



Estabelecimento de coleção de culturas de enquitreídeos (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida)

Cintia Carla Niva⁽¹⁾; Rafaela Kovalski⁽²⁾; Rüdiger Maria Schmelz⁽³⁾ & George Gardner Brown⁽⁴⁾

⁽¹⁾Pós-doutoranda, PNPd/ MCT/ FINEP/ CNPq – Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira km 111, Cx Postal 319, Colombo, PR, CEP 83411-000, cintiacn@gmail.com (apresentador do trabalho); ⁽²⁾Graduanda da Faculdades Integradas Espírita, Curitiba, PR, rafinha_ctba13@hotmail.com; ⁽³⁾Pesquisador, Universidad de A Coruña, Fac. Ciencias, Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecoloxía, Alejandro da Sota, 1, E-15008 A Coruña, Espanha. enchytrailer@telefonica.net; ⁽⁴⁾ Pesquisador Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira km 111, Cx Postal 319, Colombo, PR, CEP 83411-000, brownng@cnpf.embrapa.br

Pôster

INTRODUÇÃO

Os enquitreídeos (família Enchytraeidae) são anelídeos majoritariamente terrestres comumente encontrados no mundo inteiro. São parentes próximos das minhocas possuindo, portanto, similaridades como hermafroditismo, clitelo, poucas cerdas sobre o corpo metamérico, mas sendo bem menores e não-pigmentados, dificilmente ultrapassando 40 mm de comprimento (Didden et al., 1997; Schmelz & Collado, 2010). Os enquitreídeos fazem parte da mesofauna saprófaga-microbívora do solo. Reproduzem-se produzindo casulos por anfimixia, partenogênese ou auto-fertilização, mas algumas espécies podem se reproduzir por fragmentação (arquitomia). Apesar de terem um papel importante no ecossistema (Didden, 1993), pouca atenção tem sido dada a esse táxon no Hemisfério Sul. A maioria dos estudos publicados em biologia e ecologia de enquitreídeos são da Europa, enquanto nas regiões tropicais/neotropicais esses estudos são muito escassos.

A diversidade específica dos enquitreídeos atinge cerca de 950 espécies no mundo inteiro (Jänsch et al., 2005). Na América Latina, 62 espécies são conhecidas e, no Brasil, a maior parte das espécies relatadas são da região sudeste (Christoffersen, 2009). Resultados de projetos na Mata Atlântica e Amazônia (Römbke, 2003; Schmelz & Römbke, 2005; Schmelz & Collado 2005; Römbke, 2007; Römbke et al., 2007) tem revelado várias espécies e até gênero ainda não descritos. Esses estudos também apontam para uma baixa abundância e biomassa de enquitreídeos em relação à zona temperada, mas uma riqueza de espécies comparável (Römbke, 2007).

O nosso objetivo é estabelecer culturas de enquitreídeos coletados no Brasil como fonte de recursos biológicos para condução de estudos científicos nas mais variadas áreas, seja na taxonomia, ecologia, fisiologia, bioquímica, toxicologia, educação, saúde, agronomia, conservação ou biotecnologia. Esta é provavelmente

a primeira iniciativa desse tipo com enquitreídeos no país. O presente trabalho traz uma lista de enquitreídeos sendo criados com sucesso em laboratório, método de criação e dados sobre o modo de reprodução.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta, extração e seleção de enquitreídeos

Amostras de solo foram trazidas de várias localidades, especialmente do estado do Paraná. Os enquitreídeos foram extraídos do solo como descrito em Niva et al. (2010).

O critério de seleção de enquitreídeos para posterior tentativa de criação em massa foi a sobrevivência após 3-4 semanas no sedimento de solo, resultante do processo de extração, em placas de Petri (9 cm diâmetro) a $22 \pm 1^\circ$ C. Todos os sobreviventes provenientes de uma unidade de extração foram transferidos para uma placa de Petri (9 cm diâmetro) com substrato à base de ágar 1% com sedimento e aveia em flocos autoclavada. Os espécimens que se reproduziram no ágar tiveram um casulo isolado para iniciar o cultivo em massa ou um juvenil. No caso de espécie fragmentadora, um indivíduo foi isolado para o cultivo em massa.

Outros enquitreídeos que foram adquiridos pela internet como alimento vivo para peixes ornamentais vieram acondicionados em carvão ativado. Estes foram transferidos para placas de ágar e tratados como as outras amostras.

