

# ÁREAS BÁSICAS

## PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL CONTRA *AZOSPIRILLUM AMAZONENSE* ESTIRPE AM15 <sup>(1)</sup>

MARINETE FLORES DA SILVA <sup>(2)</sup>; VERONICA MASSENA REIS <sup>(3\*)</sup>

### RESUMO

O uso de ferramentas moleculares e imunológicas permite a detecção e o monitoramento específico de microrganismos usados como inoculantes agrícolas. O maior exemplo de sucesso com uso de bactérias diazotróficas na agricultura é o caso da inoculação de soja no Brasil. Entretanto, a inoculação de bactérias diferentes de rizóbio não permite a localização de um sítio específico onde ocorra a redução do nitrogênio atmosférico, pois não há a formação de estruturas nodulares. Este trabalho foi realizado na Embrapa-Agrobiologia, e objetivou produzir e caracterizar um anticorpo policlonal a partir da inoculação de células intactas da estirpe Am15 pertencente à espécie *Azospirillum amazonense* (Anti-Am15) utilizando o método de ELISA indireto. O anticorpo foi usado em sementes peletizadas com turfa contendo a bactéria-alvo e avaliada sua sobrevivência durante 60 dias. Este anticorpo foi capaz de quantificar populações bacterianas em amostras cujo número mínimo celular foi superior a valores de 100.000 células por mL. De acordo com os resultados, o soro policlonal foi específico contra o antígeno de interesse, sendo possível sua utilização em estudos de quantificação e monitoramento do *Azospirillum* sp em plantas de milho que receberam inóculo e no controle da qualidade de inoculante turfoso.

**Palavras-chave:** imunologia, anticorpos, bactérias diazotróficas.

### ABSTRACT

#### PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF POLICLONAL ANTIBODIES AGAINST *AZOSPIRILLUM AMAZONENSE* STRAIN AM15

Molecular and immunological approaches are useful for monitoring the localization of microorganism used as agricultural inoculants. A successful example is the use of a diazotrophic bacteria, as soybean in Brazil. However, as diazotrophic bacteria other than rizobium do not form nodular structures, the localization of the specific site where nitrogen reduction occurs is impossible. In this study, carried out at Embrapa Agrobiology, a polyclonal antibody against *Azospirillum amazonense* (As-Am15) was to produced and characterized through an indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Maize seedscoated with peat containing the target bacterium were enoculated with the policlonal antibody and evaluated during 60 days. The antibody was able to quantify bacteria populations in samples where the minimal cell number were superior to 100,000 cells L<sup>-1</sup>. According to these results, the policlonal antibody As-Am15 showed high specificity to the target antigen and was able to quantify or monitor *Azospirillum* strains and able to be used as a control of the quality of a peat inoculant product.

**Key words:** immunology, antibodies, diazotrophic bacteria.

---

<sup>(1)</sup> Recebido para publicação em 30 de janeiro de 2006 e aceito em 31 de julho de 2008.

<sup>(2)</sup> Estudante de Mestrado do Curso de Pós-graduação em Ciência do Solo, Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

<sup>(3)</sup> Embrapa-Agrobiologia, BR 465, km 07 Caixa Postal 74.505, 23890-000 Seropédica (RJ). E-mail: marineteflores@ufrj.br; veronica@cnpab.embrapa.br (\*) Autora para correspondência.

## 1. INTRODUÇÃO

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é um dos mais importantes processos conhecidos na natureza e nas associações com gramíneas, realizado por alguns gêneros de microrganismos tais como: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia* (BALDANI et al., 1999). Esses microrganismos têm demonstrado seu potencial agrícola seja via FBN, seja através da produção de hormônios vegetais, promovendo incremento no crescimento de plantas de diferentes espécies com ênfase no uso das gramíneas forrageiras, (REIS JÚNIOR et al., 2004) e principalmente por aumento da exploração da área radicular, mesmo em condições de baixo suprimento de nutrientes e umidade (BASTIAN et al., 1998).

Inoculantes, no que se refere aos vegetais, são classificados como material que contém microrganismos com atuação favorável ao desenvolvimento vegetal no meio agrícola. No Brasil, o maior sucesso da utilização destes produtos contendo turfa infectada com estirpes selecionadas de rizóbio é sua aplicação na cultura da soja. Esta tecnologia rende uma economia para o País de cerca de 2,5 bilhões de dólares ao ano pela não-utilização de fertilizantes nitrogenados, além de evitar perdas subterrâneas e atmosféricas de formas de N, que ocorrem principalmente em solos tropicais (ALVES et al., 2003). O inoculante turfoso foi muito usado no passado, mas, atualmente, o inoculante líquido é o que domina o mercado brasileiro.

Inoculantes para cereais vêm sendo utilizados em muitos países. Na Itália, há alguns anos, já existe um inoculante contendo uma mistura de microrganismos diazotróficos como *A. brasilense* estirpe Cd e *A. lipoferum* estirpe Br 17 registrado como Zea-Nit<sup>TM</sup> e na França, o Azogreen<sup>TM</sup>, contendo a estirpe CRT-1 de *A. lipoferum* como inóculo para a cultura do milho (OKON e LABANDERA-GONZALEZ, 1994). Várias culturas de interesse agrícola podem se beneficiar da prática de inoculação de estirpes selecionadas de *Azospirillum* spp. como trigo, sorgo, arroz e o milho. De maneira geral, em 60% a 70% dos experimentos citados por OKON e LABANDERA-GONZALEZ (1994), houve incrementos de produção com a inoculação, no entanto, somente em 5%-30% as respostas foram estatisticamente significativas. Esses dados demonstram o potencial do benefício do processo de FBN para o agronegócio de cereais no Brasil, contribuindo para a sustentabilidade no setor.

Técnicas imunológicas aplicáveis à área agrícola têm sido aplicadas com sucesso e permitem detectar, quantificar ou mesmo capturar microrganismos presentes em amostras de solo, água

e plantas (REIS et al., 1997). A análise de diagnóstico por imunoabsorção com anticorpo conjugado marcado com enzima (ELISA – “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”), é utilizada em muitos campos da Biologia como, por exemplo, para identificar e quantificar bactérias específicas em extratos vegetais e sua visualização *in situ* (SCHLOTER et al., 1995). O principal entrave para a utilização destes ensaios imunológicos refere-se ao número mínimo necessário do organismo alvo para a detecção positiva e a redução da reação cruzada. LI e MACRAE (1992) e REIS et al. (2000) utilizaram um método simples para reduzir as taxas de reação cruzada do soro policlonal contra microrganismos da mesma espécie e de diferentes gêneros, imunoabsorvendo o soro produzido contra uma estirpe em que se tenha constatado elevado percentual de reação cruzada, por simples incubação e centrifugação. Em relação ao número de detecção, REIS et al. (1997) utilizaram soros policlonais e observaram o limite de detecção de  $10^5$  células mL<sup>-1</sup>.

