

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CIÊNCIA DO SOLO**

**DISSERTAÇÃO**

**Diversidade de Microrganismos no Trato Intestinal e  
Resíduos Digestivos de *Trigoniulus corallinus*  
(Gervais) (Diplopoda, Spirobolida, Pachybolidae)**

**Samuel Ribeiro Passos**

**2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CIÊNCIA DO SOLO**

**DIVERSIDADE DE MICRORGANISMOS NO TRATO INTESTINAL E  
RESÍDUOS DIGESTIVOS DE *Trigoniulus corallinus* (GERVAIS)  
(DIPLOPODA, SPIROBOLIDA, PACHYBOLIDAE)**

**SAMUEL RIBEIRO PASSOS**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Gustavo Ribeiro Xavier**

*e Co-orientação da Professora*  
**Maria Elizabeth Fernandes Correia**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2010

631.46  
P289d  
T

Passos, Samuel Ribeiro, 1983-.  
Diversidade de microorganismos no trato intestinal e resíduos digestivos de *Trigoniulus corallinus* (Gervais) (Diplopoda, Spirobolida, Pachybolidae) / Samuel Ribeiro Passos - 2010.  
50 f.: il.

Orientador: Gustavo Ribeiro Xavier.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia.

Bibliografia: f. 38-43.

1. Microbiologia agrícola - Teses. 2. Aparelho digestivo - Teses. 3. Fauna do solo - Teses. I. Mazur, Nelson, 1955-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO**

**SAMUEL RIBEIRO PASSOS**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**  
no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23/02/2010

---

Gustavo Ribeiro Xavier. Dr. Embrapa Agrobiologia  
(Orientador)

---

Lucia Helena Cunha dos Anjos. Ph.D. UFRRJ

---

Luís Henrique de Barros Soares. Dr. Embrapa Agrobiologia

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus por nos permitir mais uma vitória ao longo de nossa jornada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudos concedida.

Ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo por permitir meu ingresso e tornar possível a confecção desta dissertação.

À Embrapa Agrobiologia por oferecer todo suporte necessário.

Aos meus Orientadores Dr. Gustavo Xavier e Dra. Maria Elizabeth por me credenciarem e acreditarem em meu potencial para que pudéssemos conduzir esta dissertação.

A Vívian, minha futura esposa pela paciência e apoio.

A toda equipe do laboratório de Ecologia Microbiana da Embrapa Agrobiologia, principalmente meus estimados amigos, João Luiz, Paulo Ivan e Andrea.

Às pesquisadoras Dra. Verônica Reis e, principalmente, a Dra. Vera Baldani pelo apoio e tempo consumidos em meu auxílio nas análises finais.

## RESUMO

PASSOS, Samuel Ribeiro. **Diversidade de microrganismos no trato intestinal e resíduos digestivos de *Trigoniulus Corallinus* (GERVAIS) (DIPLOPODA, SPIROBOLIDA, PACHYBOLIDAE)**. 2010. 50f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

A crescente demanda por processos biológicos alternativos, ambientalmente favoráveis e eficientes na transformação de material lignocelulósico, ampliando seu potencial de aplicação agroindustrial, estimula pesquisas em todo o mundo. Assim, microrganismos isolados na natureza, em ecossistemas específicos, tornam-se cada vez mais importantes pela sua diversidade metabólica e fisiológica, que lhes confere grande potencialidade no desenvolvimento de processos biotecnológicos de interesse à sociedade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a comunidade microbiana associada ao trato intestinal do diplópode *Trigoniulus corallinus* e a bioprospecção de microrganismos com capacidade celulolítica. Os diplópodes foram coletados e incubados em dietas com serrapilheira de grama batatais (*Paspalum notatum*) e sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*). As amostragens aconteceram aos 15, 30, 45 e 75 dias de incubação. O trato intestinal de cinco indivíduos foi removido e seccionado o terço posterior tratado em ultrassom e estocado. Procedeu-se a extração de DNA da microbiota associada ao trato intestinal, serrapilheira e coprólito, com análise por DGGE utilizando o gene 16S rDNA, DGGE para grupo actinomicetos e avaliação da presença de genes *nifH*. A análise do gene 16s 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 distribuiu-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. Nos diplópodes alimentados com sabiá, o resultado foi diferente, sendo as amostras de serrapilheira e coprólitos 50% similares às do trato intestinal. Todas as amostragens tiveram genes *nifH* detectados via PCR. Amostras coletadas aos 45 dias foram também inoculadas em meio mineral mínimo de Busnell-Hass adicionado de carboxi-metil-celulose (CMC) como única fonte de carbono. Os microrganismos isolados foram avaliados quanto à capacidade de degradação de celulose e 15 apresentaram índice enzimático maior que 1. O isolado com o maior índice (3,65) foi alvo de outras análises. A visualização em microscópio sugeriu que não se tratava de um isolado e sim de um complexo de microrganismos atuando na degradação da celulose. Há evidências de FBN no trato intestinal do diplópode e microrganismos proliferados em meio CMC pela boa amplificação de genes *nifH* e proliferação em meio com ausência de nitrogênio. A comunidade de procariotos foi influenciada pela dieta oferecida até os 45 dias e a comunidade de actinomicetos foi condicionada em função da dieta. Foram isolados microrganismos e complexos de microrganismos com capacidade celulolítica, com grande potencial para a busca de tecnologias ambientalmente sustentáveis na geração de agrobioenergia.

**Palavras-chave:** Microbiota associada ao trato intestinal. FBN no trato intestinal. Enzimas celulolíticas.

## ABSTRACT

PASSOS, Samuel Ribeiro. **Diversity of microorganisms in the gut and food waste of *Trigoniulus corallinus* (GERVAIS) (DIPLOPODA, SPIROBOLIDA, PACHYBOLIDAE)**. 2010. 50p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

The increasing demand for biological processes alternative, environmentally friendly and efficient in converting lignocellulosic material, expanding their application potential for agribusiness, motivates researches worldwide. Thus, organisms isolated in nature, in specific ecosystems, become increasingly important because of their physiological and metabolic diversity, which gives them a great potential in the development of biotechnological processes of interest to society. The aim of this study was to assess the microbial community associated with the intestinal tract of millipede *Trigoniulus corallinus* and bioprospecting for microorganisms with cellulolytic capacity. The millipedes were collected and incubated with litter in diets of grass (*Paspalum notatum*) and “sabia” (*Mimosa caesalpinifolia*). Sampling occurred at 15, 30, 45, and 75 days of incubation. The intestinal tract of five individuals was removed, sectioned the posterior third, processed and stored in ultrasound. DNA from microbes associated with the intestinal tract, litter and coprolite was extracted, and DGGE analysis using 16S rDNA, DGGE group actinomycetes, and it was evaluated the presence of *nifH* genes. The 16s gene analysis by DGGE revealed a microbial diversity conditioned by the diet offered to 45 days. After this period, this effect was no longer visible. The community associated with coprolites and the type of litter was distributed in separate clusters of samples from the intestinal tract. This effect was not observed in the community assessment of actinomycetes, where the big difference for division of groups was the diet. The animals fed on grass litter showed a diverse community, and they were not influenced by time or compartmentalization. The samples associated with litter and coprolites were 80% similar to samples from the intestinal tract. In millipedes fed with material from *Mimosa caesalpinifolia*, the result was different, the samples of litter and coprolites were 50% similar to the intestinal tract. All samples had *nifH* genes detected by polymerase chain reaction. Samples collected at 45 days were also inoculated in mineral minimum medium of Busnell-Hass added carboxymethyl-cellulose (CMC) as sole carbon source. Colonies were evaluated for their ability to breakdown cellulose enzyme and 15 had an index greater than 1. The isolate that showed the highest rate (3.65) was subjected to further analysis. The microscope observation suggested that this was not an isolated but a complex of microorganisms acting on the degradation of cellulose. There is evidence of BNF in the intestinal tract of the millipede and microorganisms proliferated in CMC through the proper amplification of *nifH* genes and proliferation in medium within nitrogen. The community of prokaryotes was influenced by the diet offered to the community up to 45 days, and the actinomycetes community was conditioned by the diet. It was possible to isolate microorganisms and complexes of microorganisms with cellulolytic capacity, with great potential in the search for environmentally friendly technologies in generating agrobioenergy.

**Key words:** Gut microbiology. BNF in the gut. Cellulolytic enzymes.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>2</b>
2.1	<b>Matéria Orgânica</b>	2
2.2	<b>Fauna do Solo</b>	3
2.3	<b>Decomposição da Matéria Orgânica</b>	3
2.4	<b>Interação Fauna do Solo e Microrganismos</b>	5
2.5	<b>Importância da Microbiota Intestinal</b>	8
2.6	<b>Caracterização de Microrganismos</b>	9
2.7	<b>Insumo Biológico</b>	10
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>12</b>
3.1	<b>Coleta de Amostra de Diplópodes</b>	12
3.2	<b>Extração de DNA dos Microrganismos Associados aos Diferentes Compartimentos</b>	12
3.2.1	Obtenção do DNA da comunidade microbiana associada à serrapilheira	12
3.2.2	Obtenção do DNA da comunidade microbiana associada ao intestino posterior	12
3.2.3	Obtenção do DNA da comunidade microbiana associada ao coprólito	12
3.2.4	Obtenção do DNA da massa celular crescida em meio adicionado carboxi-metil-celulose (CMC)	13
3.3	<b>Amplificação para o Gene 16S rDNA Utilizando-se os Iniciadores Universais</b>	13
3.4	<b>Amplificação por 16s do Grupo Actinomicetos</b>	14
3.5	<b>Amplificação para Genes <i>nifH</i></b>	14
3.6	<b>Análise por DGGE (Gel de Eletroforese em Gradiente de Desnaturante Químico)</b>	14
3.7	<b>Prospecção de Microrganismos com Capacidade Celulolítica</b>	15
3.8	<b>Análise Genotípica dos Isolados por Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)</b>	15
3.8.1	Re-isolamento	15
3.8.2	Análise por seqüenciamento do 16S rDNA e microscopia	15
3.9	<b>Re-isolamento do Complexo S10.2+</b>	16
3.10	<b>Indicação da Possível Capacidade de Fixação Biológica de Nitrogênio</b>	16
3.11	<b>Tratamento dos Dados</b>	16
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>17</b>
4.1	<b>Diversidade Bacteriana</b>	17
4.1.1	Extração do trato intestinal	17
4.1.2	Análise por 16S rDNA utilizando iniciadores universais	17
4.1.3	Análise por 16S rDNA utilizando iniciadores para actinomicetos	20
4.2	<b>Análise da Presença de Genes <i>nifH</i></b>	23
4.3	<b>Bioprospecção de Microrganismos com Capacidade Celulolítica</b>	24
4.3.1	Análise e seleção por ARDRA	27
4.3.2	Re-isolamento em meio TY	27
4.3.3	Re-isolamento em Glicose-MMBH	29
4.3.4	Análise por seqüenciamento do 16S rDNA	31
4.3.5	Incubação e microscopia de S10.2+	33
4.3.6	Tentativa de re-isolamento de S10.2 +	34



<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>38</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Um dos principais papéis da biomassa na natureza é armazenar carbono, contribuindo para a diminuição do efeito estufa. Nesta biomassa se encontra também um grande potencial energético, o qual vem atraindo grande atenção da comunidade científica. A possibilidade de agregar valor a biomassa, possibilitando seu uso em aplicações que proporcionem mais benefício à sociedade, mantendo seu caráter sustentável. Contudo, a degradação e obtenção de energia armazenada na biomassa ainda é difícil (XU, F. 2004). Utilizam-se várias estratégias de lise química, pre-tratamentos químicos, hidrólise enzimática e a fermentação microbiana. Esta última é a técnica mais promissora por sua eficiência, mas ainda assim é pouco explorada (HIMMEL et al., 2007).

Em ambientes naturais, a fauna do solo atua no processo de ciclagem de nutrientes, iniciando a degradação dos compostos adicionados ao solo. Dentre os organismos se encontram os cupins ou térmitas, que tem reconhecida capacidade de se alimentar de resíduos com elevada relação C/N. Esta capacidade vem despertando o interesse da comunidade científica pelo seu potencial biotecnológico (WARNECKE et al., 2007). 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. Segundo MEN'KO (2006) as pesquisas de microrganismos associados a fauna do solo se iniciaram utilizando-se os métodos tradicionais de cultivo em meio artificial, acessando uma pequena parte da comunidade existente.

O diplópode *Trigoniulus corallinus* é um representante da macrofauna do solo passível de manipulação, pela sua ampla capacidade de dispersão e por se alimentar dos mais variados resíduos existentes na natureza (CORREIA, 2003) É capaz de se associar a microbiota em seu trato intestinal, atuando diretamente na decomposição e assimilação de alimentos desfavoráveis nutricionalmente para outros organismos. Recentemente, a incorporação de métodos moleculares associados a métodos de cultivo vem acessando uma maior fração de membros não cultiváveis associados ao trato intestinal (KUKOLYA et al. 2002). Técnicas de genotipagem baseadas em perfil de eletroforese ou simplesmente "fingerprint" são ferramentas amplamente utilizadas na avaliação de comunidades microbianas, por sua versatilidade e resultados rápidos. Entre elas o Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante (DGGE; MUYZER et al., 1993) e Polimorfismo de Conformação da Fita Simples (SSCP; SCHWIEGER & TEBBE, 1998).

A hipótese deste trabalho foi a de que existem microrganismos com capacidade hidrolítica associados à microbiota intestinal de *T.corallinus* e que seu perfil pode ser alterado em função da dieta oferecida.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de procariotos e actinomicetos, presença de genes *nifH* de microrganismos associados ao trato intestinal de *Trigoniulus corallinus*, bem como isolar microrganismos com capacidade celulolítica, também associados ao trato intestinal do diplópode.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Matéria Orgânica

A matéria orgânica do solo (MOS) pode ser definida como a quantidade de carbono total do solo, proveniente da deposição de compostos orgânicos oriundos da fotossíntese que é adicionada ao solo. Esta se apresenta por um complexo sistema de substâncias que é transformado por fatores químicos, físicos e biológicos sendo um conjunto de substâncias altamente heterogêneo, que inclui numerosos compostos de carbono, variando de açúcares, ácidos orgânicos de baixas massas moleculares, proteínas e outros constituintes biológicos, até o conjunto complexo de produtos recalcitrantes resultantes de transformações químicas e microbianas, denominado de substâncias húmicas.

Segundo BREZNAK & BRUNE (1994) a fixação de carbono atmosférico pela fotossíntese gira em torno de  $1,36 \times 10^{17}$  g por ano. A biomassa oriunda da fotossíntese é formada basicamente por compostos lignocelulósicos, constituídos em sua maioria por celulose, hemicelulose e lignina, que são caracterizados a seguir:

a) **Celulose:** é o componente mais abundante das paredes vegetais (BREZNAK & BRUNE, 1994) sendo um homopolímero de glicose em ligação  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4. As microfibrilas formam a parte cristalina da celulose e conferem rigidez e resistência à hidrólise, enquanto ocorrem também regiões amorfas. A hidrólise enzimática da celulose é realizada por grupo de enzimas denominado genericamente de celulasas, mas que é composto por uma mistura de enzimas com diferentes atividades e especificidade. Estas estão divididas em três grandes grupos:

- endoglucanases (endo-1,4-glicanases) – são ativas nas regiões amorfas da celulose;
- exoglucanases que incluem as celobiohidrolases (1,4- $\beta$ -D-glucan celobiohidrolases) e as exoglucanases (1,4- $\beta$ -D-glucan glucohidrolase) – atacam as partes terminais da celulose liberando unidades de celobiose e glicose;
- $\beta$ - glicosidases – hidrolisam celobioses e celodextrinas de glicose solúveis em água;

b) **Hemicelulose:** é um heteropolímero composto por polissacarídeos solúveis em meio alcalino e mais facilmente hidrolizáveis por ácidos minerais que a celulose (WILKIE, 1983). Esta compreende diferentes grupos de polissacarídeos em cadeia linear ou ramificadas, sendo distribuídas em três tipos:

- Xilanas e heteroxilanas
- Arabinogalactanas
- Manases e galactomanases

Constituídos em sua maioria por D-xylose, D-manose, L-arabinose ou D-galactose, bem como estes compostos em combinação (BREZNAK & BRUNE, 1994). As xilanas são as principais constituintes da hemicelulose. A hidrólise das xilanas, exige o aparato enzimático da hidrólise de celulose, incluindo também a endo-1,4- $\beta$ -xylanase e as  $\beta$ -xilosidases que hidrolizam as xilobioses e pequenos oligosacarídeos liberados pela endo-1,4- $\beta$ -xylanase

c) **Lignina:** é o constituinte de mais difícil degradação, sendo sua estrutura descrita como subunidades de fenilpropanóides em ligações C-C no centro da molécula de lignina. A lignina não pode ser separada do complexo ligninocelulósico por estar intimamente associada a polímeros ligados à hemicelulose, sendo necessária a degradação parcial do complexo. A resistência da lignina ao ataque enzimático é atribuída ao seu tamanho, estrutura complexa e

estabilidade química pelos tipos de ligação entre os monômeros (BREZNAK & BRUNE, 1994). A depolimerização da lignina pode ocorrer via ataque de ligninaperoxidases, produzidas, por exemplo, pelo mofo branco das raízes (*Himatia corticales*), que libera peroxidases extracelulares que iniciam a “combustão enzimática” da macromolécula. A reação libera uma mistura de monômeros, dímeros e outros oligômeros aromáticos como produto da depolimerização. As peroxidases são normalmente restritas a fungos. Entretanto RAMACHANDRA et al., (1988) reportaram sua produção por *Streptomyces spp*, afirmando que outros actinomicetos também têm a capacidade de degradar a lignina precipitada em meio ácido.

A decomposição da lignocelulose é carregada inicialmente por microrganismos, principalmente fungos e bactérias. Contudo, um acréscimo na decomposição é proporcionado pela associação com macro-invertebrados do solo, que tem efeito sobre a fragmentação e dispersão do material vegetal e auxiliam na desestruturação da lignocelulose. Grande parte dos constituintes da lignocelulose são polímeros de estrutura não nitrogenada, o que confere a lignocelulose baixo teor de nitrogênio (0,03 a 0,1% N) (LYND et al., 2002). O sucesso de microrganismos decompositores está relacionado à alta eficiência no uso do nitrogênio, e/ou aporte externo de nitrogênio via fixação biológica de nitrogênio (FBN).

## 2.2 Fauna do Solo

A fauna de solo pode ser dividida em 3 grandes grupamentos, principalmente em função de seu tamanho, mas que também tem conotação funcional (SWIFT et al., 1979). A microfauna do solo compreende uma gama de invertebrados aquáticos que se distribuem nos filmes d'água do solo e que têm tamanho inferior a 0,2 mm. A mesofauna do solo compreende os organismos de tamanho de 0,2 mm até 2,0 mm e compreende diversos grupos como ácaros, colêmbolos e enquitreídeos. A macrofauna do solo do solo compreende organismos com tamanho superior a 2 mm e este grupo de invertebrados difere grandemente em função de morfologia, comportamento e habilidade de colonizar e modificar o meio, sendo descritos como “engenheiros do ecossistema” (LAVELLE et al., 1997).

É reconhecida a importância que os invertebrados saprófagos encontrados na serapilheira e no solo tem em processos de decomposição e ciclagem de nutrientes (BYZOV et al., 1996). Estes atuam como fragmentadores primários, sendo capazes de processar a matéria orgânica adicionada ao sistema, reduzindo o tamanho dos fragmentos e, por conseguinte, aumentando sua superfície específica (CORREIA et al., 2009).

Quanto maior a fragmentação maior será a digestibilidade do material ingerido. A velocidade de decomposição dependerá de características do material, como teor de lignina e polifenóis, relação C/N elevada, temperatura, umidade, grau de decomposição e inoculo. A passagem pelo trato intestinal auxilia o processo de ciclagem, devido ao ataque de enzimas digestivas secretadas por glândulas salivares e células epiteliais e pela inoculação com os microrganismos presentes no trato intestinal (CORREIA & AQUINO, 2005).

## 2.3 Decomposição da Matéria Orgânica

A biomassa vegetal adicionada ao solo pode ser incorporada ou perdida para o ambiente na forma de CO<sub>2</sub> pela atividade microbiana, que contribui com mais de 90% da ciclagem de nutrientes (KENNEDY, 1999). A decomposição da biomassa vegetal é seguida por uma gama de microrganismos que decompõe inicialmente os compostos de menor peso molecular como açúcares, amidos, gorduras, etc., seguidos dos compostos ligninocelulósicos (LYND et al., 2002).

