobacterium* was also exclusively found in the hindguts except for one sample of midgut (**Fig.2**).

The crop bacterial composition of *M. seminigra* seems to be more homogeneous than the bacterial composition of midgut and hindgut, which are both highly variable (**Fig.4**, **Table 2**). The higher variation in bacterial composition of midgut and hindgut compared to the crop is congruent with the genera's diversity found in these parts whereas crop microbiota is essentially lactobacillary (**Fig. 3**). The dispersion pattern of the gut bacterial composition along the morphofunctional parts was also observed in all taxonomic levels (Phylum, Class, Order and Family) (**Table 2**, **Fig S3**), which have more information of composition (more taxonomic assigned sequences).

## Discussion

Symbiotic microbiota can be shaped by a variety of factors of the host lifestyle such as diet, reproduction and social grouping. In social bees, the sociality seems to be a guiding force for the development and maintenance of bees microbiota[21]; honey bees are the best example of it: they harbor a distinctive and specialized gut microbiota which transmission between generations is supported by social contact[33, 34]. Bumble bees also share some features of honey bees microbiota, but the eusocial stingless bees (Meliponini), besides being underexploited, come to light as a heterogeneous group [10, 21, 22]. How and if the sociality shapes Meliponini bees microbiota is unknown and there is a need for extending the microbial research and sampling effort in this group. In this work we focused in an Amazonian stingless bee that has not been studied before, the *Melipona seminigra*. This species is widely distributed in central Amazon and it has great social and economic value in meliponiculture [26]. Microbiota information related to meliponas bees are scanty [10, 28] and null for Amazonian native species.

In order to test whether the colony site could be a source of variation in the bacterial composition of *M. seminigra* gut, as observed for other Meliponini species in which the microbiomes differed between colonies [21, 22], we collected bees from two different sites

(Fig.1). The two meliponaries are distant at least 15 km from each other and consequently the bees cannot migrate between them. Neither the different colonies from a single site nor the colonies from different meliponaries showed significant differences in the bee gut bacterial composition. These findings are in agreement with Kwong and colleagues [21] proposition that host identity is more important than geographic factor for determining gut microbiome composition. Habitats had also minor effect on gut microbial communities of bumble bees [35].

Since the colony of origin had no significant effect on the gut bacterial composition, samples of bees from both meliponaries were considered as a single set of data for subsequent analyses. The PCoA ordination and np-MANOVA revealed a specific pattern of bacterial distribution in the *M. seminigra* bee gut. The morphofunctional parts of *M. seminigra* gut - crop, midgut and hindgut - showed different structures in terms of bacterial composition. Midgut and hindgut organs held more diversity of taxa than crop. The crop mostly consisted of Lactobacillaceae members and a few sequences of Acetobacteraceae were detected, one of them assigned to *Bombella* genus. One unique sequence of *Fructobacillus* (family: Leuconostaceae) was also found in *M. seminigra* crop [36, 37]. As an acidic sugar-rich environmental, the crop is dominated by lactic-acid bacteria (LAB) and acetic-acetic bacteria (AAB) [7, 19]. These results are in line with the findings for honey bees' crop and other meliponini bees [12, 28, 38]; the taxon *Bombella* has been recently proposed as a new genus of acetic-acid bacteria, first isolated in bumble bee crop [39]. One sequence of *Spiroplasma* bacterium was observed in crop and also it was detected in one sample of midgut. *Spiroplasma* is typically found in the gut or haemolymph of insects and it has been reported as an opportunistic bee pathogen [40]. Probably it was in transit from crop to the distal parts of the gut. The crop is the distensible part of the foregut that is used for collection, storage and transport of nectar and water to hive. Because it is frequently filled and emptied with nectar, it has been discussed that crop microbiota is transient and tightly associated with the pollination environment and colony food stores [36, 41].

Although Lactobacillaceae bacteria members were found in high abundance in all the gut parts, for midgut and hindgut samples other taxa also made up the bacterial community. In terms of taxa diversity, the bacterial microbiota of midgut and hindgut were statistically similar (PCoA dispersal) but their compositions were statistically distinct (PCoA ordination). These data suggest that midgut and hindgut have each one an exclusive set of bacteria that possibly play specific functions in these niches. *Anaplasma* (family:

Anaplasmataceae), Moraxellaceae (four sequences assigned to *Acinetobacter* genus) and Streptococcaceae bacteria were solely detected in midgut samples. *Anaplasma* and other members of Anaplasmataceae are known pathogens of vertebrates and invertebrates animals [42] but this genus hadn't been described in bees so far. Bacteria from *Acinetobacter* genus are composed of ubiquitous gram negative and non-fermenting coccobacilli bacteria that have been reported in several habitats as soil, water and sludge [43]; they are also abundant in floral nectar of many plant species and it is probably environmentally acquired by the bees [44–46]. The midgut exclusive taxon Streptococcaceae was detected in two different colonies, two sequences in total being one assigned to *Lactococcus*. Green plants are the natural habitat for the LAB lactococci but nowadays they are widely used in industrial process (*i.e.* food fermentation) [47]. *Lactococcus* species are not commonly associated to bees, albeit they have been reported in termites hindguts [48]. Other environmental taxa in origin were detected in midgut and also shared with hindgut: *Rosenbergiella* (family: Enterobacteriaceae), *Pectinatus* (Veillonellaceae), Acetobacteraceae, Leuconostocaceae and other Enterobacteriaceae members, and they have been described in honey bees colonies (hive components and individuals) [21, 38, 45, 49, 35]. These bacteria were also detected in other Meliponini bees' gut [21, 22].

The prevalence in midgut of taxa from environmental origin suggests that the external conditions may play a role in shaping midgut bacterial composition. Ludvigsen et al [50] revealed that the honey bee midgut/pyloric shifts the bacterial composition throughout the season probably because of environmental/dietary changes. The bee midgut is the main site for digestion and absorption of food and it is formed by a secretory epithelium that is not considered suitable for bacterial colonization as it secretes a continuously shed chitinous material called the peritrophic membrane [51], with similar functions to the mucus in human gut. There are a very few bacteria in midgut of honey bees and this microbiota is actually restricted to pylorus site in transition with ileum [34]. Using only cloning methodology, as in this work, we are not able to quantify bacteria population in the *M.seminigra* gut. The relative abundance gives us an idea of the dominant phylotypes but inferences in respect to bacteria amount should be done with caution. It is expected that midgut community be much less abundant than hindgut one, even though they be similar in diversity of taxa. The midgut bacterial diversity showed here for *M.seminigra* seems to be bigger than honey bee's midgut microbiota [34]; we still do not know if these bacteria are transient, real colonizers of the