De acordo com as normas estabelecidas pelo Ministério da Agricultura, os inoculantes devem obedecer aos padrões de qualidade do produto, contendo no mínimo  $10^9$  células viáveis por grama ou mililitro de produto até a data de seu vencimento (Instrução Normativa número 5, de 6 de agosto de 2004). Esses números indicam que o método de ELISA indireto tem sensibilidade menor do que o limite mínimo de células exigido por lei. Este método não detecta apenas células vivas, mas também células mortas ou antígenos particulados.

Este trabalho teve o objetivo de produzir e caracterizar um anticorpo policlonal a partir da inoculação de células intactas da estirpe Am15 pertencente à espécie *Azospirillum amazonense* (Anti-Am15) utilizando o método de ELISA indireto.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para produção dos soros foi seguido o procedimento descrito por REIS et al. (1997). Foi produzido um soro policlonal em três coelhos da raça Nova Zelândia com idades entre 30-45 dias. Um coelho foi utilizado como controle do ambiente e os outros dois foram infectados com a mesma estirpe de *Azospirillum amazonense* (Am15). Esta estirpe foi isolada da seiva do xilema do milho cultivado em Sistema Integrado de Produção Agroecológica (Fazendinha-Agroecológica), localizada na Embrapa Agrobiologia. Os imunógenos foram preparados a partir de células puras e intactas de *A. amazonense*, usando o meio LGI (MAGALHÃES et al., 1983) acrescido de  $1 \text{ g l}^{-1}$  de  $\text{KNO}_3$  e mantido a 30 °C sob agitação de 175 rpm e coletadas após 24 horas.

Após o crescimento, a cultura foi transferida para frascos do tipo FALCON™ com capacidade para 50 mL e lavadas por centrifugação a  $8,94 \times g$  por 6 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi descartado e a massa celular ressuspensa em 50 mL de água destilada estéril. Este procedimento de lavagem foi repetido três vezes para eliminar os produtos do seu metabolismo. No fim, o concentrado celular foi ressuspensa em 2 mL de água destilada estéril e tratada termicamente a 90 °C por 30 minutos para neutralizar e eliminar proteínas do flagelo, mantendo as células intactas. Após este tratamento os animais foram submetidos à inoculação.

Inicialmente, foi retirada uma alíquota de 5 mL do sangue de cada animal para a obtenção do soro pré-imune, que foi utilizado como branco (controle negativo) das reações pertinentes aos imunoenaios. A primeira imunização consistiu da mistura de 0,5 mL de djuvante de Freund completo e o incompleto (Sigma Chemical CO., USA) a 1 mL da suspensão bacteriana contendo  $10^9$  células mL<sup>-1</sup>, sendo então homogeneizados. As aplicações foram feitas no dorso do animal via subcutânea, em seis diferentes sítios por coelho (HARLOW e LANE, 1988). Sete dias após a primeira imunização foi feita a segunda, só que intramuscular, em um total de nove imunizações com intervalos de sete dias entre aplicações de 1 mL do inóculo bacteriano. Após a sétima semana de aplicações do imunógeno, foi feita nova inoculação para provocar o aumento do título, resultando em mais cinco imunizações de 1 mL cada, com intervalos de dois dias entre aplicações. Antes da sangria total, foram retiradas amostras de 5 mL do sangue, obtido do terço médio superior das orelhas dos coelhos com auxílio de seringa plástica descartável, para acompanhar a evolução das imunoglobulinas da classe G. A coleta do sangue total, resultou em aproximadamente 50 mL por coelho, que ficaram coagulando por 3 horas à temperatura ambiente, dentro da seringa, para que o soro pudesse ser liberado. Posteriormente, o soro foi transferido para tubos Eppendorf™, centrifugados a 4 °C por 10 minutos a  $8,94 \times g$  para remover partículas sólidas presentes, como hemáceas. Após esta etapa, apenas o sobrenadante foi recolhido, e transferido para novos tubos Eppendorf™, onde foi feito tratamento térmico a 56 °C por 30 minutos, a fim de inativar as proteínas do sistema complemento. No fim, alíquotas de 1 mL do soro foram transferidas para frascos de vidro estéreis e armazenados a -20 °C.

O procedimento adotado para o método ELISA foi o indireto seguindo método descrito por REIS et al. (2000). Cada placa recebeu o controle pré-imune, além de controles da reação, tais como sem anticorpo primário, sem anticorpo conjugado, sem células e só substrato.

Para testar o mínimo de sensibilidade dos soros brutos (contém uma mistura de imunoglobulinas) e purificado (contém apenas imunoglobulinas da classe G), foram feitas diluições seriadas do antígeno (estirpe Am15), utilizada para imunização, que variou de ( $10^1$  a  $10^8$  células mL<sup>-1</sup>). O teste de especificidade foi feito utilizando estirpes purificadas e depositadas na coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia e pertencentes à diferentes gêneros e espécies bacterianas (Tabela 1). Todos os isolados cresceram em tubos de ensaio contendo meio líquido Nfb pH 6,8 (BALDANI e DÖBEREINER, 1980) e LGI pH 6,0 – 6,2 acrescidos de 1 g de NH<sub>4</sub>Cl e KNO<sub>3</sub> respectivamente para os isolados *Azospirillum* spp, para os isolados de *Herbaspirillum* spp, foi utilizado o meio líquido caldo nutritivo pH 6,0, para *Burkholderia* spp, o meio líquido JMV pH 5,5 (BALDANI, 1996), para *Rhizobium* spp., *Bradyrhizobium* spp e *Sinorhizobium* o meio líquido 79 com pH 7,0 (FRED e WAKSMAN, 1928). As estirpes foram colocadas a 30 °C por 16 horas a 175 rpm. A densidade ótica (a 436 nm) foi ajustada para que todas as estirpes tivessem a contagem de  $10^8$  células mL<sup>-1</sup>.

As microplacas foram sensibilizadas com 50 µL de antígeno ressuspensa em tampão carbonato e aplicou-se o teste ELISA indireto, utilizando os soros bruto (soro contendo todas as imunoglobulinas produzidas como IgM, IgE, IgD, IgA e IgG ) e purificado (soro contendo apenas a imunoglobulina de interesse como a IgG).