Esta decomposição é mediada por grupos de bactérias e fungos, tendo representantes do domínio *Eucarya*, e alguns celulolíticos do domínio *Archaea*. Dentre as eubacterias com

capacidade celulolítica se destaca a ordem aeróbica *Actinomycetales* (Filo *Actinobacteria*) e a ordem anaeróbica de *Clostridiales* (Filo *Firmicutes*), mostradas em detalhes na Tabela 1.

**Tabela 1:** Principais bactérias com capacidade celulolítica.

Gênero	Espécie representativa
<b>Aeróbicos</b>	
<i>Acidothermus</i>	<i>A. cellulolyticus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. pumilis</i>
<i>Caldibacillus</i>	<i>C. cellovorans</i>
<i>Cellulomonas</i>	<i>C. flavigena</i> , <i>C. uda</i>
<i>Cellvibrio</i>	<i>C. fulvus</i> , <i>C. gilvus</i>
<i>Cytophaga</i>	<i>C. hutchinsonii</i>
<i>Erwinia</i>	<i>C. carotovora</i>
<i>Micromonospora</i>	<i>M. chalcae</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. fluorescens</i> var. <i>cellulosa</i>
<i>Sporocytophaga</i>	<i>S. myxococcoides</i>
<i>Rhodothermus</i>	<i>R. marinus</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>S. reticuli</i>
<i>Thermobifida</i>	<i>T. fusca</i>
<b>Anaeróbicos</b>	
<i>Acetivibrio</i>	<i>D. cellulolyticus</i>
<i>Anaerocellum</i>	<i>D. thermophilum</i>
<i>Butyrivibrio</i>	<i>B. fibrisolvens</i>
<i>Caldicellulosiruptor</i>	<i>C. saccharolyticum</i>
<i>Clostridium</i>	<i>C. thermocellum</i> , <i>C. cellulolyticum</i>
<i>Eubacterium</i>	<i>E. cellulosolvens</i>
<i>Fervidobacterium</i>	<i>F. islandicum</i>
<i>Fibrobacter</i>	<i>F. succinogenes</i>
<i>Halocella</i>	<i>H. cellulolytica</i>
<i>Ruminococcus</i>	<i>R. albus</i> , <i>R. flavefaciens</i>
<i>Spirochaeta</i>	<i>S. thermophila</i>
<i>Thermotoga</i>	<i>T. neapolitana</i>

Adaptado de LYND et al. (2002).

Entre os fungos se destacam aqueles com capacidade aeróbica. Sendo que, entre as 700 espécies de *Zygomycetes*, somente alguns membros do gênero *Mucor* têm demonstrado atividade celulolítica. Em contraste, nas subdivisões Ascomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos, cada uma com mais de 15000 espécies existe uma gama de gêneros que possuem capacidade celulolítica, incluindo *Bulgaria*, *Chaetomium*, e *Helotium* (Ascomicetos); *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Poria*, *Schizophyllum* e *Serpula* (Basidiomicetos); e *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, e *Trichoderma* (Deuteromicetos) que atualmente ainda é o microrganismo padrão para estudos de capacidade hidrolítica (CARLE-URIESTE et al., 1997).

## 2.4 Interação Fauna do Solo e Microrganismos

O solo oferece suporte a um grande conjunto de organismos que desempenham as mais variadas funções e que determinam na maioria das vezes, as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (THEENHAUS & SCHEU, 1996) e que constituem a biota do solo. A diversidade desta é importante para a estabilidade dos ciclos biogeoquímicos que mantêm o ambiente em equilíbrio dinâmico, resultando nas mais diferentes transformações biogeoquímicas realizadas pelos diversos grupos de organismos do solo. Dentro da biota do solo, podem-se destacar os organismos da fauna que em associações com microrganismos podem influenciar direta e indiretamente a ciclagem de nutrientes, aporte de carbono bem como a perda de carbono para a atmosfera (CORREIA & AQUINO, 2005).

Dos grupos que compõem a fauna do solo, a macrofauna especificamente, exerce uma grande influência na fragmentação de serrapilheira, e influencia indiretamente os processos biológicos intermediados por microrganismos (STRIGANOVA, 1995). As interações entre organismos da macrofauna e microrganismos já é conhecida e estudada a algum tempo, principalmente a partir da década de 80 (O'BRIEN & SLAYTOR, 1982; TOKUDA & WATANABE, 2007) em trabalhos com térmitas superiores.

A simbiose de organismos da fauna do solo com microrganismos para a decomposição de polímeros estruturais de lignocelulose vem sendo amplamente estudada e discutida, principalmente no que tange a simbiose em térmitas (TOKUDA & WATANABE, 2007).

O estudo de simbioses com térmitas, visando o entendimento da dinâmica microbiológica vem sendo amplamente divulgado, no intuito de se utilizar estes conhecimentos para a geração de bioenergia (HONGO, 2008). Segundo este autor, a capacidade dos térmitas em degradar complexos lignocelulósicos ocorre devido à comunidade microbiana especializada composta por protozoários flagelados e procariotos. No trato intestinal dos térmitas são encontradas enzimas recombinantes oriundas possivelmente da evolução para catálise do hidrogênio, que é um processo produzido durante a fermentação da celulose (BRUNE & FRIEDRICH, 2000).

A produção de hidrogênio molecular é um importante processo para a acetogênese que ocorre no trato intestinal dos térmitas. Flagelados do filo *Parabasalium* são responsáveis por proteger as organelas produtoras de hidrogênio ou hidrogenossomas, e organelas geradoras de anaerobiose. O metabolismo dos *Parabasalium* do trato intestinal dos térmitas é muito similar a alguns representantes cultiváveis de *Parabasalium* e *Trichomonas vaginalis*, que tiveram seus genomas publicados recentemente (CARLTON et al., 2007).

Em térmitas é reconhecida a associação entre procariotos e flagelados (BRUNE & STINGL, 2005), sendo classificados como endossimbiontes quando em qualquer situação intracelular e como ectossimbiontes quando aderidos à qualquer superfície celular. A associação de procariotos e espiroquetas do gênero *Treponema*, bacteróides, sinergistas e metanogênicos do gênero *Metanobrevibacter*, foi feita no filo TG1, para que não ficassem em árvores filogenéticas dispersas. Estudos de funcionalidade vêm sendo conduzidos em grande escala (TOKUDA & WATANABE, 2007) com base em zimogramas de SDS-PAGE avaliando os diferentes tipos de celulasas e atividade enzimática *in vitro* a partir de celulose microcristalina.

WARNECKE et al. (2007) avaliaram com base em análise metagenômica, a diversidade microbiana do intestino posterior de térmitas da espécie *Nasutitermes*, na Costa Rica, e observaram a ocorrência de representantes de 12 filos e 216 filotipos de bactérias. Estes exploraram várias famílias de celulasas, incluindo em sua maioria glicosidases, celulasas, xilanasas, manosidases e entre outras, perfazendo um total de mais de 100 genes identificados nestes domínios catalíticos e mais 34 grupos de genes com funções não conhecidas. A maior parte da comunidade bacteriana analisada compreende bactérias do filo *Espirochetas* e filo *Fibrobacter*, sendo os principais representantes encontrados as

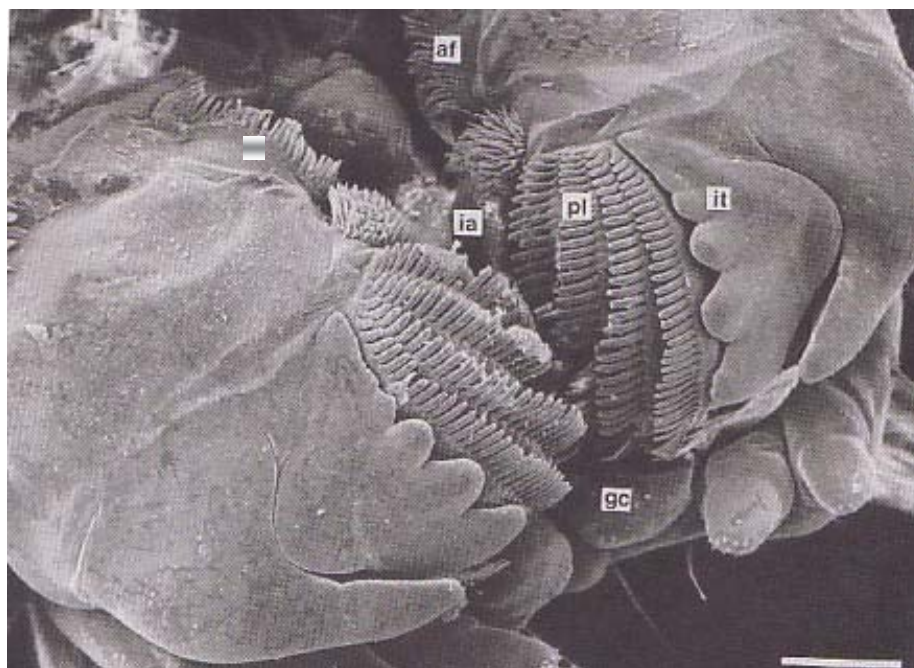
*Treponemas* e *Fibrobacter*, respectivamente, além de várias *Acidobacterias*, *Proteobacterias*, *Firmicutes* e *Bacteroides*. Os autores ressaltaram que, devido à alta quantidade de carbono presente nos resíduos de madeira, a decomposição e posterior incorporação aos tecidos animais devia ser acrescida de nitrogênio, para que a relação C/N fosse a mais próxima do organismo do térmita. Para isto, avaliaram a diversidade de genes *nifH* na microbiota do intestino posterior, sendo identificados 12 genes *nifH* homólogos completos, e entre 31 e 100 homólogos para outros componentes do complexo nitrogenase como *nifD*, *nifK*, *nifE* e *nifN*, indicando a possível presença de bactérias fixadoras de nitrogênio. LILBURN et al., (2001) atribuíram a FBN no intestino posterior de térmitas a bactérias simbióticas *Treponema sp.* E a *Espirochetas* de vida livre, baseando-se também na presença de genes *nifH* no DNA genômico.

KNAPP et al. (2009a) avaliaram a comunidade microbiana associada ao trato intestinal, excretas e três fontes de alimento de uma espécie de minhoca (*Lumbricus rubellus*), considerada decompositora chave, em ambiente nos Alpes Austríacos. Os autores avaliaram a comunidade de procariotos através do gene 16S rDNA por PCR-DGGE e de clonagem. Os autores verificaram que grande parte dos microrganismos associados ao trato intestinal pertencia às proteobactérias. Estes chegaram a isolar 59 microrganismos em meio de cultivo, mas não avaliaram presença de genes relacionados à fixação biológica de nitrogênio.

Estas simbioses entre os organismos da fauna do solo estão sendo apresentadas recentemente, em sua maioria em estudos com minhocas (oligoquetos) e térmitas (cupins). Apesar de que, em sistemas florestais, as minhocas raramente formam um agrupamento funcionalmente ativo e os cupins possuem um comportamento social, que não pode ser extrapolados para toda a fauna do solo (CORREIA, 2003).

Outro grupo da fauna do solo, que tem capacidade de se nutrir saprofiticamente, atuando na ciclagem de nutrientes são os diplópodes. Estes são invertebrados que possuem dois pares de pernas por segmento e tamanho variando de 2 a 30 cm, sendo conhecidos vulgarmente como gongolos, piolho de cobra ou embuas. Os diplópodes desenvolveram capacidade de se alimentar de detritos vegetais que geralmente compõem a serrapilheira sobre o solo. Porém, estes são materiais que em sua composição são pobres em constituintes facilmente degradáveis e a sua maior parte é composta por celulose, hemicelulose e lignina (CORREIA & AQUINO, 2005), que são compostos de parede celular muito estável com baixos teores de nitrogênio e fósforo, o que dificulta sua decomposição e incorporação aos tecidos biológicos. Devido à baixa eficiência de assimilação, estes saprófagos são obrigados a ingerir grandes quantidades de serrapilheira (MARTIN & MARINISSEN, 1993), e em alguns casos há evidência de coprofagia (MCBRAYER, 1973). A simbiose com microrganismos especializados na decomposição destes compostos se mostrou então como uma estratégia ímpar para os diplópodes, visto que estes possuem vasta atividade enzimática especializada na decomposição dos mesmos (ABE & HIGASHI, 1991).

Dentre estes se destaca no Brasil o *Trigoniulus corallinus* que é um diplópode sem origem definida, é uma espécie exótica facilmente encontrada em pilhas de serrapilheira e composto nas áreas de clima tropical. Os diplópodes são essencialmente fragmentadores apresentando um sistema bucal que consiste de um par de mandíbulas e um par de maxilas. Cada mandíbula é dividida em 3 partes (Figura 1): o cardo, as estipes e o lobo gnatal móvel, que possui dentes e uma superfície raspadora (BARNES, 1984) e tem como função fragmentar o material vegetal em minúsculas partículas. Ventralmente, as mandíbulas são cobertas pelo gnatoquilário, que é formado pela maxila (CORREIA & AQUINO, 2005).



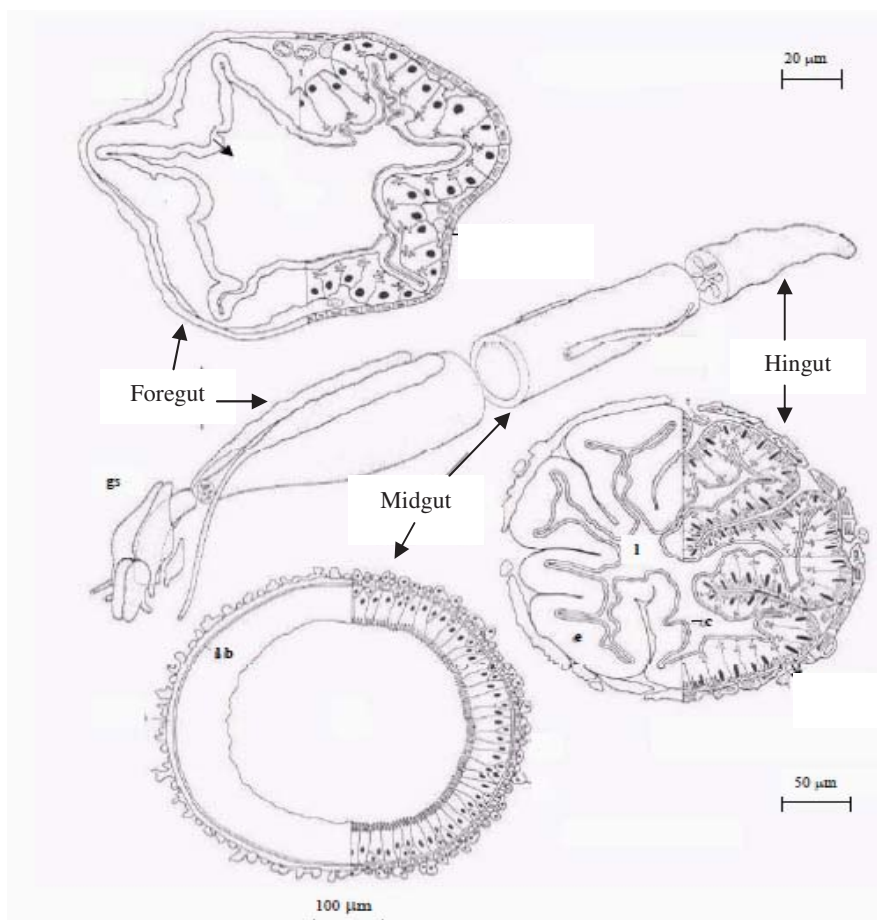
**Figura 1:** Fotomicrografia eletrônica de varredura dos lobos na região da cavidade oral do diplópode *Julus scandinavus*. AF: franja anterior; PL: lamela pectinada; IT: dente interno; GC: gnatoquilário (modificado de KÖHLER & ALBERTI, 1990) Escala de 100 um.

O trato intestinal é dividido em três partes (Figura 2): intestino anterior ou “Foregut”, intestino médio ou “midgut” e o intestino posterior ou “hindgut”. Segundo CAZEMIER et al., (1997), o intestino posterior é um compartimento tamponado, aeróbico e onde ocorre a maior atividade microbiana, na ordem de  $1,5 \pm 6,7 \times 10^{10}$  bactérias.mL<sup>-1</sup>, enquanto no “midgut” fica em torno de  $1,4 \pm 0,52 \times 10^9$  bactérias.mL<sup>-1</sup> gut e no “foregut”  $1,7 \pm 1,3 \times 10^9$  bactérias.mL<sup>-1</sup> gut.

CORREIA (2003) avaliou a preferência alimentar e a transformação de serrapilheira por diplópodes em três tipos de cobertura vegetal antrópica, nas camadas L e F<sup>1</sup> da serrapilheira. As coberturas foram *Pseudosamanea guachapele*, *Acacia mangium* e *Eucalyptus grandis*. A autora observou sempre um maior consumo de serrapilheira na camada F das culturas amostradas, exceto do *Eucalyptus grandis* em que o consumo foi o mesmo e a maior preferência alimentar foi de *P.guachapele*, seguida de *A.mangium* e *E. grandis*. Esta serrapilheira foi oferecida a três espécies de diplópodes *Leptogoniulus sorornus*, *Trigoniulus corallinus* e *Rhinocricus padbergi*. Os maiores consumos foram de *L. sorornus*, seguido de *T. corallinus* e *R. padbergi*. A autora avaliou também a microbiota bacteriana associada à serrapilheira e aos coprólitos das diferentes espécies através da amplificação do gene 16S rDNA e análise por DGGE (Gel de eletroforese em gradiente de desnaturante) bem como a densidade de microrganismos em meio de cultura. Pode-se observar um incremento de bactérias na passagem pelo tubo digestivo dos diplópodes, sendo as maiores diversidades encontradas após a ingestão de serrapilheira por *T. corallinus*, resultado este confirmado pela análise por DGGE, em que as amostras provindas dos coprólitos de *T. corallinus* foram as mais contrastantes em relação às amostras de serrapilheira.

<sup>1</sup> A camada F se apresenta na interface entre a serrapilheira imediatamente depositada e o solo. É a zona onde ocorre intensa atividade biológica, com a fragmentação promovida pela fauna do solo e a degradação bioquímica promovida pelos microrganismos. A camada L é composta por folhas recém-caídas e ainda não atacadas pela fauna de solo, constituindo-se, portanto, de folhas inteiras (TOUTAIN, 1987).





**Figura 2:** Diagrama esquemático do trato intestinal *Craspedosoma alemannicum* com o trato intestinal seccionado em Foregut, Midgut e Hindgut (modificado de KÖHLER et al., (1991).

Recentemente KNAPP et al. (2009b) avaliaram por PCR-DGGE variações na comunidade microbiana associada ao trato intestinal do diplópode *Cylindroiulus fulviceps* em função do tempo e dieta oferecida. Este diplópode é encontrado em regiões temperadas, e foi coletado nas regiões alpinas de Tyrol, na Áustria, onde a temperatura média do solo fica em torno de 12°C. A coleta dos diplópodes foi feita após 6 semanas de incubação e alimentação basicamente com esterco bovino, serrapilheira de *Vaccinium gaultheroides* e de *Luzula sp.* Os autores utilizaram os marcadores moleculares 16S (procariontes) e 18S rDNA (eucariontes). Contrastando com resultados descritos por BYZOV et al. (1993, 1998), os autores detectaram a presença de fungos no intestino posterior do diplópode, e atribuíram a sua presença não somente como fonte de alimento para o diplópode, mas participando no processo digestivo.

## 2.5 Importância da Microbiota Intestinal

WARNECKE et al. (2007) foram os pioneiros ao analisar a comunidade microbiana associada a térmitas superiores com base em metagenômica. Os autores escolheram esta espécie devido a não associação com protozoários para a decomposição de celulose. A partir deste trabalho, foram surgindo outros trabalhos na literatura internacional, que utilizaram como ambiente de análise e/ou prospecção o trato intestinal de diferentes organismos. KNAPP et al., (2009a) avaliaram a comunidade microbiana associada a minhoca (*Lumbricus rubellus*) por PCR-DGGE e biblioteca genômica. LEFEBVRE et al., (2009) avaliaram por nested PCR-DGGE a estrutura e a diversidade de actinobactérias associadas a o térmita

superior *Nasutitermes corniger*. MATSUI et al. (2009) avaliaram a comunidade microbiana associada ao ceco (primeira porção do intestino grosso a receber conteúdo do intestino delgado) de avestruz, um herbívoro não ruminante, e encontraram uma nova espécie de *Fibrobacter*. MICHELLAND et al., (2009), avaliaram por CE-SSCP (Polimorfismo de Conformação da Fita Simples por Eletroferese em Capilar) a comunidade bacteriana no trato digestivo de coelhos, onde somente 20% da riqueza de bactérias era conhecida, e notaram comportamento alimentar cecotrófico, um tanto particular em herbívoros. SU et al., (2008) avaliaram por PCR-DGGE as mudanças ocorridas no trato intestinal de leitões, devido a grandes mortalidades ocorrerem nesta fase por diarreias ocasionadas principalmente por antibióticos e promotores de crescimento usados na produção animal.

