

Article

Diversidade de Microrganismos no Trato Intestinal e Resíduos Digestivos de *Trigoniulus corallinus*

Samuel Ribeiro Passos¹ , Luiz Fernando de Sousa Antunes² , Norma Gouvêa Rumjanek³ , Maria Elizabeth Fernandes Correia⁴ , Gustavo Ribeiro Xavier⁵ 

¹ Doutorado em Agronomia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). ORCID: 0000-0002-3405-9014. E-mail: passos.samuel@gmail.com

² Doutor em Fitotecnia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). ORCID: 0000-0001-8315-4213. E-mail: fernando.ufrrj.agro@gmail.com

³ Doutorado em Química Farmacêutica pela University of London (Embrapa). ORCID: 0000-0002-2174-1137. E-mail: norma.rumjanek@embrapa.br

⁴ Doutorado em Agronomia Ciência do Solo (Embrapa). ORCID: 0000-0003-1919-6659. E-mail: elizabeth.correia@embrapa.br

⁵ Doutorado em Agronomia Ciência do Solo (Embrapa). ORCID: 0000-0002-8770-518X. E-mail: gustavo.xavier@embrapa.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a comunidade microbiana associada ao trato intestinal do diplópode *Trigoniulus corallinus*. Os diplópodes foram coletados e incubados em dietas com serrapilheira de grama batatais (*Paspalum notatum*) e sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*). A análise do gene 16S DNA por DGGE revelou diversidade microbiana condicionada pela dieta oferecida até os 45 dias. Após este período o efeito não foi mais visível. A comunidade associada aos coprólitos e ao tipo de serrapilheira distribui-se em agrupamentos separados das amostras oriundas do trato intestinal. O mesmo não foi observado na avaliação da comunidade de actinomicetos, onde o grande diferencial para divisão de grupos foi a dieta. Os animais alimentados com serrapilheira de grama mostraram uma comunidade diversa e não influenciada pelo tempo ou compartimentalização. As amostras associadas à serrapilheira e aos coprólitos foram 80% similares às do trato intestinal. Todas as amostragens tiveram genes *nifH* detectados via PCR. Há evidências de FBN no trato intestinal do diplópode. A comunidade de procariotos foi influenciada pela dieta oferecida até os 45 dias e a comunidade de actinomicetos foi condicionada em função da dieta.

Palavras-chave: microbiota associada ao trato intestinal; FBN no trato intestinal; enzimas celulolíticas.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the microbial community associated with the intestinal tract of the millipede *Trigoniulus corallinus*. Diplopods were collected and incubated on diets with litter of potato grass (*Paspalum notatum*) and thrush (*Mimosa caesalpinifolia*). Analysis of the 16S DNA gene by DGGE revealed microbial diversity conditioned by the diet offered up to 45 days. After this period the effect was no longer visible. The community associated with coprolites and the type of litter is distributed in separate groups of samples from the intestinal tract. The same was not observed in the evaluation of the actinomycetes community, where the great differential for group division was the diet. Animals fed grass litter showed a diverse community and not influenced by time or compartmentalization. Samples associated with litter and coprolites were 80% similar to those from the intestinal tract. All samples had *nifH* genes detected via PCR. There is evidence of BNF in the intestinal tract of millipedes. The prokaryotes community was influenced by the diet offered up to 45 days and the actinomycetes community was conditioned according to the diet.

Keywords: gut microbiology; BNF in the gut; cellulolytic enzymes.



Submissão: 01/08/2023



Aceite: 05/10/2023



Publicação: 27/10/2023



Introdução

Um dos principais papéis da biomassa na natureza é armazenar carbono, contribuindo para a diminuição do efeito estufa. Nela também há um grande potencial de produção de compostos orgânicos, os quais podem ser utilizados como fertilizantes ou matéria-prima para formulação de substratos para plantas.

Em ambientes naturais, a fauna do solo atua no processo de ciclagem de nutrientes, iniciando a degradação da matéria orgânica bruta adicionada ao solo. Dentre os organismos se encontram os cupins ou térmitas, que têm reconhecida capacidade de se alimentar de resíduos com elevada relação C/N (INDRAYANI; ANWARI, 2021).

É sabido que a capacidade de degradação e incorporação que os térmitas possuem é mediada por microrganismos. Assim, interações entre fauna do solo e a microbiota são de fundamental importância na regulação de processos que ocorrem na natureza. O diplópode *Trigoniulus corallinus* é um representante da macrofauna do solo passível de manipulação devido à sua ampla capacidade de dispersão e por se alimentar dos mais variados resíduos existentes na natureza (ANTUNES; VAZ; CORREIA, 2021). É capaz de se associar a microbiota em seu trato intestinal, atuando diretamente na decomposição e assimilação de alimentos desfavoráveis nutricionalmente para outros organismos.

Segundo Men'ko (2006) as pesquisas de microrganismos associados à fauna do solo se iniciaram utilizando-se os métodos tradicionais de cultivo em meio artificial, acessando uma pequena parte da comunidade existente. Recentemente, a incorporação de métodos moleculares associados a métodos de cultivo vem acessando uma maior fração de membros não cultiváveis associados ao trato intestinal (CORREIA *et al.*, 2018).

Numerosas pesquisas têm empregado abordagens dependentes e independentes de cultivo, tais como, identificação bioquímica, reação em cadeia da polimerase, eletroforese em gel de gradiente desnaturante (PCR-DGGE), polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição terminal e polimorfismo de conformação de fita única, e sequenciamento de última geração para caracterizar a dinâmica da comunidade microbiana em diversos tipos de materiais orgânicos (PALANIVELOO *et al.*, 2020; ZHAN *et al.*, 2023).

Destarte, a hipótese deste trabalho foi a de que existem microrganismos associados à microbiota intestinal de *T. corallinus* e que seu perfil pode ser alterado em função da dieta oferecida. Já o objetivo consistiu na avaliação do perfil de procariotos e actinomicetos e presença de genes *nifH* de microrganismos associados ao trato intestinal de *Trigoniulus corallinus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de amostra de diplópodes

Os diplópodes foram obtidos a partir de armadilhas, constituídas basicamente de pilhas de serrapilheira acumuladas, como usado por Correia (2003). Após a coleta estes foram classificados morfológicamente e deixados por 24 horas sem alimentação, sendo então divididos em dois grupos, que foram submetidos a duas fontes de serrapilheira:

- 1 – camada F obtida de áreas com plantio de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia*) (leguminosa);
- 2 – detritos obtidos a partir do corte de grama batatais (*Paspalum notatum*) após murchamento e perda da coloração verde, indicando que toda a clorofila foi degradada.

Os diplópodes foram incubados por 75 dias em condições de temperatura controlada para que não excedesse 30 °C. Após este período foram analisadas as comunidades microbianas associadas às serrapilheiras, a porção final (*hindgut*) do trato intestinal dos diplópodes e às comunidades presentes nos coprólitos (Tabela 2), sendo a codificação das amostras apresentadas como:



- TZ: Tempo zero (animais na colônia ou tratamento controle);
- TIS15 (trato intestinal animais incubados sabiá 15 dias);
- TIG15 (trato intestinal animais incubados grama 15 dias);
- TIS30 (trato intestinal animais incubados sabiá 30 dias);
- TIG30 (trato intestinal animais incubados grama 30 dias);
- TIS45 (trato intestinal animais incubados sabiá 45 dias);
- TIG45 (trato intestinal animais incubados grama 45 dias);
- TIS75 (trato intestinal animais incubados sabiá 75 dias);
- TIG75 (trato intestinal animais incubados grama 75 dias);
- CS75 (Coprólito animais incubados em sabiá 75 dias);
- CG75 (Coprólito animais incubados em grama 75 dias);
- SS75 (Serrapilheira de sabiá 75 dias); e
- SG75 (Serrapilheira de Grama 75 dias).