A avaliação da reação cruzada, utilizando soros brutos e os mesmos purificados em coluna contendo proteína A, foi feita seguindo método descrito por REIS et al. (2000). O percentual de reação cruzada refere-se ao valor de densidade ótica obtido pelo teste de ELISA indireto em relação ao valor obtido pela estirpe que deu origem ao soro. Para a purificação dos antissoros e eliminação das imunoglobulinas inespecíficas foi utilizada uma coluna de proteína A - extraída de *Staphylococcus aureus* - (ABICAP, MERCK) contendo agarose, com capacidade de retenção de 0,5-1,0 mg de IgG. Inicialmente, lavou-se a coluna duas vezes com 1 mL de tampão de lavagem (Tris [100 mM], pH 8,0). A seguir, misturou-se 10 mL do soro diluído 1:100 no tampão de lavagem. Lavou-se novamente a coluna, utilizando-se o mesmo tampão (duas vezes 1 mL), para que as imunoglobulinas - IgM, IgE, IgD, IgA e outras - sem afinidade com a coluna fossem removidas. A próxima etapa consistiu na eluição das imunoglobulinas específicas (IgG's) de sua fase estacionária (proteína A em agarose) através da lavagem da coluna com duas vezes 1 mL de tampão glicina ([100 mM], pH 3,0 e 4,0). As alíquotas eluídas foram recolhidas em frascos de vidro estéril. Ajustou-se o pH do anticorpo purificado para próximo de sete utilizando-se NaOH 0,5 M. Os soros purificados foram armazenados a 4 °C após a adição de azida sódica (20 mL do estoque a 2% em PBS para cada 2 mL de soro).

**Tabela 1.** Isolados utilizados nos imunoenaios de especificidade do anticorpo produzido contra a estirpe Am 15 de *Azospirillum amazonense*

Espécie/Estirpe	Planta	Local	Origem
<i>Azospirillum brasilense</i>			
1- Cd <sup>T</sup>	<i>Cynodon dactylon</i>	Raízes	Israel
2- Sp 245	<i>Triticum aestivum</i>	Raiz desinfestada	Brasil
3- 7Mst	<i>Zea mays</i>	Raiz esterilizada	Argentina
4- 48BC(1)	<i>Zea mays</i>	Solo	CNPAB
5- Sp108	<i>Zea mays</i>	Raiz desinfestada	CNPAB
6- Sp 80	<i>Zea mays</i>	Raiz estéril	CNPAB
7-15C4	<i>Zea mays</i>	Mutante NR <sup>-</sup>	Argentina
8-F2	<i>Zea mays</i>	Mutante	México
9- Sp107	<i>Triticum aestivum</i>	Raiz desinfestada	Brasil
10- 15REa	<i>Zea mays</i>	Raiz lavada	CNPAB
11- JA16	<i>Triticum aestivum</i>	Raiz lavada	CNPAB
12- 48BC	<i>Zea mays</i>	Solo entrelinha	CNPAB
13-I2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	sementes	Brasil
14-Sp7	<i>Digitaria decumbens</i>	raízes	CNPAB
<i>Azospirillum lipoferum</i>			
15- JA10	<i>Triticum aestivum</i>	Raiz lavada	Brasil
16- D13	Mutante NR <sup>-</sup> de 242	Rizosfera	Brasil
17- Sp59a <sup>T</sup>	<i>Triticum aestivum</i>	Raiz desinfestada	Brasil
18-BR 17 <sup>T</sup>	<i>Zea mays</i>	Raiz lavada	Brasília
19- JA4	<i>Triticum aestivum</i>	Raiz desinfestada	Brasil
20-Sp204	<i>Zea mays</i>	Raiz lavada	Brasil
21- 12REC1	<i>Zea mays</i>	Raiz desinfestada	CNPAB
22- BSL505	<i>Zea mays</i>	Raiz lavada	CNPAB
23- R1	<i>Triticum aestivum</i>	Raiz	Brasil
24- I4	<i>Triticum aestivum</i>	Xilema	Brasil
25- 2569	<i>Zea mays</i>	SI	CNPAB
26-JA2	<i>Zea mays</i>	Raiz lavada	Passo Fundo
<i>Azospirillum amazonense</i>			
27 -Ym 6 <sup>T</sup>	<i>Zea mays</i>	Rizosfera	CNPAB
28 -Ym 10	<i>Zea mays</i>	Rizosfera	CNPAB
29-Am33	<i>Zea mays</i>	Xilema	CNPAB
30-Am 12	<i>Zea mays</i>	Xilema	CNPAB
31- Am 15	<i>Zea mays</i>	Xilema	CNPAB
32-Ym148	<i>Zea mays</i>	Solo rizosfera	CNPAB
33-Y2 <sup>T</sup>	<i>Hyparrhenia rufa</i>	Raiz esterilizada	CNPAB
34-Am28	<i>Zea mays</i>	Xilema	CNPAB
35-Ym22	<i>Zea mays</i>	Solo rizosfera	CNPAB
36-CBAmC	<i>Saccharum spp.</i>	Colmo	CNPAB
37-Y6	<i>Penisetum purpureum</i>	Raízes	CNPAB
38-Y36	<i>Zea mays</i>	Raiz desinfestada	CNPAB
39-Am19	<i>Zea mays</i>	Xilema	CNPAB
40-Am8	<i>Zea mays</i>	Xilema	CNPAB
41-Am76	<i>Zea mays</i>	Raiz lavada	CNPAB
42-Am16	<i>Zea mays</i>	Xilema	CNPAB
43-Ym11	<i>Zea mays</i>	Raiz lavada	CNPAB
44-Ym69	<i>Zea mays</i>	Raiz desinfestada	CNPAB
45-Am24	<i>Zea mays</i>	Xilema	CNPAB

Continua

Tabela 1. Conclusão

Espécie/Estirpe	Planta	Local	Origem
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>			
46- HRC51	<i>Saccharum</i> spp.	Raízes	CNPAB
47-M1	<i>Saccharum</i> spp.	Folhas	CNPAB
48-M5	<i>Saccharum</i> spp.	Folhas	CNPAB
49- M4 <sup>T</sup>	<i>Saccharum</i> spp.	Folhas	CNPAB
50- HCC103	<i>Saccharum</i> spp.	Colmo	CNPAB
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>			
51-ZMS 152	<i>Zea mays</i>	Raízes	CNPAB
52- ZAE 78	<i>Sorghum vulgare</i>	Raízes	CNPAB
53- HRC54	<i>Saccharum</i> spp.	Raiz esterilizada	CNPAB
54- ZAE67 <sup>T</sup>	<i>Oriza sativa</i>	Raízes	CNPAB
55-HRC80	<i>Saccharum</i> spp.	Raízes	CNPAB
56- IR B6 509	<i>Oriza sativa</i>	Raízes	CNPAB
<i>H. frisingense</i>			
57-GSF 30 <sup>T</sup>	<i>Miscanthus sacchariflorus</i>	Raízes	Alemanha
<i>Burkholderia</i> sp.			
58- M130	<i>Oriza sativa</i>	Raiz esterilizada	CNPAB
59- Sp36	<i>Oriza sativa</i>	Raízes lavadas	CNPAB
60- MV219	<i>Oriza sativa</i>	Raízes esterilizadas	CNPAB
61-F129	<i>Oriza sativa</i>	Raízes esterilizadas	CNPAB
62-F142	<i>Oriza sativa</i>	Parte aérea	CNPAB
63- Ppe7	<i>Saccharum</i> spp.	Parte aérea	CNPAB
64-TVV75	<i>Oriza sativa</i>	Rizosfera	Vietnã
65-114	<i>Oriza sativa</i>	Parte aérea	CNPAB
66-139	<i>Oriza sativa</i>	Parte aérea	CNPAB
<i>Burkholderia gadioli</i>			
67-LMG2216	<i>Gladiolus</i> sp.	SI	SI
<i>Burkholderia sacchari</i>			
68-IPT 101 <sup>T</sup>	<i>Saccharum</i> spp.	Solo	USDA
<i>Burkholderia tropica</i>			
69- Ppe8 <sup>T</sup>	<i>Saccharum</i> spp.	Parte aérea	CNPAB
70-Ppe4	<i>Saccharum</i> spp.	Parte aérea	CNPAB
<i>Burkholderia kururiensis</i>			
71- KP23 <sup>T</sup>	Aqüíferos poluídos	SI	Japão
<i>Rhizobium tropici</i>			
72- BR 520	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Nódulos de raízes	CPAC
73-BR920	<i>Leucaena</i> spp.	Nódulos de raízes	Brasil
<i>Rhizobium huakii</i>			
74-BR524	<i>Stragalus simicus</i>	Nódulos de raízes	USDA
<i>Sinorhizobium medicae</i>			
75-BR525	<i>Medicago sativa</i>	Nódulos de raízes	USDA
<i>Rhizobium. geardini</i>			
76-BR529	SI	Nódulos de raízes	SI
<i>Sinorhizobium. saheli</i>			
77 -BR526	<i>Sesbania cannabina</i>	Nódulos de raízes	Senegal
<i>Rhizobium. leguminosarum</i>			
78-BR292	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Nódulos de raízes	USDA

