



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA**

RELATÓRIO FINAL PIBIC 2012

**ESTUDO DA MICROBIOTA BACTERIANA DE
“WATER STRIDER” (*Limnogonus* sp.) DOS
ÍGARAPÉS DO CAMPUS UNIVERSITÁRIO**

ORIENTANDA: ANDRESSA CRISTINA DA S. BARROSO

COLABORADOR: THIAGO BARROS DO NASCIMENTO DE MORAIS

ORIENTADOR: PROF. DOUTOR TAKESHI MATSUURA

JUNHO / 2012



RELATÓRIO FINAL PIBIC 2012

ESTUDO DA MICROBIOTA BACTERIANA DE “WATER STRIDER” (*Limnogonus* sp.) DOS ÍGARAPÉS DO CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Relatório técnico científico em caráter final, apresentado como critério avaliativo das atividades desenvolvidas e seus respectivos resultados obtidos.

ORIENTANDA: ANDRESSA CRISTINA DA S. BARROSO

COLABORADOR: THIAGO BARROS DO NASCIMENTO DE MORAIS

ORIENTADOR: PROF. DOUTOR TAKESHI MATSUURA

JUNHO / 2012

SUMÁRIO

Resumo	5
1. Introdução	5
2. Objetivos	7
2.1. Geral	7
2.2. Específicos	7
3. Justificativa	8
4. Material e Métodos	9
4.1. Captura dos insetos.....	9
4.2. Processamento dos insetos.....	9
4.3. Isolamento da microbiota bacteriana	9
4.4. Identificação dos microrganismos.....	10
4.5. Determinação da sensibilidade aos antimicrobianos	10
4.6. Preservação dos microrganismos.....	10
5. Resultados e Discussão	11
5.1. Captura dos insetos.....	11
5.2. Isolamento da microbiota bacteriana total e patogênica do trato digestivo do inseto	11
5.3. Identificação das bactérias	13
6. Conclusões	14
7. Referências	14

Resumo

O inseto aquático “water strider” (*Limnogonus* sp.) é um animal exótico e pouco estudado. Sua capacidade de caminhar rapidamente sobre a água chama a atenção e desperta grande curiosidade científica e popular. O *habitat* deste animal é a água, tanto límpida quanto aparentemente suja. Conhecer a microbiota bacteriana deste inseto é importante para saber a relação destes microrganismos com o animal e também se estes podem ser reservatórios de microrganismos patogênicos de veiculação hídrica. Baseando-se nestas informações, o presente trabalho tem como objetivo determinar qual a microbiota bacteriana presente no water strider (*Limnogonus* sp.) e determinar os riscos que este inseto representa para a saúde humana.

1. Introdução

A água é um importante veículo de transmissão de doenças notadamente do aparelho intestinal. Os microrganismos patogênicos responsáveis por estas doenças atingem a água com os excretas de pessoas ou animais infectados, dando como conseqüências as doenças de transmissão hídrica. Em geral, os microrganismos comumente presentes na água podem ter seu habitat nas águas de superfície (FRANCO & LANDGRAAF, 2003), com isso torna-se importante o estudo da microbiota patogênica presente nos diferentes animais aquáticos dentre eles o water strider, sem designação em português, que é um Hemiptera aquático, da família Gerridae que faz parte do subfilo Hexapoda que pertence ao filo Artropoda, onde cerca de 85% das espécies animais conhecidas são de artrópodes, exercendo diversas funções e vivendo em diversos habitats do planeta (BRUSCA & BRUSCA, 2007), visto seu grande numero de indivíduos presentes no ambiente aquático.

O *Limnogonus* sp., um inseto predador possui as seguintes características: corpo curto e alongado, abdome abreviado em algumas espécies, longo em outros, superfície dorsal escura, preta e lustrosa, superfície ventral amarelada, cabeça direcionada para frente e larga, brilhante, lisa, tipicamente com um par de listras longitudinais sub laterais amarelas (SAMPAIO & PY-DANIEL, 1993).

Outra espécie de water strider muito encontrada é a *Brachymetra lata*, da subfamília Charmatometrinae, muito encontrada na região Norte do país e suas características são corpo laranja e comprimento em torno de um centímetro no indivíduo adulto (SHAW, 1933).