A extração do trato intestinal foi realizada através da secção do sistema digestivo com auxílio de estereoscópio, após a incubação dos diplópodes em éter absoluto (10 min) com ação retardante e posterior desinfestação superficial com álcool 70%.

Tabela 1. Tratamentos e tempos de coleta

Comunidade microbiana	Tratamentos e tempos de coleta (dias)				
	0 ¹	15	30	45	75
Associada ao trato intestinal de sabiá (TIS) e grama (TIG)	X	X	X	X	X
Associada ao coprólito de sabiá (CS) e grama (CG)					X
Associada à serrapilheira de sabiá (CS) e grama (CG)					X

¹Corresponde a extração da comunidade associada ao trato intestinal de diplópodes que foram capturados e incubados em uma “colônia” com umidade controlada e dieta constituída por serrapilheira coletada no local da captura.

Fonte: elaborado pelos autores (2023)

2.2 Extração de DNA dos microrganismos associados aos diferentes compartimentos

2.2.1 Obtenção do DNA da comunidade microbiana associada à serrapilheira

Amostras simples das serrapilheiras de grama e sabiá foram coletadas após 75 dias de incubação com os diplópodes, e homogeneizadas para formar uma amostra composta. Foi retirado cerca de 1g de serrapilheira para extração dos microrganismos aderidos usando em 1,0 mL de solução de Ringer – 47 mM NaCl, 183 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 6,8 (CAZEMIER *et al.*, 1997), agitada em agitador de agitação pulsada modelo vórtex por 30s a velocidade máxima, deixados por 15 minutos em geladeira e tratados em ultra-som por 45 segundos. Os microtubos foram então centrifugados por 15 minutos a 9300g, descartado o sobrenadante e o pellet foi submetido à extração de DNA utilizando-se o kit Ultra Clean Soil (cat. No 12800-100) dos laboratórios MoBio, seguidas as instruções do fabricante.



2.2.2 Obtenção do DNA da comunidade microbiana associada ao intestino posterior

Foram retirados cinco diplópodes ao acaso (TOKUDA; WATANABE, 2007), nos diferentes tempos de incubação, (15, 30, 45 e 75 dias), e anestesiados em éter por 10 minutos. Foram então esterilizados superficialmente com álcool a 70% e dissecados em lupa. O sistema digestivo foi todo removido e a porção posterior foi seccionado e acondicionado em 1,0 mL solução de Ringer. O procedimento de extração seguiu o mesmo protocolo descrito para a serrapilheira.

2.2.3 Obtenção do DNA da comunidade microbiana associada ao coprólitos

Os coprólitos foram coletados aos 75 dias, onde se acomodaram cinco diplópodes em placas de Petri estéreis por 24 horas. Após este período os coprólitos foram coletados em microtubos estéreis e levados para a extração de DNA direta com o auxílio do kit Ultra Clean Soil (cat. No 12800-100) dos laboratórios MoBio, seguidas as instruções do fabricante.

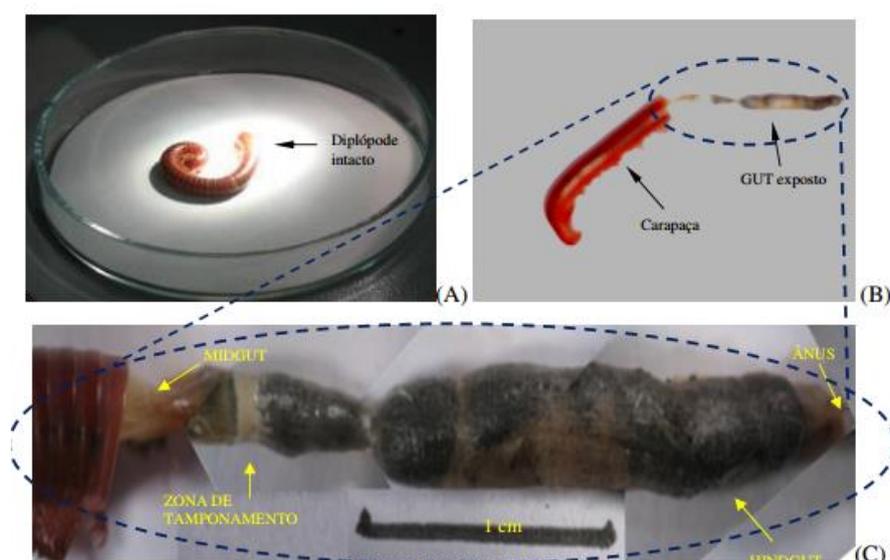


Figura 1. Diplópode ainda intacto já desinfestado superficialmente (A); Diplópode com a carapaça retirada e o trato intestinal ou “gut” exposto (B); Detalhes sobre as divisões do trato intestinal em intestino médio ou “midgut”, Zona de tamponamento (transição), intestino posterior ou “hindgut” e ânus (Final gut) (C). Fonte: elaborado pelos autores (2023)

2.2.4 Obtenção do DNA da massa celular crescida em meio adicionado carboxi-metil celulose (CMC)

Durante a coleta dos microrganismos associados ao trato intestinal, uma alíquota de 100 uL, obtida após tratamento em ultrassom, foi plaqueada em meio de cultivo mineral mínimo Bushnell-Haas (MMBH) – 0,2g MgSO₄; 0,02g CaCl₂; 1,0g KH₂PO₄; 1,0g K₂HPO₄; 1,0g NH₄NO₃; 0,05g FeCl₃; H₂O destilada q.s.p. 1,0L, contendo como única fonte de carbono carboxi-metil-celulose (CMC) a 1 %. As placas foram incubadas a 28°C por 15 dias em condições de aerobiose e anaerobiose. Procedeu-se as duas coletas, aos 6 e aos 15 dias. A coleta da massa celular proliferada no meio ocorreu em capela de fluxo vertical, adicionando 2 mL de água destilada estéril a placa, seguida de raspagem com alça de Drigalski, e acondicionamento em microtubos de 1,5 mL estéreis, seguidas de centrifugação por 15 minutos a 9300g. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi estocado a -20°C. O DNA foi extraído conforme descrito no item 2.2.1.

2.3 Amplificação para o gene 16S rDNA utilizando-se os iniciadores universais

Para a reação de PCR utilizou-se o DNA extraído das amostras obtidas a partir do trato intestinal, coprólito e serrapilheira dos diplópodes incubados em serrapilheira de sabiá e grama nos tempos de incubação



mencionados na Tabela 2, dimensionada para volume final de 25 μL contendo tampão de reação 1X, MgCl_2 1,5 mM, Taq DNA polimerase 2,5U (Invitrogen cat. N° 11615-010), BSA 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, dNTP 250 μM e 0,2 μM de cada iniciador F968 (Gcclamp* - 5' AAC GCG AAG AAC CTT AC 3') e R1401 (5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3'). *Gcclamp – 5'- CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3' correspondente à região variável V6 – V8 do 16s rDNA (MUYZER; DE WAAL; UTTERLINDEN, 1993; PASSOS *et al.*, 2008) e seguidos de uma etapa de desnaturação inicial de 93 °C por 5 min e 35 ciclos de 93°C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72°C por 2 min e extensão final a 72 °C por 10 min. A confirmação da amplificação foi feita em gel de agarose 1% utilizando-se 2 μL da amostra e 2 μL de corante (0,5% azul de bromofenol, 40% sacarose, 0,1 mol L⁻¹ de EDTA, 5% de SDS) por 60 minutos a voltagem constante de 80V. Em seguida o gel foi corado em solução de brometo de etídio 10mg.l⁻¹ e fotografado em sistema Kodak GL100.