CNPAB - Embrapa Agrobiologia - Coleção de Bactérias Diazotróficas.  
SI - Sem identificação.

A estirpe escolhida foi aquela com valores intermediários de reação cruzada (inespecificidade). A estirpe selecionada para proceder a imunoabsorção do anticorpo de *A. amazonense* foi a Ym 10. Esta estirpe foi cultivada em Erlemeyer de 1 litro contendo 500 mL de meio de cultura LGI suplementado com 1 g de KNO<sub>3</sub> por 24 h a 30 °C e 175 rpm. A cultura foi centrifugada em tubos do tipo FALCOM<sup>TM</sup>, com capacidade para 50 mL, e o sobrenadante, descartado, ficando a massa celular, ressuspensa em 5 mL de PBS, resultando em uma D.O. final igual a 3 (436nm). As células bacterianas (5 mL) foram mortas com a adição de azida sódica (0,02 %) por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 500 ml do soro purificado *A. amazonense* (Am 15) e foi incubado sob agitação de 1,43 x g por 2 h a 30 °C. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 1,43 x g durante 5 minutos, o sobrenadante foi recolhido e a massa celular, descartada. Os imunoenaios foram novamente aplicados para caracterização do Anti-Am15 (anticorpo policlonal produzido contra a estirpe de *A. amazonense* Am15).

Para a quantificação do *Azospirillum* spp. inoculado nas sementes com turfa, foram utilizadas sementes de milho híbrido SHS 5050 (Santa Helena Ltda.) e uniformizadas a massa seca do grão a 14% de umidade (0,1 g). A estirpe Am15 foi crescida em meio de cultivo LGI (conforme citado) e em seguida saquinhos de plástico contendo 35 g de turfa foram infectados com 70 mL da suspensão bacteriana do isolado Am 15. Após este procedimento, o inoculante ficou sob incubação a 30 °C por 24 horas. Após este período, as sementes foram peletizadas com 10 g do inoculante turfoso misturado com 10 mL do aditivo goma arábica a 10%.

Para a quantificação da estirpe Am15 nas sementes contendo o inoculante turfoso, foram utilizados três métodos diferentes: contagem das colônias pelo método da gota (MILES e MISRA, 1938), que consiste em determinar o número de células por diluição seriada, através da contagem em placa, onde foram utilizados 20 mL da solução de diluição por placa e aplicada em triplicata, sendo inoculado em meio de cultura LGI pH 6,0-6,2 sólido, cujas placas foram divididas em quatro setores. Incubou-se por 48 horas, quando foi feita a contagem usando uma lupa, e avaliado o número de colônias individuais formadas por cada alíquota de 20 mL, obtendo-se a média. Em seguida, este número foi multiplicado pela diluição adicionada à placa para que pudesse ser feita a contagem das colônias individuais e depois multiplicado por 50 (fator de correção) para ser expresso o número de células por mL.

A contagem pelo método NMP foi determinada através das amostras usando 0,1 g do material fresco lavado em 900 mL de solução salina.

A seguir, procedeu-se a diluição seriada (1/10) em solução salina. De cada diluição, foram adicionados 100 mL de suspensão em meio de cultivo LGI semissólido, sem adição de nitrogênio. A contagem foi realizada aos sete dias de incubação através da visualização da película característica e utilizando a tabela de McCrady (DÖBEREINER et al., 1995).

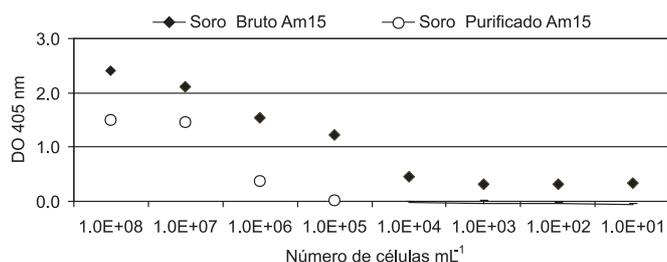
O procedimento de ELISA indireto constou do seguinte: as placas foram preenchidas com 50 mL/poço do antígeno em tampão carbonato (50 mM de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 50 mM de NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6) e postas para impregnar por 18 horas a 4 °C. Após este período, foram lavadas uma vez com 200 mL/poço de solução de lavagem (PBS [0,01 M], BSA [0,5%] (SIGMA [fração V]); Tween 20 [0,05%]). Logo após foram adicionados 200 mL de solução de albumina bovina (BSA (3% em PBS), para bloquear os espaços não ocupados pelo antígeno e impedir uma possível adesão dos anticorpos primários à placa. Incubou-se por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, adicionaram-se 50 mL do anticorpo primário por poço, diluído em PBS-BSA (0,1%) e incubou-se por 30 minutos a 37 °C. Após este período, lavou-se três vezes com 200 mL/poço de solução de lavagem. Adicionaram-se 50 L/poço do anticorpo secundário (IgG Anti-coelho conjugada com peroxidase, Amersham Life Science) diluído em PBS-BSA (0,1%). Incubou-se por 45 minutos a 37 °C. Após esse procedimento, lavou-se por cinco vezes com 200 mL/poço de solução de lavagem. Adicionaram-se 100 mL/poço do substrato ABTS (2,2'-Amino-di-[3etil-benzotiazolinasulfonato(6)] sal de diamônio cristalizado, (Boehringer Mannheim Biochemica) na concentração de 1 mg/mL diluído em tampão ABTS (Boehringer Mannheim Biochemica - perborato de sódio, ácido cítrico e fosfato de sódio dibásico - 1,67 g em 10 mL de água destilada). A leitura das absorbâncias foi realizada com filtro de interferência de 405 nm em espectrofotômetro Labsystem Multiskan Plus (Labsystems Oy, Helsinki, Finlândia) sendo esses valores armazenados e processados pelo programa Labsystems Transmit Multiskan Plus for Windows. Os controles utilizados foram: soro pré-imune, sem o anticorpo primário, sem o anticorpo secundário, sem antígeno, somente com o substrato e com o substrato diretamente na placa.