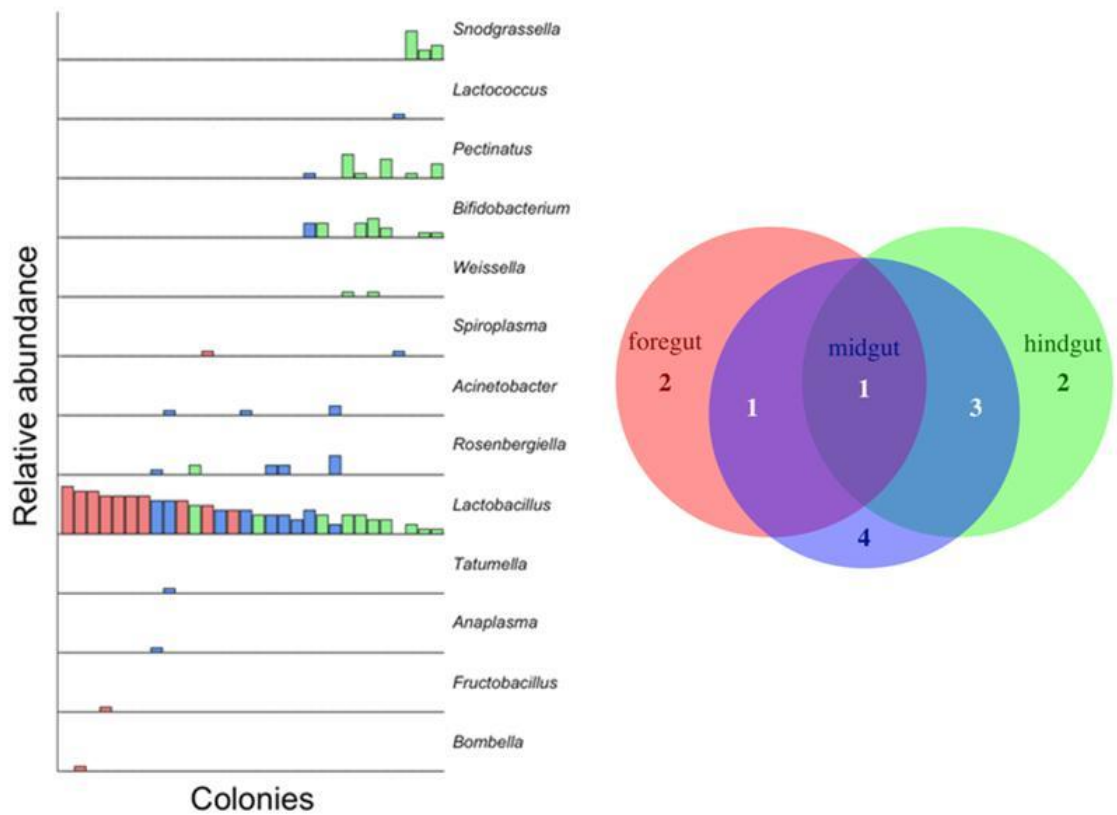
midgut or if this diversity of taxa is a reflection of the pylorus/ileum transition site that may have been pooled together with midgut samples during the gut dissection.

The hindgut is divided in two compartments, the ileum and the rectum, and in honey bees they show different bacterial composition and abundance [34, 33]. Honey bee's hindgut is colonized mainly by a specialized Gram-positive LAB microbiota (*Lactobacillus* and *Bifidobacterium*) and by two ubiquitous Gram-negative species, the *Snodgrassella alvi* and *Gilliamella apicola*[34, 52]. These species are host-restricted and generally absent outside adult guts and they have been proposed as the core of the corbiculate gut microbiome [21]. The high relative abundance of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* members in *M. seminigra* in addition to the presence of *Snodgrassella* in a few colonies indicate that these Amazonian bees resemble honey and bumble bees in some aspects of bacterial composition as well some Meliponini bees [21]. Two colonies of *M. seminigra* also exhibited *Weissella* (Leuconostocaceae) bacteria in their hindgut samples, a LAB that is associated with bumble bee gut microbiota [53]. Yet, members of Prevotellaceae are rarely reported in bee hive [41] and they were detected in hindguts samples. Prevotellaceae are typically found in rumen where they are involved with food digestion [54].

Taken together our results show that *M. seminigra* gut microbiota displays a compositional structuring that follows the morphofunctional division of the gut. It is not clear if this spatial organization is an indicative of any level of microbiota specialization in this Amazonian bee; it deserves further study to better characterize the gut bacterial lineages in *M. seminigra* gut. We corroborate the hypothesis that corbiculate bees harbor a small set of core gut bacteria, represented in *M. seminigra* bees by the recurring *Lactobacillus* genus and also the *Bifidobacterium* and *Snodgrassella* members. However, the presence of environmental bacteria in many samples of *M. seminigra* gut could be an evidence of the Amazon forestry influence in the evolution and shaping of these native bees microbiota.

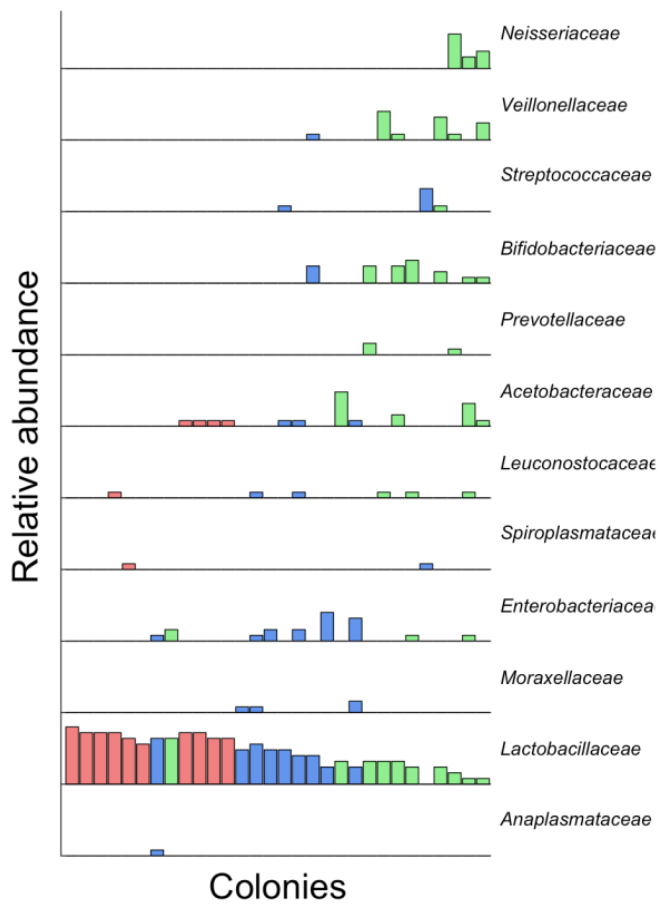
**Table 1.** Summary of np-MANOVA results of *M. seminigra* bacterial composition at different taxonomical levels as a factor of meliponary site and gut part. Significant results are in bold.