Ressaltando a importância do conhecimento das interações entre a comunidade associada ao trato intestinal (Gut) e o hospedeiro, RAOULT (2009) afirma que a obesidade em humanos está associada à diminuição no intestino de bactérias gram-negativas, especialmente *bacteroidetes* e ao consequente aumento de *firmicutes* gram-positivos. A origem deste desbalanceamento pode estar relacionada à ingestão de iogurtes e/ou alimentos probióticos, com concentrações acima de  $10^8$  *Lactobacillus spp.* ou *Bifidobacterium spp.* por grama ou mL do produto. Esta perturbação pode também ser advinda do uso de probióticos na criação de aves, suínos e vitelos, bem como efeito dos antibióticos usados na produção destes animais. SEKIROV et al. (2008) ilustraram como a perturbação da microbiota intestinal com antibióticos administrados via oral aumenta drasticamente a infecção por *Salmonella enterica*.

DAMMAN & SURAWICS (2009) reportam também a ocorrência de doenças intestinais infamatórias, câncer colorretal e doenças atópicas oriundas da perturbação da microbiota intestinal. Os autores tecem ainda uma analogia quanto a importância de microrganismos no intestino humano e citam a ocorrência de em torno de 10-100 trilhões de bactérias no intestino grosso, 10 vezes mais do que o número de células somáticas e germinativas em nosso corpo. Comentam ainda que a relação entre o número de genes destes micro-organismos somados é de 100 genes microbianos para cada 1 gene humano. Os autores concluem que somos mais “bactérias” do que “humanos”, e que esta população desempenha papel crítico na saúde gastrointestinal e controle de doenças.

Com o avanço dos estudos em ecologia microbiana do trato intestinal, espera-se elucidar se este efeito ocorre também para outros organismos na natureza.

## 2.6 Caracterização de Microrganismos

Em um ambiente estável, a diversidade de bactérias é alta (ØVREÅS & TORSVIK, 1998). No solo, apesar de ocorrer uma grande diversidade genética, acessada por análises de seqüências genômicas, um pequeno número de linhagens são cultiváveis e isoladas pelos meios tradicionais de cultivo (HUGENHOLTZ et al., 1998).

A introdução de métodos independentes de cultivo em meio artificial na taxonomia microbiana, principalmente baseados na seqüência do 16S rDNA, levou a drástica mudança na perspectiva de quantificação da diversidade microbiana ( THOMPSON et al., 2005).

Atualmente, a limitação dos métodos de cultivo, como ferramenta capaz de acessar a diversidade microbiana do solo, vem sendo superada por métodos moleculares, nos estudos vinculados à diversidade microbiana. Abordagens que utilizam métodos de cultivo de microrganismos vinculados às técnicas moleculares têm se mostrado uma estratégia promissora nos estudos microbianos (JANSSEN et al., 2002).

EDENBORN & SEXTONE (2007) analisaram a diversidade bacteriana de amostras de solo coletadas em três épocas diferentes. Para tal utilizaram a metodologia de DGGE (MUYZER et al., 1993) e combinaram o cultivo em meios de culturas com a extração direta de DNA. A análise ilustrou que 34% das bandas foram obtidas pela extração direta, 32% a partir do cultivo em placas e 34% de ambas as metodologias. Estes dados demonstram que há

uma complementaridade entre as metodologias e que uma maior diversidade e funcionalidade pode ser acessada combinando as duas abordagens.

Outras estratégias têm sido utilizadas para acessar a diversidade bacteriana utilizando o solo e resíduos vegetais em meio de cultivo e por DGGE (ZILLI et al., 2008)

Uma grande quantidade de trabalhos vem sendo desenvolvida a partir de simbioses, em que os térmitas superiores têm sido foco de vários estudos em relação a diversidade e funcionalidade microbiana no trato intestinal (WARNECKE et al., 2007) no intuito de se elucidar os mecanismos de conversão de compostos ligninocelulósicos á açúcares simples para fins bioenergéticos. Neste intuito, o diplópode *T. corallinus* se mostra como organismo potencial, devido a capacidade de maior ingestão e decomposição de materiais lignificados provindos da serrapilheira, quando comparado aos térmitas, aliado a distribuição espacial, facilidade de manipulação, devido ao maior tamanho e a facilidade de multiplicação.

## 2.7 Insumo Biológico

A decomposição da matéria orgânica pode ser acelerada ou mesmo otimizada com adição de microrganismos selecionados para tal fim. Em métodos de decomposição controlada como a compostagem, já existe um produto comercial denominado EM (Microrganismos Eficientes) comercializado pela Fundação Mokiti Okada, que se constitui basicamente por: bactérias fotossintéticas, que sintetizam substâncias como aminoácidos, ácidos nucléicos, antioxidantes, substâncias bioativas e açúcares, funcionando como promotores de crescimento; bactérias produtoras de ácido láctico, o ácido láctico possui ação esterilizante e auxilia na decomposição de lignina e celulose; leveduras: sintetizam antibióticos e substâncias que auxiliam no desenvolvimento de bactérias e actinomicetos (LEAL, 2006) promovendo maior taxa de ciclagem de nutrientes.

Técnicas como a compostagem bem como seleção de bactérias com capacidade de solubilizar fosfato, potássio, e juntamente com a fixação biológica de nitrogênio, contribuem para maior estabilidade do sistema solo-planta, conseqüentemente, menor dependência de energia externa e menor custo de produção, tornando mais competitiva a cadeia produtiva nacional. De fato, o mercado mundial conta com 50 a 100 bilhões de dólares anuais, provindos da utilização de produtos microbianos (THOMPSON et al., 2005).

A adoção com sucesso do etanol no Brasil despertou nos últimos 20 anos interesse de países europeus e dos USA. Como alternativa ao petróleo, que chegou a US\$ 80,00 em 2006, a produção do etanol de cana se mostra uma alternativa energética viável economicamente, nos dias de hoje. A União Européia planeja a reestruturação do setor de transportes, visando a substituição de 20% no uso de combustíveis fósseis, por combustíveis alternativos até 2020. A política de “Energy Policy Act” americana de 2005 sinalizou para a adoção de 7,5 bilhões de galões de combustíveis alternativos para 2012 (GRAY et al., 2006).

Métodos biológicos, químicos e físicos vêm sendo incorporados às pesquisas em biocombustíveis, contudo ainda não são sustentáveis, devido a várias etapas na sua produção, gerando um delta negativo de energia ao final do processo (HAHN-HAGERDAL, 2006).

Um dos maiores desafios da produção de etanol de celulose é a integração dos processos de engenharia nas áreas de fermentação tecnológica, enzimática e metabólica. Os microrganismos ou complexos microbianos com a capacidade de geração de bioenergia podem reduzir o tempo e o custo de produção deste tipo de energia. A ação integrada de várias enzimas hidrolíticas em um único reator, originárias de um ou mais organismos, acopladas a baixo consumo de açúcares simples pode proporcionar o bioprocessamento eficiente e viável economicamente (HAHN-HAGERDAL, 2006).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta de Amostra de Diplópodes

Os diplópodes (Figura 3) 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 caesalpinifolia*) (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.



**Figura 3:** Exemplos de *T. corallinus* alimentados em serrapilheira de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) (PASSOS, 2010).

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 bacterianas 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 2:** Tratamentos e tempos de coleta

Comunidade microbiana	Tratamentos e tempos de coleta (dias)				
	0 <sup>1</sup>	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 á serrapilheira de sabiá (CS) e grama (CG)					X

<sup>1</sup> Corresponde 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.

## 3.2 Extração de DNA dos Microrganismos Associados aos Diferentes Compartimentos

### 3.2.1 Obtenção do DNA da comunidade microbiana associada à serrapilheira

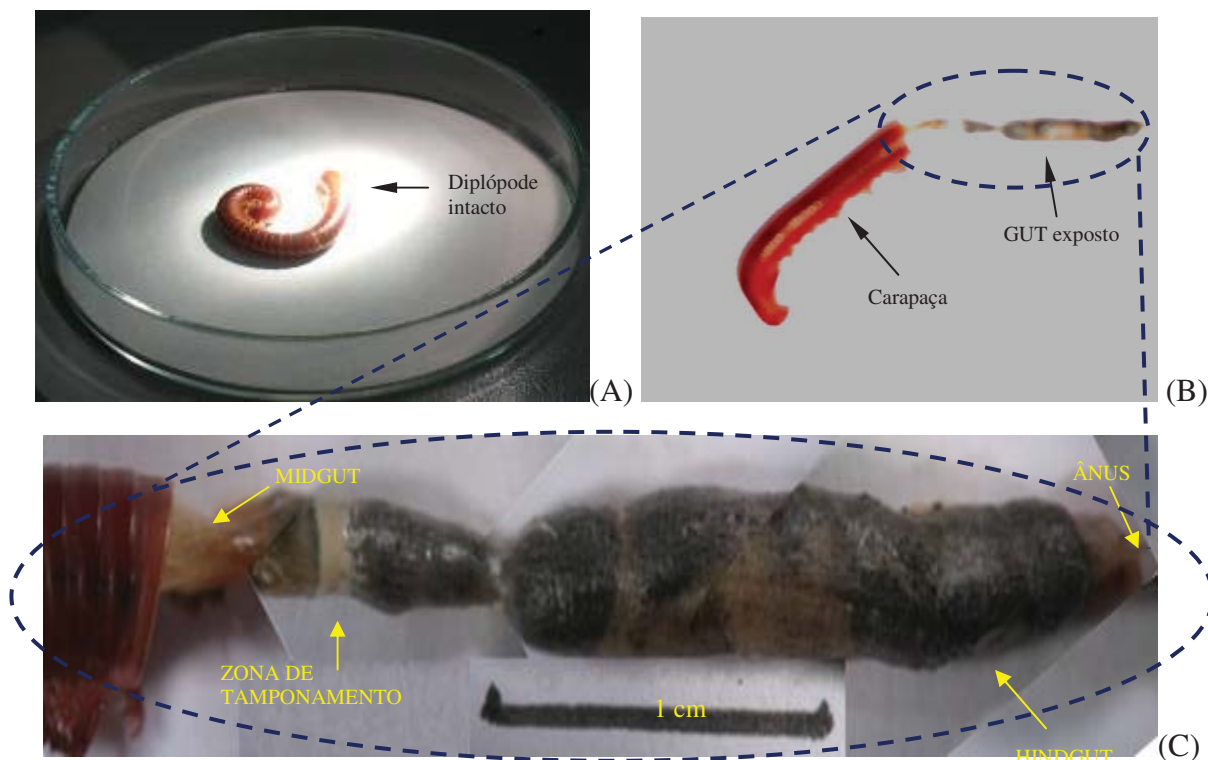
Amostras simples das serrapilheiras de grama e sabiá foram coletadas após 75 dias de incubação com os diplópodes, e homogeneizadas para formar uma amostra composta. Foi retirado cerca de 1g de serrapilheira para extração dos microrganismos aderidos usando em 1,0 mL de solução de Ringer – 47 mM NaCl, 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.

### 3.2.2 Obtenção do DNA da comunidade microbiana associada ao intestino posterior

Foram retirados 5 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.

### 3.2.3 Obtenção do DNA da comunidade microbiana associada ao coprólito

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 4:** A – Diplópode ainda intacto já desinfestado superficialmente. B – Diplópode com a carapaça retirada e o trato intestinal ou “gut” exposto. C – Figura detalhando as divisões do trato intestinal em intestino médio ou “midgut”, Zona de tamponamento (transição), intestino posterior ou “hindgut” e ânus (Final gut).

### 3.2.4 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 MgSO<sub>4</sub>; 0,02g CaCl<sub>2</sub>; 1,0g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,0g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 0,05g FeCl<sub>3</sub>; H<sub>2</sub>O 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 3.2.1.

### 3.3 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 ul contendo tampão de reação 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Taq DNA polimerase 2,5U (Invitrogen cat. N° 11615-010), BSA 0,15ug/uL, dNTP 250 uM e 0,2 uM 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 et al., 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 uL da amostra e 2 uL de corante (0,5% azul de bromofenol, 40% sacarose, 0,1 mol.L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> e fotografado em sistema Kodak GL100.

### **3.4 Amplificação por 16s do Grupo Actinomicetos:**

A reação de PCR foi dimensionada para volume final de 25 ul contendo tampão de reação 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Taq DNA polimerase 2,5U (Invitrogen cat. N° 11615-010), BSA 0,15ug/uL, dNTP 250 uM e 0,2 uM de cada iniciador F243 e R1401 (MILLING et al., 2004) 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.

### **3.5 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 uL em tampão de reação concentração final 1X, 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,15 ug/uL de soro de BSA, 200 mM de dNTP, 1 uM 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. 1uL do produto de PCR foi utilizado como molde para a segunda reação utilizando os iniciadores PolF-GC e Pol R (POLY et al., 2001) ambos na concentração de 1uM, tampão de reação na concentração final de 1X, 2,3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 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 uL da amostra e 2 uL de corante (0,5% azul de bromofenol, 40% sacarose, 0,1 mol.L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> e fotografado em sistema Kodak GL100.

### **3.6 Análise por DGGE - Gel de eletroforese em Gradiente de Desnaturante Químico**

Confirmada a amplificação das amostras, tanto para o gene 16s 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<sup>-1</sup> 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 IIA*) 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.

### 3.7 Prospecção de Microrganismos com Capacidade Celulolítica

Durante a coleta dos microrganismos associados ao trato intestinal, uma alíquota de 100 uL obtida após a fase de tratamento em ultrassom foi plaqueada em meio de cultivo mineral mínimo Bushnell-Haas (MMBH) – 0,2g MgSO<sub>4</sub>; 0,02g CaCl<sub>2</sub>; 1,0g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,0g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 0,05g FeCl<sub>3</sub>; H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 1,0L, contendo como única fonte de carbono o carboxi-metil-celulose (CMC) a 1 %. As placas foram incubadas a 28°C por 5 dias em condições de aerobiose e anaerobiose. As colônias isoladas em meio CMC foram obtidas e estocadas em tubos de 1,5 mL contendo meio CMC sem ágar e glicerol a 50% a -70° C. O teste de atividade hidrolítica foi realizado em triplicata, conduzido em capela de fluxo vertical constituindo-se de incubação das placas em solução de vermelho congo 0,1% por 30 minutos (SALEH-RASTIN et al., 1991), seguida de duas lavagens com água destilada estéril para retirar o excesso de corante. Adicionou-se 5 mL por placa de solução de NaCl 1,0M por 5 min (2x) para retirar todo o corante que não estivesse preso às ligações β1-4 da celulose. Utilizou-se ácido acético glacial 1,0M para aumentar a nitidez da visualização.

### 3.8 Análise Genotípica dos Isolados por Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)

Os isolados foram novamente proliferados em meio CMC e após crescimento, uma alçada foi transferida para microtubo de 1,5 mL estéril, a partir de onde se procedeu a extração de DNA utilizando-se método fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (XAVIER et al., 2004), seguida da amplificação utilizando-se os iniciadores universais para 16S AMP1 e AMP2 (WARD et al., 1992) na concentração de 0,2 uM de cada tampão de reação na concentração final de 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, BSA a 0,15ug/uL, e 2,5 U de Taq DNA polimerase. As condições de amplificação foram 95°C por 5 min, seguidos de 35 ciclos de 93°C 45s, 58°C 45s e 72°C 2 min e extensão final a 72°C por 10 min.

Confirmada a amplificação procedeu-se a clivagem com a endonuclease de restrição *Hinf* I (PROMEGA CORP, cat. R6201) conforme orientação do fabricante. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 3%, 80V por 3,5 horas, seguido de coloração em brometo de etídio 10mg.L<sup>-1</sup>.

#### 3.8.1 Re-isolamento

Todos os isolados foram submetidos à diluição seriada de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup> e plaqueados em meio TY (tryptone- yeast extract – *Difco* Laboratories, Detroit, Mich) e meio Glicose-MMBH (Solução mineral de Bushnell-Hass, substituindo-se a fonte de carbono de CMC por glicose), incubados a 28°C por cinco dias e re-estocados em meio CMC líquido com glicerol a 50%. Procedeu-se o teste de atividade celulolítica, como descrito anteriormente.

#### 3.8.2 Análise por seqüenciamento do 16S rDNA e microscopia

Os isolados que apresentaram somente uma seqüência do gene 16S rDNA confirmado pelo ARDRA, foram submetidos ao seqüenciamento em seqüenciador automático Mega Base (General Electric).

Os isolados que obtiveram seqüenciamento completo foram visualizados em microscópio ótico de contraste de fase com aumento de até 100X.



### 3.9 Re-isolamento do complexo S10.2+

O isolado ou complexo de microrganismos S10.2+ foi inoculado em meio CMC líquido sem a adição de nitrato de amônia como fonte de nitrogênio e incubado sem agitação a temperatura constante de 28°C. A massa celular que se desenvolveu no meio (Figura 19) foi visualizada em microscópio ótico e fotografada no aumento de 100X (Figura 20).

Para tentativa de re-isolamento este foi incubado em meio líquido DYGS (BALDANI, 1996) e TY sob agitação constante de 100 RPM a 28°C por 120 horas, seguido de diluição seriada de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$  e plaqueamento em meio DYGS com e sem indicador azul de bromotimol na concentração de 0,5%, meio TY, também com e sem indicador e meio BDA (Potato Dextrose Agar – Difco Cat. No. 213300) com indicador. As placas foram incubadas a 28°C até o aparecimento das colônias. Em seguida procedeu-se a um novo isolamento das colônias proliferadas em meio DYGS e BDA com indicador, a partir da diluição  $10^{-10}$ . O isolamento foi feito novamente em meio DYGS com indicador e meio CMC. As placas foram incubadas a 28°C por cinco dias.

### 3.10 Indicação da Possível Capacidade de Fixação Biológica de Nitrogênio

Os isolados obtidos a partir do complexo S10.2+ foram novamente inoculados em meio semi-sólido JMV (BALDANI, 1996), e incubados a 28°C por cinco dias para avaliação da capacidade de proliferação. Estes foram novamente re-inoculados em meio JMV semi-sólido por três vezes para a completa extinção das reservas de nitrogênio da célula.

### 3.11 Tratamento dos dados

Os microrganismos proliferados em meio CMC foram repicados de forma a se obter colônias isoladas, nas quais foram medidos com auxílio de régua o tamanho da colônia e do halo de degradação visualizado após o teste de atividade celulolítica. Estas medidas foram utilizadas para se obter o índice enzimático extracelular como HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975). Sendo uma relação entre diâmetro médio do halo de degradação ( $\text{Øh}$ ) e o diâmetro médio da colônia ( $\text{Øc}$ ), de tal modo que quanto maior o índice, maior capacidade que o microrganismo possui em degradar celulose. [ $I_e = (\text{Øc} + \text{Øh}) / \text{Øc}$ ].