Antes da incubação de cada soro as placas foram agitadas por 3 minutos a 300 rpm em agitador IKA-Schüttler MTS 2 (Janke & Kunkel GmbH & Co KG IKA-Labortechnik Staufen, Germany). Durante o tempo de reação do substrato com a enzima as placas foram agitadas a 100 rpm. Os valores foram diminuídos dos valores do soro pré-imune, sendo considerados bons aqueles com valores superiores ao soro pré-imune.

A avaliação da sobrevivência do *Azospirillum* spp no inoculante turfoso (preparado como citado) foi feita através de contagens em meio de cultivo semissólido LGI pH 6,0-6,2, em 24 horas após a inoculação e a intervalos de 15 dias subsequentemente por um período de armazenamento de 60 dias utilizando o método do NMP (DÖBEREINER et al. 1995) usando três repetições a cada coleta.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para determinar a sensibilidade do ELISA, foram utilizadas diluições seriadas da bactéria e o anticorpo primário bruto foi diluído 1000 vezes e o purificado foi diluído 20 vezes. Foram necessários no mínimo de  $10^4$  e  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  com os soros bruto e purificado respectivamente de *A. amazonense* Am 15 para uma detecção positiva (Figura 1). Esses resultados sugerem que a purificação contribuiu com a perda de anticorpos específicos contra células de *A. amazonense* Am15, diminuindo sua sensibilidade.



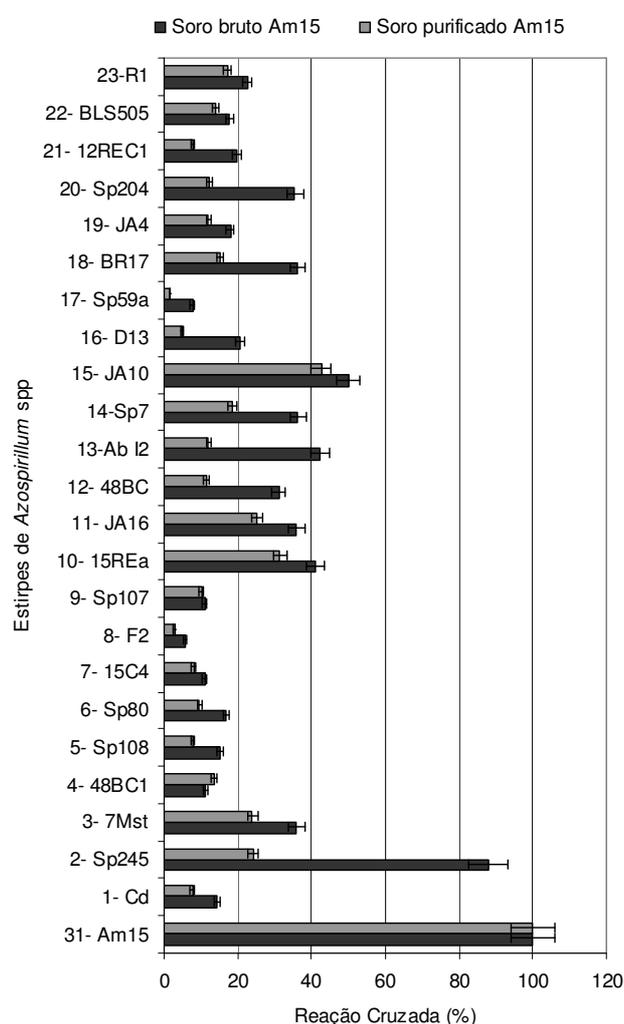
**Figura 1.** Valores de absorvância da sensibilidade dos soros bruto e purificado por cromatografia de afinidade, produzidos contra *A. amazonense* Am15. Valores médios de quatro repetições.

Resultados similares foram constatados por ARAÚJO et al. (2005) utilizando soros policlonais purificados em proteína A, cujo nível mínimo de detecção ficou em torno de  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , para os isolados 4558 e 4560 ambos de *Xanthomonas campestris* pv. vitícola.

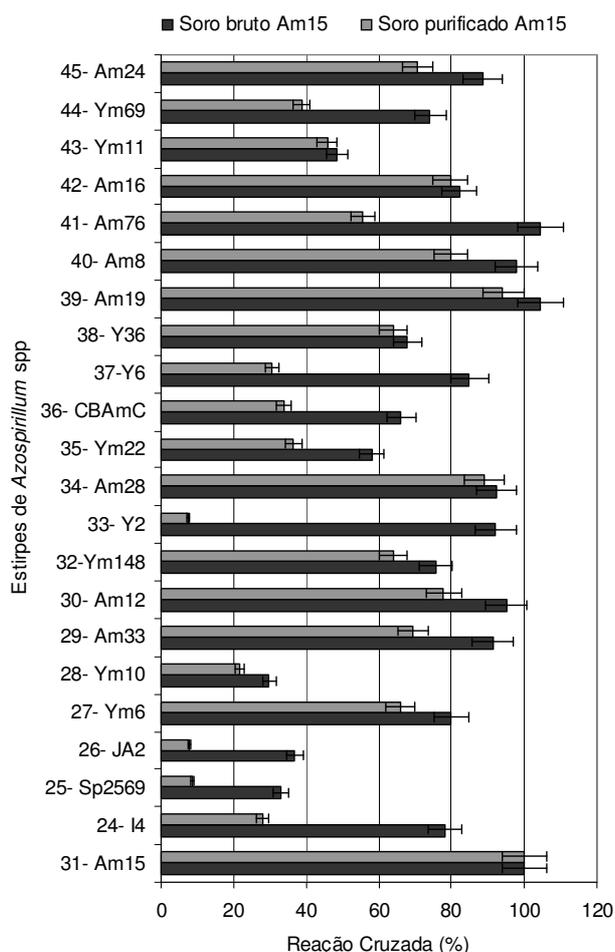
O anticorpo produzido contra a estirpe Am 15 foi testado contra 78 estirpes, e após a purificação deste soro, verificou-se que em 54 estirpes o percentual de reconhecimento cruzado ficou abaixo de 20% e em 24 estirpes, os valores ficaram na faixa dos 30% a 80% de reconhecimento cruzado, com exceção das estirpes de *A. amazonense* Am 19 e Am 28 com reação cruzada de quase 100%. Sugere-se que essas estirpes sejam homólogas e podem estar relacionadas com o habitat, pois foram isoladas da seiva do xilema do milho, assim

como o Am 15 (Figuras 2, 3, 4, 5 e 6). Em relação aos demais gêneros, todas as estirpes de *Herbaspirillum* spp. testadas contra o anticorpo purificado Am15 tiveram reações cruzadas inferiores a 10% e ausência de reação inespecífica contra os isolados de *Burkholderia* spp. e, finalmente, para estirpes de *Rhizobium* spp., foi também abaixo de 20%.