2.4 Amplificação por 16s do grupo actinomicetos

A reação de PCR foi dimensionada para volume final de 25 μL contendo tampão de reação 1X, MgCl_2 1,5 mM, Taq DNA polimerase 2,5U (Invitrogen cat. N° 11615-010), BSA 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, dNTP 250 μM e 0,2 μM de cada iniciador F243 e R1401 (MILLING *et al.*, 2005) seguidos de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 min e 25 ciclos de 93°C por 1 min, 63 °C por 1 min e 72 °C por 1,5 min e extensão final a 72 °C por 10 min. O produto de PCR foi diluído em 20X e um microlitro foi adicionado como molde da reação para amplificação do gene 16s, seguindo a metodologia já descrita acima, à exceção do BSA que foi retirado da reação.

2.5 Amplificação para genes *nifH*

A reação de amplificação consistiu em: amplificação com iniciadores *Zani 3* e *Zani 4* (ZANI *et al.*, 2000) a partir do DNA genômico das amostras mencionadas na primeira PCR e também das amostras obtidas no cultivo em meio CMC. A reação foi dimensionada para 15 μL em tampão de reação concentração final 1X, 3,0 mM de MgCl_2 , 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de soro de BSA, 200 mM de dNTP, 1 μM de cada iniciador, DMSO 5% e 1,5 U Taq DNA polimerase. As condições de amplificação foram 94 °C por 5 minutos, seguidos de 25 ciclos de desnaturação a 93 °C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 seg e extensão a 72 °C por 45 segundos, seguido de extensão final de 72 °C por 10 minutos. 1 μL do produto de PCR foi utilizado como molde para a segunda reação utilizando os iniciadores PolF-GC e Pol R (POLY; MONROZIER; BALLY, 2001) ambos na concentração de 1 μM , tampão de reação na concentração final de 1X, 2,3 mM de MgCl_2 , 200mM de dNTP e 5 U de Taq DNA polimerase. As condições de amplificação foram 94 °C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 93 °C por 45 segundos, anelamento a 57 °C por 45 seg e extensão a 72 °C por 45 segundos, seguido de extensão final de 72°C por 10 minutos. A confirmação da amplificação foi feita em gel de agarose 1% utilizando-se 2 μL da amostra e 2 μL de corante (0,5% azul de bromofenol, 40% sacarose, 0,1 mol L⁻¹ de EDTA, 5% de SDS) por 60 minutos a voltagem constante de 80V. Em seguida o gel foi corado em solução de brometo de etílio 10mg L⁻¹ e fotografado em sistema Kodak GL100.



2.6 Análise por DGGE - gel de eletroforese em gradiente de desnaturante químico

Confirmada a amplificação das amostras, tanto para o gene 16S DNA total, quanto para o grupo dos actinomicetos, cerca de 20 uL de cada amostra amplificada foi aplicada no gel, adicionada de 3 µL de corante (0,5% azul de bromofenol, 40% sacarose, 0,1 mol L⁻¹ de EDTA, 5% de SDS) e submetidos à eletroforese em gradiente de desnaturante químico. O gradiente de desnaturação de uréia-formamida utilizado foi de 50% a 65% em tampão TAE 0,5X (120 V – 70 mA) por 16 horas (ZILLI *et al.*, 2003). Como marcador para normalização dos géis foi utilizada amostra formada pela mistura da amplificação do DNA de quatro microrganismos (*Sinorhizobium fredii*, *Azospirillum brasilense*, *Burkholderia sp.*, *Rhizobium tropici* IL4) cujas posições das bandas no gel são conhecidas. As imagens dos géis foram digitalizadas e com o auxílio do programa Gel Compar II (*Applied Maths*) foram construídos os dendrogramas de similaridade entre os tratamentos, utilizando-se o coeficiente de similaridade Jaccard e o método de agrupamento UPGMA (“*Unweighted pair-group method*”). De posse da planilha binária gerada pelo software Gel Compar II em função da presença ou ausência de bandas no gel de DGGE, foi-se gerada uma análise correspondência no software Canoco e plotados os resultados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perfil e Diversidade Bacteriana

3.1.1 Extração do trato intestinal

O diplópode *T. corallinus* quando adulto apresenta tamanho aproximado de 5 a 7 cm. Este fato facilita a manipulação do trato intestinal (gut) como detalhado na Figura 1, quando comparado ao dos térmitas, que é em torno de 1 cm (WARNECKE *et al.*, 2007).

3.1.2 Análise por 16S rDNA utilizando iniciadores universais

As amostras oriundas de serrapilheira e coprólito de grama aos 75 dias não obtiveram resultado positivo para a extração de DNA e amplificação para o gene 16S rDNA (Figuras 2-A e 2-B) como as amostras do trato intestinal. As amostras amplificadas com o gene 16S rDNA como alvo foram submetidas a análise por DGGE e deram origem ao dendrograma mostrado na Figura 2-C.

No dendrograma (Figura 2-C) é possível observar a formação de agrupamentos distintos (1, 2 e 3) em função da origem dos microrganismos associados. Apesar do tempo de incubação de 75 dias, a diversidade bacteriana das amostras de serrapilheira (grupo 1), trato intestinal (grupo 2) e coprólito (grupo 3) foram distintas, sendo a comunidade bacteriana do coprólito a que mais se distanciou, com pouco mais de 10% de similaridade com os outros grupos. As amostras de serrapilheira também se agruparam, com similaridade de 20%, com amostras obtidas a partir do trato intestinal.

As amostras oriundas das comunidades bacterianas associadas ao trato intestinal de *T. corallinus* se agruparam (grupo 2 – Figura 2-C) e formaram dois subgrupos (2.1 e 2.2) em função do tempo de incubação. No subgrupo 2.1, foram agrupadas, com mais de 60% de similaridade, as amostras oriundas das comunidades associadas à serrapilheira de sabiá com 15 e 30 dias de incubação, seguidas das amostras oriundas das comunidades associadas a palhada de grama com 15 e 30 dias de incubação e, mais externamente, as comunidades associadas ao trato intestinal dos diplópodes que foram capturados do ambiente e se encontravam incubados em serrapilheiras de várias plantas à sombra com umidade mantida constante.