Estes insetos habitam águas continentais entre margens ou protegidas por fragmentos vegetais, podendo também colonizar com êxito poças temporárias; possui um sistema de flutuação que lhes permite não quebrar a tensão superficial da água e uma vez submersos, raramente recuperam-se, e morrem (ANDERSEN & POLHEMUS, 1976 *apud* SAMPAIO & PY-DANIEL, 1993).

O waterstrider tem como fonte de alimentação pequenas larvas de insetos aquáticos e terrestres que caem na água sugando-os com o auxílio de suas garras empurrando para sua boca (SKALICKY, 2012), uma vez que as larvas se alimentam por material orgânico os microrganismos patogênicos presentes na matéria orgânica podem ser transmitidos para o inseto e servem como veículo de contaminação do inseto pela sua ingestão juntamente com a própria poluição do seu habitat.

As principais patologias bacterianas de transmissão hídrica são as doenças diarréicas causadas por membros da família Enterobacteriaceae como as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. e *Yersinia* sp.; a cólera causada por *Vibrio cholerae*; e doenças menos comuns como a listeriose causada por *Listeria monocytogenes*; a tuberculose por *Mycobacterium tuberculosis*; graves infecções oportunistas por *Pseudomonas aeruginosa*; toxiinfecções por *Staphylococcus aureus* (FRANCO & LANDGRAAF, 2003).

Apesar de não haver relatos do water strider ser causador de alguma patologia humana, Portaels e colaboradores (2008) relataram o isolamento de *Mycobacterium ulcerans*, agente etiológico de lesões cutâneas em mamíferos, neste inseto, abrindo desta maneira precedente para a presença de outras bactérias patogênicas.

Para que seja possível constatar a presença do risco de contaminação hídrica associada à presença do Water Strider no meio aquático, o presente trabalho tem o objetivo de determinar quais as bactérias (totais e patogênicas) presentes no trato digestório de insetos aquáticos conhecidos como water strider.

2. Objetivos

2.1. Geral

- Estudar a microbiota bacteriana existente no water strider (*Limnogonus* sp.) e determinar a inter-relação das bactérias isoladas e seu papel como reservatório de doenças em humanos.

2.2. Específicos

- Isolar e identificar as bactérias totais do trato digestório do water strider (*Limnogonus* sp.);
- Isolar e identificar as bactérias do gênero *Staphylococcus* do trato digestório do water strider (*Limnogonus* sp.);
- Isolar e identificar as bactérias da família Enterobacteriaceae do trato digestório do water strider (*Limnogonus* sp.);
- Isolar e identificar as bactérias dos gêneros *Salmonella* e *Shigella* do trato digestório do water strider (*Limnogonus* sp.);
- Isolar e identificar as bactérias do gênero *Yersinia* do trato digestório do water strider (*Limnogonus* sp.);
- Isolar e identificar as bactérias do gênero *Pseudomonas* do trato digestório do water strider (*Limnogonus* sp.);
- Isolar e identificar as bactérias do gênero *Vibrio* do trato digestório do water strider (*Limnogonus* sp.);
- Isolar e identificar as bactérias do gênero *Mycobacterium* do trato digestório do water strider (*Limnogonus* sp.);
- Determinar a sensibilidade aos antimicrobianos das bactérias de interesse clínico isoladas.

3. Justificativa

Devido à ampla distribuição do water strider, ele é encontrado facilmente em diversos ambientes aquáticos naturais e seria capaz de contaminar as pessoas através da excreção na água e uma vez que possa ser reservatório das bactérias patogênicas, a propagação de microrganismos patogênicos de veiculação hídrica torna-se uma possibilidade.

Inicialmente, este projeto focou no estudo do water strider da espécie *Limnogonus* sp., no entanto, acreditamos que o atraso no cronograma de execução do projeto, que culminou no período de chuva dificultou a captura da espécie de water strider proposta. Assim, buscou-se, incessantemente, a captura do water strider *Limnogonus* sp., mas devido a ausência desta espécie, optou-se por estudar a espécie *Brachymetra lata* que sempre esteve presente nos igarapés nos dias de coleta.

Assim sendo, visando não interromper os estudos sobre o water strider procurou-se seguir o projeto com esta nova amostra.

O conhecimento das bactérias associadas ao water strider é importante para determinar a ecologia desse animal e as possibilidades que virão disto.

Outro ponto a ser verificado é que o water strider podendo viver em águas contaminadas, se estes insetos são capazes de resistir às infecções por estas bactérias patogênicas, o que aumenta ainda mais o interesse em se estudar as bactérias que as habitam internamente e determinar se seriam capazes de beneficiar o animal produzindo compostos bioativos para proteção do inseto.