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

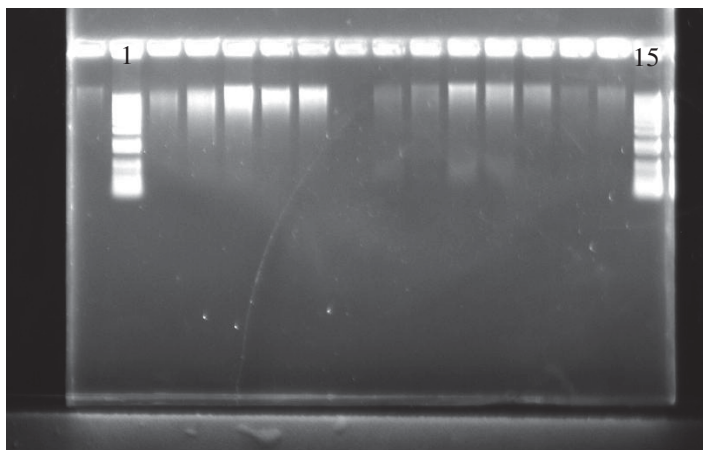
### 4.1 Perfil e Diversidade Bacteriana

#### 4.1.1 Extração do trato intestinal

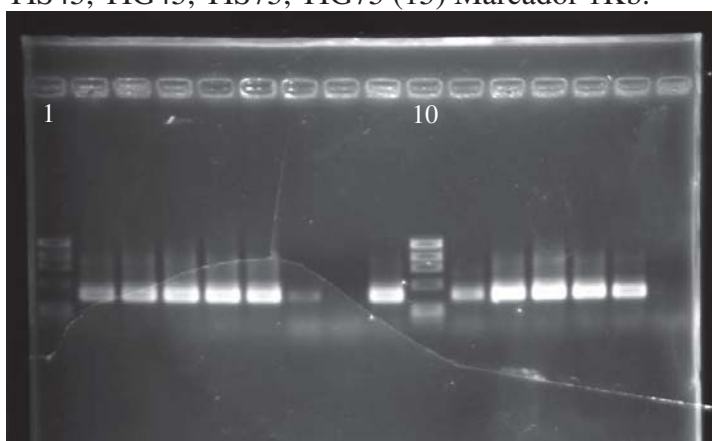
O diplópode *T.corallinus* quando adulto apresenta tamanho aproximado de 5 a 7 cm. Este fato facilita a manipulação do trato intestinal (gut) como detalhado na Figura 4, quando comparado ao dos térmitas em torno de 1 cm (WARNECKE et al., 2007)

#### 4.1.2 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 ( Figura 5 e 6) como as amostras do trato intestinal.

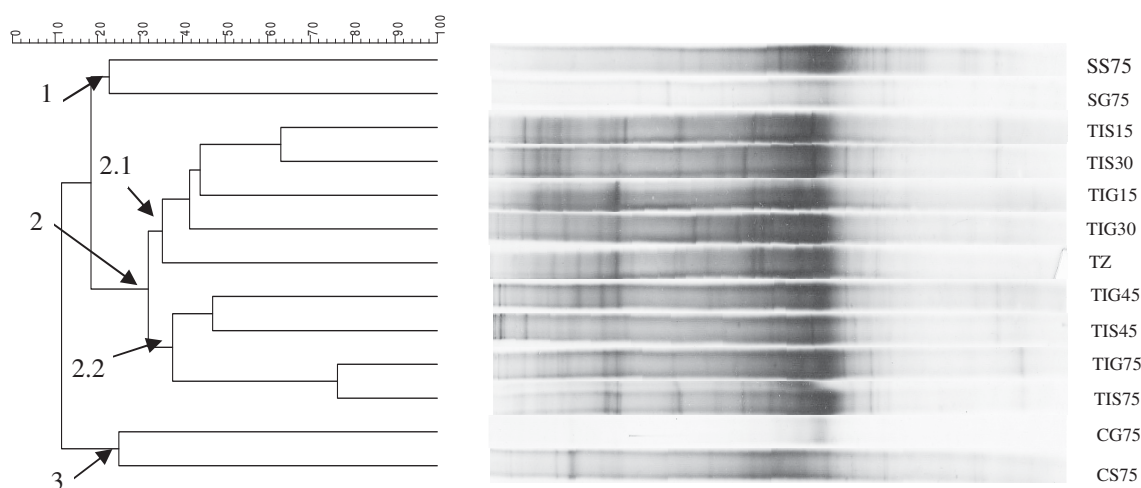


**Figura 5:** Gel de agarose a 0,8% contendo a extração de DNA das seguintes amostras: (1) Marcador 1Kb, TZ, TIS15, TIG15, TIS30, TIG30, CG75, CS75, SS75, SG75, TIS45, TIG45, TIS75, TIG75 (15) Marcador 1Kb.



**Figura 6:** 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.

As amostras amplificadas com o gene 16S rDNA como alvo foram submetidas a análise por DGGE e deram origem ao dendrograma mostrado na Figura 7.



**Figura 7:** Dendrograma de similaridade entre os tratamentos, gerado pelo programa Gel Compar II (Applied Maths).

No dendrograma (Figura 7) 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, as amostras de serrapilheira (grupo 1), trato intestinal (grupo 2) e coprólito (grupo 3), a diversidade bacteriana se mostrou distinta, 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 7) 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.

Com base no padrão destas amostras (figura 7, 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 7, 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 8 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 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. 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 a serrapilheira apresentou similaridade em relação ao controle de 23,5% e a comunidade microbiana no coprólito foi de 10,65% em média. A comunidade microbiana no coprólito foi a que apresentou maior alteração em relação à comunidade microbiana no trato intestinal dos animais no tempo zero.

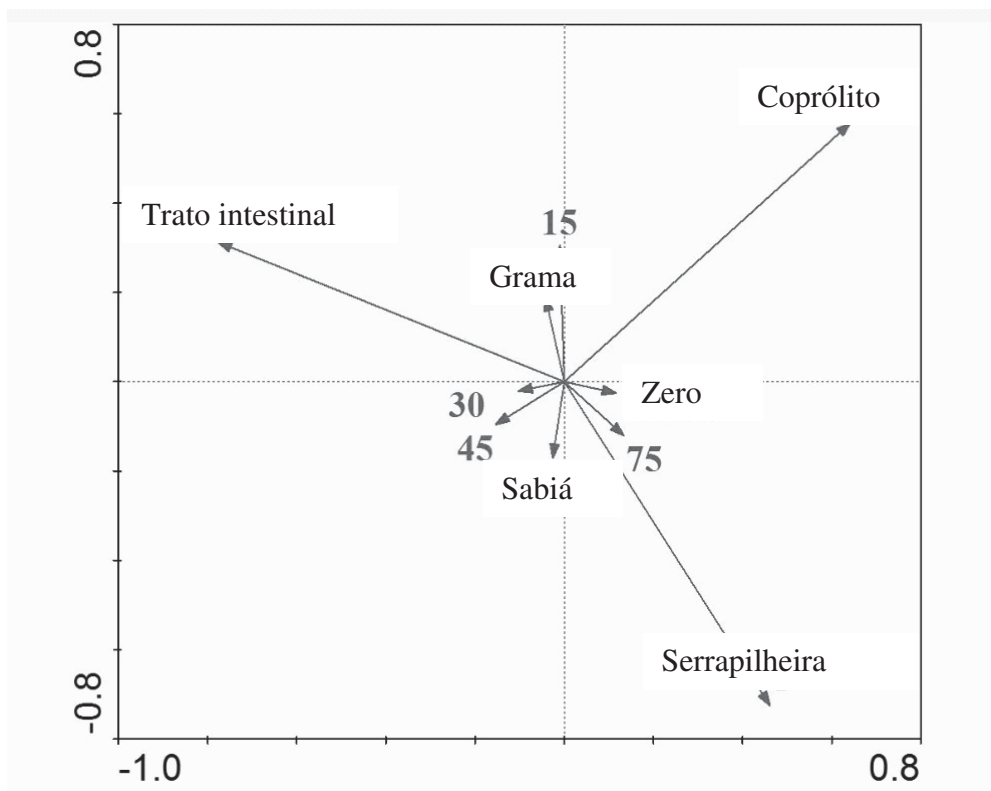
BYZOV et al., (1993 e 1996) e MARIALIGETI et al., (1985), utilizando métodos tradicionais de cultivo em placas e microscopia, evidenciaram que a microbiota intestinal era afetada pelo tipo de dieta oferecida. Os autores afirmam que a inoculação promovida pela fonte de alimento é a principal condicionadora 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 de Enterobacteriaceas.



**Figura 8:** 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.

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 9 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.



**Figura 9:** Análise de correspondência gerada pelo programa Canoco utilizando dados binários (presença ou ausência de bandas no gel).

A ordenação gerada na Figura 9 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.

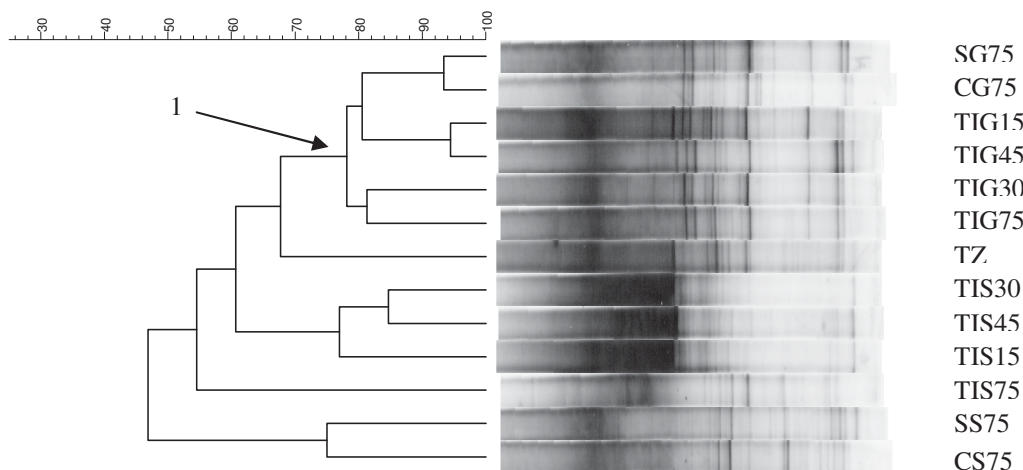
Os tratamentos de 75 dias de incubação e o tempo zero foram agrupados juntos, ilustrando a capacidade de resiliência da comunidade microbiana do trato intestinal. Dados estes corroborados por KNAPP et al., (2009a), em que os autores avaliaram a composição da microbiota do trato intestinal da minhoca *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*.

#### 4.1.3 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 10.

No dendrograma da Figura 10 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.

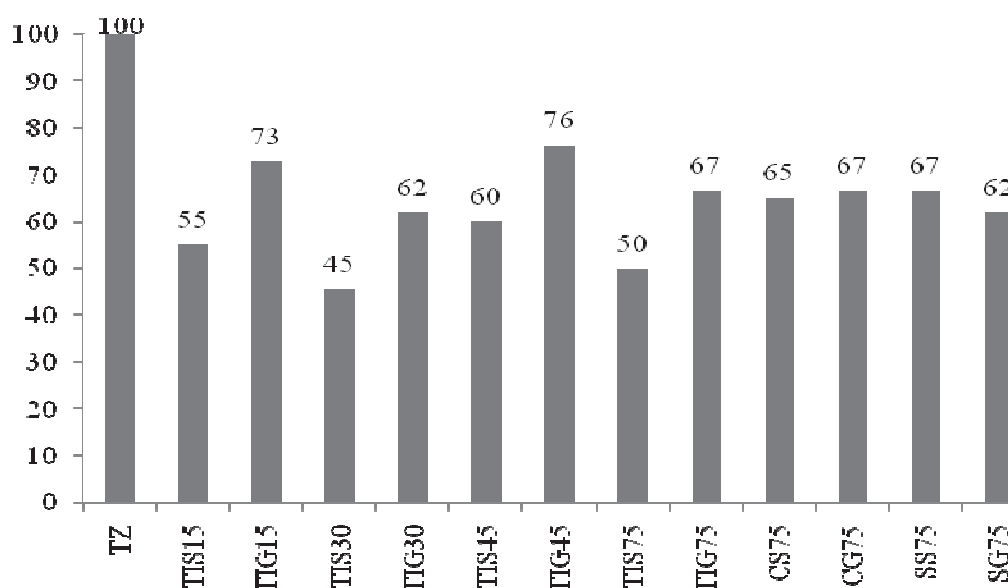


**Figura 10:** Dendrograma de similaridade gerado pelo programa Gel Compar II (Applied Maths) para o grupo dos actinomicetos.

O dendrograma foi formado basicamente por um grupamento (grupo 1 na Figura 10) 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 12), 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 11 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.

Ao contrário do resultado apresentado para o marcador molecular 16S rDNA, que exprimi a variação de toda a comunidade de bactérias presentes, a Figura 11 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 microbológica.



**Figura 11:** Percentagem de similaridade genética entre as comunidades de actinobacterias 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.

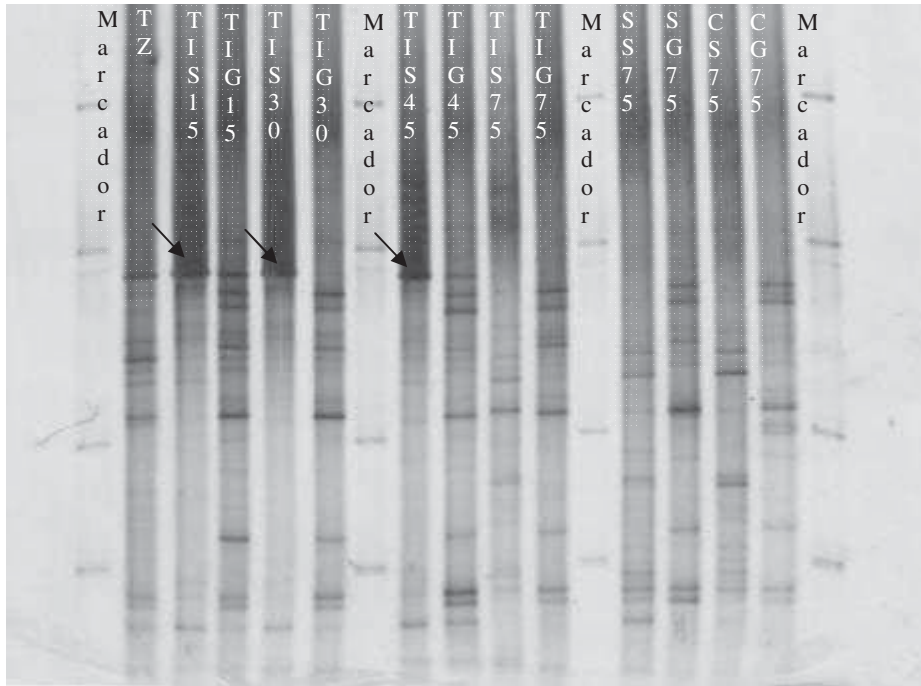
CHU et al. (1987) avaliaram a presença de actinomicetos nocardioform no trato intestinal e coprórito de *Glomeris hexatisha*, diplópode de clima temperado. Obtiveram inicialmente 1435 bactérias isoladas, que foram divididas em 13 grupos, e 122 estirpes isoladas de nocardioformes. A primeira espécie deste organismo foi descrita em 1983. Este autor executou testes em diversas fontes de carbono, com resultados positivos para utilização de arabinose, dextrina, frutose, galactose, glicerol, lactose, manitol, melibiose, rafinose, sacarose e xilose, mas negativos para a decomposição de celulose e o crescimento anaeróbico.

A presença de actinomicetos no trato intestinal de cupins foi descrita inicialmente por HUNGATE (1946), que isolou um *Micromonospora* sp. VON WINTZINGERODE et al., (1997) em sua revisão constataram que poucas seqüências de 16S rDNA pertenciam às actinobacterias, 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 actinobacterias, detectaram por nested-PCR, várias seqüências de actinobacterias 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 10. LEFEBVRE et al., (2009) propôs a hipótese que a comunidade de actinobacterias 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 9. Os autores eluíram e seqüenciaram bandas do gel de DGGE que julgaram ser importantes e reportaram membros das famílias *Corynebacteriaceae*, *Streptomyetaceae*, *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*.

LEFEBVRE et al. (2009) 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.

Na Figura 12 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.



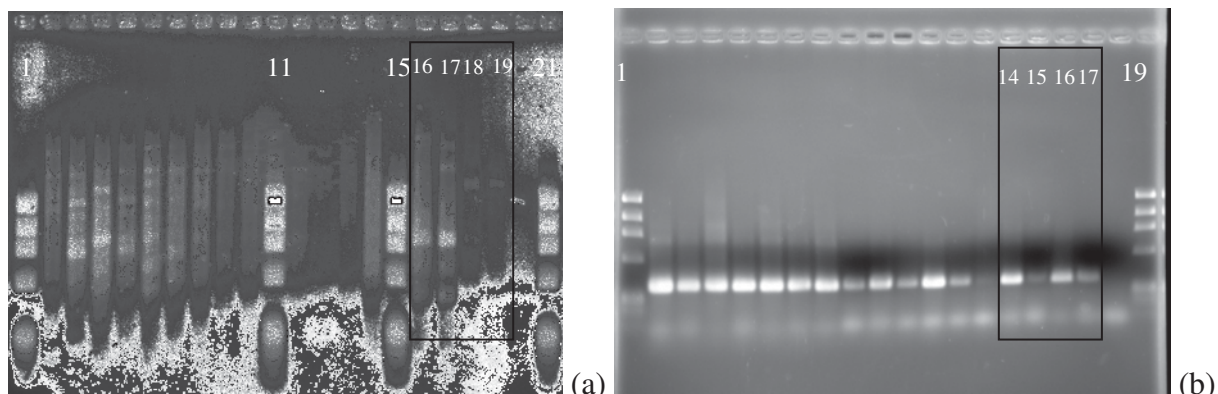
**Figura 12:** Gel de DGGE ilustrando o comportamento da comunidade de actinomicetos associados á serrapilheira, trato intestinal e coprólito de *T.corallinus*.

#### 4.2 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.

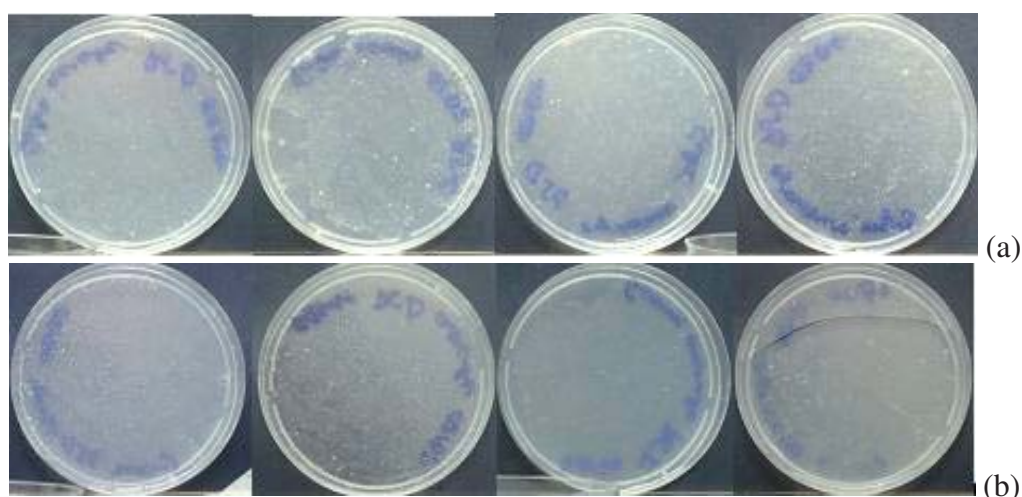
A Figura 13 ilustra o resultado da amplificação via PCR das amostras para a presença de genes *nifH* e também as amostras da massa celular proliferada em meio CMC. A presença de genes do grupo *nif*, que são genes que codificam para o complexo nitrogenase. O gene *nifH* codifica para a subunidade Fe-proteína (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. Ainda não está evidenciado se a nutrição do diplópode é diretamente influenciada pelo material digerido ou pela proteína microbiana.





**Figura 13:** 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.

As amostras 14, 15, 16 e 17 (detalhe na Figura 13b) representam a amplificação direta da massa celular proliferada em meio CMC em aerobiose e anaerobiose (Figura 14). As amostras de microrganismos incubadas em aerobiose apresentaram bandas mais nítidas no gel, o que indica maior número de cópias do gene, conseqüentemente maior número de representantes aptos a FBN. A amplificação do gene *nifH* nesta massa celular implica na capacidade de alguns microrganismos proliferarem em meio seletivo como o CMC e estarem aptos a fixar nitrogênio biologicamente. Esta característica seria fundamental no processamento de resíduos rurais e urbanos com alta relação C/N. Resultados similares foram descritos por WARNECKE et al. (2007), avaliando microbiota intestinal do térmita superior *Nasutitermes corniger*.