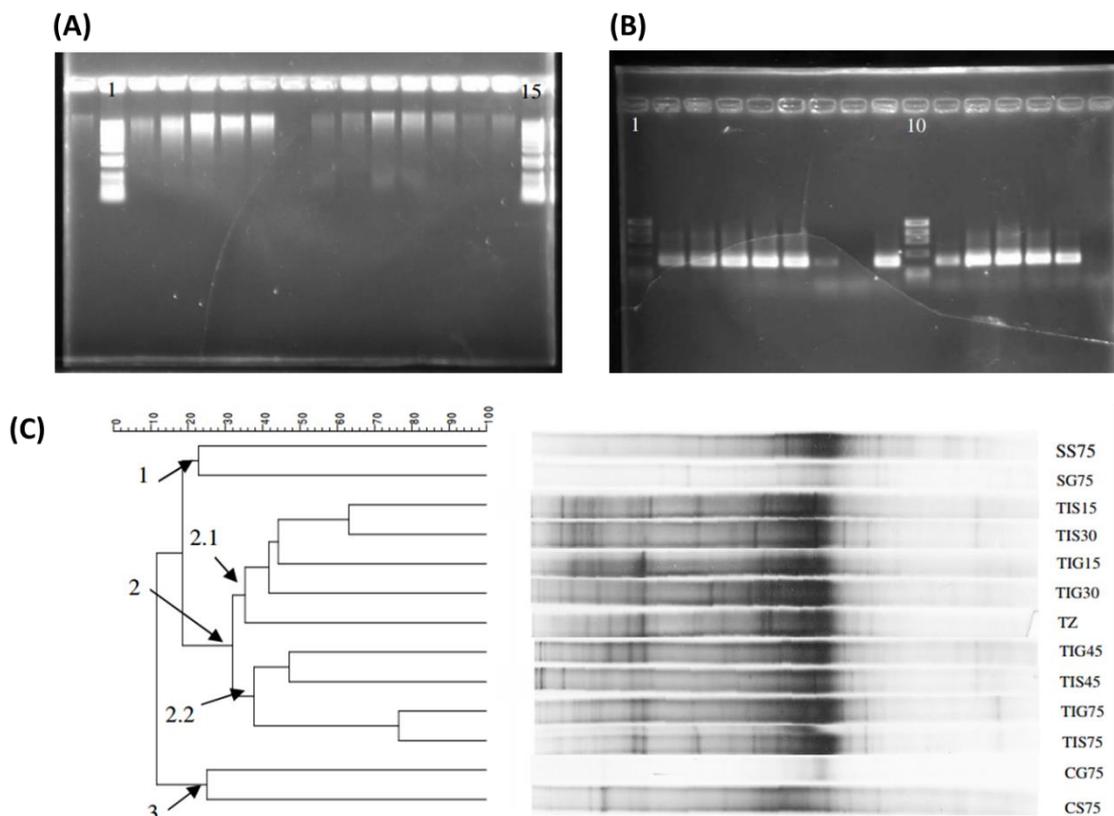


Figura 2. Gel de agarose a 0,8% contendo a extração de DNA das seguintes amostras: (1) Marcador 1Kb, TZ, TIS15, TIG15, TIS30, TIG30, CG75, CS75, SS75, SG75, TIS45, TIG45, TIS75, TIG75 (15) Marcador 1Kb (A); Gel de agarose 1,0% contendo as amostras de PCR das seguintes amostras: (1) Marcador Ø174, TZ, TIS15, TIG15, TIS30, TIG30, CG75, CS75, SS75, (10) Marcador Ø174, SG75, TIS45, TIG45, TIS75, TIG75 e controle negativo (B); Dendrograma de similaridade entre os tratamentos, gerado pelo programa Gel Compar II (Applied Maths) (C). Fonte: elaborado pelos autores (2023)

Com base no padrão destas amostras (Figura 2-C, subgrupo 2.1 e 2.2) é possível deduzir que a comunidade bacteriana é sensível a dieta oferecida somente nos períodos iniciais de alimentação, pois mostrou alteração aos 15 dias de incubação e se manteve até os 30 dias com proximidade à amostra dos animais da colônia que seria o tempo zero de incubação. Após este período, a comunidade se estabiliza (Figura 2-C, grupo 2, subgrupo 2.2), sendo que aos 45 dias de incubação as amostras oriundas de sabiá e grama se agruparam com quase 50% de similaridade, e aos 75 dias com mais de 75% de similaridade, indicando grande capacidade de adaptação desta comunidade ao longo do tempo, não influenciada pela dieta oferecida

Na Figura 3 é possível observar a similaridade de todos os tratamentos em relação ao tratamento zero, que representa os animais ainda na colônia. Os valores são expressos em porcentagem de similaridade e foram obtidos na matriz de similaridade gerada pelo programa Gel Compar II, gerada em função da presença ou ausência de bandas no gel de DGGE. O índice de similaridade utilizado foi o Índice de Jaccard.

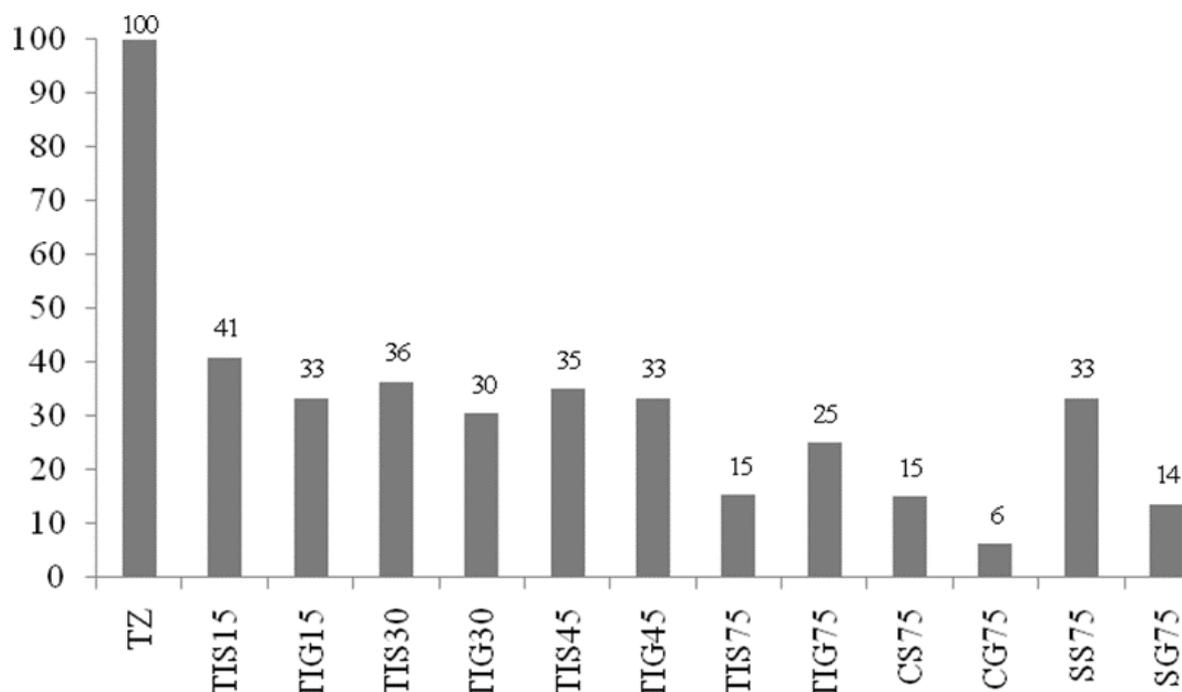


Figura 3. Percentagem de similaridade genética calculada pelo índice de Jaccard e obtidas na matriz de similaridade gerada pelo programa Gel Compar II, dos tratamentos em relação aos animais na colônia. TZ: Tempo zero (animais na colônia ou tratamento controle), TIS15, TIG15, TIS30, TIG30, TIS45, TIG45, TIS75, TIG75, CS75, CG75, SS75, SG75. Fonte: elaborado pelos autores (2023)

O tratamento TZ é o tratamento zero, onde os animais se encontravam na colônia, alimentados com serrapilheira de diversas plantas obtidas nas áreas onde estes foram capturados. Já aos 15 dias de incubação, a comunidade microbiana se mostrou diferente em relação ao controle. As menores similaridades ocorreram com a oferta de somente grama como dieta. Até os 45 dias de alimentação a similaridade média foi de 35% em relação ao controle, aos 75 dias de 20,2%. A comunidade associada à serrapilheira apresentou similaridade em relação ao controle de 23,5% e a comunidade microbiana no coprólito foi de 10,65% em média, a qual apresentou maior alteração em relação à comunidade microbiana no trato intestinal dos animais no tempo zero.