Não menos importante, a exigüidade de informações sobre o water strider foi um fator que nos estimulou a realizar esta pesquisa.

4. Material e Métodos

4.1. Captura dos insetos

As coletas foram feitas em um dos Igarapés do Setor Sul do Campus da UFAM, localizado em uma trilha que começa por trás do Restaurante Universitário, onde procurou-se fazer as coletas em dias favoráveis a espécie de estudo, como dias de temperatura em torno de 37°C, dias ensolarados que refletiram na melhor visualização da espécie a ser capturada.

Os water striders foram capturados em período diurno, com auxílio de um puçá, armazenados em frasco limpo e transportados em caixa isotérmica para o Laboratório de Microbiologia para o devido processamento.

4.2. Processamento dos insetos

No Laboratório, os insetos foram submetidos ao processo de esterilização de superfície, através das soluções de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% m/v, solução de álcool etílico (EtOH) a 70% v/v e enxaguados em água destilada, por cinco minutos e um minuto, respectivamente, dissecados e trituração do trato digestório do inseto formando uma suspensão e posteriormente diluído em série para isolamento das bactérias (MATSUURA, 2001).

4.3. Isolamento da microbiota bacteriana

4.3.1. Bactérias totais do trato digestivo

Após o processamento do inseto, o isolamento da microbiota do trato digestivo foi realizado através da semeadura, através da técnica de *spread-plate*, no meio de cultura Ágar Sangue, e incubado a 30° C, por um período de até sete dias conforme a metodologia preconizada por MATSUURA (2001).

4.3.2. Bactérias patogênicas do trato digestivo

O volume de 0,1 mL da suspensão densa do trato digestivo, obtido no item anterior, seria semeado, através da técnica de spread-plate, nos meios de cultura abaixo citados e incubados a 37° C pelo período de 24 a 120h:

- Ágar EMB: isolamento de bactérias da família Enterobacteriaceae em geral;
- Ágar *Salmonella-Shigella*: isolamento dos gêneros *Salmonella* e *Shigella*;
- Ágar seletivo *Yersinia*: isolamento de bactérias do gênero *Yersinia*;
- Ágar TCBS: isolamento de bactérias do gênero *Vibrio*;
- Ágar GSP: isolamento de bactérias do gênero *Pseudomonas*;
- Ágar Chapman & Stone: isolamento do gênero *Staphylococcus*;
- Ágar Seletivo *Listeria*: isolamento de bactérias do gênero *Listeria*;
- Ágar Löwenstein-Jensen: isolamento do gênero *Mycobacterium*.

4.4. Identificação dos microrganismos

Os microrganismos isolados foram identificados através de métodos fenotípicos preconizados por HOLT *et al.* (1994), a saber, características morfotintórias como coloração de Gram, BAAR e esporos; e as provas bioquímicas e fisiológicas, tais como caracterização de amilase, fermentação de açúcares, utilização de citrato, respiração, motilidade, etc..

4.5. Determinação da sensibilidade aos antimicrobianos

Os microrganismos isolados serão testados quanto à sensibilidade aos antimicrobianos através da metodologia clássica de difusão em ágar segundo BAUER *et al.* (1966).

4.6. Preservação dos microrganismos

A preservação dos microrganismos foi procedida através da técnica de congelamento a -20° C conforme os procedimentos descritos em MURO & LUCHI (1989).

5. Resultados e Discussão

5.1. Captura dos insetos

Com a realização das coletas percebemos que existe exigüidade de *Limnogonus* sp. escolhida para este estudo, apesar de já ter sido descrita como uma espécie comum nos igarapés da UFAM. Exigüidade esta que podemos apontar pelo fato das coletas terem sido feitas em período chuvoso uma vez que segundo o cronograma deveria ter sido em período de seca. Assim, foram capturadas amostras da espécie *Brachymetra lata* da subfamília Charmatometrinae, descrita por Shaw (1933), evidenciando assim dados descritos em estudos realizados na região norte do país, mostrando a grande incidência das duas famílias, tanto no Amazonas quanto no Pará.

A espécie *Brachymetra lata* se caracteriza por apresentar um corpo laranja e comprimento em torno de um centímetro no indivíduo adulto.