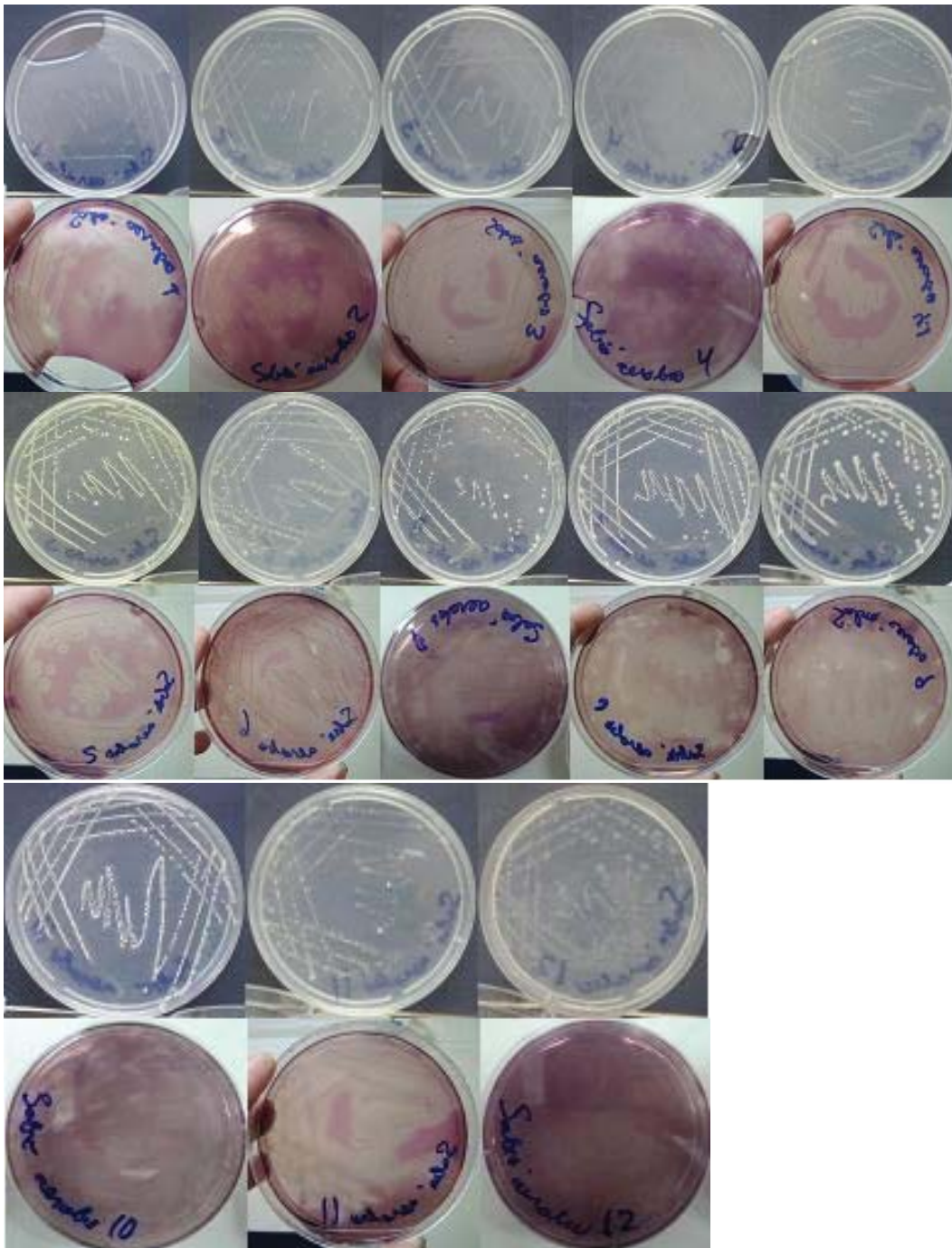


**Figura 14.** Da esquerda para a direita: Meio CMC com microrganismos proliferados por em 6 e 15 dias em aerobiose e 6 e 15 dias em anaerobiose oriundos do trato intestinal de diplópodes incubados em serrapilheira de sabiá(A) e grama(B)

### 4.3 Bioprospecção de Microrganismos com Capacidade Celulolítica

Foram testados 24 dos 48 isolados obtidos (microrganismos associados a serrapilheira de sabiá e grama em aerobiose, pelo teste do vermelho congo. Esta molécula tem afinidade pelas ligações  $\beta$ 1-4 da celulose, de modo que onde houver celulose o corante se mantém

ligado e onde ela foi degradada não haverá corante, indicando atividade de enzimas celulolíticas (Figura 15). Os microrganismos são oriundos de diplópodes incubados em serrapilheira de sabiá, submetidos ao teste de capacidade celulolítica após a extração.



**Figura 15:** Isolados a partir da comunidade associada ao diplópode alimentado com serrapilheira de sabiá, incubada em meio CMC e submetida ao teste de capacidade hidrolítica através do corante vermelho congo. São eles: S1, S2, S3, S4, S4.1, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12.

Na Figura 15 foi ilustrada a prospecção inicial, onde somente os isolados cultivados em aerobiose obtidos do trato intestinal dos diplópodes associados a serrapilheira de sabiá foram testados. Foram obtidos 13 isolados, um a mais a partir do isolado 4. Foram selecionados os isolados S1, S2, S3, S4, S4.1, S5, S6, S7 e S11, que apresentaram atividade

celulolítica por este método. Dos isolados a partir do trato intestinal dos organismos incubados em serrapilheira de grama somente 3 apresentaram atividade celulolítica, sendo eles G8, G11 e G12.1 como ilustrado na Figura 16.



**Figura 16:** Isolados oriundo do trato intestinal dos diplópodes incubados em serrapilheira de grama e apresentaram atividade celulolítica: G8, G11 e G12.1

No decorrer das avaliações foi observado que alguns isolados não estavam purificados, sendo repicados para outras placas até o total isolamento. Dessa forma passou-se de 12 para 21 para as amostras de serrapilheira de sabiá e os de grama estão em 13.

Paralelamente foi calculado o índice enzimático extracelular como HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975). Sendo este a relação entre diâmetro médio do halo de degradação ( $\varnothing h$ ) e o diâmetro médio da colônia ( $\varnothing c$ ), de tal modo que quanto maior o índice, maior a capacidade do microrganismo de degradar celulose.

**Tabela 3:** Resultados do teste de atividade celulolítica

Isolado	$\varnothing c$	$\varnothing h$	Íe	Isolado	$\varnothing c$	$\varnothing h$	Íe
G1	-	-	-	S3	1	1	2
G2	-	-	-	S3.1	3	1	1,33
G3	-	-	-	S4.1	-	-	-
G4	-	-	-	S4.1.1	1	1	2
G5	-	-	-	S4	-	-	-
G6	-	-	-	S5	3	1	1,33
G7	-	-	-	S6	1	1	2
G8	-	-	-	S6.1	3	2	1,66
G9	-	-	-	S7	-	-	-
G10	-	-	-	S7.1	3	1	1,33
G11	-	-	-	S8	2	2	2
G12	-	-	-	S8.1	-	-	-
G12.1	3	5	2,67	S9	3	1	1,33
S1.1	-	-	-	S9.1	3	1	1,33
S1.2	-	-	-	S10 (fica amarelada)	-	-	-
S2	-	-	-	S10.1	-	-	-
S2.1	-	-	-	S10.2	2	5	3,5

( $\varnothing c$ ): diâmetro médio da colônia (mm), ( $\varnothing h$ ): diâmetro médio do halo de degradação (mm), **Íe**: índice enzimático; (-): não produziu halo. ( $\text{Íe} = (\varnothing c + \varnothing h) / \varnothing c$ )

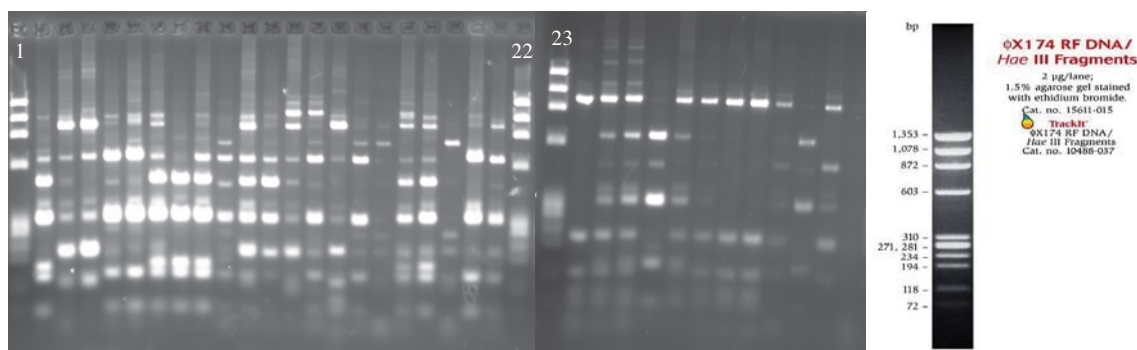
Dos 34 isolados, 19 (56%) apresentaram atividade celulolítica. Os isolados S2.1, S2, G12, G11, G8, G6 e G2 mostraram baixa atividade, tendo degradado a celulose apenas abaixo

da colônia, e a forma foi puntiforme, sendo difícil de mensurar a degradação. Já os isolados G12.1, S3, S3.1, S4.1.1, S5, S6, S6.1, S7.1, S8, S9, S9.1 e S10.2 apresentaram atividade de celulase além da colônia. O índice enzimático variou de 1,33 a 3,5, sendo um parâmetro muito útil para avaliar e selecionar microrganismos com potencial biotecnológico.

Quanto maior o índice, maior a quantidade ou variedade de celulases liberadas no meio. RUEGGER & TAUKE-TORNISIELO (2004) utilizaram este índice na avaliação de atividade celulolítica de alguns fungos isolados de solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins – SP, utilizando também a CMC como fonte de carbono. Das 80 linhagens avaliadas 15 não cresceram no meio com CMC e 29 não apresentaram atividade celulolítica, perfazendo um total de 55% dos isolados sem atividade.

#### 4.3.1 Análise e seleção por ARDRA

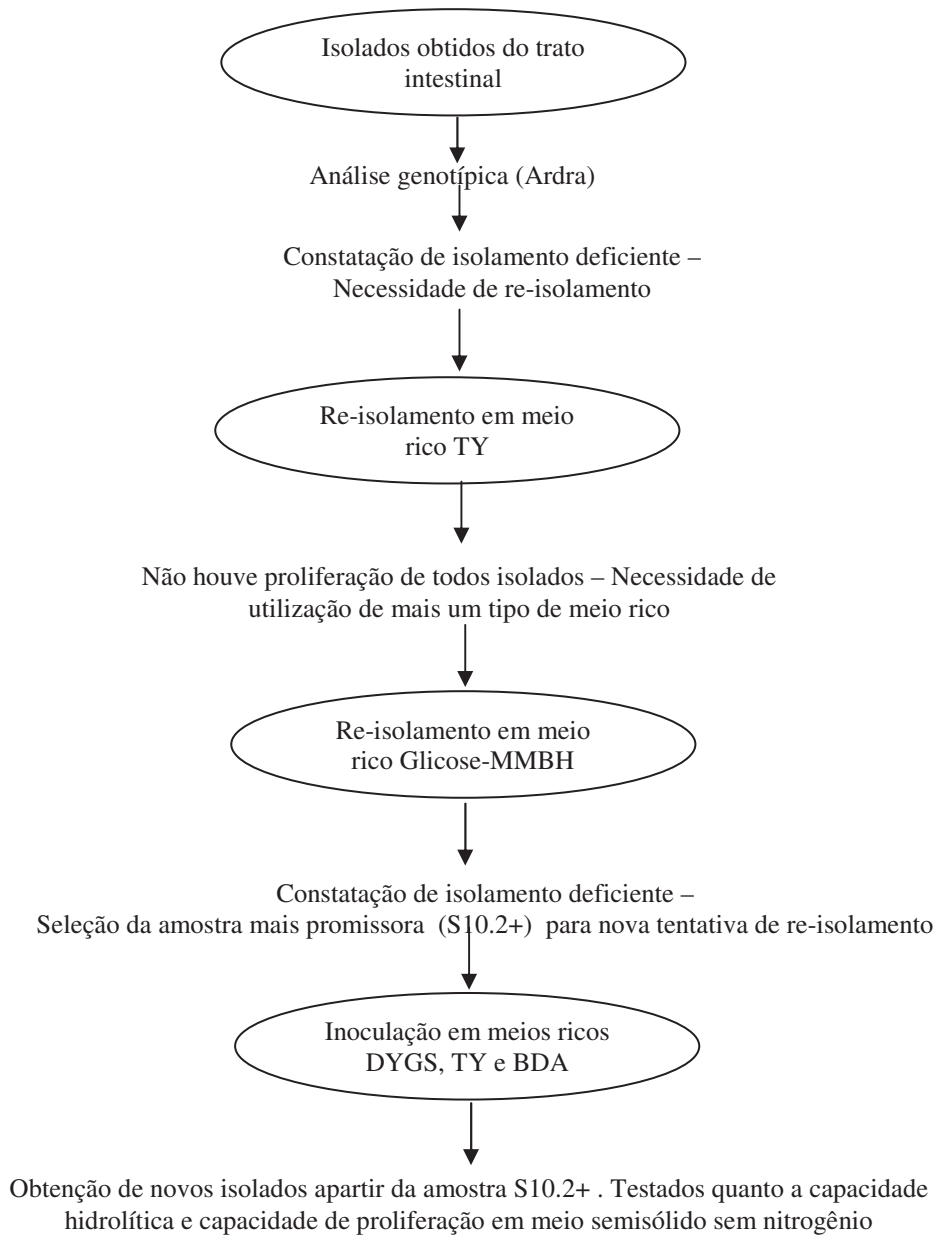
Para avaliar a diversidade desta coleção de bactérias isoladas, procedeu-se a análise por ARDRA, mas não foi possível interpretar os resultados da restrição, como mostrado na Figura 17. Como o gene 16S rDNA possui em torno de 1500 bp, o resultado da restrição deve possuir um somatório de bandas em torno deste valor. É possível observar que o somatório é superior a 1500 bp para a maioria dos isolados, indicando a contaminação, ou melhor a necessidade de re-isolamento e purificação em meio de cultivo.



**Figura 17:** Isolados de serrapilheira de grama e sabiá. 1 – Marcador de peso molecular  $\phi$ 174. 2 a 21 isolados de sabiá (S1.1, S1.2, S2, S2.1 S3, S3.1, S4, S4.1, S4.1.1, S5, S6, S6.1, S7, S7.1, S8, S8.1, S9, S9.1, S10, S10.1, S10.2). 22 e 23 – Marcador de peso molecular  $\phi$ 174, seguidos os isolados de grama G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11, G 12 e G12.1.

#### 4.3.2 Re-isolamento em meio TY

Com base no resultado do ARDRA, constatou-se a necessidade de re-isolamento mostardo em forma de esquema na Figura 18. Os 34 isolados foram submetidos à diluição seriada, plaqueados em meio rico TY e incubados. Somente alguns isolados proliferaram em meio TY, sendo eles: S1.1, S1.2, S2, S2.1, S3.1, S4, S4.1, S5, S7, S8, S8.1, S9.1, S10, S10.2, G1, G8, G9 e G12.1. Durante a incubação foram constatadas diferentes morfologias de colônia, dentro de cada amostra e foram novamente repicadas em meio CMC para avaliação da atividade celulolítica. O resultado é mostrado em detalhe na Tabela 4. Os re-isolados foram renomeados com o nome do isolado e o símbolo + (mais).



**Figura 18:** Diagrama esquemático mostrando o fluxo necessário ao re-isolamento.

**Tabela 4:** Isolados proliferados em meio TY, novamente inoculados em meio CMC e procedido o teste de atividade celulolítica, ( $\emptyset c$ ): diâmetro médio da colônia (mm), ( $\emptyset h$ ): diâmetro médio do halo de degradação (mm).  $\acute{I}e$ : índice enzimático; (-): não produziu halo. ( $\acute{I}e = (\emptyset c + \emptyset h) / \emptyset c$ )

Isolado	$\emptyset c$	$\emptyset h$	$\acute{I}e$	$\acute{I}e$ anterior	Isolado	$\emptyset c$	$\emptyset h$	$\acute{I}e$	$\acute{I}e$ anterior*
G1	-	-	-	-	S4.1+	-	-	-	-
G1+	-	-	-	-	S4'	-	-	-	-
G8	-	-	-	-	S4''	-	-	-	-
G8+	-	-	-	-	S4+	-	-	-	-
G9	-	-	-	-	S5	3	2	1,66	1,33
G12.1	-	-	-	2,66	S5 adere	3	1	1,33	1,33
G12.1+	-	-	-	2,66	S5 não adere	3	1	1,33	1,33
S1.1	-	-	-	-	S7	-	-	-	-
S1.2	-	-	-	-	S8	2	2	2	2
S2	-	-	-	-	S8.1	-	-	-	-
S2.1	1	1	2	-	S9.1	3	2	1,66	1,33
S2.1+	-	-	-	-	S10 (amarelada)	-	-	-	-
S2+	-	-	-	-	S10+	-	-	-	-
S3.1	-	-	-	-	S10.2+	3	8	3,66	3,5
S3.1+	3	1	1,33	1,33	S10.2	-	-	-	-
S4.1	-	-	-	-					

\* $\acute{I}e$  anterior exprime o índice enzimático anterior a tentativa de isolamento em meio TY

É possível notar que a capacidade celulolítica de alguns isolados foi alterada após o re-isolamento. O isolado G12.1 que antes apresentava um índice enzimático (IE) de 2,66, perdeu a capacidade de degradação. Já o isolado S2.1 passou a apresentar atividade após o re-isolamento. Os isolados S10.2, S7 e S4+ perderam a viabilidade ou deixaram de proliferar em meio CMC após a separação em meio TY. Este fato indica que estes possuem algum mecanismo sinérgico ou promovem algum tipo de interação simbiótica para proliferar em meio CMC. Este fato poderá ser mais bem estudado após a junção destes e avaliação da viabilidade em meio CMC.

#### 4.3.3 Re-isolamento em Glicose-MMBH

Os isolados que não proliferaram foram novamente inoculados em meio rico Glicose-MMBH e proliferaram com sucesso. Foram eles: S3, S4.1.1, S6, S6.1, 7.1, S9, S10.1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G10, G11, G 12. Durante a incubação foram constatadas diferentes morfologias dentro de cada amostra e foram novamente repicadas em meio CMC para avaliação da atividade celulolítica. O resultado é mostrado na Tabela 5. Os re-isolados foram renomeados com o nome do isolado e o símbolo + (mais).

**Tabela 5:** Isolados proliferados em meio Glicose-MMBH , novamente inoculados em meio CMC e procedido o teste de atividade celulolítica, ( $\varnothing c$ ): diâmetro médio da colônia (mm), ( $\varnothing h$ ): diâmetro médio do halo de degradação (mm).  $\acute{I}e$ : índice enzimático; (-): não produziu halo. ( $\acute{I}e = (\varnothing c + \varnothing h) / \varnothing c$ )

Isolado	$\varnothing c$	$\varnothing h$	$\acute{I}e$	$\acute{I}e$ anterior	Isolado	$\varnothing c$	$\varnothing h$	$\acute{I}e$	$\acute{I}e$ anterior
G2	-	-	-	-	G11	-	-	-	-
G3	-	-	-	-	G11+	-	-	-	-
G4	-	-	-	-	G12	-	-	-	-
G4+	-	-	-	-	G12+	-	-	-	-
G5	-	-	-	-	S3	-	-	-	2
G5+	-	-	-	-	S4.1.1	-	-	-	2
G6	-	-	-	-	S6	-	-	-	2
G6+	-	-	-	-	S6.1	-	-	-	1,66
G7	-	-	-	-	S7.1	-	-	-	1,33
G10	-	-	-	-	S9	-	-	-	1,33
G10+	-	-	-	-	S10.1	-	-	-	-

\* $\acute{I}e$  anterior exprime o índice enzimático anterior a tentativa de isolamento em meio Glicose-MMBH

O re-isolamento em meio glicose-MMBH provocou a perda de atividade celulolítica dos isolados S3, S4.1.1, S6, S6.1, S7.1 e S9, que apesar de terem continuado com somente uma morfologia perderam a capacidade de hidrolisar celulose. Provavelmente, a quantidade de carbono facilmente assimilável foi um agente de seleção contra outro(s) microrganismo(s) que provavelmente estavam associados a este isolado. A disponibilidade de um açúcar simples pode ter privilegiado aqueles que têm maior capacidade de cultivo, inibindo outro(s), o que afetou a capacidade de hidrolisar celulose. Como no re-isolamento em TY, foram obtidos isolados que não mais proliferaram em CMC, foram eles G6+ e G11+.

Resultados diferentes foram encontrados por RUEGGER & TAUKE-TORNISIELO (2004) na avaliação de fungos celulolíticos, em que os autores discutem que no cultivo, fungos perdem capacidade de hidrolisar celulose pela não competição que ocorre em cultura pura. Nas condições ambientais estes se associam com outros organismos e ocupam nichos específicos de decomposição.

Na Tabela 6 é possível observar como alguns isolados mantiveram, adquiriram ou perderam capacidade de hidrolisar a carboxi-metil-celulose após a proliferação nos meios TY e glicose-MMBH.