Byzov *et al.* (1993; 1996) e Marialigeti *et al.* (1985), utilizando métodos tradicionais de cultivo em placas e microscopia, evidenciaram que a microbiota intestinal era afetada pelo tipo de dieta oferecida. Os autores afirmam que a inoculação promovida pela fonte de alimento é a principal condicionadora da mudança na comunidade microbiana. Byzov *et al.* (1996) afirmaram ainda que a predominância de microrganismos no trato intestinal de *Glomeris connexa* e *Chromatoiulus rossicus* foi da família Enterobacteriaceas, pertencente ao filo Proteobacteria.

Resultados similares foram encontrados por Knapp *et al.* (2009b), em avaliação da diversidade microbiana do trato intestinal de outro diplópode *Cylindroiulus fulviceps*, que é um diplópode encontrado em regiões de clima temperado. Os autores avaliaram a comunidade microbiana aos 45 dias de incubação de diplópodes incubados em esterco bovino, serrapilheira de *Vaccinium gaultheroides* e de *Luzula sp.* Estes autores obtiveram resultados muito similares aos já citados, encontrando aos 45 dias um perfil de DGGE do gene 16S rDNA com agrupamentos condicionados por trato intestinal e fonte de alimento. Obtiveram também, correlação da dieta condicionando a comunidade microbiana no trato intestinal. Na Figura 4 foi utilizada a planilha binária gerada pelo programa Gel Compar II em função da presença ou ausência de bandas como descrito no item Material e Métodos.



Sardar et al. (2022) ao analisarem a microbiota intestinal responsável pela degradação de polissacarídeos do diplópode *Telodeinopus aoutii*, verificaram que além das bactérias pertencentes à família de Proteobacteria, houve ocorrência de bactérias dos *phyla* Firmicutes, Bacteroidetes, Lentisphaerae, Tenericutes e Synergistetes.

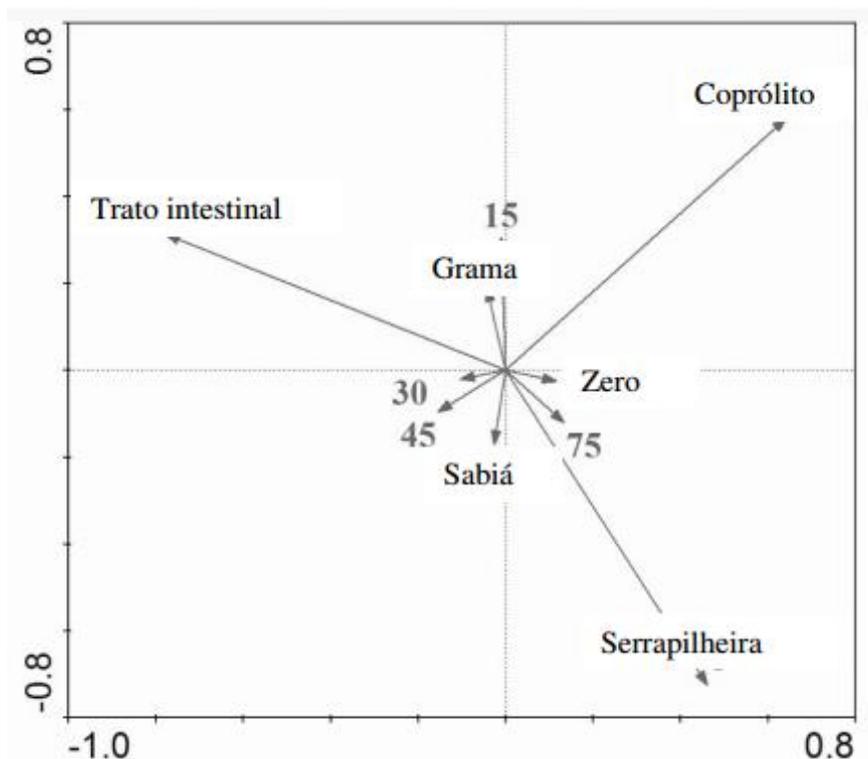


Figura 4. Análise de correspondência gerada pelo programa Canoco utilizando dados binários (presença ou ausência de bandas no gel). Fonte: elaborado pelos autores (2023)

A ordenação gerada na Figura 4 mostra o condicionamento da comunidade microbiana em função da dieta oferecida, ficando as duas fontes de alimento em quadrantes distintos, bem como cada compartimento analisado. Os tempos de incubação de 30 e 45 dias foram similares, enquanto o de 15 dias se distanciou dos demais. Fato este resultante da mudança e adaptação da comunidade microbiana em função da fonte de alimento. Os tratamentos de 75 dias de incubação e o tempo zero foram agrupados juntos, ilustrando a capacidade de resiliência da comunidade microbiana do trato intestinal. Dados estes corroborados por Knapp *et al.* (2009a), em que os autores avaliaram a composição da microbiota do trato intestinal da minhoca *Lumbricus rubellus*, também por 16S rDNA e PCR- DGGE. Estes autores executaram uma análise de componentes principais (PCA) e logo após uma correlação canônica. As variáveis utilizadas foram a comunidade da fonte de alimento (esterco bovino, serrapilheira de *Vaccinium gaultheroides* e de *Luzula sp.*), comunidade microbiana do trato intestinal e fezes das minhocas alimentadas com cada um. Os autores concluíram em função da análise canônica que a comunidade do trato intestinal de *L. rubellus* foi afetada pela dieta oferecida e que o complexo padrão de bandas apresentadas no gel, sugeria uma grande diversidade de bactérias associadas ao trato intestinal de *L. rubellus*.



3.1.3 Análise por 16S rDNA utilizando iniciadores para actinomicetos

As amostras amplificadas foram submetidas à análise por DGGE e deram origem ao dendrograma mostrado na Figura 5. No dendrograma é possível notar que a comunidade de actinomicetos associados ao trato intestinal se mostrou sensível a dieta oferecida, contrastando com o efeito da comunidade total de procariotos, onde este efeito não foi observado. As amostras tanto de trato intestinal, como serrapilheira e coprólito de grama apresentam também um maior número de bandas no gel, o que pode ser um indício de uma população mais diversa em relação à população de actinomicetos nas amostras de serrapilheira de sabiá. Fato este compreensível devido à maior dificuldade de degradação da serrapilheira de grama devido à maior relação C/N.

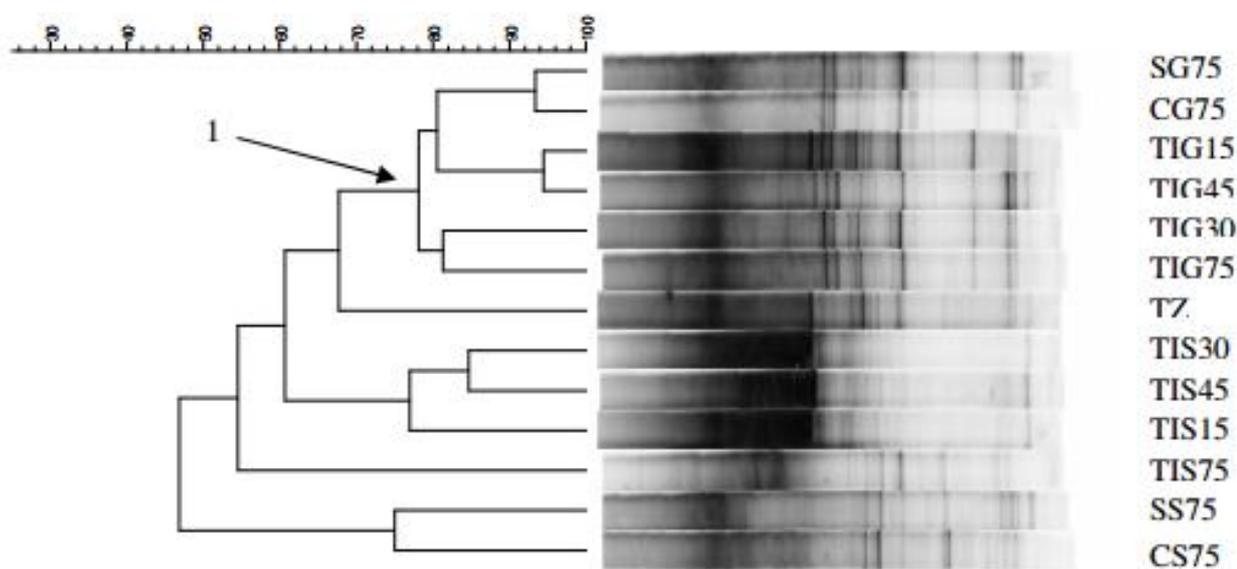


Figura 5. Dendrograma de similaridade gerado pelo programa Gel Compar II (Applied Maths) para o grupo dos actinomicetos. Fonte: elaborado pelos autores (2023)