	Phylum		Class		Order		Family		Genus		
	Df	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P
<b>Site</b>	1	0.041	0.182	0.019	0.498	0.016	0.636	0.018	0.657	0.010	0.913
<b>GutPart</b>	2	0.326	<b>0.002</b>	0.378	<b>0.001</b>	0.367	<b>0.001</b>	0.311	<b>0.001</b>	0.294	<b>0.001</b>
<b>Residuals</b>	26	0.633		0.602		0.617		0.670		0.696	



**Fig.2. Spatial organization of the gut bacteria in *Melipona seminigra* bees at genus taxonomic level. a) PCoA ordination of the bacterial composition. b) Venn Diagram representing unique and shared bacterial genera between the the crop, midgut and hindgut. Crop= pink, Midgut= blue and Hindgut= green.**

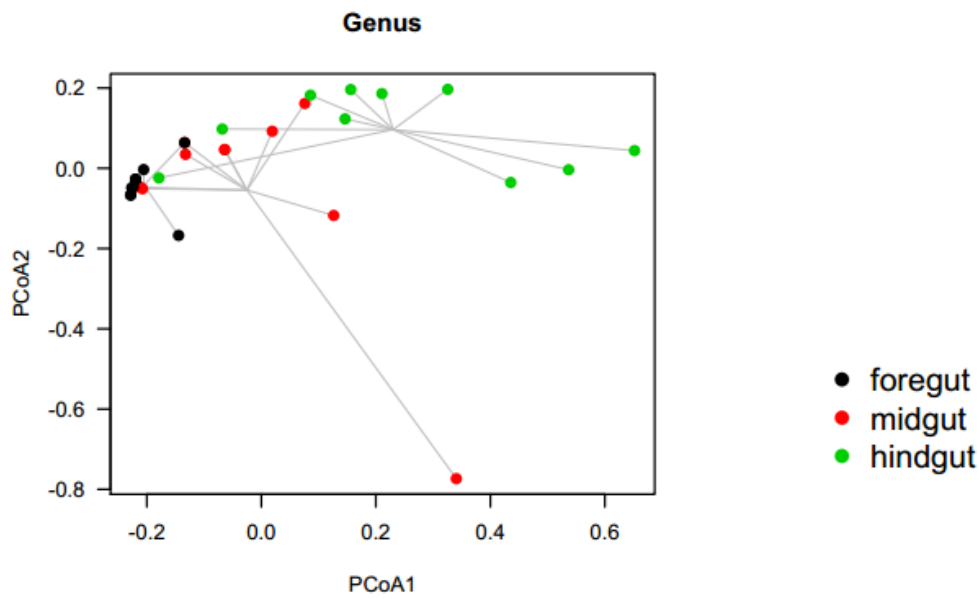




**Fig.3. Spatial organization of the gut bacteria in *Melipona seminigra* bees at family taxonomic level.** PCoA ordination of the bacterial composition. Crop= pink, Midgut= blue and Hindgut= green.

**Table 2.** Summary of PERMDISP results of *M.seminigra* overall bacterial heterogeneity at different taxonomical levels

	Phylum			Class			Order			Family		Genus
	Df	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	
<b>Gut Part</b>	2	11.01	< 0.001	18.30	< 0.001	20.52	< 0.001	13.05	< 0.001	12.68	< 0.001	
<b>Residuals</b>	27											

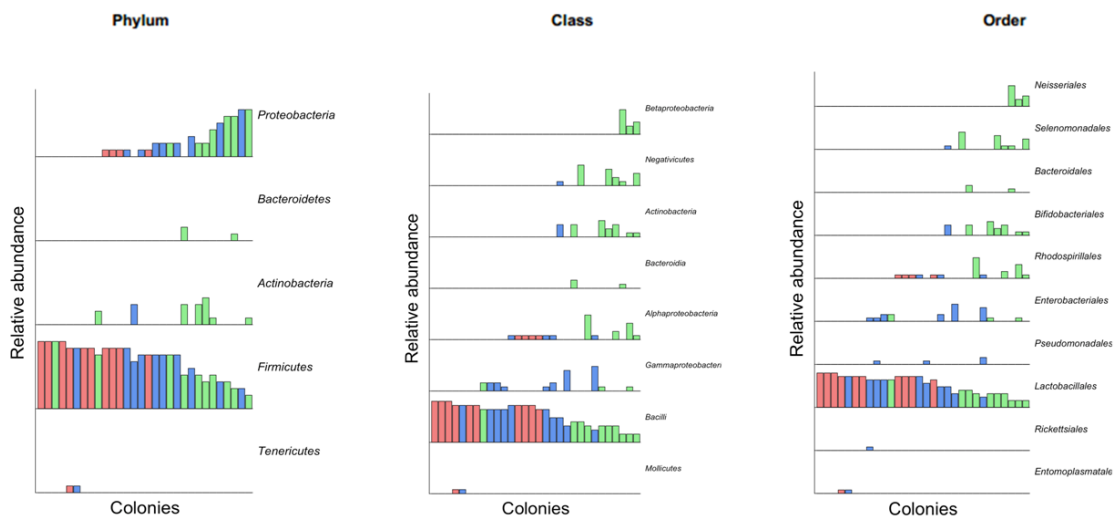


**Fig.4. Heterogeneity of bacterial composition of the morphofunctional parts of *Melipona seminigra* gut.** Each circle represents a different sample/colony for each gut part (10 samples for crop, 10 samples for midgut and 10 samples for hindgut).

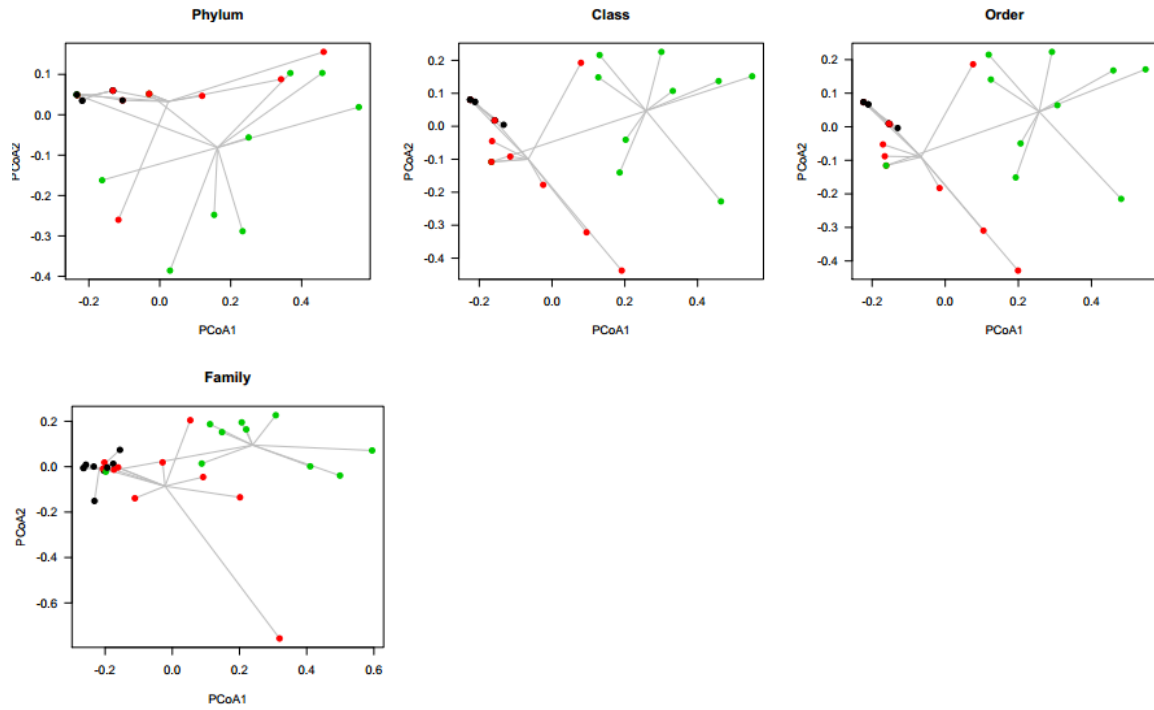
**SUPPLEMENTARY MATERIAL:**

(Figures merged in PDF file)