Criação em massa de enquitreídeos

Os enquitreídeos foram criados em placas de Petri (9 cm diâmetro) preenchidas com ágar 0.8-1% até atingir cerca de 0.5 cm de altura e alimentados semanalmente com 30-50 mg de aveia em flocos autoclavada. A cultura de enquitreídeos foi repicada em nova placa de ágar à medida que o substrato se tornasse liquefeito ou demasiadamente contaminado com ácaros, em intervalos de aproximadamente 30-40 dias. Replicatas das culturas são mantidas em gerbox em solo natural desfaunado umedecido a



60-70% da capacidade de campo. A criação está sendo mantida a $22 \pm 1^\circ \text{C}$.

Modo de reprodução

Durante o estabelecimento das criações em massa, o modo de reprodução em substrato de ágar de cada linhagem foi observado e classificado em produtor de casulos ou fragmentador.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Enquitreídeos coletados no estado do Paraná ou comprados pela internet perfazem as 13 linhagens sendo atualmente criadas em laboratório em substrato de ágar e solo natural. Todas elas foram identificadas como sendo do gênero *Enchytraeus* Henle, 1837. Três das linhagens que se reproduzem por casulo são possivelmente de espécies ainda não descritas e a outra é provavelmente *Enchytraeus buchholzi* Vejvodský 1879 sensu lato. Essa espécie é cosmopolita e abundante em habitats ricos em nutrientes (Schmelz & Collado, 2010).

Os enquitreídeos reproduzem-se por anfimixia, mas muitas espécies também produzem casulos por auto-fecundação ou partenogênese (Dórsza-Farkas, 1995; Christensen, 1964). Das linhagens produtoras de casulo do presente trabalho, constatou-se que três podem se reproduzir uniparentalmente. A outra ainda não foi determinada. Todas as quatro linhagens parecem ter um ciclo rápido e são bastante prolíficas. Estudos mais detalhados sobre o ciclo de vida e capacidade reprodutiva de uma linhagem está em andamento.

Outras oito linhagens são de enquitreídeos fragmentadores, ou seja, enquitreídeos que se reproduzem uniparentalmente sem produzir casulos, mas por auto-fragmentação do corpo seguida de regeneração das porções amputadas. Esse modo de reprodução é conhecido em apenas oito espécies de enquitreídeos no mundo. Fragmentadores do gênero *Enchytraeus* são frequentemente encontrados na Amazônia e Mata Atlântica (Römbke et al., 2007) e também nos locais amostrados no estado do Paraná. É o primeiro registro da espécie *Enchytraeus dudichi* Dórsza-Farkas, 1995 na América do Sul.

Especimens do gênero *Fridericia* foram coletados em várias ocasiões, mas parecem não tolerar, por muito tempo, as condições do sistema de seleção adotado, demonstrando agitação e estresse quando acondicionados em substrato de ágar ou água excessiva. Em ágar, morreram após poucos dias. Por outro lado, se acondicionados em solo natural umedecido ou substrato preparado com solo natural umedecido e ágar 1% ainda quente formando uma massa, os espécimens se mantêm vivos e aparentemente saudáveis por muitos meses, mas não

parecem se reproduzir, apesar de apresentarem óvulos na região clitelar.

Três linhagens de enquitreídeos foram compradas como *Enchytraeus albidus* Henle 1837 de três diferentes fornecedores pela internet, mas nenhum deles correspondeu a essa espécie. Dois dos fornecedores equivocadamente comercializam espécies fragmentadoras *E. bigeminus* sensu lato e o outro uma espécie produtora de casulos ainda desconhecida. *E. albidus* tem sido bastante estudado e utilizado como organismo-teste em ensaios ecotoxicológicos na Europa (Römbke, 2003) e também comercializado entre os criadores de peixe ornamental. Na América do Sul, até hoje, essa espécie só foi encontrada em habitats litorâneos (Schmelz & Collado, 2010).