**Tabela 6:** Comportamento dos isolados quanto à capacidade de degradação de CMC após a proliferação em meio TY e Glicose-MMBH. ( $\varnothing c$ ): diâmetro médio da colônia (mm), ( $\varnothing h$ ): diâmetro médio do halo de degradação (mm).  $\acute{I}e$ : índice enzimático; (-): não produziu halo. ( $\acute{I}e = (\varnothing c + \varnothing h) / \varnothing c$ )

Isolado	$\varnothing c$	$\varnothing h$	$\acute{I}e$	$\acute{I}e$ anterior	Meio de re-isolamento
G12.1	-	-	-	2,66	TY
G12.1+	-	-	-	2,66	TY
S2.1	1	1	2	-	TY
S3.1+	3	1	1,33	1,33	TY
S5	3	2	1,66	1,33	TY
S5 adere	3	1	1,33	1,33	TY
S5 não adere	3	1	1,33	1,33	TY
S8	2	2	2	2	TY
S9.1	3	2	1,66	1,33	TY
S10.2+	3	8	3,66	3,5	TY
S3	-	-	-	2	Glicose-MMBH
S4.1.1	-	-	-	2	Glicose-MMBH
S6	-	-	-	2	Glicose-MMBH
S6.1	-	-	-	1,66	Glicose-MMBH
S7.1	-	-	-	1,33	Glicose-MMBH
S9	-	-	-	1,33	Glicose-MMBH

Perfazem agora um total de 54 isolados, sendo que somente oito isolados continuaram apresentando atividade celulolítica após a tentativa de re-isolamento, e, oito perderam capacidade de hidrolisar celulose. O isolado S2.1 foi o único que passou a apresentar atividade celulolítica após o re-isolamento. As interações que ocorrem quando do cultivo de amostras ainda são desconhecidas, mas apontam para um potencial biotecnológico ainda inexplorado. O cultivo em meio com celulose como única fonte de carbono seleciona complexos de microrganismos que se apresentam em uma única colônia no meio de cultivo. Este fato está sendo avaliado na amostra S10.2+, que quando fotografada em microscópio mostrou grande diversidade de microrganismos.

#### 4.3.4 Análise por seqüenciamento do 16S rDNA

Com base na Figura 19, que contem o resultado da clivagem do gene 16S rDNA, os isolados que apresentaram perfil de restrição com fragmentos que somavam em torno de 1500pb foram encaminhados para análise por seqüenciamento. Foram eles: S2, S3.1, S4, S4.1, S7.1, S8, S9, S11, G1, G5, G7, G8, G9 e G12.1.

Os grupamentos obtidos pela árvore filogenética corroboram os resultados apresentados na Tabela 7, porém permitem ver como os isolados se pareiam com os correspondentes no banco de dados NCBI. No grupo 1 indicado na Figura 19, estão isolados comumente encontrados em tratos intestinais (entéricas) e a *Burkholderia cenocepacia*, onde estão agrupados os isolados S4.1 e G12.1, ambos com altos valores de bootstrap, o que indica alta confiabilidade da análise. Todos os isolados neste grupo 1 apresentaram mais de uma morfologia de célula. Apesar de somente os isolados G12.1e S7.1 apresentarem similaridade

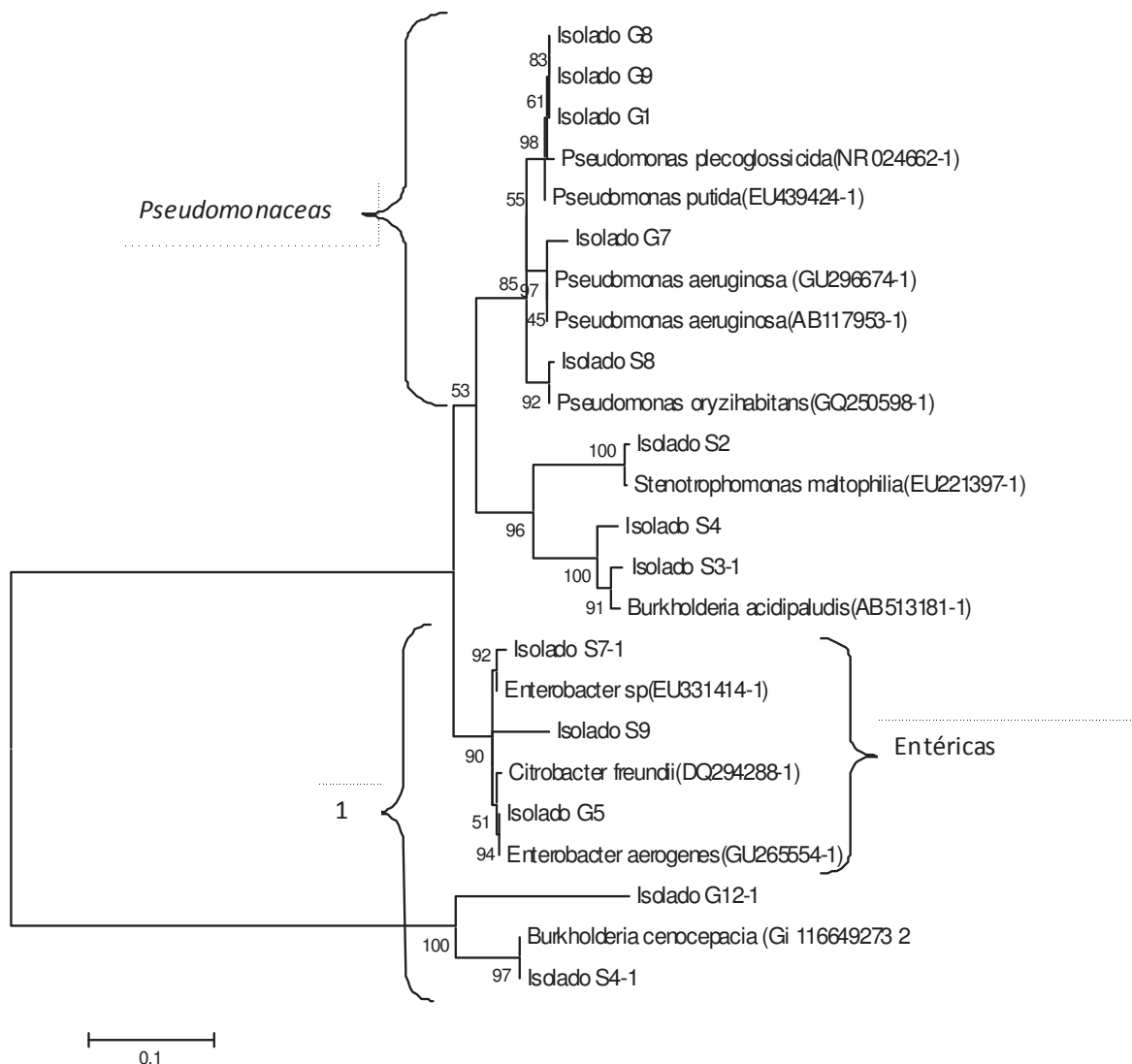


menor do que 98% (similaridade mínima para se fazer correspondência com o banco de dados), a associação com outro microrganismo, possivelmente uma actinobacteria, condicionou este agrupamento.

**Tabela 7:** Resultado do alinhamento das seqüências do gene 16S rDNA, obtidas e comparadas com o banco de dados NCBI ([www.nlm.nih.gov](http://www.nlm.nih.gov)) utilizando o programa BLASTn ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)).

Isolado	Correspondente	Identidade	Nº acesso	Tamanho fragmento (□a)
S3.1	<i>Burkholderia acidipaludis</i>	97%	<a href="#">AB513181.1</a>	1489
S4	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	99%	<a href="#">CP000459.1</a>	1485
S4.1	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	99%	<a href="#">CP000459.1</a>	1468
S9	<i>Citrobacter freundii</i>	99%	<a href="#">DQ294288.1</a>	1526
G5	<i>Enterobacter aerogenes</i>	99%	<a href="#">GU265554.1</a>	1481
S7.1	<i>Enterobacter sp.</i>	97%	<a href="#">EU331414.1</a>	1082
G12.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	96%	<a href="#">AB117953.1</a>	1506
G7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98%	<a href="#">GU296674.1</a>	1420
S8	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	99%	<a href="#">GQ250598.1</a>	1479
G9	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	99%	<a href="#">NR_024662.1</a>	1486
G1	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	<a href="#">EU439424.1</a>	1483
G8	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	<a href="#">EU439424.1</a>	1487
S2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99%	<a href="#">EU221397.1</a>	1492

A presença de mais de uma morfologia por isolado está provavelmente associada á simbiose entre o microrganismo descrito pelo seqüenciamento do gene 16S rDNA. Os microrganismos do gênero pseudomonas já foram descritos como oportunistas por PALLERONI (1991), em associação com actinobacterias. Os actinomicetos tem reconhecida capacidade celulolítica, e apesar de estes não terem sido detectados no seqüenciamento do gene 16S rDNA, as morfologias apresentadas no Anexo A (Figuras b), indicam a presença destes juntamente com os microrganismos descritos.

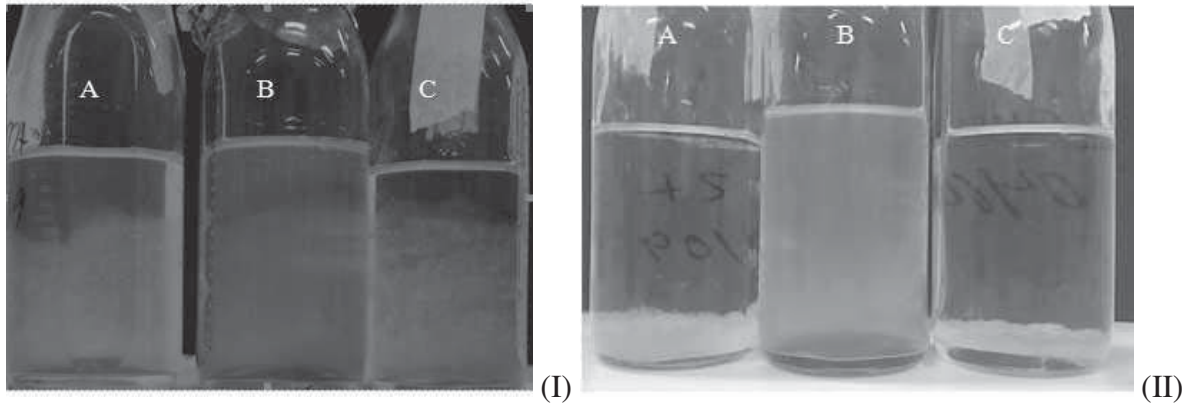


**Figura 19:** Árvore filogenética gerada no programa MEGA 3.1, utilizando o método de Neighbor-Joining e o modelo de Kimura 2-parameter, em 1000 valores de *bootstrap*, contendo as 13 seqüências obtidas e as seqüências que foram alinhadas no banco de dados utilizando a ferramenta BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)). Os números presentes nos ramos da árvore filogenética indicam os valores de *bootstrap*.

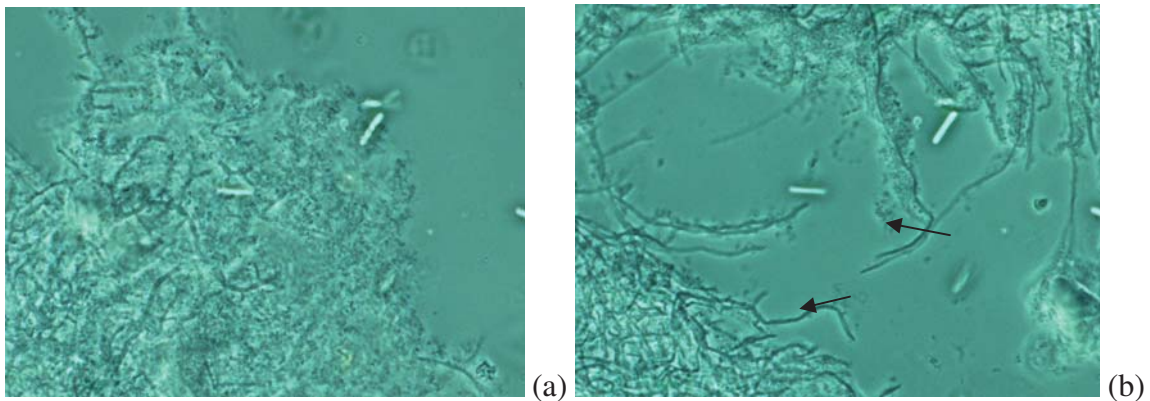
#### 4.3.5 Incubação e microscopia de S10.2+

O isolado S10.2+ foi o que apresentou maior índice enzimático foi também inoculado e meio CMC líquido e visualmente se nota a degradação do meio. Este resultado é mostrado na Figura 20.

Após 3 dias de incubação foi possível notar a degradação do meio de cultivo e início da formação de um precipitado. Após 10 dias, todo o meio foi degradado e houve a formação de um precipitado no fundo do frasco. Durante o processo de degradação notou-se a formação de vários grumos em forma de esfera, visualizados em microscópio (Figura 21a e 21b).



**Figura 20:** Meio CMC líquido sem N inoculado o isolado S10.2+ após 72 horas (I) e 240 horas (II) de crescimento. A e C inoculados, B meio sem inoculação.



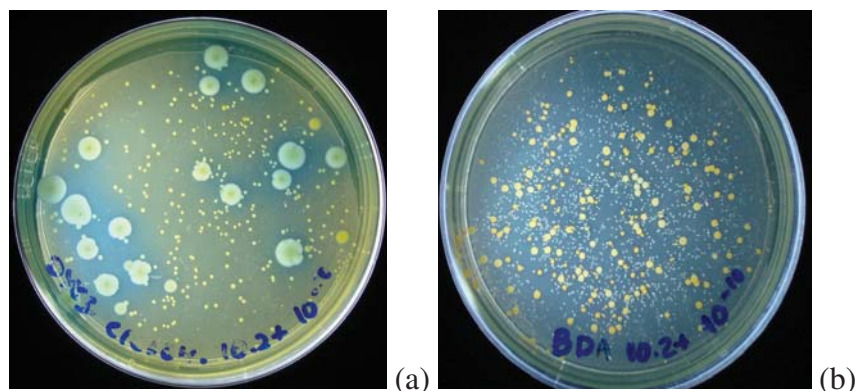
**Figura 21:** Micrografia da massa crescida em meio CMC líquido.

Embora as fotos acima não estejam coradas, nota-se na foto (a), um enovelamento de estruturas relativamente parecidas com micélios. Na Figura (b) os supostos micélios estão recobertos por uma manta de microrganismos. Devido a esta presença foi necessário tentar isolar os microrganismos mostrados na fotografia.

#### 4.3.6 Tentativa de re-isolamento de S10.2 +

Para isolar o complexo de microrganismos vistos na Figura 21, procedeu-se à diluição seriada do isolado até a diluição de  $10^{-10}$  e estas foram plaqueadas nos meios ricos DYGS, BDA e TY. A diluição  $10^{-10}$  foi utilizada para isolamento e os meios DYGS com indicador e BDA com indicador foram os que apresentaram maior número de morfologias. Foram observadas 3 e 4 morfologias diferentes para o meio BDA e DYGS respectivamente. (Figura 22). Áreas do meio de cultivo amareladas indicam acidificação do meio pelo microrganismo e áreas em azul/verde indicam alcalinização do meio.

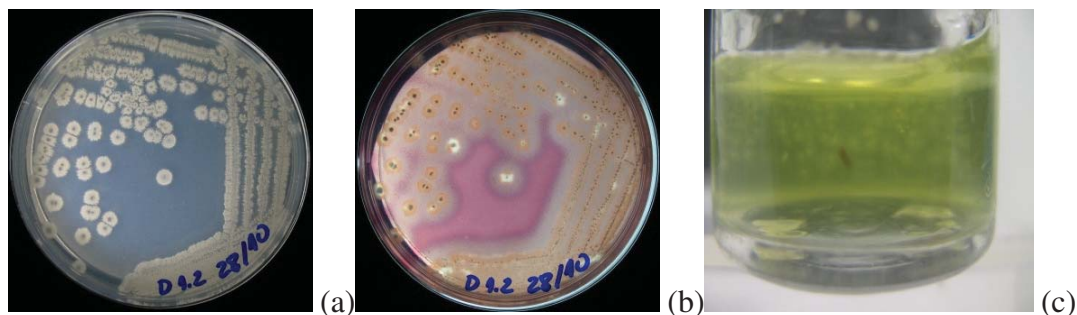
As morfologias diferentes foram novamente plaqueadas separadamente em meio DYGS para purificação e repicados em meio CMC para avaliar a viabilidade de crescimento e capacidade de degradação de celulose. Foram obtidas 14 novas morfologias, sendo 6 oriundas do meio BDA e 8 do meio DYGS.



**Figura 22:** Placas de Petri contendo a diluição  $10^{-10}$  do isolado S10.2+. (a) em meio DYGS e (b) em meio BDA incubadas por 72 horas.

Os novos isolados foram novamente inoculados em meio CMC, incubados por 5 dias a  $28^{\circ}\text{C}$ , e procedido o teste de atividade celulolítica por teste do Vermelho Congo e todos preservaram a capacidade de degradação de celulose. Paralelamente, estes foram incubados em meio semi-sólido JMV, por 5 dias a  $28^{\circ}\text{C}$  (Anexo B) para avaliar se haveria desenvolvimento celular neste meio de cultivo desprovido de nitrogênio. O isolado D1.2 destacou-se na Figura 25 ilustrando a manutenção da capacidade celulolítica (Figura 23b) e a proliferação em meio desprovido de nitrogênio (Figura 23c).

À exceção do isolado B1.2, todos se desenvolveram no meio mesmo após três repicagens seguidas em meio JMV. As sucessivas repicagens são necessárias para esgotar o estoque de nitrogênio contido na célula (BALDANI, 1996), e induzir a fixação biológica de nitrogênio. Apesar de não ser possível observar a formação da “película” de células no meio, todos os isolados proliferaram no meio JMV, sendo este um indicativo de capacidade de fixar nitrogênio biologicamente.



**Figura 23:** (a) Novos isolados obtidos a partir do complexo S10.2+, são eles: B1.1, B1.2, B1.3, B2.1, B2.2, B3.1, D1.1, D1.2, D2.2, D2.3, D2.4, D2.5, D3.1, D3.2. (b) Resultado do teste atividade celulolítica. (c) Isolados inoculados em meio semi-sólido JMV.

A capacidade de degradação de celulose, aliada a FBN pode ser um diferencial no processamento de resíduos orgânicos com vistas a produção de bicompostíveis. Resíduos da indústria sucroalcooleira e da agricultura são em sua maioria altamente lignificados e muito estáveis, por conseguinte de difícil degradação. A utilização de um “pool” de microrganismos, com diferentes atribuições e que se complementam no processo de degradação de compostos lignocelulósicos pode ser um diferencial importante na produção de agrobiocombustíveis.

## 5 CONCLUSÕES

Foi possível encontrar e isolar complexos de microrganismos com atividade celulolítica.

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 boa amplificação de genes *nifH* e a sua proliferação em meio com ausência de nitrogênio.

O isolamento de microrganismos diretamente do trato intestinal do diplópode, se mostrou promissora como fonte de recursos genéticos para utilização biotecnológica.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados apresentados demonstraram o potencial de interações entre a fauna do solo e os microrganismos e como a fonte de bioprospecção é uma ferramenta chave para a descoberta de recursos genéticos promissores do ponto de vista biotecnológico.

O teste de somente uma amostra a S10.2+ demonstrou que existem várias interações e processos ecológicos envolvidos. O entendimento e conhecimento das relações existentes entre estes microrganismos será um dos principais alvos a serem atingidos na continuação do projeto.