**Fig. S2. Spatial organization of the gut bacteria in *Melipona seminigra* bees in Phylum, Class and Order taxonomic levels.** Crop= pink; Midgut= blue and Hindgut= green.



**Fig.S3. Heterogeneity of bacterial composition of the morphofunctional parts of *Melipona seminigra* gut in Phylum, Class, Order and Family taxonomic levels. Foregut/crop= black, Midgut= red and hindgut= green.**



## References

1. Feldhaar H, Gross R (2009) Insects as hosts for mutualistic bacteria. *Int J Med Microbiol* 299:1–8. doi: 10.1016/j.ijmm.2008.05.010
2. Feldhaar H (2011) Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecol Entomol* 36:533–543. doi: 10.1111/j.1365-2311.2011.01318.x
3. Dillon R, Dillon V (2004) THE GUT BACTERIA OF INSECTS: Nonpathogenic Interactions. *Annu Rev Entomol* 71–92. doi: 10.1146/annurev.ento.49.061802.123416
4. Gross R, Vavre F, Heddi A, et al (2009) Immunity and symbiosis. *Mol Microbiol* 73:751–759. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06820.x
5. Koskella B (2014) Research highlights for issue 5: the role of the microbiome in shaping evolution. *Evol Appl* 7:519–20. doi: 10.1111/eva.12167
6. Turner JS (2004) Extended phenotypes and extended organisms. *Biol Philos* 19:327–352. doi: 10.1023/B:BIPH.0000036115.65522.a1
7. Anderson KE, Sheehan TH, Eckholm BJ, et al (2011) An emerging paradigm of colony health: Microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Soc* 58:431–444. doi: 10.1007/s00040-011-0194-6
8. McFrederick QS, Wcislo WT, Hout MC, Mueller UG (2014) Host species and developmental stage, but not host social structure, affects bacterial community structure in socially polymorphic bees. *FEMS Microbiol Ecol* 88:398–406. doi: 10.1111/1574-6941.12302
9. Anderson KE, Rodrigues PAP, Mott BM, et al (2016) Ecological Succession in the Honey Bee Gut: Shift in *Lactobacillus* Strain Dominance During Early Adult Development. *Microb Ecol* 71:1008–1019. doi: 10.1007/s00248-015-0716-2
10. Koch H, Abrol DP, Li J, Schmid-Hempel P (2013) Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees. *Mol Ecol* 22:2028–2044. doi: 10.1111/mec.12209
11. Kwong WK, Moran NA (2016) Gut microbial communities of social bees. *Nat Rev Microbiol* 14:374–384. doi: 10.1038/nrmicro.2016.43
12. Olofsson TC, Vásquez A (2008) Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Curr Microbiol* 57:356–363. doi: 10.1007/s00284-008-9202-0
13. Babendreier D, Joller D, Romeis J, et al (2007) Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiol*

- Ecol 59:600–610. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00249.x
14. Engel P, Martinson VG, Moran N a (2012) Supplementary Information ( SI ) Appendix “ Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee ” Table of contents Supplementary Figures 1-8 Supplementary Tables 1-5 Supplementary Materials and Methods References Supplementary Figures. Proc Natl Acad Sci U S A. doi: 10.1073/pnas.1202970109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1202970109
  15. Moran NA, Hansen AK, Powell JE, Sabree ZL (2012) Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. PLoS One 7:1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0036393
  16. Cox-foster DL, Conlan S, Holmes EC, et al (2007) A Metagenomic Survey of Collapse Disorder. October 318:283–287. doi: 10.1126/science.1146498
  17. Koch H, Schmid-Hempel P (2011) Bacterial Communities in Central European Bumblebees: Low Diversity and High Specificity. Microb Ecol 62:121–133. doi: 10.1007/s00248-011-9854-3
  18. Kwong WK, Moran NA (2015) Evolution of host specialization in gut microbes: The bee gut as a model. Gut Microbes 6:214–220. doi: 10.1080/19490976.2015.1047129
  19. Martinson VG, Danforth BN, Minckley RL, et al (2011) A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. Mol Ecol 20:619–628. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04959.x
  20. Li J, Powell JE, Guo J, et al (2015) Two gut community enterotypes recur in diverse bumblebee species. Curr Biol. doi: 10.1016/j.cub.2015.06.031
  21. Kwong WK, Medina LA, Koch H, et al (2017) Dynamic microbiome evolution in social bees. Sci Adv 3:1–17. doi: 10.1126/sciadv.1600513
  22. Leonhardt SD, Kaltenpoth M (2014) Microbial communities of three sympatric Australian stingless bee species. PLoS One 9:e105718. doi: 10.1371/journal.pone.0105718
  23. McFrederick QS, Thomas JM, Neff JL, et al (2016) Flowers and Wild Megachilid Bees Share Microbes. Microb Ecol. doi: 10.1007/s00248-016-0838-1
  24. McFrederick QS, Wcislo WT, Taylor DR, et al (2012) Environment or kin: Whence do bees obtain acidophilic bacteria? Mol Ecol 21:1754–1768. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05496.x
  25. J. M. F. Camargo & S. R. M. Pedro (2013) Moure’s Bee Catalogue.