As culturas já se mantêm há mais de um ano em laboratório. O substrato à base de ágar permite um monitoramento do desenvolvimento dos enquitreídeos e dos embriões em seus casulos transparentes com facilidade, porém demanda mais mão de obra, pois a renovação do substrato deve ser feita pelo menos a cada 30 dias, dependendo da densidade de indivíduos. A alta densidade em ágar parece induzir a uma “fuga em massa” dos indivíduos que obstruem a borda do recipiente onde está sendo criado e, supostamente, acabam morrendo por sufocamento. A criação em solo natural dificulta o monitoramento do desenvolvimento em maior detalhe, mas permite a manutenção muito mais prolongada da cultura sem a troca do substrato. Algumas culturas já se mantêm há mais de um ano no mesmo substrato. O revolvimento esporádico do solo parece ser favorável. A contaminação das culturas por ácaros tem sido frequentes e difíceis de erradicar, mas aparentemente só prejudicam os enquitreídeos pela competição por alimento. Porém, atenção é necessária, pois existem espécies predadoras que podem dizimar a cultura. Em geral, substratos mais secos e alimento demasiado parecem favorecer o aparecimento de ácaros. A limpeza da tampa e das bordas do recipiente com papel toalha umedecido ajuda a reduzir a população de ácaros, pois são locais preferidos por eles. Por outro lado, substratos muito úmidos e alimento demasiado também são desfavoráveis, pois podem fermentar e sufocar os enquitreídeos. Nematoides, colêmbolos, e, com menos frequência, larvas de díptera podem contaminar as culturas quando estas já não estão muito saudáveis. A contaminação por fungo também pode ocorrer, mas é mais frequente em culturas novas com poucos enquitreídeos. Qualquer que seja o caso recomenda-se repicar a cultura para novos substratos, em caso de contaminação demasiada.

As culturas de enquitreídeos proporcionam vários tipos de estudo, inclusive para uso em aulas práticas



de biologia. A diversidade do modo de reprodução torna os enquitreídeos organismos interessantes para estudos da biologia da reprodução. A regeneração completa dos fragmentos ocorre em poucos dias, portanto, é um ótimo material para estudos de regeneração (Christensen, 1964; Myohara et al., 1999). Os enquitreídeos também são ótimos bioindicadores da qualidade e contaminação do solo utilizados há mais de 20 anos na Europa (Römbke, 2003) e, mais recentemente, também como indicador dos efeitos do aquecimento global devido à sua sensibilidade à temperatura e dessecação (BRIONES et al., 2007). Tendo em mãos pelo menos uma lupa, criatividade e um pouco de paciência há muito o que se investigar e descobrir sobre os enquitreídeos.

CONCLUSÕES

1. Enquitreídeos coletados a campo podem ser facilmente criados em laboratório, em especial espécies do gênero *Enchytraeus*.
2. As culturas de enquitreídeos mantidas no laboratório proporcionam inúmeras possibilidades para estudos de biologia da reprodução, regeneração, ecotoxicologia e outras linhas de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as sugestões de Jörg Römbke (ECT Oecologie, Alemanha) quanto ao método de seleção de enquitreídeos, e a todos que contribuíram na obtenção de amostras de solo com enquitreídeos. Agradecemos também o suporte financeiro fornecido pelo Programa Nacional de Pós-doutorado (PNPD), Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) e apoio da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Florestas (Embrapa – CNPF).

REFERÊNCIAS

BRIONES, M.J.; INESON, P.; HEINEMEYER, A. Predicting potential impacts of climate change on the geographical distribution of enchytraeids: a meta-analysis approach. **Global Change Biology**, v.13, p.2252-2269, 2007.

CHRISTENSEN, B. Regeneration of a new anterior end in *Enchytraeus bigeminus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Vidensk. Medd. Dansk Naturhist Foren 127:259–273, 1964.

CHRISTOFFERSEN, M. L. Species diversity and distributions of microdrile earthworms (Annelida, Clitellata, Enchytraeidae) from South America.

Zootaxa, v.2065, p.51-68, 2009.

DIDDEN, W. A. M.; FRUND, H. C.; GRAEFE, U. Enchytraeids. In: BENCKISER, G. (Ed.). Fauna in Soil Ecosystems. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 135-172.

DIDDEN, W.A.M. Ecology of terrestrial Enchytraeidae. **Pedobiologia**, v.37, p.2-29, 1993.

DÓRZSA-FARKAS, K. Self-fertilization: An adaptive strategy in widespread enchytraeids. **European Journal of Soil Biology**, v.31, p.207-215, 1995.

JÄNSCH, S.; RÖMBKE, J.; DIDDEN, W. The use of enchytraeidae in ecological soil classification and assessment concepts. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.62, p.266-277, 2005.