5.2. Isolamento da microbiota bacteriana total e patogênica do trato digestivo do inseto

Com um resultado parcial onde nenhum inseto mostrou crescimento bacteriano a partir do trato digestório foram feitos ajustes metodológicos no que diz respeito à esterilização de superfície, onde foram testados inúmeras concentrações de NaOCl juntamente com a variação de tempo em que o inseto era exposto.

Após isso chegamos a uma concentração e um tempo que foi possível observar crescimento bacteriano a partir do trato digestório com a certeza de que a esterilização foi bem sucedida e que os microrganismos referem-se ao trato digestório do animal.

Outro ajuste feito foi a semeadura da suspensão do trato digestório do animal no meio de cultura ágar sangue, foi feita esta troca de meio de cultura onde o proposto era ser semeado em meios específicos, pois após alguns testes visto que o crescimento era nulo apostou-se na utilização do

meio ágar sangue por se tratar de um meio rico e não seletivo o que proporciona o crescimento geral.

O sexo e estágio de maturação do inseto predominante na captura foram de machos e adultos, respectivamente.

A tabela 1 mostra o total de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) provenientes de cada inseto coletado.

Tabela 01. Frequência de UFC, de acordo com o sexo e idade do inseto *Brachymetra lata*.

INSETO	SEXO	ESTADO DE MATURAÇÃO	BACTÉRIAS ISOLADAS (UFC)
BI 01	Macho	Adulto	0
BI 02	Fêmea	Adulto	2
BI 03	Macho	Adulto	1
BI 04	Macho	Adulto	0
BI 05	Macho	Adulto	0
BI 06	Macho	Adulto	0
BI 07	Macho	Adulto	5
BI 08	Macho	Adulto	0
BI 09	Macho	Adulto	2
BI 10	Macho	Adulto	1
TOTAL			11

Conforme observa-se na tabela 01, foram isolados 11 UFC, a partir de cinco insetos, mostrando que em outros cinco animais a metodologia de esterilização de superfície ainda não estava ajustada, pois nenhuma colônia foi isolada dos insetos.

A ausência de isolados em cinco insetos reforça ainda mais a importância do processo de ajuste da metodologia quanto à esterilização de superfície do animal. Por outro lado, com o isolamento de colônias nos outros cinco insetos mostra que estamos no caminho correto na adequação desta metodologia.

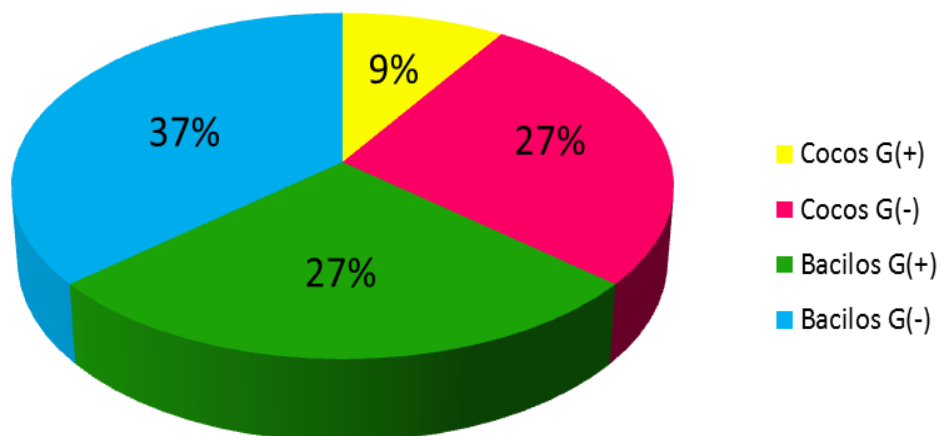
Em virtude da necessidade de adequação da metodologia de esterilização de superfície, características como sexo e estado de maturação

do animal não forneceram dados que se possa utilizar como fatores que influenciam no total da microbiota presente no animal.

5.3. Identificação das bactérias

Inicialmente, as bactérias isoladas foram submetidas à determinação das características morfo-tintoriais. Assim a figura 01 mostra os principais grupos morfo-tintoriais de bactérias isoladas de Water strider (*Brachymetra lata*), através da técnica de coloração de Gram.

Figura 01. Identificação dos isolados bacterianos de water strider de acordo com os grupos morfo-tintoriais.



Apartir da figura 01 pode-se observar que os bacilos Gram-negativos foram o grupo majoritário cultivável no interior do inseto. Podemos supor que a maior frequência deste grupo bacteriano pode estar relacionada com a contaminação da água por material Fecal.