- <http://moure.cria.org.br/catalogue?id=34135>. Accessed 17 May 2017
26. Carvalho-Zilse, G.A. Nunes-Silva C. (2012) Threats to stingless.
  27. Vit P, Roubik DW, Pedro SRM (2012) Pot-Honey: A legacy of stingless bees. *Pot-Honey A Leg Stingless Bees* 1–654. doi: 10.1007/978-1-4614-4960-7
  28. Vásquez A, Forsgren E, Fries I, et al (2012) Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0033188
  29. Engel P, Kwong WK, McFrederick Q, et al (2016) The bee microbiome: Impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *MBio*. doi: 10.1128/mBio.02164-15
  30. Altschul SF, Gish W, Miller W, et al (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
  31. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73:5261–5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07
  32. Cole JR, Wang Q, Fish JA, et al (2014) Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 42:633–642. doi: 10.1093/nar/gkt1244
  33. Powell JE, Martinson VG, Urban-Mead K, Moran NA (2014) Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Appl Environ Microbiol* 80:7378–7387. doi: 10.1128/AEM.01861-14
  34. Martinson VG, Moy J, Moran NA (2012) Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Appl Environ Microbiol* 78:2830–2840. doi: 10.1128/AEM.07810-11
  35. Cariveau DP, Elijah Powell J, Koch H, et al (2014) Variation in gut microbial communities and its association with pathogen infection in wild bumble bees (*Bombus*). *ISME J* 8:2369–79. doi: 10.1038/ismej.2014.68
  36. Endo A, Salminen S (2013) Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Syst Appl Microbiol* 36:444–448. doi: 10.1016/j.syapm.2013.06.002
  37. Endo A, Futagawa-Endo Y, Dicks LMT (2009) Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructose-rich niches. *Syst Appl Microbiol* 32:593–600. doi: 10.1016/j.syapm.2009.08.002

38. Corby-Harris V, Maes P, Anderson KE (2014) The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. PLoS One. doi: 10.1371/journal.pone.0095056
39. Li L, Praet J, Borremans W, et al (2015) *Bombella intestini* gen. nov., sp. nov., an acetic acid bacterium isolated from bumble bee crop. Int J Syst Evol Microbiol 65:267–273. doi: 10.1099/ijs.0.068049-0
40. Schwarz RS, Teixeira ÉW, Tauber JP, et al (2014) Honey bee colonies act as reservoirs for two *Spiroplasma* facultative symbionts and incur complex, multiyear infection dynamics. Microbiologyopen 3:341–55. doi: 10.1002/mbo3.172
41. Anderson KE, Sheehan TH, Mott BM, et al (2013) 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. doi: 10.1371/journal.pone.0083125
42. Pruneau L, Moumène A, Meyer DF, et al (2014) Understanding Anaplasmatocae pathogenesis using “Omics” approaches. Front Cell Infect Microbiol 4:86. doi: 10.3389/fcimb.2014.00086
43. Al Atrouni A, Joly-Guillou M-L, Hamze M, Kempf M (2016) Reservoirs of Non-baumannii *Acinetobacter* Species. Front Microbiol 7:49. doi: 10.3389/fmicb.2016.00049
44. Fridman S, Izhaki I, Gerchman Y, Halpern M (2012) Bacterial communities in floral nectar. Environ Microbiol Rep 4:97–104. doi: 10.1111/j.1758-2229.2011.00309.x
45. Aizenberg-Gershtein Y, Izhaki I, Halpern M (2013) Do Honeybees Shape the Bacterial Community Composition in Floral Nectar? PLoS One. doi: 10.1371/journal.pone.0067556
46. Alvarez-Perez S, Lievens B, Jacquemyn H, Herrera CM (2013) *Acinetobacter nectaris* sp. nov. and *Acinetobacter boissieri* sp. nov., isolated from floral nectar of wild Mediterranean insect-pollinated plants. Int J Syst Evol Microbiol 63:1532–1539. doi: 10.1099/ijs.0.043489-0
47. Alemayehu D, Hannon JA, McAuliffe O, Ross RP (2014) Characterization of plant-derived lactococci on the basis of their volatile compounds profile when grown in milk. Int J Food Microbiol 172:57–61. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.024
48. Bauer S, Tholen A, Overmann J, Brune A (2000) Characterization of abundance and diversity of lactic acid bacteria in the hindgut of wood- and soil-feeding termites by

- molecular and culture-dependent techniques. Arch Microbiol 173:126–37.
49. Corby-Harris V, Snyder LA, Schwan MR, et al (2014) Origin and effect of Alpha 2.2 Acetobacteraceae in honey bee larvae and description of *Parasaccharibacter apium* gen. nov., sp. nov. Appl Environ Microbiol. doi: 10.1128/AEM.02043-14
  50. L J, R A, A E, et al (2015) Shifts in the Midgut / Pyloric Microbiota Composition within a Honey Bee Apiary throughout a Season. 30:235–244. doi: 10.1264/jsme2.ME15019
  51. Engel P, Moran NA (2013) The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. FEMS Microbiol Rev 37:699–735. doi: 10.1111/1574-6976.12025
  52. Kwong WK, Moran NA (2013) Cultivation and characterization of the gut symbionts of honey bees and bumble bees: description of *Snodgrassella alvi* gen. nov., sp. nov., a member of the family Neisseriaceae of the Betaproteobacteria, and *Gilliamella apicola* gen. nov., sp. nov., a member of Orbaceae fam. nov., Orbales ord. nov., a sister taxon to the order “Enterobacteriales” of the Gammaproteobacteria. Int J Syst Evol Microbiol 63:2008–2018. doi: 10.1099/ijs.0.044875-0
  53. Praet J, Meeus I, Cnockaert M, et al (2015) 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, Int J Gen Mol Microbiol 107:1337–1349. doi: 10.1007/s10482-015-0429-z
  54. Creevey CJ, Kelly WJ, Henderson G, Leahy SC (2014) Determining the culturability of the rumen bacterial microbiome. Microb Biotechnol 7:467–79. doi: 10.1111/1751-7915.12141



## 6. CONCLUSÃO GERAL

As abordagens metodológicas deste trabalho permitiram elucidar microrganismos simbióticos associados a colônias da abelha amazônica sem ferrão *Melipona seminigra*. Estão aqui catalogados os principais gêneros de bactérias envolvidos no armazenamento e maturação do pólen bem como bactérias endossimbióticas colonizadoras do intestino dessa abelha. A comunidade bacteriana do intestino é, em geral, abundante em bactérias Lactobacillales (filo: Firmicutes), mas também apresenta um pequeno conjunto de taxóons que colonizam diferencialmente as três partes morfofuncionais deste intestino. O papo/intestino anterior apresenta uma comunidade homogênea dominada por *Lactobacillus* enquanto os intestinos médios e posteriores abrigam uma maior diversidade de filotipos, tais como Enterobacteriales, Bifidobacteriales, Selenomonadales e Pseudomonadales. A estruturação composicional da microbiota intestinal aponta para possíveis processos de co-evolução e especialização entre essas abelhas e suas bactérias, relação a qual tem sido amplamente utilizada para o entendimento da filogenia e evolução de abelhas sociais. Bactérias do ácido láctico (LAB) (ex: *Lactococcus*, *Fructobacillus*, *Weissella* e *Lactobacillus*) foram detectadas no intestino das abelhas e também nos alimentos armazenados na colônia, embora em abundâncias relativas diferentes. Esse compartilhamento da microbiota entre diferentes compartimentos da colônia – desde internamente no indivíduo até os nichos do ninho- refletem a continuidade e a interface existente entre a abelha e o seu ninho, reforçando a idéia da colônia como um superorganismo.