O dendrograma foi formado basicamente por um grupamento (grupo 1 na Figura 5) constituído pelas amostras dos diplópodes incubados em grama. Pode-se notar que a população de actinomicetos se manteve muito estável em todas as fases de alimentação, tanto os que estavam associados à serrapilheira, como ao trato intestinal e nos coprólitos. Esta estabilidade pode ser confirmada no fechamento do grupamento com quase 80% de similaridade. A amostra no tempo zero foi agrupada logo em seguida, com pouco mais de 65% de similaridade, seguida das amostras de sabiá. A dieta com serrapilheira de sabiá causou redução do número de bandas no gel e a superexpressão de uma banda (Figura 7), o que sugere uma especialização do grupo dos actinomicetos quando a dieta de sabiá é oferecida. Esta mudança foi evidente já aos 15 dias de incubação.

Na Figura 6 foi possível observar a similaridade de todos os tratamentos para a comunidade de actinobactérias em relação ao tratamento zero ou animais ainda na colônia. Os valores são expressos em percentagem de similaridade e foram obtidos na matriz de similaridade gerada pelo programa Gel Compar II, gerada em função da presença ou ausência de bandas no gel de DGGE. O índice de similaridade utilizado foi o Índice de Jaccard.

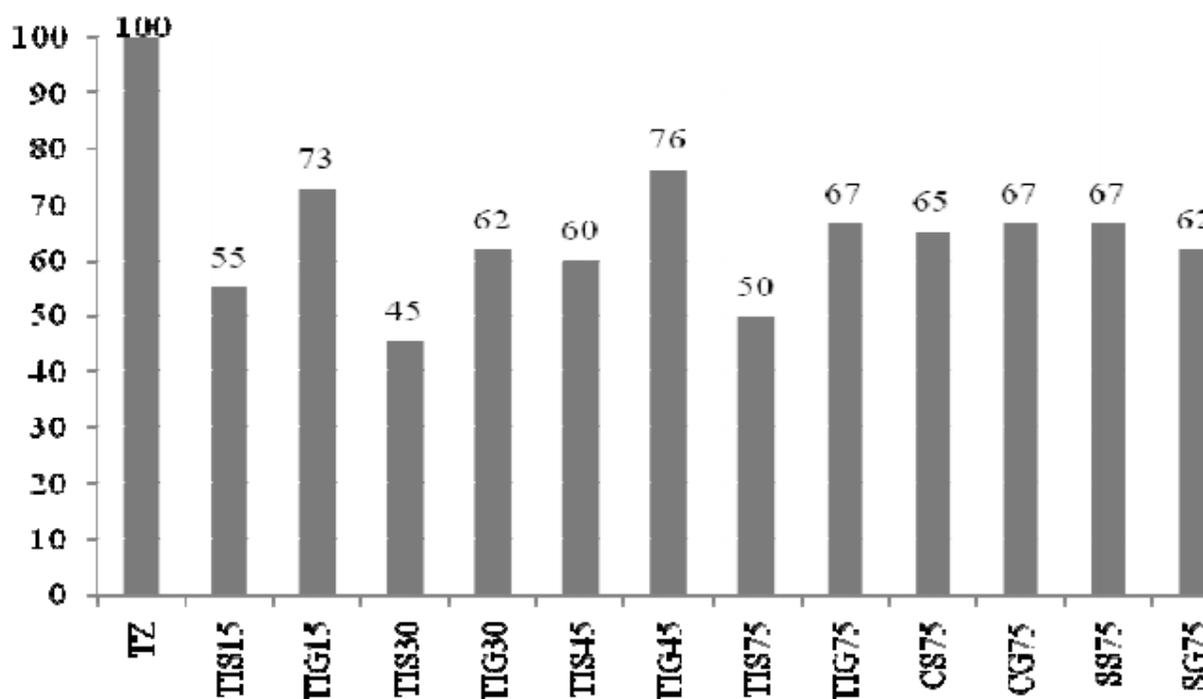


Figura 6. Percentagem de similaridade genética entre as comunidades de actinobactérias calculada pelo índice de Jaccard e obtidas na matriz de similaridade gerada pelo programa Gel Compar II, relação aos animais na colônia. TZ: Tempo zero (animais na colônia ou tratamento controle), TIS15, TIG15, TIS30, TIG30, TIS45, TIG45, TIS75, TIG75, CS75, CG75, SS75, SG75. Fonte: elaborado pelos autores (2023)

Ao contrário do resultado apresentado para o marcador molecular 16S rDNA, que exprimiu a variação de toda a comunidade de bactérias presentes, a Figura 6 ilustra a variação na comunidade de actinobactérias. Esta apresentou menor alteração em função das dietas oferecidas. Como no dendrograma, foi possível observar maior similaridade em função da dieta de serrapilheira de grama, sendo que a similaridade média dos tratamentos até os 75 dias de incubação foi de 69%. A dieta de serrapilheira de sabiá condicionou a comunidade de actinobactérias a uma similaridade média de 52,61%, até os 75 dias de incubação, em relação ao controle. As comunidades de serrapilheira e coprólito de grama e de sabiá se mantiveram muito similares, indicando que a passagem pelo trato intestinal de *T. corallinus* não influenciou a comunidade de actinobactérias. Contudo, foi possível notar no dendrograma um complexo perfil de bandeamento, principalmente para a dieta de serrapilheira de grama, o que indica que apesar desta se manter praticamente inalterada após a passagem pelo trato intestinal, durante o processo digestivo ocorreram alterações na dinâmica microbiológica. A comunidade microbiana no intestino dos diplópodes é rica e diversa. No entanto, a microbiota simbiótica estável ainda não foi confirmada e a proporção de microrganismos transitórios de vida livre ingeridos com alimentos ainda não foi claramente descrita (SARDAR *et al.*, 2022).

A presença de actinomicetos no trato intestinal de cupins foi descrita inicialmente por Hungate (1946), que isolou bactérias do gênero *Micromonospora*. Von Wintzingerode *et al.* (1997) em sua revisão constataram que poucas sequências de 16S rDNA pertenciam às actinobactérias, e que, portanto, estas seriam uma pequena parte de comunidade microbiana no trato intestinal de cupins. Contudo Lefebvre *et al.* (2009) utilizando iniciadores específicos para actinobactérias, detectaram por nested-PCR, várias sequências de actinobactérias no trato intestinal do cupim *Nasutitermes corniger*. Um número elevado de bandas do gene 16S rDNA de actinomicetos também pode ser encontrado no trato intestinal de *T. corallinus*, como demonstrado na Figura 5. Lefebvre *et al.* (2009) propuseram a hipótese que a comunidade de actinobactérias no trato intestinal de *N. corniger*

é totalmente influenciada pela microbiota presente no alimento ingerido. Resultado que pode ser comprovado também para *T. corallinus*, como mostrado na Figura 4. Os autores eluíram e sequenciaram bandas do gel de DGGE que julgaram ser importantes e reportaram membros das famílias Corynebacteriaceae, Streptomycetaceae, Cellulomonadaceae, Propionibacteriaceae e Coriobacterineae, mostrando a especificidade dos iniciadores utilizados e mostrando que a riqueza de bandas no gel de DGGE indicou a presença de diversos taxa de actinobacteria no trato intestinal de *N. corniger*. Os autores também observam que são necessárias mais pesquisas para avaliar as mudanças na comunidade de actinobacterias no trato intestinal de *N. corniger* e que o uso de alimentos esterilizados seria uma alternativa, para elucidar como as mudanças na comunidade de actinobacterias pode influenciar a capacidade de degradação de lignocelulose.