Por outro lado, a menor incidência de cocos Gram-positivos foi uma surpresa, pois a princípio, espera-se que haja uma incidência maior de cocos Gram-positivos devido sua grande distribuição em todos os habitats. Esta linhagem foi identificada como *Staphylococcus aureus*.

6. Conclusões

Mesmo com o atraso no cumprimento do cronograma devido as sucessivas trocas de bolsistas foi possível chegar à alguns resultados satisfatórios que evidencia a importância de continuar o estudo deste inseto aquático.

- O water strider *Limnogonus* sp. não é uma espécie encontrada em período de chuva nos igarapés da UFAM;
- A concentração do agente químico e o tempo de exposição ideais para esterilização da superfície do inseto foram 25% v/v e três minutos, respectivamente;
- Existe um predomínio do grupo morfo-tintorial de Bacilos Gram-negativos em machos adultos de *Brachymetra lata*;
- Com a sua grande distribuição pode-se salientar que pela presença de microrganismos no seu trato digestório ele pode vir a ser um veículo de contaminação, uma vez que o inseto dejeta na água onde vive, água esta que por vezes é utilizada pelos moradores, como os ribeirinhos da nossa região, próximos ao habitat deste inseto.

7. Referências

BAUER, A. W., KIRBY, W. M., SHERRIS, J. C. & TURCK, M. Antibiotic susceptibility Sting by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, 45: 493-496, 1966.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J.. Invertebrados. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

DRESS, B. M. & JACKMAN, J. **Field Guide to Texas Insects**. Houston: Gulf Publishing Company, 1999.

FRANCO, B. D. G. DE & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2003.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

ICHIKAWA, T., ISHIKURA, T. & OZAKI, A. Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiologica**, 16: 218-224, 1971.

McCAFFERTY, W. P. & PROVONSHA, A. Aquatic Entomology: The Fishermen's Guide and Ecologists' Illustrated Guide to Insects and Their Relatives (Crosscurrents). 1983.

MATSUURA, T. Ocorrência de actinomicetos no trato gastrointestinal de uma nova espécie de arraia amazônica: Arraia Cururu (*Potamotrygon* sp. C). **XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Foz do Iguaçu (PR), 2001.

MATSUURA, T. **Caracterização taxonômica de actinomicetosendofíticos produtores de antibióticos isolados de cupuaçuzeiro (*Theobromaglandiflorum* Schum.)**. 70 p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

MOREIRA, F. F. F.; ALECRIM, V. P.; RIBEIRO, J. R. I. & NESSIMIAN, J. L. Identification key to the Gerridae (Insecta: Heteroptera: Gerromorpha) from the Amazon River floodplain, Brazil, with new records for the Brazilian Amazon. **Zoologia**, 28(2): 269-279, 2011.

MURO, M. A. & LUCHI, M. R. **Preservação de microrganismos**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Toselo”, 1989.

PORTAELS, F.; MEYERS, W. M. ABLORDEY A., CASTRO A., CHEMLAL K., DE RIJK P., ELSEN P., FISSETTE K., FRAGA A., LEE R., MAHROUS E., SMALL P., STRAGIER P., TORRADO E., VAN AERDE A., TEXEIRA DA SILVA M., PEDROSA J. First cultivation and characterization of *Mycobacterium ulcerans* from the environment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2:178, 2008.

RUPPERT, E. E. & BARNES, R. D. **Invertebrate Zoology**. 6. ed. Orlando: Harcourt, 1996.

SAMPAIO, R.T.M. & PY-DANIEL, V. A Subfamília Gerrinae (Hemiptera: Heteroptera: Gerridae) na Bacia Hidrográfica do Rio Trombetas, Pará, Brasil. **Acta Amazonica**, 23(1):83-94, 1993.

SKALICKY, F. Missouri Department of Conservation. Disponível em: <http://entertainment.news-leader.com/outdoors/_archive/1209-Waterstrid-246115.html>. Acessado em: 25/08/2012.

WGBH Educational Foundation, Enchanted Learning. Disponível em: <<http://www.enchantedlearning.com/subjects/insects/bugs/waterstrider/Wsprout.t.shtml>>. Acessado em: 26/08/2012.

YOUNGSTEADT, E. **Infectious Disease: Elusive Pathogen Cornered at Last**. *Science* 28 March 2008: Vol. 319. no. 5871, p. 1747. DOI: 10.1126/science.319.5871.1747a