Entretanto, diferentes determinantes estão presentes nos antígenos e podem gerar anticorpos policlonais inespecíficos. Estudos realizados por LEVANONY e BASHAN (1988) demonstram que o antígeno específico de *A. brasilense* Cd está visivelmente localizado na camada de exopolissacarídeo, encapsulando cada bactéria.

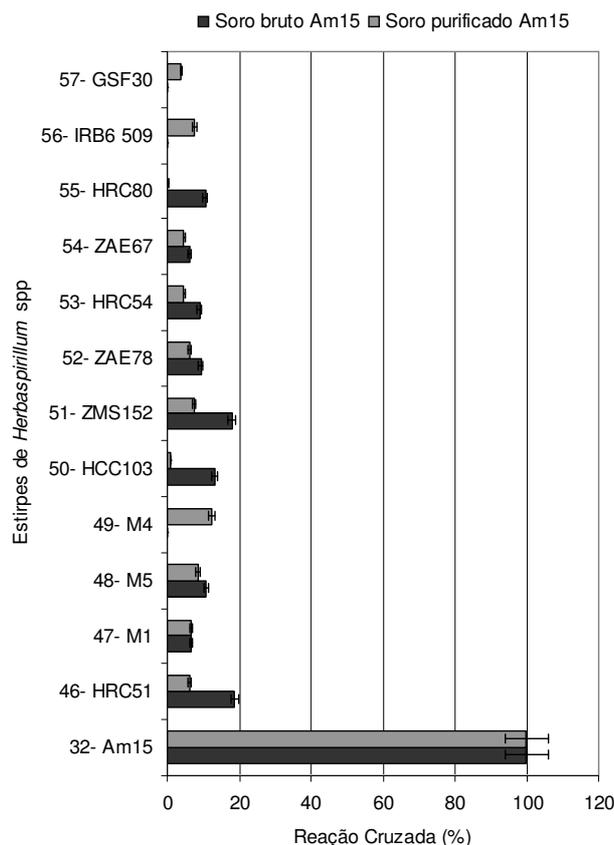


**Figura 2.** Especificidade dos soros policlonais Anti-Am15 bruto e purificado em coluna preenchida com proteína A, contra diferentes isolados de *Azospirillum* spp. (% reação cruzada comparada à estirpe usada por imunização). Barras de erro indicam o desvio-padrão. Valores médios de três repetições. Legenda: Números antes da identificação das estirpes referem-se à sua posição na tabela 1.



**Figura 3.** Especificidade dos soros policlonais Anti-Am15, bruto e purificado em coluna preenchida com proteína A, contra diferentes isolados de *Azospirillum* spp. (% reação cruzada comparada à estirpe usada por imunização). Barras de erro indicam o desvio-padrão. Valores médios de três repetições. Legenda: Números antes da identificação das estirpes referem-se à sua posição na tabela 1.

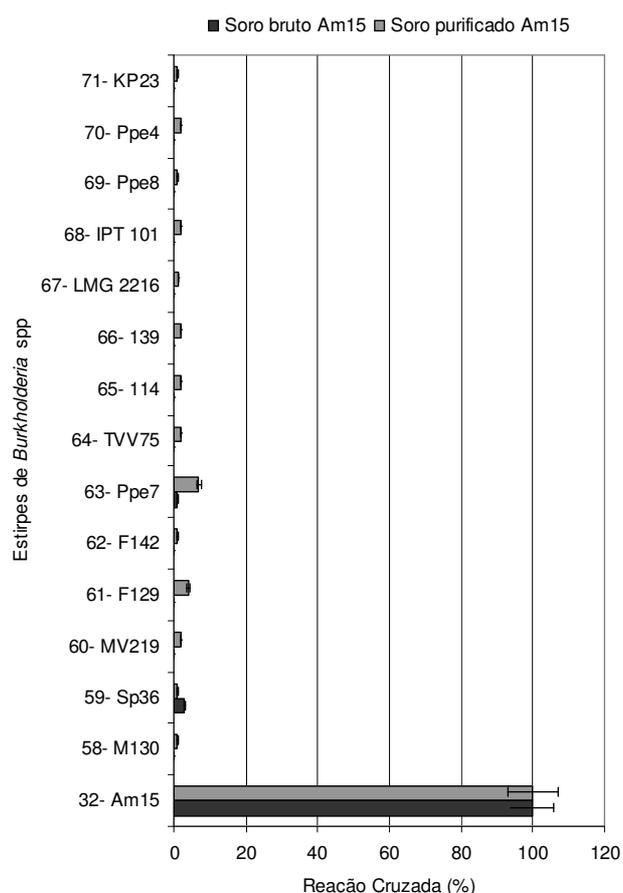
Neste mesmo estudo, o anticorpo específico precipitou com o exopolissacarídeo da estirpe Cd. De acordo com OLIVARES (1997), para um soro com percentuais de reação cruzada superior a 20%, torna-se necessário um tratamento para a eliminação das imunoglobulinas inespecíficas. Esta técnica permitiu diminuir as reações cruzadas ainda proporcionadas pelo anticorpo Am15 pois, antígenos semelhantes às duas estirpes reagiram e foram separados por centrifugação. O restante dos anticorpos que não foram removidos pela reação de adsorção, tornam o soro específico para a estirpe de interesse.



**Figura 4.** Especificidade dos soros policlonais Anti-Am15 bruto e purificado em coluna preenchida com proteína A, diferentes isolados de *Herbaspirillum* spp (% reação cruzada comparada a estirpe usada por imunização). Barras de erro indicam o desvio-padrão. Valores médios de três repetições. Legenda: Números antes da identificação das estirpes referem-se à sua posição na tabela 1.

Após a purificação do anticorpo Am15 com *A. amazonense* Ym10, resultou o soro Anti-Am15-Ym10 (Anti-Am15) com propriedades estirpe específico para o imunógeno (Figura 7). Este anticorpo revelou porcentagem de reação cruzada abaixo de 20%, com exceção das estirpes Am12, Am19 e Am33, todas provenientes do xilema do milho assim como o Am15.