Os actinomicetos são um importante componente microbiano da rizosfera, onde eles, semelhante às bactérias promotoras do crescimento vegetal, contribuem para a ciclagem de nutrientes do solo (SUTHISA; PARAPHONG; PIMVICHAI, 2023).

Na Figura 7 é possível notar menor o número de bandas associado aos tratamentos TIS15, TIS30 e TIS45. Em contrapartida, nota-se maior expressão de uma banda (em detalhe), indicativa de que a dieta a base de serrapilheira de sabiá influenciou ou forneceu um grupo específico de actinobactérias.

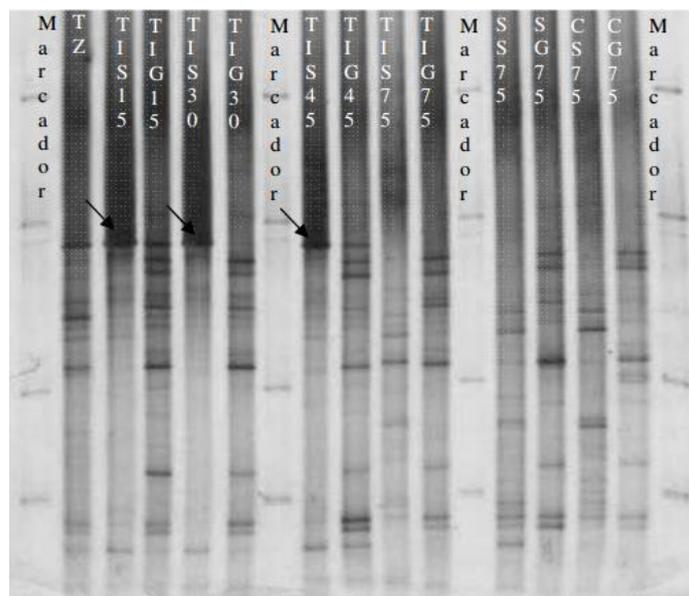


Figura 7. Gel de DGGE ilustrando o comportamento da comunidade de actinomicetos associados à serrapilheira, trato intestinal e coprólito de *T. corallinus*.

Fonte: elaborado pelos autores (2023)

3.2 Análise da Presença de Genes *nifH*

A presença de genes *nifH* é um indicativo da possível presença de organismos com capacidade de fixar nitrogênio biologicamente no interior do trato intestinal do diplópode. A Figura 8 ilustra o resultado da amplificação via PCR das amostras para a presença de genes *nifH* e também as amostras da massa celular proliferada em meio CMC. A presença de genes do grupo *nif*, que são genes que codificam para o complexo nitrogenase.

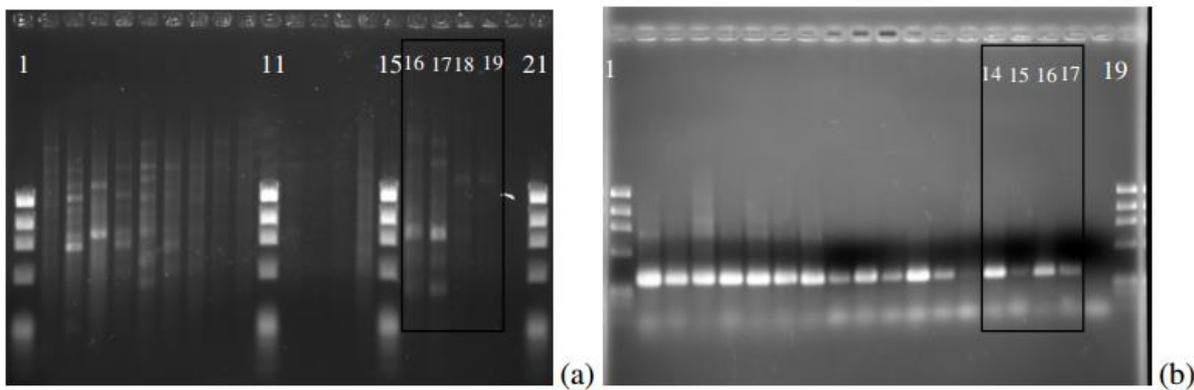


Figura 8. Resultado da amplificação das amostras: TZ, TIS15, TIG15, TIS30, TIG30, TIS45, TIG45, TIS75, TIG75, SS75, SG75, CS75, CG75. Massa celular oriunda proliferada em meio CMC oriunda de sabiá incubada em aerobiose (16a e 14b) e anaerobiose (17a e 15b); Massa celular oriunda proliferada em meio CMC oriunda de grama, incubada em aerobiose (18a e 16b) e anaerobiose (19a e 17b) e controle negativo: A (1,11,15 e 21 – Marcador 174), iniciadores Zani 3 e 4 e B (1 e 19 Marcador 174) Nested-PCR com iniciadores PolF-CG e Pol R. Fonte: elaborado pelos autores (2023)

O gene *nifH* codifica para a subunidade Fe-proteína (EADY et al., 1988). A presença deste gene em um ambiente pode indicar que está ocorrendo fixação biológica de nitrogênio (TEIXEIRA, 1997). A presença de possíveis fixadores de nitrogênio no trato intestinal de *T. corallinus* é vista com importante papel na evolução deste organismo, sendo de fundamental importância quando da degradação de materiais lignificados ou com alta relação C/N. O aporte de nitrogênio externo via FBN é necessário para equilibrar a relação C/N dos materiais à da microbiota no trato intestinal, possibilitando a degradação e a incorporação do material digerido aos tecidos microbiano ou do diplópode.

A eficiência da assimilação de alimentos nos diplópodes geralmente não é alta e uma grande quantidade de alimento deve ser ingerida para atender as suas demandas metabólicas. A grande produção de coprólitos, influenciada pela microbiota do intestino posterior dos diplópodes, é de grande importância ecológica para a transformação da matéria orgânica do solo (SARDAR *et al.*, 2022). Ainda, de acordo com os autores, o aparato enzimático do diplópode é, provavelmente, capaz de degradar celulose, hemiceluloses, amido, laminarina ou liquenina, sacarose, trealose e quitina, mas não a lignina. A quebra das partes impregnadas de lignina que servirão de alimento ao diplópode dependem da degradação parcial por microrganismos ligninolíticos presentes no horizonte da serrapilheira do solo.

A microbiota dos coprólitos do diplópode *Thyropygus resimus* foi capaz de produzir sideróforos e ácido indolacético, além de ter isolados que inibiram o crescimento de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, o agente causal da doença bacteriana da folha do arroz (100 ppm) (SUTTHISA; PARAPHONG; PIMVICHAI, 2023). Os estudos sobre a microbiota de diplópodes ainda são incipientes. No entanto, os resultados têm sido promissores e sua aplicabilidade na agricultura poderá trazer inúmeros benefícios com o progresso das pesquisas nesta área.