O uso combinado dos métodos dependentes e independentes de cultivo permitiu a detecção de 26 taxóons em amostras de pólen corbicular, pólen armazenado e alimento larval de *M.seminigra*. Predominantemente de origem ambiental, muitas das bactérias são reportadas como fermentadoras típicas, de grande aplicação industrial. Ao longo da rota do pólen, desde a sua compactação na corbícula da abelha até sua distribuição em células de cria para compor o alimento larval, três diferentes comunidades bacterianas foram caracterizadas: (1) a do pólen corbicular, (2) do pólen armazenado em potes na colônia e a do (3) alimento larval. A separação espacial e temporal da produção do pólen parece criar nichos bacterianos específicos que coletivamente garantem as condições adequadas para a maturação e preservação do pólen. Bactérias do gênero *Lactococcus* e *Corynebactrium*, ambas abundantes no pólen armazenado nos potes da colônia, foram aqui apontadas como as fermentadoras em potencial deste alimento.

O sequenciamento dos isolados obtidos com o cultivo bacteriano do pólen e alimento larval revelou uma fração da diversidade bacteriana não identificada pelo sequenciamento na plataforma Ion Torrent. As diferentes coberturas da mesma comunidade bacteriana apresentadas pelos dois métodos (dependentes e não dependentes de cultura) sugerem que ambos os métodos devam ser utilizados para uma completa representação da microbiota do pólen. O cultivo bacteriano é uma ferramenta importante que, além de auxiliar nos estudos de diversidade, permite acesso direto à biodiversidade. Os isolados bacterianos obtidos do cultivo do pólen e alimento larval apresentaram uma gama de produção de enzimas hidrolíticas, tais como amilases, celulasas, lípases e proteases. A versatilidade em produzir diferentes tipos de enzima associada aos altos índices de atividade enzimática aqui relatados (I.E) indicam o grande potencial das bactérias do pólen e alimento larval para a bioprospecção.

Este trabalho contribui com dados inéditos para o entendimento das relações simbióticas existentes em colônias de abelhas *M. seminigra*. A catalogação e análise da diversidade bacteriana associada a essas abelhas são um ponto de partida fundamental para os avanços nos estudos em microbiota dessa espécie (Apêndice D), a qual pode servir de modelo para estudos com abelhas sociais da Amazônia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCAIDE, M. et al. Identification and characterization of carboxyl esterases of gill chamber-associated microbiota in the deep-sea shrimp *Rimicaris exoculata* by using functional metagenomics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 6, p.2125-2136, 2015.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B. et al. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 1, p. 105–111, 2005.

ANDERSON, K. E. et al. An emerging paradigm of colony health: Microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). **Insectes Sociaux**, v. 58, n. 4, p. 431–444, 2011.

ANDERSON, K. E. et al. 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, 2013.

ANDERSON, K. E. et al. Hive-stored pollen of honey bees: Many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 23, p. 5904–5917, 2014.

BABENDREIER, D. et al. Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, n. 3, p. 600–610, 2007.

BIESMEIJER, J. C. (1997). The organization of foraging in stingless bees of genus *Melipona*: an individual-oriented approach. **PhD thesis**. Utrecht, Universität Utrecht, 263p.

BODE, H. B. Insect-Associated Microorganisms as a Source for Novel Secondary Metabolites with Therapeutic Potential. In: **Insect Biotechnology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011. p. 77–93.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular Microbial Diversity in Soils from Eastern Amazonia: Evidence for Unusual Microorganisms and Microbial Population Shifts Associated with Deforestation. **Brock Institute for Environmental Microbiology and the Department of Agronomy**, University of Wisconsin-Madison, *Madison*, v. 63, p. 2647-2653, 1997.

CARVALHO-ZILSE, G. A.; NUNES-SILVA, C. G. 2012. 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. 327 pp.

CAPORASO. Access : **QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data : Nature Methods**. Disponível em: <<http://www.nature.com/nmeth/journal/v7/n5/full/nmeth.f.303.html>>. Acesso em: 25 jun. 2017.

CHALLINOR, V. L.; BODE, H. B. Bioactive natural products from novel microbial sources. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1354, n. 1, p. 82–97, 2015.

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

COX-FOSTER, D. L. et al. A Metagenomic Survey of Collapse Disorder. **October**, v. 318, n. October, p. 283–287, 2007.

CRUZ-LANDIM, C. Bacteria present in the intestinal tract of *Melipona quadrifasciata* anthioides Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **J. Hym. Res.**, v. 5, p. 264-272, 1996.

DE ARRUDA, V. A. S. et al. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 2, p. 100–105, 2013.

DI PASQUALE, G. et al. Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–13, 2013.

ECKHARDT, M.; HAIDER, M.; DORN, S.; MULEER, A. Pollen mixing in pollen generalist solitary bees: a possible strategy to complement or mitigate unfavourable pollen properties? **Journal of Animal Ecology**, p. 1-10, 2013.

FEAS, X. et al. Organic bee pollen: Botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 8359–8377, 2012

FERNANDES-DA-SILVA, P. G.; SERRÃO, J. E. Nutritive value and apparent digestibility of bee-collected and bee-stored pollen in the stingless bee, *Scaptotrigona postica* Latr. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Apidologie**, v. 31, p. 39–45, 2000.

FLÓREZ-PATINO, L. V. et al. Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. **Natural Product Reports**, v.32, n.7, p. 904-936, 2015.

FOX, G. E. et al. Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, n. 10, p. 4537-4541, 1977.

GILLIAM, M. MICROBIOLOGY OF POLLEN AND BEE BREAD : THE GENUS BACILLUS. v. 10, n. 3, p. 269–274, 1979.

GILLIAM, M. *et al.* Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds. **Apidologie**, v.20, p.53-68, 1989.

GILLIAM, M. *et al.* Bacteria belonging to the genus *Bacillus* associated with three species of solitary bees. **Apidologie**, v.21, p. 99-105, 1990A.

GILLIAM, M., D. ROUBIK & B. LORENZ. Microorganisms associated with pollen, honey and brood provision in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. **Apidologie**, v. 21, p. 89-97, 1990B.

GILLIAM, M., D. ROUBIK & B. LORENZ. Microorganisms associated with pollen, honey and brood provision in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. **Apidologie**, v. 21, p. 89-97, 1990B.

GILLIAM, M. Original article Bacteria belonging to the genus Bacillus associated with three species of solitary bees \*. **Apidologie**, v. 21, p. 99–105, 1990.

GILLIAM, M. Identificación y roles de microorganismos no patógenos asociados con abejas melíferas. **FEMS Microbiology Letters**, v. 155, n. 1997, 1997.

HANDELSMAN, J.; HANDELSMAN, J. Metagenomics : Application of Genomics to Uncultured Microorganisms **Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669–685, 2004.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v.67, p. 597-607, 1975.

HARTFELDER, K. et al. Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 144–163, 22 mar. 2006.

HERBERT, E. W.; SHIMANUKI, H. OF BEE-COLLECTED AND BEE-STORED POLLEN nutrient status of the plant , methods of pollen extraction , and storage . Also this large physiological effects ( M ODD and B. 1978.

HUGHES, D. P.; PIERCE, N. E.; BOOMSMA, J. J. Social insect symbionts: evolution in homeostatic fortresses. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 23, n. 12, p. 672–677, 2008.