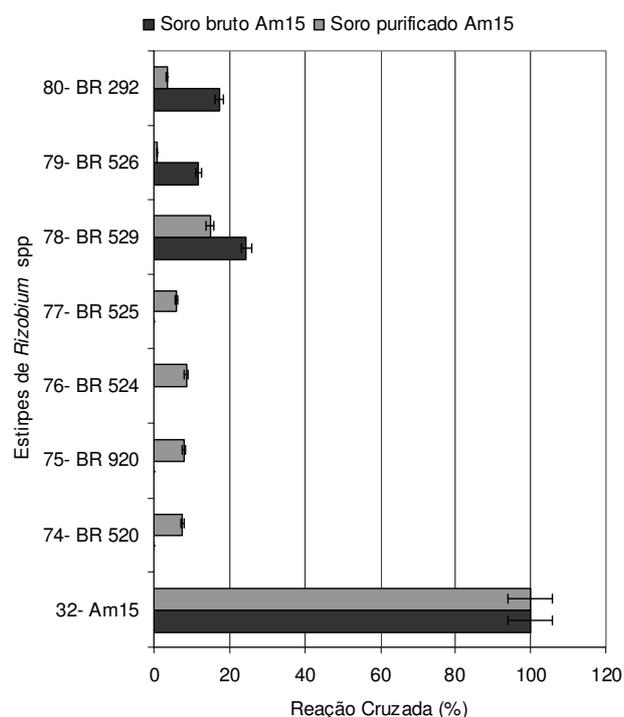
A eliminação das imunoglobulinas inespecíficas, geradas pela diversidade de determinantes antigênicos considerados indesejáveis, pode ser eliminada por uma simples incubação com células de uma estirpe semelhante, mas não idêntica tornando o soro estirpe-específico. Dados obtidos por LI e MACRAE (1992) mostram a completa diminuição da reação cruzada do soro de *Gluconacetobacter diazotrophicus* purificado por imunoabsorção contra diferentes isolados do mesmo gênero. O mesmo foi observado por REIS et al. (2000), com soro de *Herbaspirillum seropedicae* Z68 contra diferentes espécies de *Herbaspirillum* spp. submetidos à mesma purificação.



**Figura 5.** Especificidade dos soros policlonais Anti-Am 15 bruto e purificado em coluna preenchida com proteína A, contra diferentes isolados de *Burkholderia* spp (% reação cruzada comparada a estirpe usada por imunização). Barras de erro indicam o desvio-padrão. Valores médios de três repetições. Legenda: Números antes da identificação das estirpes referem-se à sua posição na tabela 1.

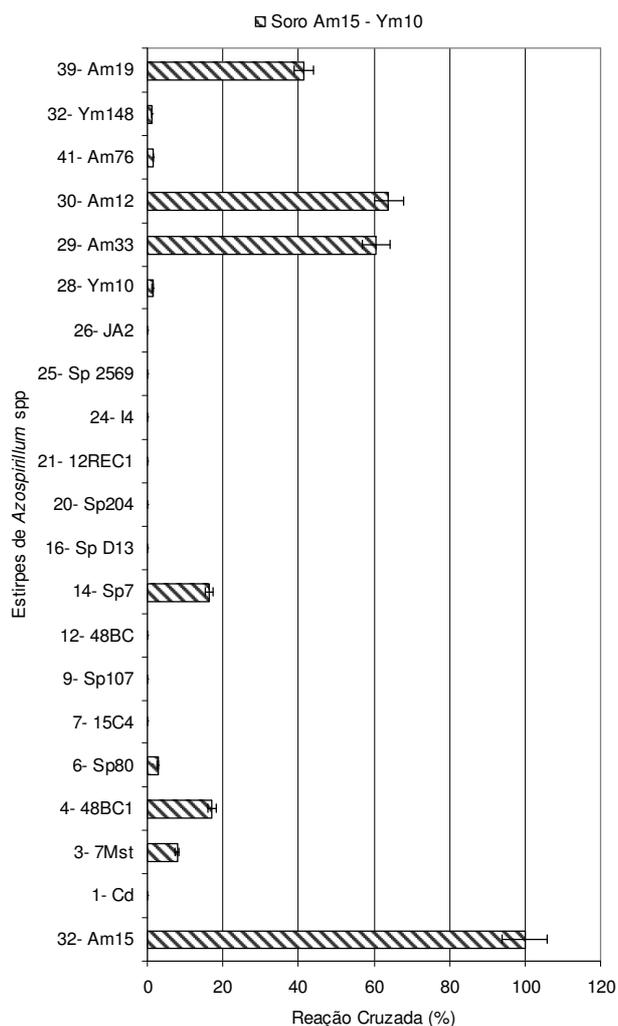
Através da peletização das sementes de milho híbrido SHS 5050 com *A. amazonense* Am15, via inoculante turfoso, após 24 horas, foi possível quantificar a população daquelas, submetidas à inoculação pelos métodos ELISA, NMP e Microcolônias (Figura 8a). Entretanto, ocorreram variações inerentes à faixa de detecção de cada método. Utilizando o teste Elisa indireto, a estirpe Am 15 atingiu  $1 \times 10^8$  células semente<sup>-1</sup>; pelo método NMP, na população da estirpe Am15 houve um declínio de 10 vezes, indo para  $2 \times 10^7$  células semente<sup>-1</sup> e o método das microcolônias, a população Am 15 foi de  $8,5 \times 10^9$  semente<sup>-1</sup>. LI e MACRAE (1992) também obtiveram números pelo método de ELISA superiores ao do NMP. Isto pode estar relacionado à diluição da amostra que não é homogênea. O mesmo pode ocorrer com o método de microcolônia. De acordo com OKON e LABANDERA-GONZALES (1994) na maioria dos casos, a

concentração ótima de células de um inoculante à base de *Azospirillum* é cerca de  $1 \times 10^7$  células semente<sup>-1</sup> ou plântula<sup>-1</sup>.



**Figura 6.** Especificidade dos soros policlonais Anti-Am 15 bruto e purificado em coluna preenchida com proteína A, contra diferentes isolados de *Rhizobium* spp (% reação cruzada comparada a estirpe usada por imunização). Barras de erro indicam o desvio-padrão. Valores médios de três repetições. Legenda: Números antes da identificação das estirpes referem-se à sua posição na tabela 1.

A sobrevivência de *Azospirillum amazonense* inoculado na turfa resultou em baixa viabilidade, mantendo um número satisfatório de células ( $10^8$  células mL<sup>-1</sup>) até 15 dias após a inoculação (Figura 8 b). Esses resultados preliminares sugerem que a sobrevivência de *A. amazonense* foi prejudicada, indicando a necessidade de utilizar condições de crescimento e armazenagem mais eficazes para a manutenção celular neste veículo inoculante. FERREIRA (2004), estudando o efeito da inoculação de estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* ZAE 94, *Azospirillum brasilense* Sp 109 e *Burkholderia* sp nas turfas comerciais provenientes do Brasil e Canadá, verificou maior sobrevivência da estirpe de *Burkholderia* sp, na turfa do Canadá com  $10^8$  células g<sup>-1</sup> do inoculante por um período de armazenamento de 180 dias. FALLIK e OKON (1996) verificaram maior sobrevivência de *A. brasilense* tendo sido inoculado  $1-3 \times 10^{10}$  células mL<sup>-1</sup> em turfa granular e moída e somente a turfa granular conteve  $4 \times 10^6$  células g<sup>-1</sup> durante 168 dias. Essas diferenças de sobrevivência entre as estirpes podem estar relacionadas com variações genéticas (SADOWSKY e GRABAM, 1998).