MYOHARA, M; YOSHIDA-NORO, C.; KOBARI, F.; TOCHINAI, S. Fragmenting oligochaete *Enchytraeus japonensis*: A new material for regeneration study. **Development, Growth & Differentiation**, v.41, p.549–555, 1999.

NIVA, C. C.; RÖMBKE, J.; SCHMELZ, R. & BROWN, G.G. Enquitreídeos (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). In Moreira, F. M. S., E. J. Huising & D. E. Bignell (eds), Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade. UFLA, Lavras, Brazil: 351-365, 2010.

RÖMBKE, J. Ecotoxicological tests with enchytraeids: A review. **Pedobiologia**, v.47, p.607-616, 2003.

RÖMBKE, J. Enchytraeidae of tropical soils: state of the art, with special emphasis on Latin America. Folia Facultatis Scientiarum Naturalium Universitatis Masarykianae Brunensis, **Biologia**, v.110, p.157-181, 2007.

RÖMBKE, J.; COLLADO, R. & SCHMELZ, R.M. Abundance, distribution and indicator potential of enchytraeid genera (Enchytraeidae, Clitellata) in secondary forests and pastures of the Mata Atlântica, **Acta Hydrobiologica Sinica**, v.31, p.139-150, 2007.

SCHMELZ, R. M.; COLLADO, R. *Achaeta becki* sp. nov. (Oligochaeta: Enchytraeidae) from Amazonian forest soils. **Zootaxa**, v.1084, p.49-57, 2005.

SCHMELZ, R. M.; COLLADO, R. Taxonomy workbook for South American terrestrial and freshwater enchytraeids (Oligochaeta) (no prelo)

SCHMELZ, R. M.; RÖMBKE, J. Three new species of *Hemienchytraeus* (Enchytraeidae, Oligochaeta) from Amazonian forest soil. **Journal of Natural History**, v.39, p.2967-2986, 2005.



Tabela 1. Lista das culturas de enchytraédeos mantidas no laboratório da Embrapa Florestas com a identificação, procedência, habitat onde foi encontrado e modo de reprodução. As letras em parênteses se referem às linhagens que são possivelmente novas.

No.	Linhagens	Procedência	Hábitat	Reprodução
1	<i>Enchytraeus dudichi</i> Dózsa-Farkas, 1995 sensu lato	Campo Largo, Itaquí - PR	Pastagem	Fragmentador
2	<i>Enchytraeus</i> sp (A)	Piraquara - PR	Solo nu	Casulo - uniparental
3	<i>Enchytraeus bigeminus</i> Nielsen & Christensen, 1963 sensu lato	?	?	Fragmentador
5	<i>Enchytraeus</i> sp (B)	Ração viva - internet	?	Casulo
6	<i>Enchytraeus bigeminus</i> Nielsen & Christensen, 1963 sensu lato	Ração viva - internet	?	Fragmentador
7	<i>Enchytraeus bigeminus</i> Nielsen & Christensen, 1963 sensu lato	Ração viva - internet	?	Fragmentador
8	<i>Enchytraeus dudichi</i> Dózsa-Farkas, 1995 sensu lato	Embrapa Florestas – Colombo-PR	Floresta de Araucária	Fragmentador
9	<i>Enchytraeus buchholzi</i> Vejdovský 1879 sensu lato (C)	Embrapa Florestas – Colombo-PR	Floresta de Araucária	Casulo - uniparental
10	<i>Fridericia</i> sp e <i>Fridericia</i> cf. <i>chongqingensis</i> Xie, Liang & Wang 1999	Embrapa Florestas – Colombo-PR	Jardim	Casulo (?)
11	<i>Enchytraeus bigeminus</i> Nielsen & Christensen, 1963 sensu lato	Pirai do Sul -PR	Aterro de indústria de papel	Fragmentador
12	<i>Enchytraeus bigeminus</i> Nielsen & Christensen, 1963 sensu lato	Agrárias-UFPR – Curitiba-PR	Humus de <i>Amyntas</i>	Fragmentador
13	<i>Enchytraeus</i> sp (D)	Agrárias-UFPR – Curitiba-PR	Humus de <i>Amyntas</i>	Casulo - uniparental
14	<i>Enchytraeus bigeminus</i> Nielsen & Christensen, 1963 sensu lato	Embrapa Florestas – Colombo-PR	Floresta de Araucária	Fragmentador