HUMAN, H.; NICOLSON, S. W. Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). **Phytochemistry**, v. 67, n. 14, p. 1486–1492, 2006.

KERR, W. K.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. (1996) **Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte: Acangaú.144p.

KIKUCHI, Y. Endosymbiotic Bacteria in Insects: Their Diversity and Culturability. **Microbes and Environments**, v. 24, n. 3, p. 195–204, 2009.

LEE, F. J. et al. Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. **Environmental Microbiology**, v. 17, p. 796–815, 2014.

LOPER. Biochemistry and microbiology of bee collected almond pollen and bre bread. **Apidologie**, v. 11, n. 1, p. 63–732, 1980.

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

MAO, D.-P. et al. Coverage evaluation of universal bacterial primers using the metagenomic datasets. **BMC microbiology**, v. 12, n. June, p. 66, 2012.

MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends in Genetics**, v. 24, n. 3, p. 133–141, 2008.

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.

MATTILA, H. R. et al. Characterization of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. [s.l: s.n.]. v. 34

//////////

PACINI, E.; HESSE, M. Pollenkitt - Its composition, forms and functions. **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 200, n. 5, p. 399–415, 2005.

RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annual Reviews of Microbiology**, v.57, p. 369-394, 2003

REBELO, K. S.; FERREIRA, A. G.; CARVALHO-ZILSE, G. A. Physicochemical characteristics of pollen collected by Amazonian stingless bees. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 927–932, 2016.

ROULSTON, T. H.; CANE, J. H. Pollen nutritional content and digestibility for animals. **Plant Systematics and Evolution**, v. 222, n. 1–4, p. 187–209, 2000.

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, 2012.

SALEM, H. et al. An out-of-body experience: the extracellular dimension for the transmission of mutualistic bacteria in insects. **Proc Biol Sci.**, v. 282, n. 1804, 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. Y. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3 edn. Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, n. 14, p. 5435–5440, 2008.

SILVA, T. M. S. et al. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6–7, p. 507–511, 2006.

SILVEIRA, F. A. et al. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. 2002. Belo Horizonte: Fundação Araucária. 253p.

SINGH, J. et al. Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 4, p. 480–494, 2009.

SOUZA, R. C. D. S. et al. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região Amazônica. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 333–336, 2004.

STANDIFER, L.; MCCAUGHEY, W. Biochemistry and microbiology of pollen collected by honey bees (*Apis mellifera* L.) from almond, *Prunus dulcis*. ii. protein, amino acids and enzymes (1). ..., v. 11, n. 2, p. 163–171, 1980.

SUENAGA, H. Targeted metagenomics: A high-resolution metagenomics approach for specific gene clusters in complex microbial communities. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 13–22, 2012.

TURNER, J. S. Extended phenotypes and extended organisms. **Biology and Philosophy**, v. 19, n. 3, p. 327–352, 2004.

VANDERPLANCK, M. et al. How does pollen chemistry impact development and feeding behaviour of polylectic bees? **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2014.

VÁSQUEZ, A.; OLOFSSON, T. C. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. **Journal of Apicultural Research**, v. 48, n. 3, p. 189–195, 2009.

VÁSQUEZ, A. et al. Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. **Plos One**, v. 7, n. 3, 2012.

VIT, P.; ROUBIK, D. W.; PEDRO, S. R. M. Pot-Honey: A legacy of stingless bees. **Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees**, n. June 2015, p. 1–654, 2012.

VOLLET-NETO, A. et al. Newly emerged workers of the stingless bee *Scaptotrigona aff. depilis* prefer stored pollen to fresh pollen. 2016.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A. Definições das nomenclaturas utilizadas nesta tese.

Definições	
<b>Grão de pólen</b>	Gametófito masculino da planta.
<b>Pólen / Pólen floral</b>	Conjunto de grãos de pólen encontrados no estame da flor.
<b>Pólen corbicular (PC) / Pólen coletado</b>	O pólen aglutinado pelas abelhas forrageadoras em suas corbículas após coletá-lo das flores.
<b>Pólen estocado - (PPA ou PPF)</b>	Pólen armazenado pelas abelhas dentro do ninho. No caso das abelhas do gênero <i>Melipona</i> este pólen é armazenado dentro de potes de cerume. Enquanto o pólen está sendo depositado nos potes estes permanecem abertos e posteriormente as abelhas os fecham, com uma tampa de cerume. Aparentemente, não existe uma regra para o fechamento do pote de pólen pelas abelhas, porém os potes fechados normalmente estão preenchidos de pólen em seu volume total. Essa tese utiliza duas nomenclaturas para pólen estocado: <b>Pólen estocado em Potes Abertos (PPA)</b> e <b>Pólen estocado em Potes Fechados (PPF)</b> .
<b>Pólen maturado ou maduro</b>	Pólen fermentado, encontrado em potes de cerume fechados. Nas regiões norte e nordeste do Brasil é popularmente chamado de "saborá".
<b>Alimento larval (AL)</b>	Mistura composta por pólen, néctar e secreções da abelha, que serve de alimento para as larvas nas células de cria do ninho.

## APÊNDICE B .

### **Obtenção do material biológico**

As colônias de *Melipona seminigra* acessadas e os respectivos materiais coletados estão listados nas tabelas abaixo. As temperaturas médias do pólen de potes fechados e potes abertos foram respectivamente 30°C e 30.1°C. A temperatura média do alimento larval dos discos de cria coletados foi 29.8°C.



Alimento larval- obtido de colônias de abelhas *Melipona seminigra* do meliponário do GPA/INPA. Cada linha da coluna de “Disco de cria” informa quantos discos foram retirados da colônia e em parênteses a região da colônia de onde foram retirados. N° - Número.

<b>Dia da coleta</b>	<b>N° Colônia</b>	<b>N° experimental</b>	<b>Disco de cria</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Massa total (g)</b>
<b>10/12/2014</b>	<b>200</b>	<b>1</b>	2 discos sobrepostos em caracol (sobreninho/ninho)	Não foi medida	70 células = 5.8
	<b>203 filha</b>	<b>2</b>	1 Disco (sobreninho)	Não foi medida	60 células= 3.4
<b>12/12/2014</b>	<b>202</b>	<b>3</b>	1 Disco (sobreninho)	Não foi medida	2.7
	<b>166</b>	<b>4</b>	1 disco (sobreninho)	3 células: 29.4°C/ 29.5°C/30.1°C	5.5
	<b>180</b>	<b>5</b>	1 disco (sobreninho)	3 células : 29.3°C / 29.1°C/ 29.4°C	4.9
	<b>190</b>	<b>6</b>	1 disco (sobreninho)	3 células: 29.5°C/ 29.6°C/29.8°C	3.9
	<b>175</b>	<b>7</b>	1 disco (sobreninho)	3 células: 30.1°C/ 31.0°C/30.9°C	6.3
	<b>178</b>	<b>8</b>	1 disco (melgueira)	3 células: 29.7°C/29.5°C/29.7°C	4.8
<b>15/12/2014</b>	<b>170f</b>	<b>9</b>	1 disco (sobreninho)	3 células: 29.7°C/29.5°C/29.6°C	2.6
	<b>201f</b>	<b>10</b>	1 disco (sobreninho)	3 células: 30°C/30°C/30.2°C	1.0

Pólen- obtido de colônias de abelhas *Melipona seminigra* do meliponário do GPA/INPA. Cada linha da coluna de “Pote coletados” representa 1 unidade de pote e em parênteses a região da colônia de onde este pote foi retirado. N° - Número.