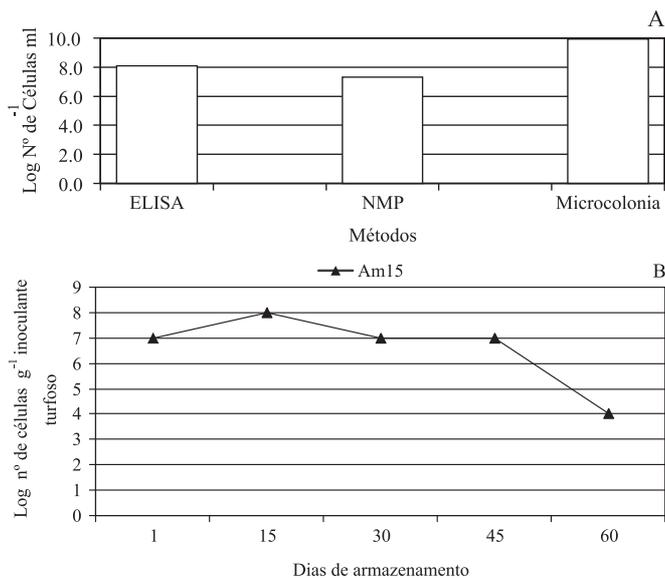


**Figura 7.** Especificidade do soro purificado por imunoadsorção Anti-Am15-Ym10 contra diferentes estirpes de *Azospirillum* spp. usando ELISA indireto (% reação cruzada comparada a estirpe usada por imunização). Barras de erro indicam o desvio-padrão. Legenda: Números antes da identificação das estirpes referem-se à sua posição na tabela 1.

#### 4. CONCLUSÕES

1. O anticorpo policlonal produzido contra a espécie *Azospirillum amazonense* Am15 reconhece apenas estirpes homólogas ao isolado utilizado na imunização, sendo considerado estirpe-específico após purificação por imunoadsorção.

2. A espécie *Azospirillum amazonense*, representada pela estirpe Am 15, é capaz de manter o número de  $10^8$  células  $g^{-1}$  no inoculante turfoso até 15 dias após a inoculação à temperatura de 4 °C.



**Figura 8. a)** Valores populacionais de *A. amazonense* Am15, utilizando as técnicas: ELISA indireto, NMP e Microcolônias, inoculados nas sementes do milho híbrido SHS 5050 após incubação por 24 horas a 30 °C. **b)** Sobrevivência da estirpe Am15 no inoculante turfoso (turfa canadense) durante o período de armazenamento a 4 °C por 60 dias após a inoculação usando o método do NMP. Valores médios de três repetições.

#### AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa de mestrado da primeira autora; ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo CPGA-CS/UFRRJ; à Embrapa-Agrobiologia. Este projeto foi parcialmente financiado pela Embrapa projeto 020251300, Pronex II número 76971051.00 e FAPERJ - Bolsa Cientista do Nosso Estado, da segunda autora.

#### REFERÊNCIAS

- ALVES, J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. *Plant and Soil*, Netherlands, v. 252, p.1-9, 2003.
- ARAÚJO, J.S. de P.; REIS JÚNIOR, F.B. dos; CRUZ, G.B.; OLIVEIRA, B.C. de; ROBBS, C.F.; RIBEIRO, R. de L.D.; POLIDORO, J.C. Produção e caracterização de anticorpos policlonais contra *Xhantomonas campylostris* pv. vitícola. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v.40, n.3, p.305-309, 2005.
- BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S; BALDANI, V.L.D. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (Ed.). *Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*. Viçosa: SBCE; Lavras: UFLA/DCS, 1999. p.621-650.

- BALDANI, V.L.D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* sp. processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização de uma nova bactéria diazotrófica.** 1996. 234p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ, Seropédica. 1996.
- BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.12, p.433-439, 1980.
- BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic and gibberellins A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v.24, p.7-11, 1998.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas.** Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1995. 60 p.
- FALLIK, E.; OKON, Y. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.28, p.123-126, 1996.
- FERREIRA, J.S. **Seleção e avaliação de veículos para a inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do arroz inundado.** Seropédica, RJ, 2004. 44p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ.
- FRED, E.B.E.; WAKSMAN, S.A. **Laboratory manual of general microbiology with special reference to the microorganisms of the soil.** New York: McGraw-Hill, 1928. 144 p.
- HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: A Laboratory Manual.** New York: Cold Spring Harbor, 1988. 726p.
- LI, R.; MACRAE, I.C. Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.24, p. 413-419, 1992.
- LEVANONY, H.; BASHAN, Y. Localization of specific antigens of *Azospirillum brasilense* Cd in its exopolysaccharide by immuno-gold staining. **Current Microbiology**, New York, v.18, p.1-5, 1988.
- LEVANONY, H.; BASHAN, Y.; KAHAMA, Z.E. Enzyme-linked immunosorbent assay for specific identification and enumeration of *Azospirillum brasilense* Cd. in cereal roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, p.358-364, 1986.
- LI, R.; MACRAE, I.C. Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.24, p.413-419, 1992.
- MAGALHÃES, F.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. New acid tolerant *Azospirillum* specie. **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.53, p.471-430, 1983.
- MILES, A.A.; MISRA, S.S. The Estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, London, v.38, p.732-749, 1938.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALES, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.26, p.1591-1601, 1994.
- OLIVARES, F.L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na identificação e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias diazotróficas do gênero *Herbaspirillum*.** 1997. 344p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ, Seropédica, 1997.
- REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.19, p.227-247, 2000.
- REIS, V.M.; CRUZ, G.B.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M.F.; FERREIRA, A.C.; REIS JÚNIOR, F.B.; SALLES, J.F.; WEBER, O.B. **Produção e caracterização de soros policlonais para a detecção de bactérias diazotróficas.** Seropédica, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1997. 11p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 30)
- REIS JÚNIOR, F.B.; SILVA, M.F.; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em difentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.28, p.103-113, 2004.
- SADOWSKY, M.J.; GRABAM, P.H. Soil biology of the rhizobiaceae. In: SPINIK, H.P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P.J.J. (Ed.). **The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria.** Dordrecht: Kluwer, 1998. p.155-172.
- SCHLOTTER, M.; ABMUS, B.; HARTMANN, A. the use of immunological methods to detect and identify bacteria in the environment. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.13, p.75-90, 1995.