A capacidade de degradação de celulose e o entendimento das interações deste complexo de microrganismos, que foi somente um de uma coleção de 14 com capacidade hidrolítica, elucidou o potencial biotecnológico ocluso e as implicações deste esforço multidisciplinar de pesquisa.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, T.; HIGASHI, M. Cellulose centered perspective on terrestrial community structure. *Oikos*, v. 60, p. 127-133, 1991
- BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. No processo de infecção e colonização de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. 1996, 238f, Tese. (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- BARNES, R. D. Zoologia dos invertebrados. São Paulo: Roca, 1179 p, 1984.
- BREZNAK, J.A., BRUNE, A. Role of microorganisms in the digestion of celluloses by termites. *Annual Review of Entomology*, v. 39, p.453–487, 1994.
- BRUNE, A. & FRIEDRICH, M. Microecology of the termite gut: structure and function on a microscale. *Current Opinion in Microbiology*, v.3, p. 263–269, 2000.
- BRUNE, A. & STINGL, U. Prokaryotic symbionts of termite gut flagellates: phylogenetic and metabolic implications of a tripartite symbiosis. In: (OVERMANN, J., ed.) *Molecular Basis of Symbiosis*, Springer, p. 39–60, 2005.
- BUDZIAK, C. R.; MAIA, C.; MANGRICH, A. S Chemical transformations of organic matter during the composting of wood industry wastes (residues). *Quimica Nova*, v. 27, p. 399-403, 2004.
- BYZOV, B. A.; KURAKOV, A. V.; TRETYAKOVA, E. B.; THANH, V. N.; LUU, N. D. T.; RABINOVICH, Y. M. Principles of the digestion of microorganisms in the gut of soil millipedes: specificity and possible mechanisms. *Applied Soil Ecology* v. 9, p. 145-151, 1998.
- BYZOV, B. A.; THANH, V. N.; BABJEVA, I. P. Interrelationships between yeasts and soil diplopods. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 25, p. 1119-1126, 1993.
- BYZOV, B. A.; CLAUS, H.; TRETYAKOVA, E. B.; ZVYAGINTSEV, D. G.; 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, p.221-228, 1996.
- CARLTON, J.M.; HIRT, R.P.; SILVA, J.C.; DELCHER, A.L.; SCHATZ, M.; ZHAO, Q.; WORTMAN, J.R.; BIDWELL, S.L.; ALSMARK, U.C.; BESTEIRO, S.; SICHERITZ-PONTEN, T.; NOEL, C.J.; DACKS, J.B.; FOSTER, P.G.; SIMILLION, C.; VAN DE PEER Y.; ; MIRANDA-SAAVEDRA D.; BARTON GJ.; WESTROP GD.; MÜLLER S.; DESSI D.; FIORI PL.; REN Q.; PAULSEN I.; ZHANG H.; BASTIDA-CORCUERA FD.; SIMOES-BARBOSA A.; BROWN MT.; HAYES RD.; MUKHERJEE M.; OKUMURA CY.; SCHNEIDER R.; SMITH AJ.; VANACOVA S.; VILLALVAZO M.; HAAS BJ.; PERTEA M.; FELDBLYUM TV.; UTTERBACK TR.; SHU CL.; OSOEGAWA K.; DE JONG PJ.; HRDY I.; HORVATHOVA L.; ZUBACOVA Z.; DOLEZAL P.; MALIK SB.; LOGSDON JM JR.; HENZE K.; GUPTA A.; WANG CC.; DUNNE RL.; UPCROFT JA.; UPCROFT P.; WHITE O.; SALZBERG SL.; TANG P.; CHIU CH.; LEE YS.; EMBLEY TM.; COOMBS GH.; MOTTRAM JC.; TACHEZY J.; FRASER-LIGGETT CM.; JOHNSON PJ. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, v.315, p.207–212, 2007.
- CARLE-URIOSTE, J. C., J. ESCOBAR-VERA, S. EL-GOGARY, F. HENRIQUE-SILVA, E. TORIGOI, O. CRIVELLARO, A. HERRERA-ESTRELLA, AND H. EL-DORRY. Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p.10169–10174, 1997.

- CAZEMIER, A. E.; HACKSTEIN, J. H. P.; DENCAMP, H.; ROSENBERG, J.; VANDERDRIFT, C. Bacteria in the intestinal tract of different species of arthropods. *Microbial Ecology*, v.33, p.189-197, 1997.
- CHU, T. L., SZABO, I. M., SZABO, I. Nocardioform gut actinomycetes of *Glomeris hexasticha* Brandt (Diplopoda). *Biology and Fertility of Soils*, v. 3, p. 113-116, 1987.
- 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.
- CORREIA, M. E. F., AQUINO, A. M. de. Os Diplópodes e suas associações com microrganismos na ciclagem de nutrientes. *Documentos, Embrapa Agrobiologia*, v.199, 41p, 2005.
- CORREIA, M. E. F., PASSOS, S. R., SOARES, L. H. B., ARAUJO, J. L. S., MARTINS, C.M.M., XAVIER, G. R., RUMJANEK N.G. Ecologia da interação entre fauna de solo e microrganismos no processo de decomposição de resíduos vegetais. XXXII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Fortaleza, 2009.
- DAMMAN, C.J., SURAWICZ, C.M. The Gut Microbiota: A Microbial arsenal protecting us from infectious and radiation-induced diarrhea. *Gastroenterology*, v.136, p. 722-724, 2009.
- EADY, R.R.; ROBSON, R.L.; SMITH, B.E. Alternative and conventional nitrogenase. In: COLE, J.A.; FERGUSON, S., *The nitrogen and sulfur cycles*. Cambridge: Cambridge University, p.363-382, 1988.
- EDENBORN, S. L.; SEXSTONE, A. J. DGGE fingerprinting of culturable soil bacterial communities complements culture-independent analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 39, p. 1570–1579, 2007
- GRAY, K.A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. *Current Opinion Chemical Biology*, v. 10, p.1–6, 2006.
- GUERRA, J.G.M., SANTOS, G.A. Métodos químicos e físicos. In: SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CANELLAS, L.P.; CAMARGO, F.A.O. Eds. *Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo: Ecossistemas Tropicais e Subtropicais*. Porto Alegre, Metrópole, 2008, p 185-198.
- HAHN-HÄGERDALA, B.; GALBEA, M.; GORWA-GRAUSLUNDA, M.F.; LIDÉNA, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *TRENDS in Biotechnology*, v. 24, p. 549-556, 2006.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. *Mycologia*, v. 67, p. 597-607, 1975.
- HIMMEL, M. E.; DING, S.Y.; JOHNSON, D.K.; ADNEY, W.S.; NIMLOS, M.R.; BRADY, J.E.; FOUST, T.D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, v.315, p.804–7, 2007.
- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL B. M.; PACE, N. R. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *The Journal of Bacteriology*, v.180, p. 4765–4774, 1998.
- HONGO, Y.; SHARMA, V. K.; PRAKASH, T.; NODA, S.; TOH, H.; TAYLOR, T.D.; KUDO, T.; SAKAKI, Y.; TOYODA, A.; HATTORI, M.; OHKUMA, M. Genome of an endosymbiont coupling N-2 fixation to cellulolysis within protist cells in termite gut. *Science*, v.322, p.1108-1109, 2008.



- HUNGATE R.E. Studies on cellulose fermentation II. An anaerobic cellulose-decomposing actinomycete, *Micromonospora propionici*, N. Sp. Journal Bacteriology. v. 51, p.51–56, 1946.
- JANSSEN, P.H., YATES, P.S., GRINTON, B.E., TAYLOR, P.M., SAIT, M. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. Applied and Environmental Microbiology 68, p.2391–2396, 2002.
- KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. Agriculture, Ecosystems and Environment, v. 74, p. 65-76, 1999.
- 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 & Biochemistry, v. 41, p. 2299-2307, 2009(a)
- 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, p. 325-336, 2009(b)
- KUKOLYA, J.; NAGY, I.; LADAY, M.; TOTH, E.; ORAVECZ, O.; MARIALIGETI, K.; HORNOK, L. *Thermobifida cellulolytica* sp nov., a novel lignocellulose-decomposing actinomycete. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. V.52, p.1193-1199, 2002.
- KÖHLER, H. R.; ALBERTI, G. Morphology of the mandibles in the millipedes (Diplopoda, Arthropoda). Zoologica Scripta, v. 19, p.195-202, 1990.
- KÖHLER, H. R.; ALBERTI, G.; STORCH, V. The influence of mandibles of Diplopoda on the food – a dependence of fine structure and assimilation efficiency. Pedobiologia, v. 35, p. 108-116, 1991.
- LAVELLE P., BIGNELL D., LEPAGE M., WOLTERS V., ROGER P., INESON P., HEAL O.W. AND DHILLION S. Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. European Journal of Soil Biology, v.33, p.159–193, 1997.
- LEAL, M.A.A. Produção e eficiência agrônômica de compostos obtidos com palhada de gramínea e leguminosa para o cultivo de hortaliças orgânicas. 2006. 133p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- LEFEBVRE, T.; MIAMBI, E.; PANDO, A.; DIOUF, M.; ROULAND-LEFEVRE, 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, p. 269-276, 2009.
- LILBURN, T. G.; KIM, K. S.; OSTROM, N. E.; BYZEK, K. R.; LEADBETTER, J. R.; BREZNAK J. A. Nitrogen fixation by symbiotic and free-living spirochetes. Science, v. 292, p. 2495-2498, 2001
- LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 66, p. 506–577, 2002.
- MARTIN, A.; MARINISSEN, J. C. Y. Biological and chemical processes in excrements of soil animals. Geoderma, v. 56, p. 331-347, 1993.

- MATSUI, H.; KATO, Y.; CHIKARAISHI, T.; MORITANI, M.; BAN-TOKUDA, T.; WAKITA, M. Microbial diversity in ostrich ceca as revealed by 16S ribosomal RNA gene clone library. *Anaerobe*, 2009 (doi:10.1016/j.anaerobe.2009.07.005, on-line)
- MCBRAYER, J.F. Exploitation of deciduous leaf litter by *Apheloria* (axoche Diplopoda: Eurydesmida). *Pedobiologia*, v. 13, p. 90-98, 1973.
- MEN'KO, E. V., CHERNOV, I. YU., BYZOV B. A. Interrelationships between yeast fungi and collembolans in soil. *Microbiology*, Vol. 75, No. 6, p. 708–715, 2006.
- MICHELLAND, R. J.; MONTEILS, V.; ZENED, A.; COMBES, S.; CAUQUIL, L.; GIDENNE, T.; HAMELIN, J.; FORTUN-LAMOTHE, L. Spatial and temporal variations of the bacterial community in the bovine digestive tract. *Journal of Applied Microbiology*, v. 107, p. 1642-1650, 2009.
- MIELNICZUK, J. Matéria orgânica e a sustentabilidade de sistemas agrícolas: In: SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CANELAS, L.P.; CAMARGO, F.A.O. (eds) *Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo: Ecossistemas tropicais e Subtropicais*. Porto Alegre, Metrópole, 2008, p 1-5.
- 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, p.23-39, 2004.
- MUYZER, G.; DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, 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, p.695–700, 1993.
- O'BRIEN, R. W.; SLAYTOR, M. Role of microorganisms in the metabolism of termites. *Australian Journal Biology Science*, v. 35, p.239–262,1982.
- ØVREÅS, L.; TORSVIK, V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology*, v. 36, p.303–315, 1998.
- PASSOS, S. R.; REIS JUNIOR, F. B.; RUMJANEK, N. G.; MENDES, I.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, p.879-885, 2008.
- 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. *Resource Microbiology*, v.152, p.95–103, 2001
- PALLERONI, N. J. Introduction to the family Pseudomonadaceae. In: STARR, M. P.; Stolp, H.; TRÜPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H. G. (ed.), *The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*, vol. I. Springer-Verlag, New York, N.Y. 1981, p 655-665.
- RAMACHANDRA, M.; CRAWFORD, D.; HERTEL, G. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. *Applied Environmental Microbiology*, v.5, p.3057-306, 1988.
- RAOULT, D. Probiotics and obesity: a link? *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, p. 616-616, 2009.

- RUEGGER, M.J.S; TAU-K-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v.27, n.2, p.205-211, 2004.
- SALEH-RASTIN, N.; PETERSEN, M.; COLEMAN, S.; HUBBELL, D. Rapid plate assay for hydrolytic enzymes of *Rhizobium*. In: KEISTER, D.; CREGON, P.B. (eds). *The Rhizosphere and Plant Growth*, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991, p 188.
- SCHWIEGER, F.; TEBBE, C.C. A new approach to utilize PCR–single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, p. 4870–4876, 1998.
- SEKIROV, I.; TAM, N.M.; JOGOVA, M. Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. *Infection and Immunity*, v.76, p.4726–4736, 2008.
- SU, Y.; YAO, W.; PEREZ-GUTIERREZ, O. N.; SMIDT, H.; ZHU, W.Y. 16S ribosomal RNA-based methods to monitor changes in the hindgut bacterial community of piglets after oral administration of *Lactobacillus sobrius* S1. *Anaerobe*, v. 14, p. 78-86, 2008.
- SWIFT, M. J.; HEAL, O. W.; ANDERSON, J. M. *Decomposition in terrestrial ecosystems*. Oxford: Blackwell, v. 5. 372 p. 1979.
- STRIGANOVA, B. R. Changes in structure and biodiversity of soil fauna on forest-steppe catena in central Russia. *Izvestiya Akademii Nauk Seriya Biologicheskaya*, v.2, p.191-208, 1995.
- TEIXEIRA, K.R. dos S. Bases moleculares e genética da fixação de nitrogênio. *Seropédica: Embrapa-CNPAB*, 1997. 26p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 32).
- THEENHAUS, A. E S. SCHEU. Successional changes in microbial biomass, activity and nutrient status in faecal material of the slug *Arion rufus* (gastropoda) deposited after feeding on different plant materials. *Soil Biology & Biochemistry*, v.28, n.4-5, p.569-577. 1996.
- THOMPSON, F.L.; OLIVEIRA, V.M.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L.; INÁCIO, C.A.; SELEGHIM, M.H.R.; KITAJIMA, E.W. *Taxonomia: microbiana, de procariontes, de fungos, de protozoários e de vírus: CGEE*, 2005. 53p.
- TOKUDA, G.; WATANABE, H. Hidden cellulases in termites: revision of an old hypothesis. *Biology Letters*, v.3, p.336-339. 2007.
- TOUTAIN, F. Les litières: siège de systèmes interactifs et moteur de ce interac-tions. *Revue du Écologie et Biologie du Sol*, Paris, v.24, p.231-242, 1987
- VON WINTZINGERODE F., GOBEL U.B. AND STACKEBRANDT E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, v.21, p.213–219, 1997.
- WARD, D.M.; BATESON, M.M.; WELLER, R.; RUFFROBERTS, A.L. Ribosomal-RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. *Advances in Microbial Ecology*, v.12, p.219-286, 1992.
- WARNECKE, F.; LUGINBUHL, P.; IVANOVA, N.; GHASSEMIAN, M.; RICHARDSON, T. H.; STEGE, J. T.; CAYOUILLE, M.; MCHARDY, A. C.; DJORDJEVIC, G.; ABOUSHADI, N.; SOREK, R.; TRINGE, S. G.; PODAR, M.; MARTIN, H.G.; KUNIN, V.; DALEVI, D.; MADEJSKA, J.; KIRTON, E.; PLATT, D.; SZETO, E.; SALAMOV, A.; BARRY, K.; MIKHAILOVA, N.; KYRPIDES, N. C.; MATSON, ERIC G. OTTESEN, E. A.; ZHANG, X.; HERNANDEZ, M.; MURILLO, C.; ACOSTA, L. G.; RIGOUTSOS, I.

TAMAYO, G.; GREEN, B. D.; CHANG, C.; RUBIN, E. M.; MATHUR, E. J.; ROBERTSON, D. E.; HUGENHOLTZ, P.; LEADBETTER, J. R.; Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature*, v.450, p.560-U17. 2007

WILKIE, K.C.B. Hemicellulose. *Chemtech*, v. 13, p. 306-319, 1983.

XAVIER, G. R.; SILVA, F. V.; ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G. Adaptação de método para extração de DNA de Microrganismos Associados a Raízes de Plantas. *Seropédica: Embrapa Agrobiologia*, 2004. 24 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 171).

XU, F. Enhancing biomass conversion to fermentable sugars: a progress report of a joint government-industrial project. In: OHMIYA, K.; SAKKA, K.; KARITA, S.; KIMURA, T.; SAKKA, M.; ONISHI, Y. editors. *Biotechnology of ligninocellulose degradation and biomass utilization*. Tokyo: Uni Publishers, 2004. p. 793–804.

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 with RT-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, p.3119–3124, 2000.

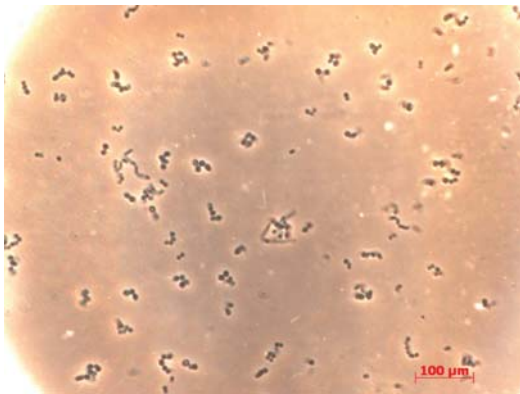
ZILLI, J. É.; BOTELHO, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Efeito de glyphosate e imazaquin na comunidade bacteriana do rizoplano de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e em características microbiológicas do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.32, p. 633-642, 2008.

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, 22, 2003, Florianópolis. *Resumos*. Florianópolis, SC: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003.

## 8 ANEXOS

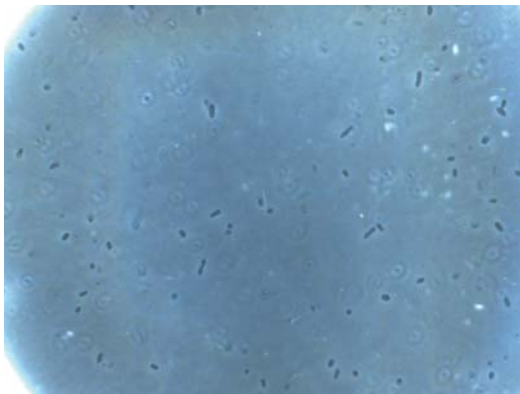
### ANEXO A – MICROGRAFIAS ÓTICAS

Micrografias ópticas de todos os isolados seqüenciados. A morfologia principal condizente com o alinhamento da seqüência do gene 16S rDNA foi designado com a letra A e a morfologia associada não detectada por seqüenciamento foi designada com letra B. Onde só a (a) somente foi detectada uma morfologia na microscopia.



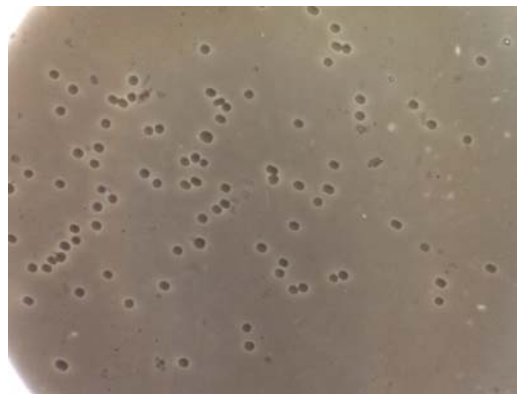
(a)

S2

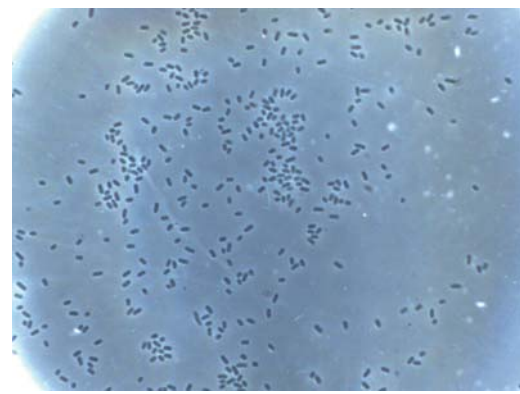


(a)

S3.1

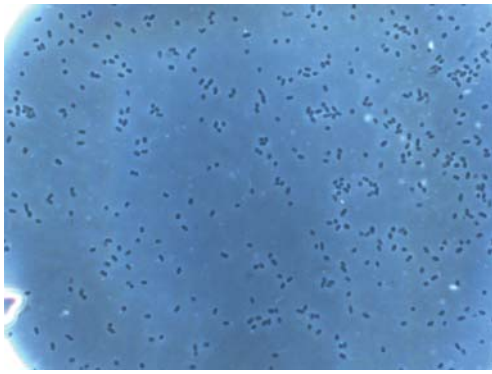


(b)

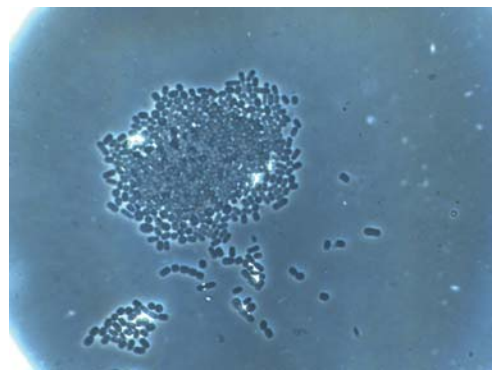


(a)

S4

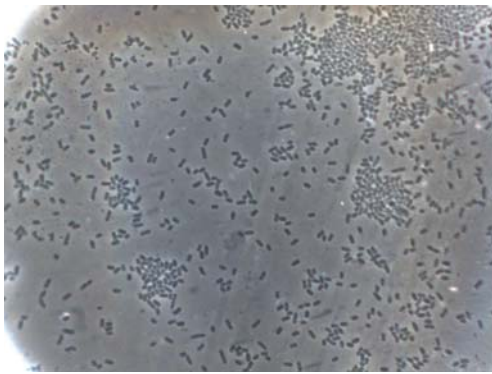


(a)