<b>Dia da coleta</b>	<b>N° Colônia</b>	<b>N° experimental</b>	<b>Potes coletados</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Massa total (g)</b>
04/12/2014	203filha	2	Fechado (melgueira)	32.5	4.5
			Fechado (melgueira)	32.5	
			Aberto (sobreninho)	32.3	4.8
			Aberto (ninho)	32.0	
09/12/2014	178	8	Fechado (ninho)	31.4°C	2.7
			Fechado (ninho)	32.0°C	
			Fechado (ninho)	31.5°C	
			Aberto (ninho)	31.4°C	2.1
			Aberto (Ninho)	31.4°C	
	201filha	10	Fechado (sobreninho)	32.4°C	2.7
			Fechado (sobreninho)	32.6°C	
			Fechado (sobreninho)	32.6°C	
			Aberto (sobreninho)	33.2°C	2.0
			Aberto (sobreninho)	32.9°C	
08/01/2015	202	3	Fechado (melgueira)	28.6	2.5
			Fechado (melgueira)	28.8	
			Fechado (sobreninho)	28.7	
			Aberto (melgueira)	29.1	1.9
			Aberto (ninho)	29.0	
	166	4	Fechado (sobreninho)	28.8	2.1
			Fechado (sobreninho)	28.8	
			Aberto (ninho)	29.0	2.2
			Aberto (ninho)	29.2	
	175	7	Fechado (sobreninho)	30.5	2.2
			Fechado (sobreninho)	30.6	
			Aberto (sobreninho)	30.5	2.1
			Aberto (sobreninho)	30.5	
			Aberto (sobreninho)	30.5	
12/01/2015	200	1	Fechado (melgueira)	29.6	2.3
			Fechado (melgueira)	29.5	
			Aberto	28.5	1.0
			Aberto	29.5	
	180	5	Fechado (sobreninho)	28.9	2.8
			Fechado(ninho)	28.8	
			Fechado (sobreninho)	28.7	
			Aberto (ninho)	29	3.0
			Aberto (ninho)	29.3	
	190	6	Fechado	28.1	2.4
			Fechado	28.0	
			Fechado	28.0	
			Aberto	29.0	2.3
			Aberto	28.9	
	170filha	9	Fechado	28.7	3.5
			Fechado	28.5	
			Fechado	28.5	
Aberto			28.8	0.96	
Aberto			28.9		

Pólen corbicular obtido de abelhas *Melipona seminigra* do meliponário do GPA/INPA. Para controle da temperatura, mediu-se a temperatura externa à colônia (do ambiente). N° - Número.

N° colônia	N° experimental	Data da coleta	N° abelhas	Tem.Externa/umidade	Massa total
202	3	29/06/2015	*	30.1°C / 76%	0.02g
		30/06/2015	*	29.3°C / 79%	
		02/07/2015	10 abelhas	28°C / 83%	0.166g
		07/07/2015	17 abelhas	26°C / 89%	0.1g
		08/07/2015	14 abelhas	26.8°C / 93%	0.79g
		09/07/2015	22 abelhas	27.5°C / 95%	
170f	9	15/07/2015_	15 abelhas	26.8°C / 86%	0,3
		16/07/2015_	12 abelhas	27.7°C / 86%	0,42
190	6	21/07/2015_	15 abelhas	27.7°C / 78%	0,77

## APÊNDICE C

### Receituário dos meios de cultura

- Nutriente Ágar HIMEDIA™, pH 7,4 +/- 0,2

ÁGAR NUTRIENTE	
Componente	Concentração
Digestão péptica de tecido animal	5g/L
Extrato de bife	1,5g/L
Extrato de levedura	1,5g/L
Cloreto de sódio	5g/L
Ágar	15g/L

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

BHI	
Componente	Concentração
Infusão cérebro-coração	8g/L
Digestão péptica de tecido animal	5g/L
Digestão pancreática da caseína	16g/L
Cloreto de sódio	5g/L
Dextrose	2g/L
Fosfato disódio	2.5g/L
Ágar	13.5g/L

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

<b>TSA</b>	
<b>Componente</b>	<b>Concentração</b>
Digestão pancreática da caseína	15g/L
Digestão papaica da farinha de soja	5g/L
Cloreto de sódio	5g/L
Ágar	15g/L

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

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

## APÊNDICE D

**Resumo dos gêneros bacterianos detectados em colônias de *Melipona seminigra*.** A presença do gênero nos diferentes ambientes está representada por um “X”. CP – pólen corbicular, PPA- Pólen de pote aberto, PPF – Pólen de pote fechado, AL- alimento larval.

Bactéria	Pólen				Intestino			
	Gênero	CP	PPA	PPF	AL	Anterior	Médio	Posterior
1	<i>Brevibacillus</i>		x	x	x			
2	<i>Bacillus</i>	x	x	x	x			
3	<i>Paenibacillus</i>		x	x	x			
4	<i>Aneurinibacillus</i>		x	x	x			
5	<i>Microbacterium</i>		x	x				
6	<i>Micrococcus</i>			x				
7	<i>Staphylococcus</i>	x	x	x	x			
8	<i>Convivina</i>				x			
9	<i>Kocuria</i>		x					
10	<i>Lysinibacillus</i>		x					
11	<i>Myroides</i>				x			
12	<i>Sporosarcina</i>		x					
13	<i>Williamsia</i>				x			
14	<i>Lactococcus</i>	x	x	x	x		x	
15	<i>Fructobacillus</i>	x	x	x		x		
16	<i>Streptococcus</i>	x	x					
17	<i>Propionibacterium</i>	x	x	x				
18	<i>Corynebacterium</i>	x	x	x				
19	<i>Dermacoccus</i>	x		x				
20	<i>Lactobacillus</i>	x	x	x	x	x	x	x
21	<i>Weissela</i>	x	x	x	x			
22	<i>Hylemonella</i>	x	x					
23	<i>Enterococcus</i>	x		x				
24	<i>Gordonia</i>	x	x	x	x			
25	<i>Stenotrophomonas</i>	x	x					
26	<i>Dysgonomonas</i>	x						
27	<i>Snodgrassella</i>							x
28	<i>Pectinatus</i>						x	x
29	<i>Bifidobacterium</i>						x	x
30	<i>Weissela</i>							x
31	<i>Spiroplasma</i>					x	x	
32	<i>Acinetobacter</i>						x	
33	<i>Rosenbergiella</i>						x	x
34	<i>Tatumella</i>						x	
35	<i>Anaplasma</i>						x	
36	<i>Bombella</i>					x		