4. Conclusões

O tempo de incubação dos diplópodes em serrapilheira só exerceu modificações na comunidade bacteriana após os 45 dias.

Até a sexta semana o tipo de dieta oferecida condicionou a comunidade bacteriana. A comunidade de actinomicetos é condicionada pela dieta e não pelo tempo.

A presença do processo de FBN no trato intestinal do diplópode e microrganismos proliferados em meio CMC foi evidenciada pela amplificação de genes *nifH*.



Os resultados apresentados demonstraram o potencial de interações entre a fauna do solo e os microrganismos e representa uma ferramenta chave para a descoberta de recursos genéticos promissores do ponto de vista de bioinsumos.

Referências

- ANTUNES, L. F. D. S.; VAZ, A. F. D. S.; CORREIA, M. E. F. Gongocompostagem: Técnica Sustentável para a Obtenção de Composto Orgânico para o Cultivo de Mudanças de Brócolis. **Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v. 10, n. 3, p. 185–194, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.21664/2238-8869.2021v10i3.p185-194>
- BYZOV, B. A.; TRETYAKOVA, E. B.; ZVYAGINTSEV, D. G.; CLAUS, H.; FILIP, Z. Effects of soil invertebrates on the survival of some genetically engineered bacteria in leaf litter and soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, n. 3, p. 221–228, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00335948>
- BYZOV, B. A.; VU NGUYEN THANH; BABJEVA, I. P. Interrelationships between yeasts and soil diplopods. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 8, p. 1119–1126, 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90160-D](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90160-D)
- CAZEMIER, A. E.; HACKSTEIN, J. H. P.; OP DEN CAMP, H. J. M.; ROSENBERG, J.; VAN DER DRIFT, C. Bacteria in the Intestinal Tract of Different Species of Arthropods. **Microbial Ecology**, v. 33, n. 3, p. 189–197, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002489900021>
- CORREIA, D. S.; PASSOS, S. R.; PROENÇA, D. N.; MORAIS, P. V.; XAVIER, G. R.; CORREIA, M. E. F. Microbial diversity associated to the intestinal tract of soil invertebrates. **Applied Soil Ecology**, v. 131, p. 38–46, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.07.009>
- CORREIA, M. E. F. **Distribuição, preferência alimentar e transformação de serrapilheira por diplópodes em sistemas florestais**. 2003. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2003.
- HUNGATE, R. E. Studies on Cellulose Fermentation: II. An Anaerobic Cellulose-decomposing Actinomycete, *Micromonospora propionici*, N. Sp. **Journal of Bacteriology**, v. 51, n. 1, p. 51–56, 1946.
- INDRAYANI, Y.; ANWARI, S. Effect of termite activity on soil chemical properties using baiting systems at an arboretum area in Pontianak, West Kalimantan, Indonesia. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 22, n. 4, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220461>. Acesso em: 27 jun. 2023.
- KNAPP, B. A.; PODMIRSEG, S. M.; SEEBER, J.; MEYER, E.; INSAM, H. Diet-related composition of the gut microbiota of *Lumbricus rubellus* as revealed by a molecular fingerprinting technique and cloning. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2299–2307, 2009 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.08.011>



- KNAPP, B. A.; SEEBER, J.; PODMIRSEG, S. M.; RIEF, A.; MEYER, E.; INSAM, H. Molecular fingerprinting analysis of the gut microbiota of *Cylindroiulus fulviceps* (Diplopoda). **Pedobiologia**, v. 52, n. 5, p. 325–336, 2009 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2008.11.005>
- LEFEBVRE, T.; MIAMBI, E.; PANDO, A.; DIOUF, M.; ROULAND-LEFÈVRE, C. Gut-specific actinobacterial community structure and diversity associated with the wood-feeding termite species, *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) described by nested PCR-DGGE analysis. **Insectes Sociaux**, v. 56, n. 3, p. 269–276, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00040-009-0020-6>
- MÁRIALIGETI, K.; CONTRERAS, B.; BARABÁS, G.; HEYDRICH, M.; SZABÓ, I. M. True intestinal actinomycetes of millipedes (Diplopoda). **Journal of invertebrate pathology**, v. 45, n. 1, p. 120–121, 1985.
- MEN'KO, E. V.; CHERNOV, I. Yu.; BYZOV, B. A. Interrelationships between yeast fungi and collembolans in soil. **Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 708–715, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S0026261706060142>
- MILLING, A.; SMALLA, K.; MAIDL, F. X.; SCHLOTTER, M.; MUNCH, J. C. Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. **Plant and Soil**, v. 266, n. 1, p. 23–39, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-005-4906-4>
- MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UTTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695–700, 1993.
- PALANIVELOO, K. *et al.* Food Waste Composting and Microbial Community Structure Profiling. **Processes**, v. 8, n. 6, p. 723, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pr8060723>
- PASSOS, S. R.; REIS JUNIOR, F. B. dos; RUMJANEK, N. G.; MENDES, I. de C.; BAPTISTA, M. J.; XAVIER, G. R. Atividade enzimática e perfil da comunidade bacteriana em solo submetido à solarização e biofumigação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 7, p. 879–885, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000700012>
- POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, v. 152, n. 1, p. 95–103, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(00\)01172-4](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(00)01172-4)
- SARDAR, P.; ŠUSTR, V.; CHROŇÁKOVÁ, A.; LORENC, F. Metatranscriptomic holobiont analysis of carbohydrate-active enzymes in the millipede *Telodeinopus aoutii* (Diplopoda, Spirostreptida). **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 10, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2022.931986>. Acesso em: 6 jul. 2023.
- ŠUSTR, V.; ŠIMEK, M.; FAKTOROVÁ, L.; MACKOVÁ, J.; TAJOVSKÝ, K. Release of greenhouse gases from millipedes as related to food, body size, and other factors. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 144, p. 107765, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107765>



SUTTHISA, W.; PARAPHONG, W.; PIMVICHAI, P. Plant Growth-promoting Ability and Pathogen Inhibitory Effect of Actinomycetes Isolated from Fecal Pellets of the Giant Millipede *Thyropygus resimus* (Diplopoda). **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 849–860, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.22207/JPAM.17.2.11>

TEIXEIRA, K. R. S. **BASES MOLECULARES E GENÉTICA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO: Documentos 32.** Seropédica-RJ: Embrapa Agrobiologia, 1997. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAB-2010/27221/1/doc032.pdf>. Acesso em: 2 jul. 2023.

TOKUDA, G.; WATANABE, H. Hidden cellulases in termites: revision of an old hypothesis. **Biology Letters**, v. 3, n. 3, p. 336–339, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0073>

VON WINTZINGERODE, F.; GÖBEL, U. B.; STACKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 213–229, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00351.x>

WARNECKE, F. *et al.* Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. **Nature**, v. 450, n. 7169, p. 560–565, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature06269>

ZANI, S.; MELLON, M. T.; COLLIER, J. L.; ZEHR, J. P. Expression of nifH Genes in Natural Microbial Assemblages in Lake George, New York, Detected by Reverse Transcriptase PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 3119–3124, 2000.

ZHAN, Y.; CHANG, Y.; TAO, Y.; ZHANG, H.; LIN, Y.; DENG, J.; MA, T.; DING, G.; WEI, Y.; LI, J. Insight into the dynamic microbial community and core bacteria in composting from different sources by advanced bioinformatics methods. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 4, p. 8956–8966, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20388-7>

ZILLI, J. E.; SANTOS, E. L.; HAGLER, L. M.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Desenvolvimento de meio de cultivo para microrganismos do solo utilizando solo como fonte de nutrientes. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA 2003, Florianópolis-SC. **Anais**. Florianópolis-SC: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003.