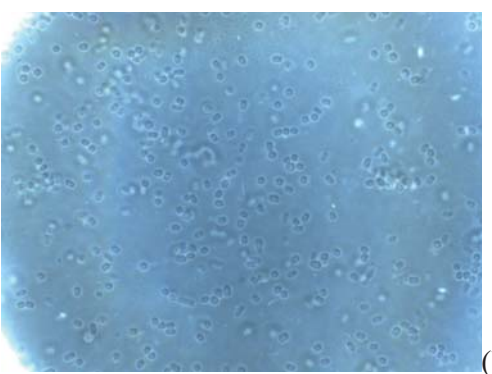


(b)

S4.1



(a)



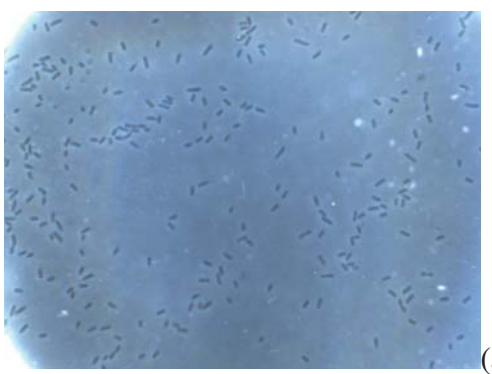
(b)

S7.1

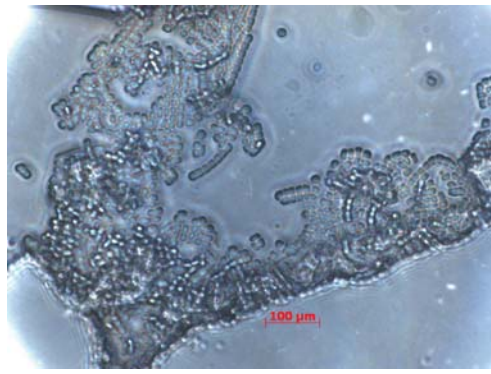


(a)

S8

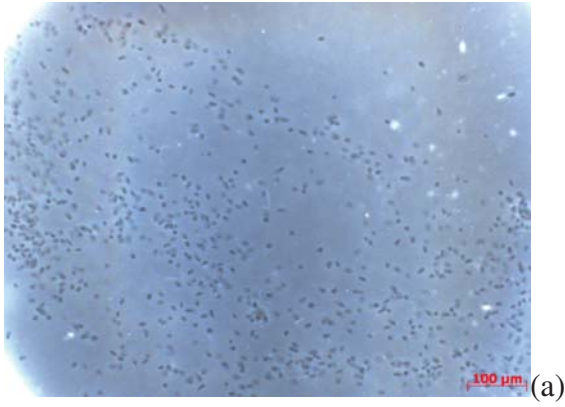


(a)

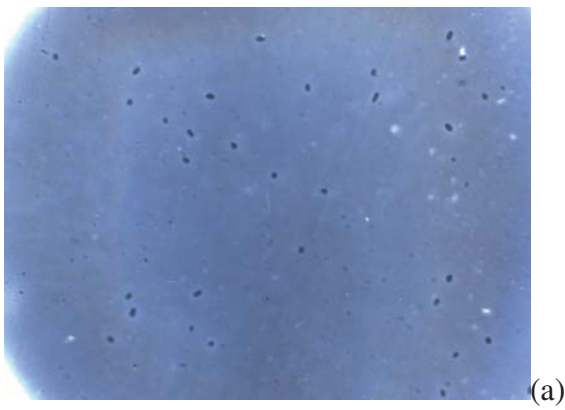


(b)

S9



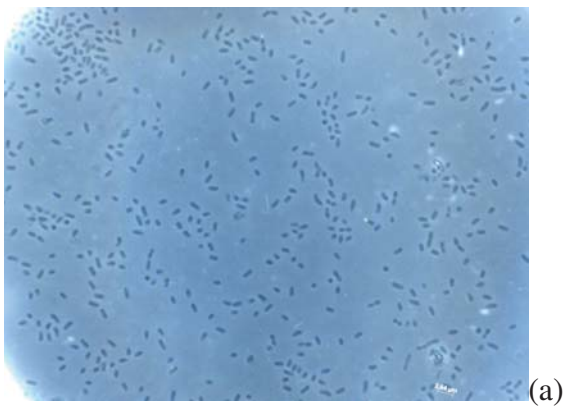
G1



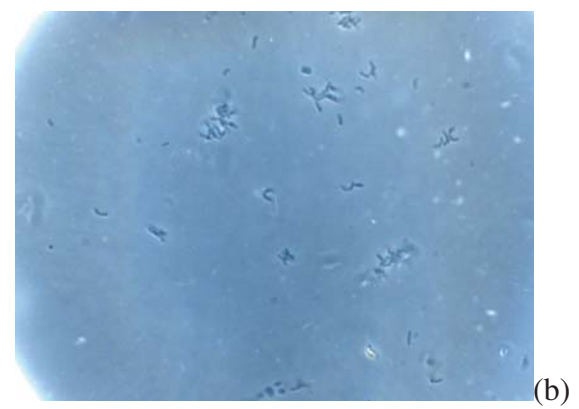
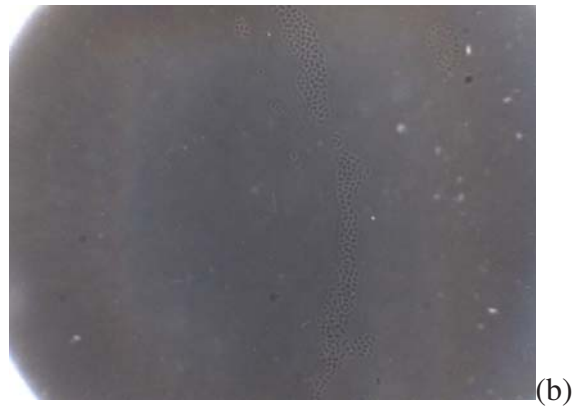
G5

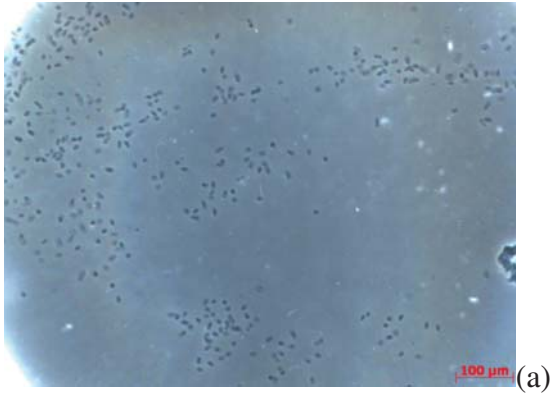


G7

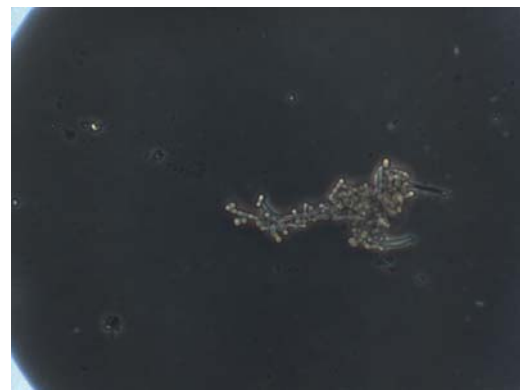
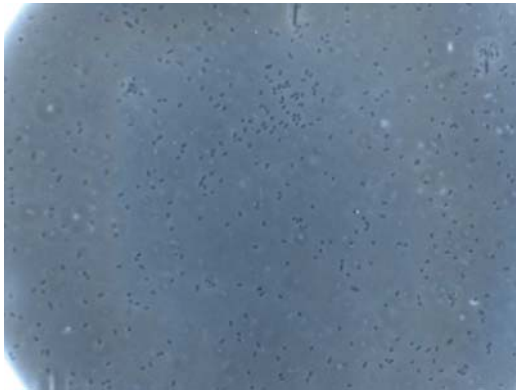


G8





G9

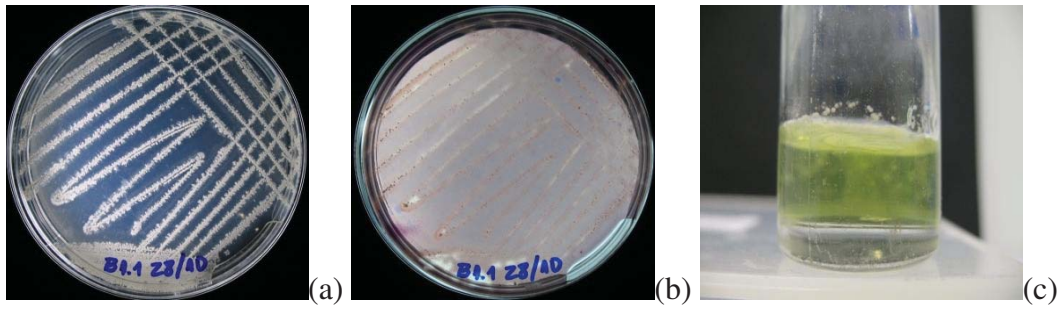


G12.1

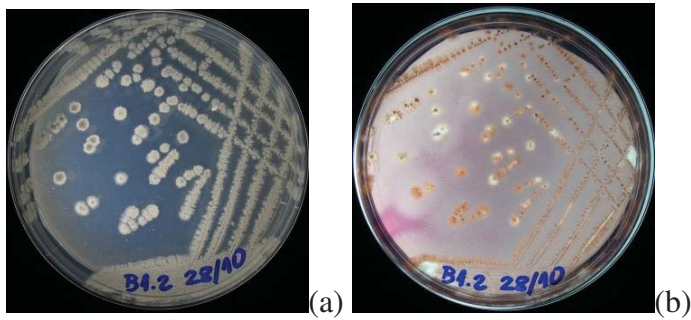
**Figura 1 Anexo:** Micrografias ópticas de todos os isolados seqüenciados na escala de 100uM



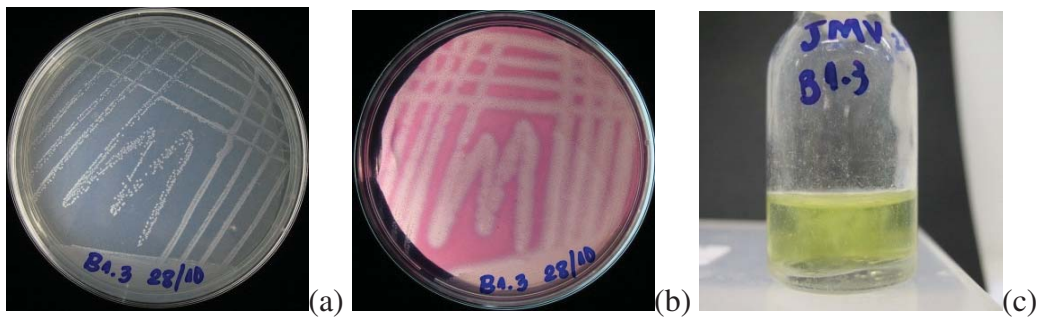
## ANEXO B. IMAGENS DO PLAQUEAMENTO EM MEIO DE CULTIVO



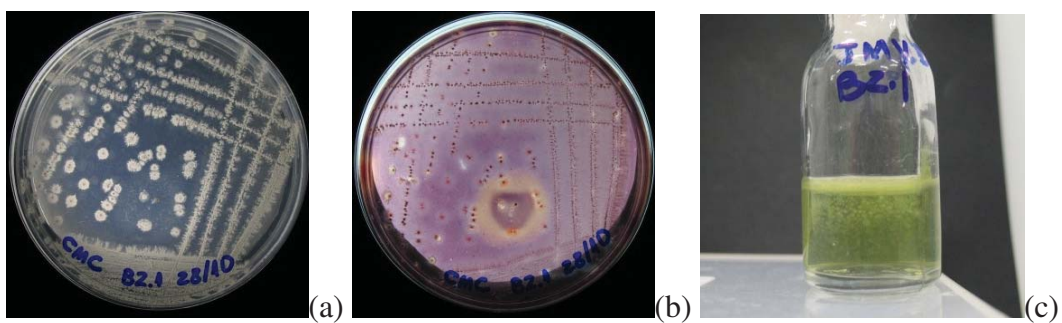
B1.1



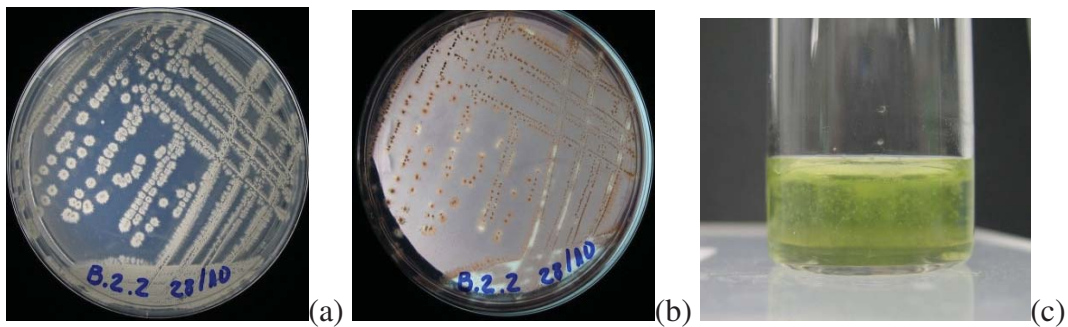
B1.2



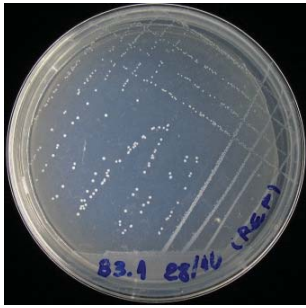
B1.3



B2.1



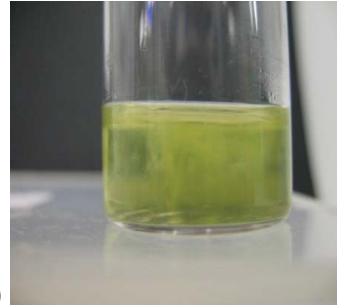
B2.2



(a)



(b)

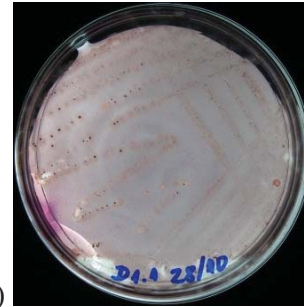


(c)

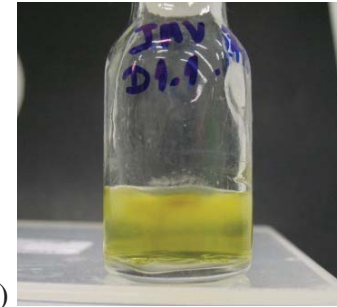
B3.1



(a)



(b)



(c)

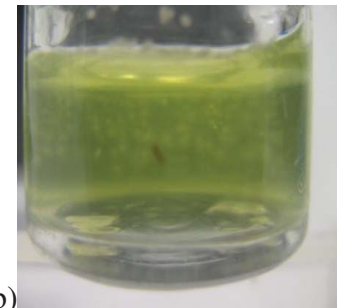
D1.1



(a)



(b)

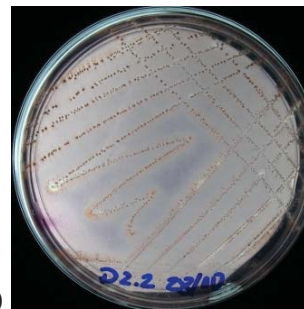


(c)

D1.2



(a)



(b)



(c)

D2.2



(a)

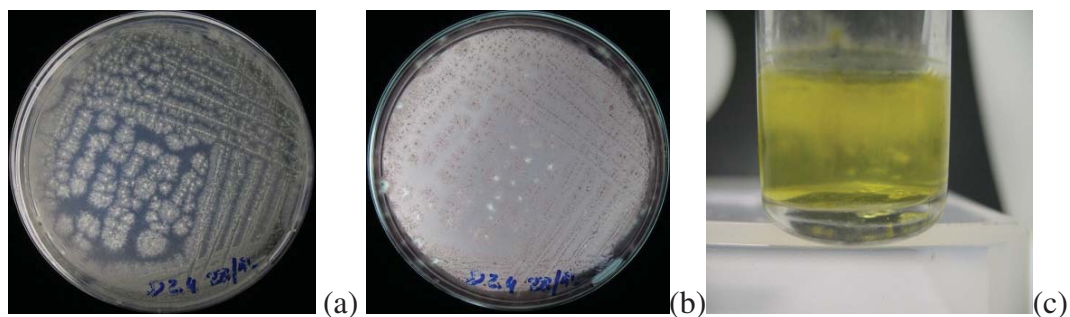


(b)

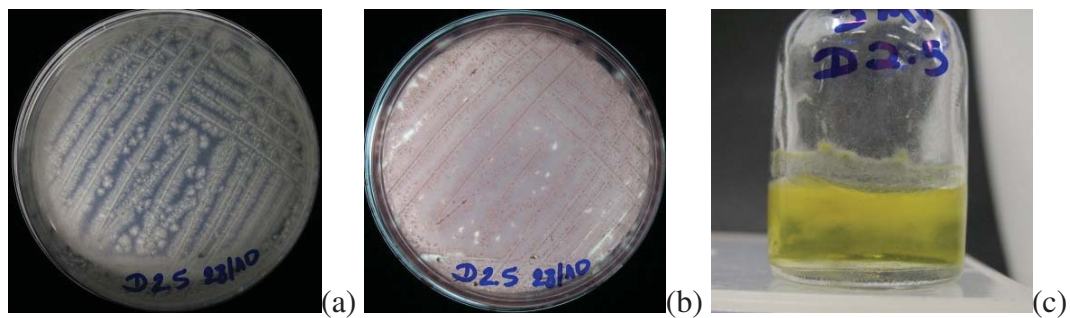


(c)

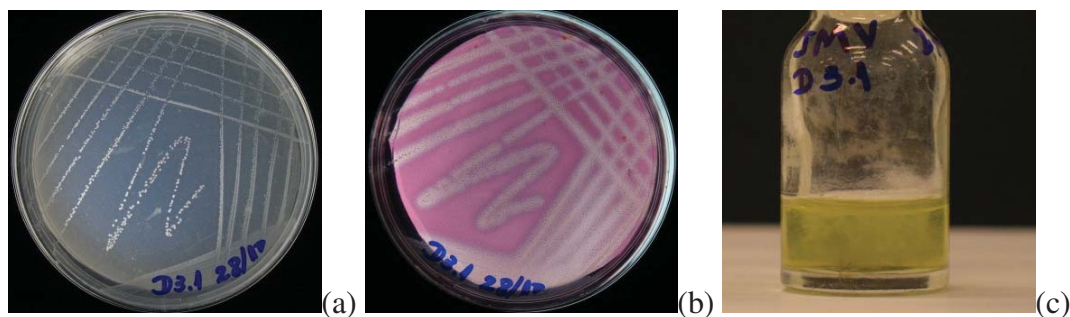
D2.3



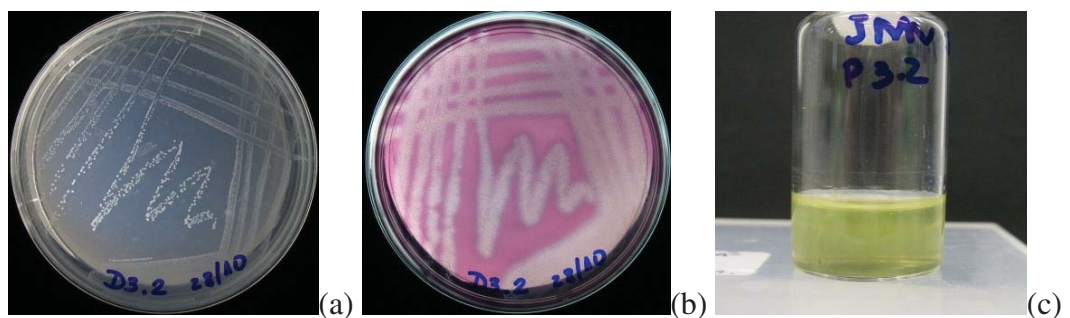
D2.4



D2.5



D3.1



D3.2

**Figura 2 Anexo:** Novos isolados a partir do complexo S10.2+ em que (a) Novos isolados B1.1, B1.2, B1.3, B2.1, B2.2, B3.1, D1.1, D1.2, D2.2, D2.3, D2.4, D2.5, D3.1, D3.2. (b) Resultado teste atividade celulolítica. (c) isolados inoculados em meio semi-sólido JMV. A exceção do isolado do isolado B1.2, todos proliferaram em meio semi-sólido JMV.